

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 124**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2012 PCT/NL2012/050011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12096573**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2012 E 12703604 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2663641**

54 Título: **miARN para el tratamiento de enfermedades y condiciones asociadas con la neoangiogénesis**

30 Prioridad:

11.01.2011 EP 11150645
11.01.2011 US 201161431656 P
11.01.2011 US 201161431667 P
10.08.2011 US 201161521917 P
10.08.2011 US 201161521931 P
11.08.2011 US 201161522346 P
29.09.2011 US 201161540640 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.06.2018

73 Titular/es:

INTERNA TECHNOLOGIES B.V. (100.0%)
Jonkerbosplein 52
6534 AB Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

WEIJZEN, SANNE;
SCHAAPVELD, ROELAND QUIRINUS JOZEF;
BOURAJJAJ, MERIEM;
VAN HAASSTERT, RICK JAN;
GRIFFIOEN, ARJAN WILLEM;
VAN BEIJNUM, JUDITH ROSINA;
CUPPEN, EDWIN PIETER JOHAN GERARD;
BEREZIKOV, EUGENE;
VAN PUIJENBROEK, ANDREAS ALPHONS
FRANCISCUSLUDOVICUS;
GOMMANS, WILLEMIJN MARIA;
BABAE, NEGAR y
VAN NOORT, PETRONELLA INNOCENTIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 672 124 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

miARN para el tratamiento de enfermedades y condiciones asociadas con la neoangiogénesis

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a un uso diagnóstico de una molécula de miARN, mimético, isomiR o fuente de la misma y a un uso terapéutico de dicha molécula de miARN, dicho mimético, dicho isomiR o dicha fuente de la misma en el tratamiento de la neoangiogénesis.

10

Antecedentes de la invención

[0002] La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos microvasos fuera de los capilares preexistentes. Se puede distinguir de la vasculogénesis, que se refiere a la neovascularización durante el crecimiento embrionario donde también se forman vasos más grandes y donde participan células progenitoras endoteliales (EPC). Sin embargo, existen pruebas de que las EPC también pueden desempeñar un papel (menor) en la angiogénesis tumoral. También se puede distinguir de la arteriogénesis, que implica principalmente la maduración y el crecimiento de vasos sanguíneos colaterales (Asahara S. *et al* 1999, Carmeliet P. 2000, y Helisch A. *et al* 2003). La angiogénesis es el mecanismo principal mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos durante procesos fisiológicos como la cicatrización de una herida, la inflamación y el ciclo reproductivo femenino. Además, la angiogénesis está implicada en varios trastornos, entre los que se incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, la artritis reumatoide, la endometriosis y el cáncer (Carmeliet P. *et al* 2005 y Griffioen A. W. *et al* 2000). Hace un siglo, se observó que la angiogénesis ocurre alrededor de tumores y la investigación adicional llevó a la hipótesis de que los tumores producen factores proangiogénesis para estimular la neovascularización (Carmeliet P. *et al* 2000, Folkman J. *et al* 1971). La hipótesis de la importancia de la angiogénesis en el crecimiento tumoral se planteó inicialmente en 1971, cuando Judah Folkman teorizó que los tumores sólidos poseen recursos limitados por los que luchan muchas células cancerosas que proliferan activamente. Desde entonces, la investigación de la angiogénesis tumoral se ha centrado en la comprensión y la interferencia con los procesos por los que las células tumorales promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Folkman J. *et al* 2007, y Ribatti D. *et al* 2000). El proceso de angiogénesis tumoral se activa principalmente cuando una masa tumoral en crecimiento sobrepasa el volumen máximo que se puede mantener por la difusión de oxígeno y nutrientes (Carmeliet P. 2000). El ambiente hipóxico provocará que las células tumorales se sometan a un interruptor angiogénico que lleva a la producción aumentada de proteínas proangiogénesis como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Folkman J. *et al* 1995, Folkman J. *et al* 2002, y Hanahan D. *et al* 1996). Estas proteínas proangiogénicas activan células endoteliales en vasos cercanos. Al mismo tiempo, una actividad aumentada de diferentes enzimas proteolíticas produce degradación de la membrana basal y desprendimiento de contactos de célula-célula, lo que facilita la migración e invasión de EC (células endoteliales) en la matriz circundante y hacia el tumor (Carmeliet P. 2000, y Griffioen A.W. *et al* 2000). La escisión proteolítica de la matriz extracelular también permite la migración de las células endoteliales activadas hacia señales quimiotácticas que se originan desde el tejido tumoral. Estas señales son detectadas por las células endoteliales y la posterior migración y proliferación de células endoteliales produce la formación de estructuras de tipo vaso (Adams H.R. *et al* 2007, y Carmeliet P. 2000). A pesar de su estructura irregular y desorganizada, esta red es capaz de proporcionar a la masa tumoral en crecimiento todos los metabolitos requeridos. Además, el lecho vascular proporciona a las células tumorales la oportunidad de entrar en la circulación y formar metástasis a distancia (Folkman J. *et al*, 2002). Mientras que diferentes tipos de célula contribuyen a la neovascularización, se reconoce generalmente que la célula endotelial es el elemento clave en el proceso de angiogénesis. En respuesta a los diferentes activadores, estas células muestran una variedad de funciones, que incluyen la remodelación, la proliferación y la migración de la matriz extracelular. Todas estas funciones requieren la expresión de moléculas específicas y la ejecución apropiada de este proceso complejo se basa en la flexibilidad de las células endoteliales para ajustar fácilmente el transcriptoma y el proteoma para cumplir las peticiones funcionales. Además de los mecanismos más tradicionales, como la regulación de la actividad promotora del gen y la rotación de la proteína alterada, ahora se ha vuelto evidente que las células también usan pequeñas moléculas de ARN no codificante para gobernar la expresión génica. Una clase de estas moléculas de ARN, microARN (miARN), actúa como interruptores moleculares que pueden redirigir el perfil de expresión de una célula. Están aumentando los indicios de que estos miARN realizan un papel importante en la regulación de la expresión génica endotelial durante la angiogénesis tumoral (Heusschen R, *et al* 2010).

[0003] Muchos miARN muestran modelos de expresión específicos de órgano que sugieren las funciones específicas del tipo de célula (Chen C.Z. *et al* 2004, Poy M.N. *et al* 2004, y van Rooij E. *et al* 2007). En consecuencia, la desregulación de la expresión y la función del miARN puede llevar a enfermedades humanas (Chang T.C. *et al* 2007). El primer análisis a gran escala de expresión de miARN en células endoteliales (EC) se efectuó en HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) e identificó 15 miARN altamente expresados con receptores de factores angiogénicos (por ejemplo, Flt-1, Nrp-2, Fgf-R, c-Met y c-kit) como objetivos de ARNm putativo, según algoritmos de predicción (Polisenol L. *et al* 2006). Estudios adicionales también perfilaron la expresión de miARN en EC (Kuehbach A. *et al* 2007, y Suarez Y. *et al* 2007). Los miARN altamente

expresados que fueron comunes en al menos 2 de los 3 estudios incluían miARN-15b, -16, -20, -21, -23a, -23b, -24, -29a y -b, -31, -99a, -100, -103, -106, -125a, -125b, -126, -130a, -181a, -191, -221, -222, -320, let-7, let-7b, let-7c y let-7d (Kuehbach A. *et al* 2007, Polisenol L. *et al* 2006, y Suarez Y. *et al* 2007). Sin embargo, sus objetivos y funciones específicos en EC relacionadas con la angiogénesis solo se han caracterizado para unos pocos de ellos.

[0004] Un estudio mostró que la transfección de HUVEC con miARN-221/222 inhibe la formación de tubos, la migración y la cicatrización de una herida en respuesta al factor de célula madre (Polisenol L. *et al* 2006). Este y otros estudios sugieren una acción antiangiogénica para estos miARN y pueden ser una herramienta potencial para bloquear la angiogénesis. Sin embargo, resulta importante indicar que miR221/222 puede también promover la proliferación de células cancerosas a través de la regulación del supresor tumoral p27(Kip1) (Le Sage C. *et al* 2007), lo que indica que la regulación de la proliferación por estos miARN parece específica del tipo de célula. Por lo tanto, la fijación de objetivos específicos celulares con miARN es un área importante de investigación que se ha de desarrollar.

[0005] Se ha demostrado que otros miARN expresados en EC, let-7f y miARN-27b, ejercen efectos proangiogénicos, como se revela por el bloqueo de la angiogénesis *in vitro* con inhibidores de 2'-O-metil oligonucleótidos (Kuehbach A. *et al* 2007), aunque sus objetivos en las EC todavía no se hayan caracterizado.

[0006] El miARN específico de EC mejor caracterizado es el miARN-126 (Fish J.E. *et al* 2008, Harris T.A. *et al* 2008, y Wang S. *et al* 2008). Promueve el factor de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular/factor de crecimiento de fibroblastos VEGF/FGF), la señalización, la angiogénesis y la integridad vascular mediante la inhibición de represores endógenos de factores de crecimiento dentro de las EC (Fish J.E. *et al* 2008, y Wang S. *et al* 2008). Estas conclusiones ilustran que un único miARN puede regular la integridad vascular y la angiogénesis, lo que proporciona un nuevo objetivo para terapias proangiogénicas o antiangiogénicas.

[0007] Un estudio muy reciente (Anand S. *et al* 2010) concluye que el miARN-132 actúa como un interruptor angiogénico mediante la supresión de la expresión de p120RasGAP endotelial (proteína de activación de GTPasa p120Ras), lo que lleva a la activación de Ras y a la inducción de la neovascularización, mientras que la aplicación de anti miARN-132 inhibe la neovascularización manteniendo los vasos en el estado de reposo.

[0008] Los siguientes documentos también revelan el papel de algunos microARN en el desarrollo de la angiogénesis y el tumor: Wu *et al.* (2009), Wang y Olson (2009), Urbich *et al.* (2008), Kuehbach *et al.* (2008), Suarez y Sessa (2009), Ma *et al.* (2010), Liqin *et al.* (2010), Würdingen *et al.* (2009), Nakashima *et al.* (2010), WO2008/014008. Adicionalmente, diversos otros hallazgos que no se describen en este documento proporcionan la demostración del concepto de los miARN como una modalidad terapéutica antiangiogénica potente y altamente específica.

[0009] Hay actualmente diversos compuestos angioestáticos en el mercado y muchos están en la fase media o final de análisis clínico. Desde hace aproximadamente 5 años, se ha aprobado medicación basada en antiangiogénesis (por ejemplo, Avastin) para la clínica. Más recientemente, se usan RTKI (inhibidor de tirosina quinasa receptora) de molécula pequeña, por ejemplo, Sunitinib. Sin embargo, por su naturaleza -teniendo como objetivo esencialmente procesos conducidos por tumor-, evocan resistencia clínica. Aunque hay definitivamente alguna prolongación de la supervivencia en cohortes de pacientes para algunos tipos de cáncer, el beneficio se puede considerar moderado. Además del tratamiento contra el cáncer, tres terapias antiangiogénesis se usan actualmente para el tratamiento de pacientes con enfermedades oculares tales como la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD): pegaptanib (Macugen, Pfizer), ranibizumab (Lucentis, Novartis) y bevacizumab (Avastin, Roche). Aquí también, aunque hay definitivamente alguna mejora de agudeza visual, el beneficio sigue siendo considerado como limitado.

[0010] Por lo tanto, hay una clara necesidad de mejores marcadores de diagnóstico para la neoangiogénesis, al igual que mejores estrategias de inhibición terapéutica de la angiogénesis.

Descripción de la invención

[0011] La invención abarca diferentes usos de una molécula de miARN, mimético, isomiR o antagomir o fuente de la misma como se identifica en este documento. En un primer aspecto, se proporciona una molécula de miARN-7, un mimético, un isomiR, o una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-7, dicho mimético, dicho isomiR o dicha fuente de la misma para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis.

[0012] Como parte de la divulgación, se proporciona una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, un equivalente, mimético, isomiR o una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, dicho equivalente o dicha fuente de la misma, preferiblemente para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis o una enfermedad o una condición asociada con la

neoangiogénesis. Los microARN (miARN) son pequeños ARN de 17-25 nucleótidos que funcionan como reguladores de la expresión génica en eucariotas. Los miARN se expresan inicialmente en el núcleo como parte de largas transcripciones primarias llamadas miARN primarios (pri-miARN). Dentro del núcleo, los pri-miARN se digieren parcialmente por la enzima Drosha para formar miARN precursores de horquilla de 65-120 nucleótidos de largo (pre-miARN) que se exportan al citoplasma para procesamiento adicional por Dicer en miARN maduros más cortos, que son las moléculas activas. En animales, estos ARN cortos comprenden una región "semilla" proximal 5' (nucleótidos 2 a 8) que parece ser el principal determinante de la especificidad de apareamiento del miARN a la región sin traducir 3' (3'-UTR) de un ARNm objetivo. Una explicación más detallada se da en la parte dedicada a las definiciones generales.

[0013] Cada una de las definiciones dadas a continuación sobre una molécula de miARN, un equivalente de miARN, un mimético de miARN o un isomiR de miARN, o un mimético o un isomiR o una fuente de miARN se debe usar para cada uno de los miARN o equivalentes de miARN o fuentes de miARN identificados de esta solicitud: miARN-574, miARN-7, miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145, let7a1, miARN-190b, miARN-142, miARN-9 y fuentes de los mismos. Las secuencias maduras o miméticas preferidas (identificadas en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 22-52), secuencias semilla (identificadas en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381), secuencias de isomiR (identificadas en la tabla 7 como SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396) o secuencias de fuente (identificadas en la tabla 4 (precursor de ARN como SEQ ID N.º: 1-21) o 6 (ADN que codifica un precursor de ARN como SEQ ID N.º: 53-60)) de dicha molécula de miARN o equivalente de la misma respectivamente se identifican en las tablas correspondientes.

En todo el texto de la solicitud, a menos que se indique lo contrario, un miARN también se puede llamar una molécula de miARN, un miR, o un equivalente de la misma o una fuente o un precursor de la misma. Un equivalente preferido es un isomiR o un mimético. Cada secuencia identificada en este documento se puede identificar como SEQ ID N.º como se usa en el texto de la solicitud o como la correspondiente SEQ ID N.º en el listado de secuencias.

[0014] También se hace referencia a miARN-132, miARN-126 y miARN-21 en la presente invención. Son las únicas moléculas de miARN de esta invención cuya expresión no se debe regular en sentido ascendente/sobreexpresar/aumentar y/o cuya actividad no se debe aumentar para usarse en aplicaciones terapéuticas identificadas en este documento. En cambio, la expresión endógena de estas moléculas de miARN necesita ser regulada en sentido descendente/disminuida y/o una actividad de tal molécula de miARN necesita ser disminuida o reducida o inhibida para obtener un efecto terapéuticamente deseable. Esto se realiza preferiblemente como se explica más tarde en este documento utilizando un antagomir. Por lo tanto, en la invención, cuando se hace referencia a cualquiera de estas moléculas de miARN en un uso terapéutico, uno siempre se refiere a un uso de un antagomir de una molécula de miARN-132, miARN-126 o miARN-21 o una fuente de un antagomir de estos miARN. Por consiguiente, cuando uno se refiere a un antagomir, uno siempre se refiere a un uso de un antagomir de una molécula de miARN-132, miARN-126 y miARN-21. Cada una de las definiciones dadas en este documento sobre una molécula de miARN o un equivalente de miARN o una fuente de miARN también se puede aplicar a cualquiera de las moléculas de miARN que se vaya a usar como un antagomir según se identifica en este párrafo. Cada definición dada en este documento sobre un antagomir determinado de una molécula de miARN también se aplica a otro antagomir de una molécula de miARN diferente, cada una como se define en este documento.

[0015] En el contexto de la invención, una molécula de miARN o un equivalente o un mimético o un antagomir o un isomiR de la misma puede ser un miARN sintético o natural o recombinante o maduro o parte de un miARN maduro o un miARN humano o derivado a partir de un miARN humano como se define adicionalmente en la parte dedicada a las definiciones generales. Una molécula de miARN humano es una molécula de miARN que se encuentra en una célula, tejido, órgano o fluido biológico humano (es decir, molécula de miARN humano endógena). Una molécula de miARN humano también puede ser una molécula de miARN humano derivada a partir de una molécula de miARN humano endógena por sustitución, delección y/o adición de un nucleótido. Una molécula de miARN o un equivalente o un mimético o un antagomir de la misma puede ser una molécula de ARN monocatenario o bicatenario.

[0016] Preferiblemente una molécula de miARN o un equivalente, o un mimético de la misma tiene una longitud de 6 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 15 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. Preferiblemente un antagomir de una molécula de miARN tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0017] En una forma de realización preferida, una molécula de miARN-7 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla de dicha molécula de miARN o mimético o isomiR de la misma (las tablas 5 y 7 muestran la secuencia semilla preferida de cada una de las moléculas de miARN identificadas en este documento como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381).

Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de miARN o un mimético o isomiR de la misma tiene una longitud de 6 a 30 nucleótidos y más preferiblemente comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla de dicha molécula de miARN. Aún más preferiblemente una molécula de miARN o un mimético o isomiR de la misma tiene una longitud de 15 a 28 nucleótidos y más preferiblemente comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla, aún más preferiblemente una molécula de miARN tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0018] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-574 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 353, 354, 78, 79, 80, 82, 83 y/o 84 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0019] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-7 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 348, 349, 350, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73 y/o 74 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0020] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-190b o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 374 y/o 96 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0021] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-142 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 375, 376, 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 y/o 110 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0022] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 377, 378, 114, 115, 379, 380 y/o 381 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0023] En una forma de realización más preferida, una molécula de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma se identifica como una molécula de miARN-9* o mimético o isomiR de la misma y comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 378, 114 y/o 115 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0024] En otra forma de realización preferida, una molécula de miARN o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en una secuencia semilla dada identificada en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381 y tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera identificada en la tabla 5 (la tabla 5 muestra secuencias maduras o miméticas preferidas de cada uno de los miARN identificadas en este documento como SEQ ID N.º: 22-52). Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

[0025] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-574 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 353, 354, 78, 79, 80, 82, 83 y/o 84 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 27, 28, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 y/o 205.

[0026] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-7 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 348, 349, 350, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73 y/o 74 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 22, 23, 24, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176 y/o 177.

[0027] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-190b o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 374 y/o 96 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 48, 234, 235, 236, 237, 238, 239 y/o 240.

- [0028] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-142 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 375, 376, 97, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 y/o 110 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 49, 50, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288 y/o 289.
- [0029] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 377, 378, 114, 115, 379, 380 y/o 381 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 51, 52, 290, 291, 291, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395 y/o 396.
- [0030] En una forma de realización más preferida, una molécula de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma se identifica como una molécula de miARN-9* o mimético o isomiR de la misma y comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 378, 114 y/o 115 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 52, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303 y/o 304.
- [0031] Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de miARN o un mimético o un isomiR de la misma tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más, comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en una secuencia semilla determinada identificada en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381 y tiene al menos 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera identificada en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 22-52. Preferiblemente, la identidad es al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- [0032] Alternativamente, preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de miARN o un mimético o un isomiR de la misma tiene una longitud de no más de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos, comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en una secuencia semilla determinada identificada en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381 y tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera identificada en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 22-52. Preferiblemente, la identidad es al menos del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.
- [0033] En otra forma de realización preferida, un isomiR de una molécula de miARN tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia de isomiR entera (la tabla 7 muestra el isomiR preferido de cada uno de los miARN maduros identificados como SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396. Preferiblemente, la identidad es al menos del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más alta. Preferiblemente en esta forma de realización, un isomiR de una molécula de miARN o un mimético de la misma tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.
- [0034] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-574 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 353, 354, 78, 79, 80, 82, 83 y/o 84 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 27, 28, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204 y/o 205 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.
- [0035] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-7 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 348, 349, 350, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73 y/o 74 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 22, 23, 24, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176 y/o 177 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.
- [0036] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-190b o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 374 y/o 96 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 48, 234, 235, 236, 237, 238, 239 y/o 240 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.
- [0037] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-142 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 375, 376, 97, 99,

100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109 y/o 110 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 49, 50, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288 y/o 289 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

[0038] Por consiguiente, una molécula preferida de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 377, 378, 114, 115, 379, 380 y/o 381, tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 51, 52, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395 y/o 396 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

[0039] En una forma de realización más preferida, una molécula de miARN-9 o mimético o isomiR de la misma se identifica como una molécula de miARN-9* o mimético o isomiR de la misma y comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 378, 114 y/o 115 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad sobre la SEQ ID N.º: 52, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303 y/o 304 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

[0040] Otra molécula de miARN preferida o mimético o un isomiR de la misma tiene al menos el 60 % de identidad con una secuencia semilla (identificada en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381 o con una secuencia madura (identificada en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 22-52 o con una secuencia del precursor (identificada en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 1-21 o con un ADN que codifica un precursor de ARN (identificado en la tabla 6 como SEQ ID N.º: 53-60 o con una secuencia de isomiR (identificada en la tabla 7 como SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396. La identidad puede ser al menos del 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %. La identidad se evalúa preferiblemente en la totalidad de SEQ ID N.º identificadas en una tabla. Sin embargo, la identidad también se puede evaluar en parte de una SEQ ID N.º determinada. Parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la SEQ ID N.º, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0041] Un equivalente de una molécula de miARN puede ser un isomiR o un mimético. Una secuencia del precursor puede dar como resultado más de una secuencia de isomiR dependiendo del proceso de maduración (véase, por ejemplo, miARN-26b, miARN-132, miARN-126 o miARN-142, donde algunos isomiR múltiples de tejidos se han identificado (tabla 7). Un mimético es una molécula que tiene una actividad similar o idéntica con una molécula de miARN. En este contexto, a una actividad similar se le da el mismo significado que a un nivel aceptable de una actividad. Un mimético es, en una determinación funcional, opuesto a un antagomir. Un antagomir de una molécula de miARN o equivalente o fuente de la misma es, por lo tanto, una molécula que tiene una actividad que es opuesta o inversa a la de la molécula de miARN correspondiente de la que se deriva. Un antagomir de una molécula de miARN o equivalente de la misma también se puede definir como una molécula que es capaz de oponerse a o silenciar o reducir una actividad de dicha molécula de miARN o equivalente de la misma. Una actividad que es opuesta o inversa a la de la molécula de miARN correspondiente de la que se deriva o una actividad que es capaz de oponerse a una actividad de dicha molécula de miARN de la que se deriva es preferiblemente una actividad que es capaz de reducir una actividad de dicha molécula de miARN, equivalente o fuente de la misma. En este contexto, reducir significa una reducción de al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad de dicha molécula de miARN o equivalente o fuente de la misma.

[0042] Un antagomir de una molécula de miARN o fuente de la misma puede ser un ácido nucleico, preferiblemente un ARN que es complementario a una parte de la molécula de miARN correspondiente del mismo. Los antagomir preferidos son complementarios a una parte de secuencias de miARN maduros o isomiR identificadas en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 22-52 o en la tabla 7 como SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396. Una parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la SEQ ID N.º, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %. En una forma de realización preferida, un antagomir es complementario a una secuencia semilla o una parte de dicha secuencia semilla de una molécula de miARN. Una parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la secuencia semilla, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0043] Preferiblemente, un antagomir tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más y es complementaria a una parte de las secuencias de miARN maduros o isomiR identificadas en la tabla 5 (como SEQ ID N.º: 22-52) o en la tabla 7 (como SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396). Una

parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de una secuencia determinada, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0044] Preferiblemente, un antagomir tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más y es complementaria a una parte de una secuencia semilla (identificada en las tablas 5 y 7 como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381). Una parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la secuencia semilla, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0045] Preferiblemente un antagomir tiene al menos el 60 % de identidad con una secuencia de antagomir (identificada en la tabla 8 como SEQ ID N.º: 305-310). La identidad puede ser al menos del 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %. La identidad se evalúa preferiblemente en la totalidad de SEQ ID N.º identificadas en la tabla 8. Sin embargo, la identidad también se puede evaluar en una parte de una SEQ ID N.º determinada. Una parte puede significar al menos el 50 % de la longitud del SEQ ID N.º, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0046] Preferiblemente, un antagomir tiene una longitud de 8 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más y tiene al menos el 60 % de identidad con una secuencia de antagomir (identificada en la tabla 8 como SEQ ID N.º: 305-310). La identidad puede ser al menos del 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %. La identidad se evalúa preferiblemente en la totalidad de SEQ ID N.º identificadas en la tabla 8. Sin embargo, la identidad también se puede evaluar en una parte de una SEQ ID N.º determinada. Una parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la SEQ ID N.º, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

[0047] La estructura química de los nucleótidos de un antagomir de una molécula de miARN o fuente de la misma se puede modificar para aumentar la estabilidad, la afinidad de enlace y/o la especificidad. Dicho antagomir puede comprender o consistir en una molécula de ARN o preferiblemente una molécula de ARN modificado. Una molécula de ARN modificado preferida comprende un azúcar modificado. Un ejemplo de tal modificación es la introducción de un grupo 2'-O-metilo o grupo 2'-O-metoxietilo o grupo 2' fluoruro en el ácido nucleico para mejorar la resistencia a nucleasa y la afinidad de enlace a ARN. Otro ejemplo de tal modificación es la introducción de un puente de metileno que conecte el átomo 2'-O y el átomo 4'-C del ácido nucleico para bloquear la conformación (ácido nucleico bloqueado (LNA)) para mejorar la afinidad al ARN monocatenario complementario. Un tercer ejemplo es la introducción de un grupo fosforotioato como enlazador entre ácido nucleico en la cadena de ARN para mejorar la estabilidad ante un ataque de nucleasa. Una cuarta modificación es la conjugación de una fracción lipofílica en el extremo 3' de la molécula, tal como colesterol, para mejorar la estabilidad y la administración celular. En una forma de realización preferida, un antagomir de la molécula de miARN consiste en un oligonucleótido fosforotioato completamente modificado con LNA, denominado LNA diminuto como se describe en Obad *et al.* Un antagomir tal y como se define en este documento puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más modificaciones de azúcar. También se incluye en la invención la introducción de más de una modificación de azúcar diferente en un antagomir.

[0048] Cada una de las moléculas de miARN o miméticos o isomiR de las mismas identificadas en este documento tiene un nivel aceptable de una actividad de un miARN determinado del que se derivan. Un nivel aceptable de una actividad es preferiblemente que dicho miARN o mimético o isomiR de la misma sigue siendo capaz de mostrar un nivel aceptable de dicha actividad de dicho miARN. Una actividad de un miARN determinado es, por ejemplo, la capacidad de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción de la neoangiogénesis como se define posteriormente en este documento. Un nivel aceptable de una actividad es preferiblemente al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad del miARN del que se derivan.

[0049] Una actividad preferida de cualquiera de la molécula de miARN o el isomiR o el mimético de la misma como se identifica en este documento (es decir, miARN-574, miARN-7, miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145, let7a1, miARN-190b, miARN-142, miARN-9) es mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción de la neoangiogénesis en un sujeto como se define posteriormente en este documento.

[0050] Una actividad preferida de cualquiera del antagomir de la molécula de miARN o de la fuente de la misma como se identifica en este documento (es decir antagomir de miARN-132, miARN-126 y miARN-21) es mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción de la neoangiogénesis en un sujeto como se define posteriormente en este documento.

[0051] Una fuente de una molécula de miARN o una fuente de un mimético o isomiR puede ser cualquier molécula que sea capaz de inducir la producción de una molécula de miARN o de un mimético o isomiR como se identifica en este documento y que comprenda una estructura de tipo horquilla y/o una molécula de ácido

nucleico bicatenario. La presencia de una estructura de tipo horquilla se puede evaluar utilizando el programa RNashapes (Steffen P. *et al* 2006) usando ventanas deslizantes de 80, 100 y 120 nt o más. La estructura de tipo horquilla está normalmente presente en una fuente natural o endógena de una molécula de miARN mientras que una molécula de ácido nucleico bicatenario está normalmente presente en una fuente recombinante o sintética de una molécula de miARN. Una fuente de un antagomir de una molécula de miARN puede ser cualquier molécula que sea capaz de inducir la producción de dicho antagomir.

[0052] Una fuente de una molécula de miARN o de un mimético o un isomiR o un antagomir de la misma puede ser un ARN monocatenario, un ARN bicatenario o un ARN parcialmente bicatenario o puede comprender tres cadenas, un ejemplo del cual se describe en WO2008/10558. Como se utiliza en este documento, parcialmente bicatenario se refiere a estructuras bicatenarias que también comprenden estructuras monocatenarias en el extremo 5' y/o 3'. Puede ocurrir cuando cada cadena de una molécula de miARN no tiene la misma longitud. En general, tal molécula de miARN parcialmente bicatenaria puede tener menos del 75 % de estructura bicatenaria y más del 25 % de estructura monocatenaria, o menos del 50 % de estructura bicatenaria y más del 50 % de estructura monocatenaria, o más preferiblemente menos del 25 %, 20 % o 15 % de estructura bicatenaria y más del 75 %, 80 %, 85 % de estructura monocatenaria.

[0053] Alternativamente, una fuente de una molécula de miARN o de un mimético o un isomiR de la misma es una molécula de ADN que codifica un precursor de una molécula de miARN o de un mimético o un isomiR de la misma. Las moléculas de ADN preferidas en este contexto se identifican en la tabla 6 como SEQ ID N.º: 53-60. La invención incluye el uso de una molécula de ADN que codifica un precursor de una molécula de miARN que tiene al menos el 70 % de identidad con dicha secuencia como se identifica en la tabla 6. Preferiblemente, la identidad es al menos del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de ADN tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más y tiene al menos el 70 % de identidad con una secuencia de ADN identificada en la tabla 6 como SEQ ID N.º: 53-60.

[0054] La inducción de la producción de una molécula de miARN determinada o de un mimético o un isomiR o de un antagomir de la misma se obtiene preferiblemente cuando dicha fuente se introduce en una célula usando un ensayo como se define a continuación. Las células incluidas por la presente invención se definen más adelante.

[0055] Una fuente preferida de una molécula de miARN o de un mimético o un isomiR de la misma es un precursor de la misma, más preferiblemente un ácido nucleico que codifica dicha molécula de miARN o de un mimético o un isomiR de la misma. Un precursor preferido es un precursor de origen natural. Un precursor puede ser un precursor sintético o recombinante.

[0056] Un precursor preferido de una molécula de miARN determinada se identifica en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 1-21. La invención incluye el uso de un precursor de una molécula de miARN que tiene al menos el 70 % de identidad con dicha secuencia. Preferiblemente, la identidad es al menos del 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de ADN tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más y tiene al menos el 70 % de identidad con una secuencia identificada en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 1-21.

[0057] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-574 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 5 y/o 55 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0058] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-7 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 1, 2, 3 y/o 53 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0059] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-190b tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 17 y/o 58 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0060] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-142 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 18 y/o 59 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0061] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-9 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 19, 20, 21 y/o 60 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0062] En este contexto, se indica que diferentes precursores de una molécula de miARN maduro determinada pueden llevar a una molécula de miARN idéntica. Por ejemplo, miARN-7 se puede originar a partir del precursor miARN-7-1, miARN7-2 o miARN-7-3 (preferiblemente identificados como SEQ ID N.º: 1, 2 o 3). En una forma de

realización preferida, un miARN-7-3 o una molécula con al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con miARN-7-3 o la SEQ ID N.º: 3 se usa como un precursor de una molécula de miARN-7. Las fuentes o precursores preferidos se definen en este documento más adelante. Una fuente preferida incluye o comprende un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico, es decir ADN que codifica dicho precursor de dicho miARN, más preferiblemente dicho constructo de expresión es un vector de terapia génica viral seleccionado de vectores de terapia génica basados en un adenovirus, un virus adeno-asociado (AAV), un virus herpes, un virus pox y un retrovirus. Un vector de terapia génica viral preferido es un vector AAV o lentiviral. Otros vectores preferidos son vectores virales oncolíticos. Tales vectores se describen con más detalle en este documento a continuación. Alternativamente, una fuente puede ser una molécula de miARN sintético o un mimético químico como se define con más detalle en la parte dedicada a las definiciones generales.

[0063] La detección de la presencia de una molécula de miARN o de un mimético o un isomiR o la presencia de un antagomir de una molécula de miARN se puede realizar utilizando cualquier técnica conocida para la persona experta.

La evaluación del nivel de expresión o de la presencia de tal molécula se realiza preferiblemente utilizando técnicas de biología molecular tradicionales tales como qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), micromatrices, matrices de esferas, análisis de protección de RNAsa o análisis de transferencia de Northern o clonación y secuenciación. La persona experta entenderá que, alternativamente o en combinación con la cuantificación de una molécula de miARN, la cuantificación de un sustrato de una molécula de miARN correspondiente de cualquier compuesto conocido por estar asociado con una función de dicha molécula de miARN o la cuantificación de una función o actividad de dicha molécula de miARN utilizando un ensayo específico se incluyen dentro del campo de la invención. Lo mismo se aplica a un antagomir de una molécula de miARN.

[0064] Las composiciones y formulaciones preferidas se definen todas más adelante en este documento. Una molécula de miARN o un mimético o un isomiR o un antagomir de la misma se puede utilizar como tal como una molécula desnuda, con o sin modificaciones de sustancias químicas, o encapsulada en una partícula o conjugada a una fracción. Una composición preferida comprende una molécula de miARN o un mimético o un isomiR o un antagomir de la misma encapsulada en una nanopartícula o una estructura liposómica. Una molécula de miARN o un mimético o un isomiR o un antagomir de la misma puede ser un híbrido de aptámero-miARN. Un aptámero-miARN se define como un miARN enlazado a un ARN (o ADN) oligonucleótido, donde el último adopta una conformación que dirige la molécula híbrida de aptámero-miARN a una proteína de la superficie de la célula (por ejemplo, péptido de RGD cíclico (péptido de arginina(R)-glicina(G)-ácido aspártico (D) cíclico). El miARN etiquetado con aptámero se puede enlazar a, por ejemplo, polietilenglicol, lo que aumenta la vida media circulante de la quimera (Dassie, J.P., *et al.* 2009).

[0065] Una actividad de un miARN determinado o un mimético, isomiR o una fuente correspondiente del mismo o una actividad de un antagomir determinado de una molécula de miARN o una fuente correspondiente de la misma todos tal y como se definen en este documento es preferiblemente la capacidad de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción de la neoangiogénesis. En el contexto de la invención, una actividad antiangiogénica puede comprender o comprende al menos uno de los siguientes:

- Disminución o reducción de la neoangiogénesis,
- Normalización de vasos y
- Reducir el número de vasos en el área patológica.

Exhibir tal actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir tal disminución o reducción de la neoangiogénesis es crucial en la presente invención con el objetivo de ser capaz de prevenir, retrasar, curar y/o tratar la neoangiogénesis. Cualquier enfermedad o condición donde la neoangiogénesis esté implicada o asociada, se puede prevenir, retrasar, curar y/o tratar con una molécula tal y como se define en este documento. En una enfermedad o condición de la invención, la neoangiogénesis puede ser detectable antes de la aparición de la enfermedad o condición, es decir, antes de la aparición de un síntoma de dicha enfermedad o condición. Además, se incluye en la presente invención que la neoangiogénesis es detectable durante el desarrollo de dicha enfermedad o condición, es decir, después de la aparición de un síntoma de dicha enfermedad o condición.

La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos microvasos fuera de los capilares preexistentes. Se puede distinguir de la vasculogénesis, que se refiere a la neovascularización durante el crecimiento embrionario donde también se forman vasos más grandes y donde participan células EPC. Sin embargo, existen indicios de que las EPC también pueden desempeñar un papel en la angiogénesis tumoral. También se puede distinguir de la arteriogénesis, que implica principalmente la maduración y el crecimiento de vasos sanguíneos colaterales (Asahara S. *et al* 1999, Carmeliet P. 2000, y Helisch A. *et al* 2003). La angiogénesis es el mecanismo principal mediante el que se forman nuevos vasos sanguíneos durante procesos fisiológicos como la cicatrización de una herida, la inflamación y el ciclo reproductivo femenino. En el contexto de la invención, la neoangiogénesis se define como angiogénesis cuando se implica en una enfermedad o condición que no es fisiológica o es patológica.

[0066] La neoangiogénesis se puede detectar utilizando cualquier técnica conocida para la persona experta.

[0067] La neoangiogénesis se puede evaluar *in situ* en un paciente o en un tumor mediante técnicas no invasivas tales como PET (tomografía de emisión de positrones), MRI (formación de imágenes por resonancia magnética) (contraste dinámico mejorado, DCE-MRI) o formación de imágenes CT (tomografía informática). Estas técnicas se pueden utilizar para controlar la carga tumoral, basándose en la filtración aumentada de la vasculatura en los tumores. Utilizando MRI o PET, se podría seguir la presencia de marcadores de angiogénesis tales como integrina $\alpha 5\beta 3$, VEGF plásmido o bFGF.

Alternativamente, la neoangiogénesis se puede evaluar utilizando una biopsia tumoral o sección y análisis inmunohistoquímicos posteriores en células endoteliales para valorar su actividad y compararla con la actividad de células endoteliales normales de un sujeto sano o de células endoteliales del paciente, pero aisladas en una posición diferente en el cuerpo. Tales análisis inmunohistoquímicos se pueden hacer usando anticuerpos de célula panendotelial tales como anti-CD31 y anti-CD34 para valorar la densidad de los microvasos. Las secciones de tejido se podrían colorear con marcadores para células endoteliales, combinados con marcadores de proliferación, para explorar la proporción entre células endoteliales tumorales y células de proliferación del tumor en el tejido. Un ejemplo de un marcador endotelial es CD31 o CD34. Un ejemplo de un marcador de proliferación es Ki67. Ki-67 es un marcador excelente para determinar la fracción de crecimiento de una población de células determinada.

La fracción de células tumorales positivas con Ki-67 (el índice de etiquetado Ki-67) se correlaciona frecuentemente con el curso clínico del cáncer. La densidad de los microvasos (MVD) se evalúa preferiblemente en una sección tumoral como en el ejemplo 13 (figura 13) coloreada con un anti-CD31 y utilizando la intensidad de la coloración para cuantificar la MVD.

La cuantificación de la MVD se hace preferiblemente contando las estructuras lumenales coloreadas positivamente en cuatro o cinco imágenes representativas por sección tumoral. Una reducción, preferiblemente una reducción significativa de la MVD evaluada en al menos cuatro o cinco imágenes representativas por sección tumoral, se ve preferiblemente como una indicación de que la molécula administrada tiene una actividad antiangiogénesis o es capaz de inducir una reducción de la neoangiogénesis.

[0068] La neoangiogénesis también se puede evaluar utilizando células, preferiblemente células endoteliales de un tumor, un sujeto sano o líneas celulares endoteliales. Las células endoteliales de un tumor se designan preferiblemente como endotelio tumoral. El endotelio tumoral se puede aislar por FACS (selección de células activadas por fluorescencia) de tejido tumoral usando CD31 como un marcador endotelial. Esto se podría realizar como se describe en van Beijnum *et al* 2008. Las células endoteliales preferidas para evaluar la neoangiogénesis *in vitro* son las HUVEC y RF24 usadas en la parte experimental. La evaluación de la actividad de la neoangiogénesis *in vitro* se puede realizar utilizando un ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio): evaluación de la actividad proliferativa de células endoteliales. Preferiblemente se realiza el ensayo de MTS y los resultados de este ensayo de MTS se analizan como se describe en la parte experimental. Sin embargo, otros ensayos de viabilidad conocidos para la persona experta se pueden utilizar tales como MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), cristal violeta y WST-1 (tetrazolio hidrosoluble).

[0069] Además, otros tipos de ensayos se podrían usar, tales como ensayo de germinación de esferoides y ensayo de formación de tubos de Matrigel como segundos ensayos de línea de actividad. En el ensayo de formación de tubos de Matrigel, células, especialmente células endoteliales, se siembran en una matriz de gel seminatural sintético (tal como gel de colágeno Matrigel de BD Biosciences, en algunos casos geles de fibrina). En ambos ensayos, se usan células endoteliales, preferiblemente HUVEC. Después de un periodo de tiempo determinado, dependiendo de las condiciones de cultivo celular, las células empiezan a formar estructuras en forma de tubo. La formación de estructuras en forma de tubo se considera como un primer paso hacia la generación de nuevos vasos. El parámetro leído es el número de nudos de vaso por unidad de área. Para el ensayo de germinación de esferoides, esferoides celulares (por ejemplo, células endoteliales) se colocan en un gel (por ejemplo, geles Matrigel y de colágeno). Después de un periodo de tiempo determinado, la formación de brotes se puede observar. La extensión de la germinación se considera como un criterio para la evaluación del potencial angiogénico de las células. El parámetro leído es el número de brotes por esferoide. Una actividad antiangiogénica puede estar presente cuando el número de nudos de vasos por unidad de área, con respecto al número de brotes por esferoide, se reduce o disminuye durante un periodo de tiempo determinado en comparación con el número correspondiente de nudos de vasos por unidad de área, con respecto al número de brotes por esferoide en células no tratadas frente al número de brotes por esferoide en células tratadas. Una reducción o una disminución puede ser una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. Preferiblemente, ningún nudo de vaso por unidad de área, y respectivamente ningún brote por esferoide, es detectable en un periodo de tiempo determinado.

[0070] Una actividad antiangiogénica en un tejido tumoral también puede estar presente cuando una normalización de los vasos se visualiza y/o cuando el número de vasos en el área patogénica se reduce.

[0071] En una forma de realización preferida, tan pronto como se descubre que el número de vasos en el área patogénica se reduce en comparación con el número de vasos al comienzo del tratamiento, hay una actividad

antiangiogénica detectable. Una reducción puede ser una reducción detectable del número de vasos en el área patológica o una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % del vaso en el área patológica. El área patológica es el área del tumor que incluye el tejido circundante, situada cerca del área tumoral. Cerca en este contexto puede significar hasta unos pocos centímetros. Una normalización de los vasos es preferiblemente un cambio en la estructura 3 dimensional de un vaso o microvaso. Por ejemplo, un vaso o microvaso patológico asociado con actividad de neoangiogénesis en un endotelio tumoral puede ser menos regular y/o parecer más tortuoso y/o parecer más permeable que un vaso de control o microvaso. Un vaso de control puede ser un vaso de un individuo sano o un vaso del paciente, pero no situado en el área patológica de dicho paciente. En una forma de realización preferida, tan pronto como la estructura 3 dimensional de un vaso parece más regular, menos tortuosa y/o menos permeable que un vaso de control, se dice que se ha detectado una actividad antiangiogénica. Preferiblemente, se detectan menos vasos irregulares, tortuosos y/o permeables en el área patológica que al comienzo del tratamiento. Más preferiblemente, menos significa 5 % menos, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % menos. De la forma más preferible, no se detecta ningún vaso irregular, tortuoso y/o permeable en el área patológica. Una normalización de los vasos y/o del número de vasos en el área patológica se puede evaluar utilizando una técnica de formación de imágenes no invasiva tal como, PET, MRI o formación de imágenes CT.

[0072] En el caso de una enfermedad ocular o condición asociada con la neoangiogénesis, diferentes ensayos se han desarrollado para la evaluación de una actividad antiangiogénesis detectable y/o una disminución o reducción de la neoangiogénesis inducida por un fármaco que se debe evaluar. En estos modelos de enfermedad diferentes, la angiogénesis se puede desencadenar por estímulos diferentes tales como estímulo mecánico (rotura inducida por láser de la membrana de Bruch) (Shen *et al*, 2006 Gene therapy. 13. 225-234) o por la sobreexpresión de crecimiento de vasos sanguíneos específicos tales como vEGF en ratones transgénicos (Miki *et al*, 2009, Ophthalmology. Septiembre 2009, 116(9): 1748-1754). Si una actividad antiangiogénesis detectable y/o una disminución o reducción de angiogénesis se evalúa utilizando una molécula de miARN o fuente de la misma como se identifica en este documento, tal molécula de miARN o fuente de la misma se dice que se usa como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis.

[0073] La evaluación de la neoangiogénesis y/o la actividad antiangiogénica se puede realizar periódicamente, por ejemplo, cada semana, cada mes. El aumento/reducción de la neoangiogénesis y/o la presencia de una actividad antiangiogénica puede, por lo tanto, evaluarse periódicamente, por ejemplo, cada semana, mes. Esta evaluación se realiza preferiblemente en diferentes puntos temporales para un sujeto determinado o en uno o más puntos temporales para un sujeto determinado y un control sano. La evaluación se puede realizar a intervalos de tiempo regulares, por ejemplo, cada semana, cada mes. La evaluación puede, por lo tanto, evaluarse regularmente, por ejemplo, cada semana, cada mes. Cuando una evaluación de la neoangiogénesis o la actividad antiangiogénica ha llevado al hallazgo de una reducción de la neoangiogénesis o a la presencia de una actividad antiangiogénica, una molécula de miARN, un mimético, un isomiR de la misma o una fuente de la misma o un antagomir o una fuente de la misma, se dice que muestra una actividad antiangiogénesis detectable y/o que induce una disminución o reducción de la neoangiogénesis.

Una reducción detectable de la actividad de neoangiogénesis y/o la presencia de una actividad antiangiogénica se ha detectado preferiblemente cuando se ha detectado, para al menos un punto temporal, una reducción de la neoangiogénesis y/o la presencia de una actividad antiangiogénica. Preferiblemente, una reducción de la neoangiogénesis y/o la presencia de una actividad antiangiogénica se ha detectado para al menos dos, tres, cuatro, cinco puntos temporales.

[0074] La invención proporciona una molécula de miARN-7, una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-7 o dicha fuente de la misma, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis. La divulgación proporciona una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, un equivalente o una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, dicho equivalente o dicha fuente de la misma, preferiblemente, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis o una enfermedad o una condición asociada con la neoangiogénesis.

[0075] Se ha descubierto sorprendentemente que una molécula de miARN-190b o mimético o isomiR de la misma es capaz de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o de inducir una reducción de la neoangiogénesis como se demuestra en el ejemplo 7 y el ejemplo 8.

[0076] Se ha descubierto sorprendentemente que una molécula de miARN-142 o mimético o isomiR de la misma es capaz de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o de inducir una reducción de la neoangiogénesis como se demuestra en el ejemplo 7 y el ejemplo 8.

[0077] Se ha descubierto sorprendentemente que una molécula de miARN-9* o mimético o isomiR de la misma es capaz de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o de inducir una reducción de la neoangiogénesis como se demuestra en el ejemplo 9, el ejemplo 10 y el ejemplo 12.

[0078] Se ha descubierto sorprendentemente que una molécula de miARN-7 o mimético o isomiR de la misma es capaz de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o de inducir una reducción de la neoangiogénesis como se demuestra en el ejemplo 7, el ejemplo 11 y el ejemplo 12.

5 [0079] Se ha descubierto sorprendentemente que una molécula de miARN-574 o mimético o isomiR de la misma es capaz de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o de inducir una reducción de la neoangiogénesis como se demuestra en el ejemplo 7, el ejemplo 11 y el ejemplo 12.

10 [0080] Preferiblemente, una molécula de miARN-7 o una fuente de la misma es capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis cuando dicha molécula muestra una actividad antiangiogénesis detectable o induce una reducción de la neoangiogénesis. Como parte de la divulgación, una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o un equivalente o una fuente de la misma es capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis o una enfermedad o una condición asociada con la neoangiogénesis cuando dicha molécula muestra una actividad antiangiogénesis detectable o induce una reducción de la neoangiogénesis.

15 En toda la invención, una molécula que exhibe una actividad antiangiogénesis detectable es sinónimo de una molécula que induce una reducción de la neoangiogénesis. Preferiblemente, una reducción de la neoangiogénesis significa una reducción significativa, preferiblemente una reducción de al menos el 5 % de la neoangiogénesis. La reducción de la neoangiogénesis se puede evaluar utilizando cualquiera de los ensayos anteriormente mencionados en este documento. La presencia de una actividad de neoangiogénesis en un sujeto se puede evaluar en células endoteliales de un tumor, un sujeto sano. Las células endoteliales de un tumor también se pueden designar como el endotelio tumoral. La evaluación de la actividad se puede realizar con análisis inmunohistoquímicos usando anticuerpos de células panendoteliales tales como anti-CD31 y anti-CD34 para evaluar la densidad de los microvasos como se ha definido anteriormente en este documento.

20 Tal reducción de actividad de neoangiogénesis se puede medir comparando dicha actividad de neoangiogénesis en una célula endotelial de un sujeto en un punto temporal determinado después del inicio del tratamiento con la actividad correspondiente a partir de una célula endotelial del mismo sujeto antes del comienzo del tratamiento. Más preferiblemente, una reducción significa una reducción de al menos el 10 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % o el 100 %. En este caso, ninguna actividad de neoangiogénesis es detectable.

[0081] La neoangiogénesis o una enfermedad o condición donde la neoangiogénesis esté implicada o asociada es cualquier enfermedad o condición donde ocurre una neovascularización anormal o excesiva o no deseada. Por ejemplo, la neoangiogénesis anormal o excesiva ocurre en varias enfermedades oculares, donde puede suponer hemorragia y trastornos funcionales del ojo, contribuir a la pérdida de visión asociada con retinopatía de prematuridad, retinopatía diabética, oclusión de vena retinal, degeneración macular relacionada con la edad y otras enfermedades oculares (véase, por ejemplo, Yoshida *et al.*, 1999, *Histol Histopathol.* 14(4): 1287-94). Estas condiciones son causas principales de la ceguera (Aiello, 1997, *Ophthalmic Res.* 29(5):354-62). La angiogénesis excesiva también desempeña un papel en otras condiciones de enfermedades tales como la artritis reumatoide y la psoriasis.

40 Además, la neoangiogénesis desempeña un papel importante en el crecimiento y la metástasis de tumores. De hecho, diferentes inhibidores de la angiogénesis se usan clínicamente en el tratamiento contra el cáncer. Por lo tanto, una condición o enfermedad donde la neoangiogénesis está implicada o asociada puede ser un cáncer.

45 En una forma de realización preferida, una enfermedad o condición donde la neoangiogénesis está implicada o asociada es un cáncer (por ejemplo, maligno, metastásico), una enfermedad ocular como un trastorno que incluye degeneración macular relacionada con la edad, una retinopatía diabética, una oclusión de vena retinal, o artritis reumatoide, psoriasis, endometriosis o cualquier otra enfermedad o condición donde haya inflamación presente (Carmeliet P. *et al* 2005 y Griffioen A.W. *et al*, 2000). Los cánceres de una forma de realización preferida de la invención incluyen un cáncer de origen epitelial o de origen neuronal o un carcinoma o un tumor sólido o un sarcoma o un tumor líquido tal como una leucemia o un linfoma. Las células cancerosas pueden ser de la vejiga, del cerebro, de la mama, del colon, del esófago, gastrointestinal, de la cabeza, del riñón, del hígado, del pulmón, de la nasofaringe, del cuello, del ovario, de la próstata, de la piel, del estómago, del testículo, de la lengua, de la neurona o del útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a ellos: neoplasma; maligno; carcinoma; carcinoma no diferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma pilomatricial; carcinoma de células transicionales; carcinoma de células transicionales papilares; adenocarcinoma; gastrinoma; maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado y colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma cístico de adenoide; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma; poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide; maligno; carcinoma bronquioloalveolar; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; adenocarcinoma basal; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulosas; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulado; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de

células en anillo de sello; carcinoma de tubos de infiltración; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget de la mama; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; tumor estromal ovárico, maligno; y roblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli. Un cáncer puede ser neuroblastoma.

5

[0082] En este contexto, una leucemia incluye cualquiera de: leucemia linfoblástica aguda (ALL) tal como leucemia linfoblástica aguda de precursor B, leucemia linfoblástica aguda de precursor T, leucemia de Burkitt, y leucemia bifenotípica aguda, leucemia linfocítica crónica (CLL) tal como leucemia prolinfocítica de célula B, una enfermedad más agresiva, leucemia mielógena aguda (AML) tal como leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, y leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielógena crónica (CML) tal como leucemia monocítica crónica, leucemia de células peludas (HCL), leucemia prolinfocítica de células T (T-PLL), leucemia linfocítica granular grande y leucemia de células T adultas.

10

[0083] En este contexto, un linfoma incluye cualquiera de: linfoma linfocítico pequeño, linfoma linfoplasmacítico (tal como macroglobulinemia de Waldenström), linfoma de zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma de células B de zona marginal nodal (linfoma MALT), linfoma de células B de zona marginal nodal (NMZL), linfoma folicular, linfoma de células de manto, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de células B grandes Mediastinal (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de efusión primaria, linfoma/leucemia de Burkitt, leucemia prolinfocítica de células T, leucemia linfocítica de células T grandes granular, leucemia de células NK agresivas, leucemia/linfoma de células T adultas, linfoma de células NK/T extranodal - tipo nasal, linfoma de células T de tipo enteropático, linfoma des células T hepatoesplénico, linfoma de células NK blástico, micosis fungoides/síndrome de Sézary, trastornos linfoproliferativos de células T CD30-positivos cutáneos primarios, linfoma de células grandes anaplásico cutáneo primario, papulosis linfomatoide, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma de células T periférico, linfoma de células grandes anaplásico sin especificar, linfoma de Hodgkin, trastornos linfoproliferativos asociados con la inmunodeficiencia.

15

20

25

[0084] Cualquier cáncer que ya se conozca que se trate con un compuesto angioestático se incluye en el campo de la invención. Los cánceres preferidos en este contexto son: carcinoma, sarcomas, leucemias y linfomas. Los cánceres más preferidos en este contexto son: carcinoma de colon, mama, pulmón y carcinoma y glioma renal.

30

[0085] Hay medicamentos conocidos actualmente (compuestos angioestáticos) que se pueden utilizar para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar específicamente la neoangiogénesis en un sujeto. Sin embargo, es posible que cada uno de estos tratamientos muestre una actividad terapéutica que no es suficiente para usarse en pacientes y/o inducir resistencia. Tal actividad terapéutica no es suficiente para usarse en pacientes preferiblemente cuando tales medicamentos conocidos (compuestos angioestáticos) no son capaces de mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o no son capaces de inducir una reducción de la neoangiogénesis. Cada una de estas características se ha definido anteriormente en este documento. La invención proporciona un nuevo medicamento que se prevé que no tenga tales inconvenientes. La invención incluye el uso de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o una fuente de la misma.

35

40

Este uso incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente, una actividad o el nivel de estado estable de dicho miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o de dicha fuente de la misma en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en el fluido corporal de dicho sujeto.

45

En el contexto de la invención, "aumentar una actividad o el nivel de estado estable de un antagomir o de dicha fuente de la misma" se podría reemplazar por "disminuir una actividad o el nivel de estado estable de una molécula de miARN". Lo mismo se aplica a otro antagomir identificado en este documento. En este uso, una actividad o nivel de estado estable de dicho miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma se aumenta para que muestre una actividad antiangiogénesis detectable y/o induzca una reducción detectable de la neoangiogénesis. La evaluación de una actividad antiangiogénesis y de neoangiogénesis en un sujeto se ha definido anteriormente en este documento.

50

[0086] Una actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, un mimético o isomiR de la misma o fuente de la misma se puede aumentar en el nivel de dicha propia molécula de miARN, por ejemplo proporcionando dicha molécula de miARN a un sujeto, preferiblemente a una célula de un sujeto, o a un tejido de dicho sujeto, o a un órgano de dicho sujeto o a dicho sujeto, donde dicha molécula de miARN es de una fuente exógena. Para proporcionar una molécula de miARN de una fuente exógena, dicha molécula de miARN puede convenientemente producirse por expresión de un ácido nucleico que codifica dicha molécula de miARN o que codifica una fuente de dicha molécula de miARN en una célula huésped adecuada como se describe a continuación o como molécula completamente sintética por síntesis química.

55

60

[0087] Preferiblemente, sin embargo, una actividad o nivel de estado estable de una molécula de miARN se aumenta regulando el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica dicha molécula de miARN o que codifica una fuente de dicha molécula de miARN. Preferiblemente, el nivel de expresión de una secuencia

65

de nucleótidos se regula en una célula de dicho sujeto o en un tejido de dicho sujeto o en el sujeto. El nivel de expresión de una molécula de miARN o una fuente de dicha molécula de miARN se puede aumentar introduciendo un miARN, o una fuente de la misma, o un constructo (o vector) de expresión en una célula, tejido, órgano o fluido corporal de dicho sujeto, o en el sujeto, donde un vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una molécula de miARN o que comprende una fuente de dicha molécula de miARN, y donde una secuencia de nucleótidos está bajo el control de un promotor capaz de transmitir la expresión de una secuencia de nucleótidos en dicha célula, tejido, órgano, sujeto. El nivel de expresión de una molécula de miARN o fuente de la misma también se puede aumentar introduciendo un constructo de expresión en una célula, tejido, órgano, sujeto, donde un constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un factor capaz de transactivar una secuencia de nucleótidos endógena que codifica una molécula de miARN.

[0088] Un uso de la invención comprende preferiblemente el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácidos nucleicos para aumentar la actividad o el nivel estable de la molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 tal y como se define en este documento. Un constructo de ácidos nucleicos puede ser un constructo de expresión como se especifica con más detalle en este documento. Preferiblemente, un constructo de expresión es un vector de terapia génica viral seleccionado de vectores de terapia génica basados en un adenovirus, un virus adeno-asociado (AAV), un virus herpes, un virus pox, un vector viral oncolítico y un retrovirus. Un vector de terapia génica viral preferido es un vector AAV o lentiviral. Alternativamente, un uso de la invención comprende preferiblemente el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de miARN-9 o una fuente de la misma tal y como se define en este documento.

[0089] En un uso de la invención, una célula, un tejido, un órgano o un fluido corporal es preferiblemente de un sujeto sospechoso de tener un alto riesgo de mostrar neoangiogénesis debido, por ejemplo, a su edad o a su contexto genético o a su dieta. Alternativamente, en otra forma de realización preferida, el uso de la invención se aplica en una célula, tejido, órgano o fluido corporal de un sujeto diagnosticado como que no tiene un riesgo predictivo de desarrollar neoangiogénesis más tarde. Un método de diagnóstico usado es preferiblemente una de las invenciones descritas en este documento. Alternativamente, una célula, un tejido u órgano que se va a tratar se puede seleccionar basándose en el riesgo de progresión de la neoangiogénesis. Tal riesgo de progresión se puede evaluar utilizando criterios clinicopatológicos tradicionales o prognosis basada en biomarcadores conocidos por la persona experta. Se incluye también en la invención la administración de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o un precursor de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma en un tejido u órgano de dicho sujeto. El órgano o tejido puede corresponder al órgano o tejido donde se ha diagnosticado la neoangiogénesis. En la invención, un tejido preferido es un tejido que comprende o que contiene o que consiste en un endotelio tumoral. En la invención, un órgano preferido es el colon, la mama, el pulmón, el riñón o el cerebro en el caso de un carcinoma de colon, de mama, de pulmón o carcinoma o glioma de riñón o cualquier endotelio tumoral derivado de dicho órgano mencionado anteriormente. Un endotelio tumoral es un tejido que comprende o consiste en células endoteliales que se asocian con células tumorales, situadas o en los límites del tejido tumoral o en su proximidad, y que se activan por la acción de señales moleculares derivadas del tumor tales como factores de crecimiento, citocinas y/u hormonas. Una proximidad de un tumor en este contexto puede significar hasta unos pocos centímetros. En un tumor normalmente 0,1 - 5 % de las células son de origen endotelial. Algunos tumores, tales como el endotelioma, hemangioma y sarcoma de Kaposi, se originan a partir de células endoteliales, en los cuales el número de células endoteliales puede ser tan alto como del 99 %.

[0090] Un endotelio tumoral es un tejido que comprende un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de células endoteliales, preferiblemente estas células se activan tal y como se ha definido anteriormente en este documento y donde dichas células se asocian con células tumorales, situadas o bien en los límites del tejido tumoral o bien en su proximidad. La evaluación de la identidad de la célula endotelial se realiza preferiblemente utilizando células de coloración FACS con marcadores endoteliales como CD31 y CD34 en un tejido tumoral obtenido a partir de una biopsia. La evaluación de la activación de la célula endotelial se realiza preferiblemente utilizando células de coloración FACS con un marcador como Ki-67 en un tejido tumoral obtenido a partir de una biopsia. Los tejidos preferidos comprenden colon, mama, pulmón o riñón en el caso de un carcinoma de colon, de mama, de pulmón o un carcinoma o glioma de riñón. En la invención, una célula preferida es una célula derivada de un colon, mama, pulmón o riñón en el caso de un carcinoma de colon, de mama, de pulmón o un carcinoma o glioma de riñón. Esta célula puede ser o comprender una célula tumoral o una célula endotelial. En cada caso, una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma se administra preferiblemente a una célula endotelial presente en dicho órgano, tejido. Dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma se administra preferiblemente a un tejido que comprende un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de células endoteliales. Dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma puede ser dirigida a células endoteliales. Un tratamiento de neoangiogénesis puede incluir un tratamiento que previene la neoangiogénesis en un tejido tumoral que contiene una célula tumoral que no ha sido aún metastatizada o que reduce la neoangiogénesis alrededor de la célula tumoral que ya tiene metástasis formada

y/o está migrando del tumor primario a sitios distantes en el cuerpo. Alternativamente o en combinación con la definición preferida, un tratamiento de neoangiogénesis puede incluir un tratamiento que previene la neoangiogénesis en un tejido tumoral que contiene células endoteliales. En esta forma de realización preferida, las células endoteliales son dirigidas específicamente por conexión o conjugación de dicho miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma a una parte objetivo. Una parte objetivo preferida es un cRGD como se identifica en este documento o cualquier molécula conocida para reconocer o enlazar una molécula que se expresa en células endoteliales. Una molécula preferida expresada en células endoteliales es CD31 y CD34.

[0091] En otro uso, la invención mencionada en este documento se puede combinar con tratamientos estándar de la enfermedad o condición asociada con la neoangiogénesis tales como la quimioterapia, la radioterapia o la cirugía. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos se identifican más adelante en este documento.

Aunque la terapia génica es una posibilidad para prevenir, tratar, revertir y/o retrasar la neoangiogénesis o una condición o una enfermedad asociada con la neoangiogénesis, otros posibles tratamientos también pueden ser previstos. Por ejemplo, también es preferido el tratamiento mediante fármacos "*de molécula pequeña*" para orientar determinadas vías moleculares en la dirección deseada. Estas pequeñas moléculas se identifican preferiblemente por el método de cribado de la invención tal y como se define más adelante en este documento.

[0092] En el contexto de la invención, prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o condición asociada con la neoangiogénesis puede significar que:

- La gravedad de al menos un síntoma de esta enfermedad o condición se ha reducido, y/o
- Al menos un parámetro asociado con esta enfermedad o condición se ha mejorado: preferiblemente tal parámetro se asocia con neoangiogénesis y/o una actividad angiogénica.

[0093] Un síntoma puede ser brotes endoteliales. La presencia de brotes endoteliales se puede evaluar *in situ* en un paciente o en un tumor mediante técnicas no invasivas tales como PET, MRI (contraste dinámico mejorado, DCE-MRI) o formación de imágenes CT en cuanto a la evaluación de la neoangiogénesis. Se dice preferiblemente que la gravedad del síntoma de los brotes endoteliales se ha reducido cuando el número de brotes endoteliales que se originan a partir de un tumor se disminuye en al menos un 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % o más. Los brotes endoteliales se pueden evaluar o detectar después de al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de tratamiento en un sujeto y en comparación con el número de brotes endoteliales al comienzo del tratamiento.

[0094] Un parámetro puede ser la evaluación de la neoangiogénesis y/o actividad antiangiogénica como se ha explicado anteriormente en este documento. En el contexto de la invención, prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis se puede sustituir por conseguir un efecto antitumoral. A menos que se indique lo contrario, un efecto antitumoral se evalúa o se detecta preferiblemente después de al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más en un sujeto tratado. Un efecto antitumoral se identifica preferiblemente en un sujeto como:

- una inhibición de la proliferación de células tumorales y/o
- una inducción o inducción aumentada de la muerte de células tumorales y/o
- un retraso en la ocurrencia de metástasis y/o de migración de células tumorales y/o
- una inhibición o prevención o retraso del aumento del peso o crecimiento de un tumor y/o
- una prolongación de la supervivencia del paciente de al menos un mes, varios meses o más (en comparación con aquellos no tratados o tratados con un control o en comparación con el sujeto al comienzo del tratamiento) y/o
- la mejora de la calidad de vida y del alivio del dolor observado

En el contexto de la invención, un paciente puede sobrevivir y/o se puede considerar como que está libre de la enfermedad. Alternativamente, la enfermedad o condición se puede detener o retrasar. En el contexto de la invención, una mejora de la calidad de vida y un alivio del dolor observado puede significar que un paciente pueda precisar menos fármacos para aliviar el dolor que al comienzo del tratamiento. Alternativamente o en combinación con el consumo de menos fármacos para aliviar el dolor, un paciente puede estar menos estreñido que en al comienzo del tratamiento. "Menos" en este contexto puede significar un 5 % menos, 10 % menos, 20 % menos, 30 % menos, 40 % menos, 50 % menos, 60 % menos, 70 % menos, 80 % menos, 90 % menos. Un paciente puede no necesitar más ningún fármaco para aliviar el dolor.

[0095] Esta mejora de la calidad de vida y el alivio del dolor observado se pueden ver, detectar o evaluar después de al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de tratamiento en un paciente y en comparación con la calidad de vida y el alivio del dolor observado al comienzo del tratamiento de dicho paciente.

[0096] Una inhibición de la proliferación de las células tumorales, preferiblemente células endoteliales del endotelio tumoral, puede ser al menos del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % o más. La proliferación de las células se puede evaluar utilizando técnicas conocidas.

Una inducción de muerte de células tumorales puede ser al menos del 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o más.

5 El crecimiento del tumor se puede inhibir al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % o más. La muerte de células tumorales se puede evaluar utilizando técnicas conocidas para la persona experta.

La muerte de células tumorales se puede evaluar utilizando MRI o CT. En algunas formas de realización, el aumento de peso del tumor o el crecimiento del tumor se puede inhibir al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 % o más. El peso del tumor o el crecimiento del tumor se puede evaluar utilizando técnicas conocidas para la persona experta.

La detección del crecimiento del tumor o la detección de la proliferación de las células tumorales se pueden evaluar *in vivo* midiendo los cambios en la utilización de glucosa por tomografía de emisión de positrones con el análogo de glucosa 2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG-PET) o [18F]-3-fluoro-3-desoxi-L-timidina PET. Una alternativa *ex vivo* puede ser colorear una biopsia tumoral con Ki67.

15 Para probar el efecto de una molécula de miARN en el crecimiento del tumor en un modelo animal *in vivo*, se puede utilizar un sistema experimental como se describe en el ejemplo 12.

Un retraso en la ocurrencia de la metástasis y/o de la migración de las células tumorales puede ser un retraso de al menos una semana, un mes, varios meses, un año o más largo. La presencia de metástasis se puede evaluar utilizando MRI, CT o ecografía o técnicas que permiten la detección de células tumorales circulantes (CTC). Ejemplos de las últimas pruebas son la prueba de CTC CellSearch (Veridex), una selección magnética basada en EpCam de CTC de sangre periférica. En algunas formas de realización, el crecimiento del tumor se puede retrasar al menos una semana, un mes, dos meses o más. En alguna forma de realización, una ocurrencia de metástasis se retrasa al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, unos meses, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más.

[0097] En otra forma de realización preferida, se proporciona una composición para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis que comprende además otra molécula de miARN y/o un antagonir de una molécula de miARN seleccionada de:

- 30 a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, de miARN-574 y/o de miARN-142, un mimético, un isomiR y/o una fuente de la misma,
 b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145 y let7a1, un mimético, un isomiR o una fuente de la misma,
 35 c) y opcionalmente al menos un antagonir de una molécula de miARN-132, miARN-126 y miARN-21 y/o una fuente de la misma.

[0098] Dado que no se prevé que cada una de las moléculas de miARN identificadas tenga los mismos genes objetivo, se asume que el uso de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma opcionalmente combinada con al menos una de las moléculas de miARN, o fuente de la misma identificada antes en a) y/o b) y/o al menos un antagonir o fuente de la misma identificado antes en c) permite un tratamiento más eficaz de la neoangiogénesis. Un tumor tratado mediante una composición o un cóctel de al menos una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, o fuente de la misma se prevé que tenga menores posibilidades de escapar o de resistir a dicho tratamiento. En otra forma de realización preferida, se incluye el diagnóstico de la expresión de cada una de las moléculas de miARN o de sus genes objetivo según se identifica en este documento y, dependiendo de los resultados, la adaptación de la identidad de las moléculas de miARN usadas para el tratamiento.

[0099] Cuando la invención se refiere a una composición que comprende más de una molécula de miARN o fuente de la misma o antagonir de la misma se incluye que cada molécula de miARN o fuente de la misma o antagonir de la misma pueda estar presente cada uno en una composición separada, donde cada composición se administra consecutivamente o simultáneamente a un sujeto. Alternativamente, también se incluye que más de una molécula de miARN o fuentes de las mismas o antagonir de las mismas estén presentes en una composición tal y como se define en este documento. Por lo tanto, la invención incluye adicionalmente el uso de una molécula de miARN, una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN o una fuente de la misma como se identifica en a) y/o b) y/o un antagonir adicional de una molécula de miARN como se identifica en c).

Este uso preferido:

60 incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente, una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN o de dicha fuente de la misma como se identifica en a) y/o b) en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en un fluido corporal de dicho sujeto y/o

65 incluye disminuir, preferiblemente disminuir farmacológicamente, una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN o de dicha fuente de la misma como se identifica en c) en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en un fluido corporal de dicho sujeto.

[0100] En este uso preferido:

una actividad o nivel de estado estable de una molécula de miARN tal y como se define en a) y/o b) se puede aumentar para mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción detectable de la neoangiogénesis y/o una actividad o nivel de estado estable de un antagomir tal y como se define en c) se puede aumentar para mostrar una actividad antiangiogénesis detectable y/o inducir una reducción detectable de la neoangiogénesis.

Las maneras de aumentar una actividad o nivel estable de un antagomir ya se han definido anteriormente en este documento. La evaluación de una actividad antiangiogénesis y de neoangiogénesis en un sujeto se habían definido anteriormente en este documento.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, o una fuente de la misma o una composición que comprende dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o una fuente de la misma preferiblemente para la producción de un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis. Cada característica de este aspecto adicional ya se ha descrito en este documento.

[0101] En un aspecto adicional, se proporciona un método para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis administrando una molécula de miARN o fuente de la misma o un antagomir de la misma o una composición como se ha definido en este documento anteriormente a un sujeto que lo necesite. Cada característica de este aspecto adicional ya se ha descrito en este documento.

[0102] En otro aspecto, se proporciona un método *ex vivo* para diagnosticar la neoangiogénesis en un sujeto, donde el método incluye las etapas de:

(a) determinar el nivel de expresión de una molécula de miARN-7, un isomiR o una fuente de la misma en una muestra a partir de un sujeto, y

(b) comparar el nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma tal y como se define en (a) con un valor de referencia para el nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma, donde el valor de referencia es preferiblemente el valor medio del nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma en un sujeto sano.

Un método para diagnosticar la angiogénesis o una enfermedad o condición asociada con la neoangiogénesis forma parte de la divulgación. En el contexto de la invención, diagnóstico significa una evaluación de riesgo predictiva de que un sujeto desarrolle la neoangiogénesis. En el contexto de la invención, un sujeto puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, un sujeto es un ser humano. En el contexto de la invención, el valor de referencia evaluado en (b) y el nivel de expresión de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, o una fuente de la misma evaluada en (a) se evalúan en un tejido correspondiente o similar de ambos sujetos. Dado que los niveles de expresión de estas secuencias de nucleótidos y/o cantidades de moléculas de miARN correspondientes o fuente de las mismas puede ser difícil de medir en un sujeto, se usa preferiblemente una muestra a partir de un sujeto. Según otra forma de realización preferida, el nivel de expresión (de una secuencia de nucleótidos o molécula de miARN o fuente de la misma) se determina *ex vivo* en una muestra obtenida a partir de un sujeto. La muestra comprende preferiblemente un fluido corporal de un sujeto. Una muestra puede ser una biopsia de tejido o una biopsia tumoral o un tejido canceroso de origen epitelial de un sujeto. Un tejido preferido es o bien tejido tumoral primario o bien tejido metastatizado. Un fluido corporal puede comprender o derivarse de sangre, suero, esputo, plasma, LCR (líquido cefalorraquídeo), deposición, orina. Se contempla específicamente que la invención puede utilizarse para evaluar o diagnosticar diferencias entre etapas de neoangiogénesis, tales como entre precáncer y cáncer, o entre un tumor primario y un tumor metastatizado.

[0103] Un aumento o reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos (o nivel estable de la molécula de miARN codificada o fuente de la misma) se define preferiblemente como un cambio detectable del nivel de expresión de un nucleótido (o nivel estable de una molécula de miARN codificada o fuente de la misma o cualquier cambio detectable en una actividad biológica de una molécula de miARN o fuente de la misma) utilizando un método tal y como se ha definido anteriormente en comparación con el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente (o nivel estable de una molécula de miARN codificada o fuente de la misma correspondiente) en un sujeto sano. Una secuencia de nucleótidos preferida es una secuencia que codifica un precursor de una molécula de miARN. Según una forma de realización preferida, un aumento o reducción de una actividad de miARN se cuantifica utilizando un ensayo específico para una actividad de miARN. Un ensayo preferido es la evaluación de la neoangiogénesis como se ha definido anteriormente en este documento.

[0104] Preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa una reducción de al menos el 10 % del nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos usando matrices. Más

preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa una reducción de al menos el 15 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % o del 100 %. En este caso, no hay expresión detectable.

[0105] Preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN o fuente de la misma significa una reducción de al menos el 10 % del nivel de expresión del miARN usando qPCR, micromatrices o análisis de transferencia de Northern. Preferiblemente qPCR es RT qPCR de tallo-bucle. Más preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN o fuente de la misma significa una reducción de al menos el 15 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % o el 100 %. En este caso, no hay expresión detectable.

[0106] Preferiblemente, una reducción de la actividad de miARN significa una reducción de al menos el 5 % de una actividad de miARN utilizando un ensayo adecuado. Más preferiblemente, una reducción de la actividad de miARN significa una reducción de al menos el 10 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 % o el 100 %. En este caso, no hay actividad detectable.

[0107] Preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa un aumento de al menos el 10 % del nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos utilizando cualquiera de las técnicas mencionadas en este documento. Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa un aumento de al menos el 15 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0108] Preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una molécula de miARN o fuente de la misma significa un aumento de al menos el 10 % del nivel de expresión de la molécula de miARN o fuente de la misma usando RT-qPCR, preferiblemente RT qPCR de tallo-bucle. Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una molécula de miARN o fuente de la misma significa un aumento de al menos el 15 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0109] Preferiblemente, un aumento de una actividad de miARN significa un aumento de al menos el 5 % de una actividad de miARN utilizando un ensayo adecuado. Más preferiblemente, un aumento de una actividad de miARN significa un aumento de al menos el 10 %, aún más preferiblemente de al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0110] Preferiblemente, un nivel de expresión se determina *ex vivo* en una muestra obtenida a partir de un sujeto. Más preferiblemente, la muestra es como se ha definido anteriormente en este documento y donde, posteriormente, una determinada secuencia de nucleótidos y/o molécula de miARN o fuente de la misma se extrae y se purifica usando métodos conocidos para la persona experta. Más preferiblemente, la muestra es o comprende o se deriva de una biopsia tumoral, sangre, esputo, deposición u orina.

[0111] En un método de diagnóstico de la invención, se determina preferiblemente el nivel de expresión de más de una, más preferiblemente de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 moléculas de miARN o fuentes de la misma y/o los niveles estables de las correspondientes moléculas de miARN o fuentes de la misma.

[0112] Por consiguiente, en un método preferido, en la etapa (a) se determina el nivel de expresión de otra molécula de miARN o fuente de la misma seleccionada de:

- a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, de miARN-574 y/o de miARN-142, un mimético, un isomiR y/o una fuente de la misma,
- b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145, let7a1, un mimético, un isomiR y/o una fuente de la misma,
- c) y opcionalmente al menos un antagomir de miARN-132, miARN-126 y miARN-21 y/o una fuente de la misma.

[0113] En otro método preferido, la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7, isomiR o una fuente de la misma. En otro método preferido, la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7, isomiR o una fuente de la misma y una reducción del nivel de expresión de al menos uno de otro miARN seleccionado de:

- a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, miARN-574 y/o de miARN-142, y/o un equivalente y/o una fuente de la misma,
- b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145 y let7a1 un equivalente o una fuente de la misma

c) y/o un aumento del nivel de expresión de al menos una de otra molécula de miARN-132, miARN-126 y miARN-21, isomiR o una fuente de la misma.

[0114] En un método preferido adicional de la divulgación, la neoangiogénesis o una enfermedad o condición asociada con la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, equivalente o una fuente de la misma. En otro método preferido, la neoangiogénesis o una enfermedad o condición asociada con la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, equivalente o una fuente de la misma y una reducción del nivel de expresión de al menos uno de otro miARN seleccionado de:

a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, miARN-7, miARN-574 y/o de miARN-142, y/o un equivalente y/o una fuente de la misma,

b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145 y let7a1, un equivalente o una fuente de la misma.

[0115] En otra forma de realización preferida, la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142, equivalente o una fuente de la misma y/o una reducción del nivel de expresión de un aumento del nivel de expresión de al menos uno de otro miARN según como se ha identificado anteriormente y/o un aumento del nivel de expresión de al menos uno de otro miARN seleccionado de:

a) un miARN-132, miARN-126 y/o un miARN-21 o un equivalente o una fuente del mismo.

[0116] En otro aspecto, se proporciona un método para la identificación de una sustancia o una molécula capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis en un sujeto, donde el método incluye las etapas de:

(a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-7 o isomiR o fuente de la misma, donde preferiblemente la población de prueba comprende células cancerosas y/o la población de células de prueba comprende células mamíferas, y/o la población de células de prueba comprende células humanas;

(b) contactar la población de células de prueba con la sustancia;

(c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7 o isomiR de la misma o fuente de la misma o la actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR de la misma o fuente de la misma en la población de células de prueba que se contacta con la sustancia;

(d) comparar la expresión, actividad o nivel estable determinados en (c) con la expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR o fuente de la misma en una población de células de prueba que no se contacta con la sustancia; y,

(e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR o fuente de la misma, entre la población de células de prueba que se contacta con la sustancia y la población de células de prueba que no se contacta con la sustancia.

[0117] En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para la identificación de una sustancia o una molécula capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis o una condición o enfermedad asociada con la neoangiogénesis en un sujeto, donde el método incluye las etapas de:

(a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o equivalente de la misma o fuente de la misma, donde preferiblemente la población de prueba comprende células cancerosas y/o la población de células de prueba comprende células mamíferas, y/o la población de células de prueba comprende células humanas;

(b) contactar la población de células de prueba con la sustancia;

(c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o equivalente de la misma o fuente de la misma o la actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o equivalente de la misma o fuente de la misma en la población de células de prueba que se contacta con la sustancia;

(d) comparar la expresión, actividad o nivel estable determinados en (c) con la expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o equivalente de la misma o fuente de la misma en una población de células de prueba que no se contacta con la sustancia; y,

(e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o

equivalente de la misma o fuente de la misma, entre la población de células de prueba que se contacta con la sustancia y la población de células de prueba que no se contacta con la sustancia.

[0118] Preferiblemente, en la etapa a), una célula de prueba comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una fuente o un precursor de una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-7, miARN-190b y/o miARN-142 o equivalente de la misma o un precursor de dicho miARN como se ha identificado anteriormente en este documento. Preferiblemente, en un método se comparan los niveles de expresión, una actividad o niveles de estado estable de más de una secuencia de nucleótidos o más de una molécula de miARN, equivalente o fuente de la misma. Preferiblemente, en un método, una población de células de prueba comprende células mamíferas, más preferiblemente células humanas. Más preferiblemente, una célula de prueba es una célula endotelial. Una línea celular también se puede usar como RF24. También se pueden usar células HUVEC. Una población de células de prueba preferida no expresa una molécula de miARN-9, miARN-574, miARN-190b y/o miARN-142 o fuente de la misma o tiene una expresión reducida en comparación con un homólogo normal. Más preferiblemente, una población de células de prueba comprende una célula endotelial. Más preferiblemente, una población de células de prueba comprende un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de células endoteliales. Las células endoteliales se pueden identificar por su expresión de marcadores CD31 y CD34. Alternativamente o además de las células mencionadas anteriormente, en un aspecto la invención también se refiere a una sustancia que se identifica en los métodos anteriormente mencionados. En un método preferido, se comparan los niveles de expresión, actividades o niveles de estado estable de al menos otra molécula de miARN o equivalente o fuente de la misma, donde preferiblemente la otra molécula de miARN o isomiR o fuente de la misma se selecciona de:

a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, de miARN-574 y/o de miARN-142, un isomiR y/o una fuente de la misma,

b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145, let7a1, miARN-132, miARN-126 y miARN-21, un isomiR o una fuente de la misma.

Definiciones generales y tecnologías generales a las que se hace referencia en este documento

[0119] Las moléculas de microARN ("miARN") tienen generalmente una longitud de 21 a 22 nucleótidos, aunque se han visto longitudes de 17 y hasta 25 nucleótidos. Cualquier longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 se incluye, por lo tanto, en la presente invención. Los miARN se procesan cada uno a partir de una molécula de ARN precursor más larga ("miARN precursor"). Los miARN precursores se transcriben a partir de genes sin codificación de proteína. Un precursor puede tener una longitud de al menos 50, 70, 75, 80, 85, 100, 150, 200 nucleótidos o más. Los miARN precursores tienen dos regiones de complementariedad que les permite formar una estructura de tallo-bucle o estructura de tipo de pliegue hacia atrás, que se escinde mediante enzimas Dicer y Drosha en animales. Dicer y Drosha son nucleasas de tipo ribonucleasa III. El miARN procesado es típicamente una porción del tallo.

[0120] El miARN procesado (también referido como "miARN maduro") se vuelve parte de un gran complejo, conocido como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), para regular en sentido descendente un gen objetivo particular. Ejemplos de miARN de animal incluyen aquellos que forman pares de base perfectamente o imperfectamente con el ARNm objetivo, dando como resultado o bien la degradación del ARNm o bien la inhibición de la traducción respectivamente (Olsen *et al*, 1999; Seggerson *et al*, 2002). Las moléculas de ARNip también se procesan mediante Dicer, pero a partir de una molécula de ARN bicatenario largo. Los ARNip no se encuentran naturalmente en células animales, pero pueden funcionar en tales células en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) para dirigir la escisión específica de la secuencia de un ARNm objetivo (Denli *et al*, 2003).

[0121] El estudio de moléculas de miARN endógenas se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 60/575.743. Un miARN es aparentemente activo en la célula cuando el ARN maduro monocatenario se une mediante un complejo de proteína que regula la traducción de ARNm que hibrida al miARN. Introducir moléculas de ARN exógenas que afectan a las células de la misma manera que los miARN expresados requiere que una molécula de ARN monocatenario de la misma secuencia que el miARN maduro endógeno sea absorbida por el complejo de proteína que facilita control traslacional. Se ha evaluado una variedad de diseños de molécula de ARN. Se han evaluado tres diseños generales que maximizan la absorción del miARN monocatenario deseado por la vía de miARN. Se puede hacer referencia a una molécula de ARN con una secuencia de miARN que tiene al menos uno de los tres diseños como un miARN sintético.

[0122] Las moléculas de miARN de la invención pueden reemplazar o suplementar la actividad de silenciamiento génico de un miARN endógeno. Un ejemplo de tales moléculas, características preferidas y modificaciones de tales moléculas y composiciones que comprenden tales moléculas se describe en WO2009/091982.

[0123] Las moléculas de miARN de la invención o equivalentes o fuente de las mismas comprenden, en algunas formas de realización, dos moléculas de ARN donde un ARN es idéntico a un miARN de origen natural maduro. Se hace referencia a la molécula de ARN que es idéntica a un miARN maduro como la cadena activa. La

segunda molécula de ARN, referida como la cadena complementaria, es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. Las cadenas activas y complementarias se hibridan para crear un ARN bicatenario, que es similar al precursor de miARN de origen natural que se une mediante el complejo de proteína inmediatamente antes de la activación del miARN en la célula. La maximización de la actividad de dicho miARN requiere maximizar la absorción de la cadena activa y minimizar la absorción de la cadena complementaria mediante el

complejo de proteína de miARN que regula la expresión génica en el nivel de traducción. Los diseños moleculares que proporcionan actividad de miARN óptima implican modificaciones de la cadena complementaria. Dos diseños incorporan modificaciones químicas de la cadena complementaria. La primera modificación implica la creación de un ARN complementario con un grupo diferente de un fosfato o hidroxilo en su terminal 5'. La presencia de la modificación en 5' elimina aparentemente la absorción de la

cadena complementaria y favorece posteriormente la absorción de la cadena activa por el complejo de proteína de miARN. La modificación en 5' puede ser cualquier variedad de moléculas entre las que se incluyen NH₂, NHCOCH₃, biotina y otros. La segunda estrategia de modificación química que reduce significativamente la absorción de la cadena complementaria por la vía del miARN es la incorporación de nucleótidos con modificaciones de azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Debe observarse que las modificaciones de azúcar de acuerdo con la segunda estrategia de diseño pueden acompañarse de modificaciones en el terminal 5' según la primera estrategia de diseño para mejorar adicionalmente las actividades de miARN.

El tercer diseño de miARN implica la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria que no son complementarios a la cadena activa.

Los híbridos de los ARN activos y complementarios resultantes son muy estables en el extremo 3' de la cadena activa, pero inestables con respecto al extremo 5' de la cadena activa. Los estudios con ARNip indican que la estabilidad del híbrido en 5' es un indicador clave de la absorción de ARN mediante el complejo de proteína que respalda la interferencia de ARN, que se relaciona al menos con la vía del miARN en las células. Los inventores han descubierto que el uso juicioso de desapareamientos en la cadena de ARN complementaria mejora significativamente la actividad de dicho miARN.

Bibliotecas de miARN

[0124] Una aplicación clave para los miARN como se identifica en este documento es la evaluación o el diagnóstico de la presencia de un individuo o grupos de miARN en una muestra. Las poblaciones de células con cada uno de los diferentes miARN pueden después evaluarse para identificar miARN cuya presencia afecte a un fenotipo celular (es decir, neoangiogénesis). El número de miARN diferentes en las bibliotecas es variable. Se contempla que puede haber, haber al menos, o haber como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, o cualquier rango derivable, moléculas específicas de miARN diferentes en la biblioteca. En formas de realización específicas, las bibliotecas tienen de 1 a 20 moléculas específicas de miARN diferentes, o de 5 a 20 moléculas específicas de miARN diferentes. Las moléculas específicas de miARN "diferentes" se refieren a ácidos nucleicos que codifican específicamente miARN con secuencias diferentes.

[0125] Se contempla que los miARN estén hechos principalmente de ARN, aunque en algunas formas de realización pueden ser ARN, análogos de nucleótidos, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos desbloqueados (UNA), ADN, o cualquier combinación de ADN, ARN, análogos de nucleótidos y PNA (ácidos nucleicos peptídicos). Por consiguiente, se entiende que la biblioteca contiene uno o más ácidos nucleicos para estos miARN diferentes. En formas de realización específicas, la biblioteca es específica para miARN humanos, aunque se contemplan bibliotecas para múltiples organismos.

[0126] Una molécula de ARN de la invención tiene o comprende o consiste en una región de miARN. En formas de realización específicas, una molécula de miARN o equivalente de la misma tiene una secuencia que se deriva de cualquiera de las SEQ ID N.º: 22-52 (tabla 5). Se contempla particularmente que las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de miARN maduro en las SEQ ID N.º: 22-52.

[0127] Una molécula de miARN o equivalente de la misma incluirá una secuencia que se extiende al menos de 1 a 5 nucleótidos de la secuencia codificante aguas arriba y/o aguas abajo de la secuencia de miARN predicha. En algunas formas de realización, las moléculas tienen hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más nucleótidos contiguos, o cualquier rango derivable, que flanquean la secuencia que codifica el miARN procesado predominante en uno o ambos lados (extremo 5' y/o 3').

[0128] Las bibliotecas de la invención pueden contener secuencias de miARN de cualquier organismo que tenga miARN, entre los que se incluyen específicamente, pero de forma no limitativa, mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos, ratas y ratones. Se contemplan específicamente bibliotecas que tienen, tienen al menos, o tienen como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más miARN diferentes (es decir, moléculas específicas de miARN con diferentes secuencias derivadas de diferentes genes de miARN). Se contemplan específicamente tales bibliotecas descritas en la frase precedente respecto a cualquiera de las SEQ ID N.º: 22-52, particularmente aquellas correspondientes a las secuencias de miARN (secuencia madura).

Ácidos nucleicos

[0129] La presente invención concierne moléculas de ácido nucleico también llamadas fuentes o precursores de miARN que pueden introducir miARN en células cultivadas o en un sujeto. Los ácidos nucleicos se pueden producir en células o *in vitro* por enzimas purificadas, aunque se producen preferentemente por síntesis química. Pueden ser crudas o purificadas. El término "miARN", a menos que se indique lo contrario, se refiere al miARN procesado, después de que se haya escindido de su precursor. La tabla 4 indica qué SEQ ID N.º corresponde a una secuencia del precursor particular de un miARN (SEQ ID N.º: 1-21) y la tabla 5 indica qué SEQ ID N.º corresponde a la secuencia madura o mimética de un miARN (SEQ ID N.º: 22-52). La tabla 6 identifica las secuencias de ADN clonadas en el vector lentiviral (SEQ ID N.º: 53-60 que se usaron en el cribado funcional como se describe en los ejemplos. Las tablas 5 y 7 identifican las secuencias semilla preferidas (como SEQ ID N.º: 348-378, 61-115 y 379-381) de cada uno de los miARN maduros de la tabla 5. El nombre del miARN se abrevia frecuentemente y se hace referida a él sin el prefijo y se entenderá como tal, dependiendo del contexto. A menos que se indique lo contrario, los miARN a los que se hace referencia en la solicitud son secuencias humanas identificadas como mir-X o let-X, donde X es un número y/o letra.

[0130] Se entiende que un miARN se deriva de secuencias genómicas o un gen no codificante. En este aspecto, el término "gen" se usa para simplicidad para referirse a la secuencia genómica que codifica el miARN precursor para un miARN determinado. Sin embargo, formas de realización de la invención pueden implicar secuencias genómicas de un miARN que se implican en su expresión, tales como una promotora u otras secuencias reguladoras.

[0131] El término "recombinante" se puede utilizar y este generalmente se refiere a una molécula que ha sido manipulada *in vitro* o que es el producto replicado o expresado de tal molécula.

[0132] El término "ácido nucleico" es muy conocido en la técnica. Un "ácido nucleico" como se utiliza en este documento se referirá generalmente a una molécula (una o más cadenas) de ADN, ARN o un derivado o análogo de la misma, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o de pirimidina de origen natural encontrada en ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). El término "ácido nucleico" incluye los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico".

[0133] El término "miARN" generalmente se refiere a una molécula monocatenaria, pero en formas de realización específicas, moléculas implementadas en la invención también incluirán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre 10 y 50 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente (más del 50 %, pero menos del 100 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena) o completamente complementaria a otra región de la misma molécula monocatenaria o a otro ácido nucleico. Así, los ácidos nucleicos pueden incluir una molécula que comprende una o más cadena(s) o complemento(s) complementarios o autocomplementarios de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el miARN precursor puede tener una región autocomplementaria, que es hasta 100 % complementaria.

[0134] Como se utiliza en este documento, "hibridación", "hibrida" o "capaz de hibridar" se entiende que significa la formación de una molécula bicatenaria o tricatenaria o una molécula con naturaleza parcial bicatenaria o tricatenaria usando técnicas conocidas para la persona experta tales como procedimientos de transferencia de Southern. El término "recocer" como se utiliza en este documento es sinónimo de "hibridar". El término "hibridación", "hibrida(n)" o "capaz de hibridar" puede significar condiciones de "baja", "media" o "alta" hibridación tal y como se define a continuación.

Condiciones de baja a media a alta astringencia significa prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 pg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y o 25 %, 35 % o 50 % de formamida para de baja a media a alta astringencias respectivamente. Posteriormente, la reacción de hibridación se lava tres veces durante 30 minutos cada una utilizando 2XSSC, 0,2 % de SDS y o 55 °C, 65 °C o 75 °C para de baja a media a alta astringencias.

[0135] Los ácidos nucleicos o derivados de los mismos de la invención comprenderán, en algunas formas de realización, la secuencia de miARN de cualquier miARN descrito en las SEQ ID N.º: 22-52 o se describen en las SEQ ID N.º: 116-304 y 382-396. Se contempla que las secuencias de ácidos nucleicos de la invención derivadas de las SEQ ID N.º: 22-52 y/o 116-304 y/o 382-396 pueden tener, tener al menos, o tener como mucho 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 nucleótidos contiguos de las SEQ ID N.º: 22-52 o 116-304 o 382-396 (o cualquier rango derivable). En otras formas de realización, los ácidos nucleicos son, son al menos, o son como mucho 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % idénticos a la secuencia de miARN de las SEQ ID N.º: 22-52 o 116-304 o 382-396 o a la secuencia del precursor de cualquiera de las SEQ ID N.º: 1-21 o 53-60 o cualquier combinación o rango derivable de las mismas.

Nucleobases

[0136] Como se utiliza en este documento, una "nucleobase" se refiere a una base heterocíclica, tal como, por ejemplo, una nucleobase de origen natural (es decir, una A, T, G, C o U) encontrada en al menos un ácido nucleico de origen natural (es decir, ADN y ARN), y derivado(s) y análogos de origen natural o no natural de tal nucleobase. Una nucleobase generalmente puede formar uno o más enlaces de hidrógeno ("se recucece" o "hibrida") con al menos una nucleobase de origen natural de una manera que puede sustituir una pareja de nucleobases de origen natural (por ejemplo, la unión de hidrógeno entre A y T, G y C, y A y U).

[0137] La(s) nucleobase(s) de "purina" y/o de "pirimidina" incluye(n) nucleobases de purina y/o de pirimidina de origen natural y también derivado(s) y análogo(s) de las mismas, entre los que se incluyen, pero de forma no limitativa, una purina o pirimidina sustituida por una fracción o más de un alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (es decir, flúor, cloro, bromo o yodo), tiol o alquiltiol. Las fracciones preferidas de alquilo (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, a aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos no limitativos de una purina o pirimidina incluyen una deazapurina, una 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, una 8-cloroguanina, una bromotimina, un 8-aminoguanina, una 8-hidroxiguanina, una 8-metilguanina, una 8-tioguanina, una azaguanina, una 2-aminopurina, una 5-etilcitosina, un 5-metilcitosina, un 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-yodouracilo, un 5-clorouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una N,N-dimetiladenina, una azaadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiaminopurina, una 6-tiopurina, una 4-(6- aminohexil/citosina), y similares. Otros ejemplos son bien conocidos para los expertos en la técnica.

[0138] Una nucleobase se puede comprender en un nucleósido o nucleótido, utilizando cualquier sustancia química o método de síntesis natural descrito en este documento o conocido para un experto en la materia. Tal nucleobase se puede marcar o puede ser parte de una molécula que se etiqueta y contiene la nucleobase.

Nucleósidos

[0139] Como se utiliza en este documento, un "nucleósido" se refiere a una unidad química individual que comprende una nucleobase fijada de manera covalente a una fracción enlazadora de nucleobase. Un ejemplo no limitativo de una "fracción enlazadora de nucleobase" es un azúcar que comprende 5 átomos de carbono (es decir, un "azúcar de 5 carbonos"), entre los que se incluye, pero de forma no limitativa, una desoxirribosa, una ribosa, una arabinosa o un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos. Ejemplos no limitativos de un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos incluyen una 2'-fluoro-2'-desoxirribosa o un azúcar carbocíclico donde un carbono se sustituye por un átomo de oxígeno en el anillo del azúcar.

[0140] Los diferentes tipos de fijación (fijaciones) covalente(s) de una nucleobase a una fracción enlazadora de nucleobase se conocen en la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, un nucleósido que comprende una purina (es decir, A o G) o una nucleobase de 7-deazapurina típicamente fija de manera covalente la posición 9 de una purina o una 7-deazapurina a la posición 1' de un azúcar de 5 carbonos. En otro ejemplo no limitativo, un nucleósido que comprende una nucleobase de pirimidina (es decir, C, T o U) típicamente fija de manera covalente una posición 1 de una pirimidina a una posición 1' de un azúcar de 5 carbonos (Kornberg y Baker, 1992).

Nucleótidos

[0141] Como se utiliza en este documento, un "nucleótido" se refiere a un nucleósido que comprende además una "fracción de esqueleto". Una fracción de esqueleto generalmente fija de manera covalente un nucleótido a otra molécula que comprende un nucleótido, o a otro nucleótido para formar un ácido nucleico. La "fracción de esqueleto" en nucleótidos de origen natural típicamente comprende una fracción de fósforo, que se fija de manera covalente a un azúcar de 5 carbonos. La fijación de la fracción de esqueleto ocurre típicamente en la posición 3' o 5' del azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, otros tipos de fijaciones se conocen en la técnica, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de un azúcar de 5 carbonos de origen natural o fracción de fósforo.

Análogos de ácido nucleico

[0142] Un ácido nucleico puede comprender, o estar compuesto totalmente de, un derivado o análogo de una nucleobase, una fracción enlazadora de nucleobase y/o fracción de esqueleto que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. ARN con análogos de ácido nucleico también se puede marcar según métodos de la invención. Como se utiliza en este caso, un "derivado" se refiere a una forma modificada o alterada químicamente de una molécula de origen natural, mientras que los términos "mimético" o "análogo" se refieren a una molécula que puede o no parecer estructuralmente una molécula o fracción de origen natural, pero que posee funciones similares. Como se utiliza en este documento, una "fracción" generalmente se refiere a un componente químico o molecular menor de una estructura química o molecular mayor. Los análogos y derivados de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos son muy conocidos en la técnica y han sido descritos (véase, por ejemplo, Scheit, 1980).

[0143] Ejemplos no limitativos adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que comprenden azúcar de 5 carbonos y/o derivados o análogos de fracción de esqueleto, incluyen aquellos en: patente de EE.UU. nº 5,681,947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina con los que forman hélices triples y/o previenen expresión de ADNbc; patentes de EE.UU. 5,652,099 y 5,763,167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos fluorescentes de nucleósidos encontrados en ADN o ARN, particularmente para el uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; patente de EE.UU. 5,614,617, que describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen estabilidad a nucleasa mejorada; patentes de EE.UU. 5,670,663, 5,872,232 y 5,859,221, que describen análogos de oligonucleótidos con azúcares modificados de 5 carbonos (es decir, fracciones de T-desoxifuranosilo modificadas) usados en la detección de ácidos nucleicos; patente de EE.UU. 5,446,137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una fracción de azúcar de 5 carbonos sustituida en la posición 4' con un sustituyente diferente del hidrógeno que se pueda usar en los ensayos de hibridación; patente de EE.UU. 5,886,165, que describe oligonucleótidos con ambos desoxirribonucleótidos con enlaces internucleótidos 3'-5' y ribonucleótidos con enlaces internucleótidos 2'-5'; patente de EE.UU. 5,714,606, que describe un enlace internucleótido modificado donde un oxígeno en la posición 3' del enlace internucleótido se sustituye por un carbono para mejorar la resistencia a nucleasa de los ácidos nucleicos; patente de EE.UU. 5,672,697, que describe oligonucleótidos que contienen uno o más enlaces internucleótidos 5' de fosfonato de metileno que mejoran la resistencia a nucleasa; patentes de EE.UU. 5,466,786 y 5,792,847, que describen el enlace de una fracción sustituyente que puede comprender un fármaco o marca en el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar estabilidad a nucleasa mejorada y capacidad para administrar fármacos o fracciones de detección; patente de EE.UU. 5,223,618, que describe análogos de oligonucleótidos con un enlace de esqueleto de carbono 2' o 3' que fija la posición 4' y la posición 3' de la fracción de azúcar de 5 carbonos adyacente para mejorar la absorción celular, resistencia a nucleasa e hibridación al ARN objetivo; patente de EE.UU. 5,470,967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un enlace internucleótido de sulfamato o sulfamida que son útiles como sonda de hibridación de ácidos nucleicos; patentes de EE.UU. 5,378,825, 5,777,092, 5,623,070, 5,610,289 y 5,602,240, que describen oligonucleótidos con tres o cuatro fracciones enlazadoras de átomos que sustituyen una fracción de esqueleto fosforodiéster para mejorar la resistencia a nucleasa, la absorción celular y regular la expresión de ARN; patente de EE.UU. 5,858,988, que describe agente portador hidrofóbico fijado a la posición 2'-O de oligonucleótidos para mejorar la permeabilidad y estabilidad de su membrana; patente de EE.UU. 5,214,136, que describe oligonucleótidos conjugados a antraquinona en el terminal 5' que posee hibridación mejorada a ADN o ARN; estabilidad mejorada a nucleasas; patente de EE.UU. 5,700,922, que describe quimeras PNA-ADN-PNA donde el ADN comprende nucleótidos de 2'-desoxi-eritropentofuranosil para resistencia a nucleasa, afinidad de enlace y capacidad para activar RNasa H mejoradas; y WO98/39352, WO99/14226, WO2003/95467 y WO2007/085485, que describen nucleótidos de ARN modificado cuya fracción de ribosa se modifica con un puente extra que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. La ribosa bloqueada aumenta significativamente la afinidad de enlace y la especificidad; y WO2008/147824, que describe nucleótidos de ARN modificado denominados UNA (ácido nucleico desbloqueado). Los UNA son análogos acíclicos de ARN donde el enlace entre los átomos C2' y C3' se ha escindido, reduciendo la afinidad de enlace hacia una cadena complementaria. Los UNA son compatibles con reconocimiento de RNasa H y escisión de ARN y mejoran el silenciamiento génico mediado de ARNip; WO2008/036127, que describe análogos de ácidos nucleicos de morfolino, que contienen tanto enlaces de intersubunidad sin carga como catiónicos; WO/2007/069092 y EP2075342 que describen ácidos nucleicos de cremallera (ZNA), que contienen conjugación de derivados de espermina como fracciones catiónicas (unidades Z) a un oligonucleótido; patente de EE.UU. 5,708,154, que describe ARN enlazado a un ADN para formar un híbrido ADN-ARN; patente de EE.UU. 5,728,525, que describe el marcado de análogos de nucleósidos con una marca fluorescente universal.

[0144] Enseñanzas adicionales para análogos de nucleósidos y análogos de ácidos nucleicos son la patente de EE.UU. 5,728,525, que describe análogos de nucleósidos que están marcados en un extremo; patente de EE.UU. 5,637,683, 6,251,666 (sustituciones de L-nucleótidos), y 5,480,980 (nucleótidos de 7-deaza- 2'-desoxiguanosina y análogos de ácidos nucleicos de los mismos).

[0145] El uso de otros análogos se contempla específicamente para el uso en el contexto de la presente invención. Tales análogos se pueden utilizar en moléculas de ácido nucleico sintético de la invención, tanto en toda la molécula o en nucleótidos seleccionados. Estos incluyen, pero de forma no limitativa,

- 1) modificaciones de ribosa (tales como 2' F, 2' NH₂, 2' N₃, 4' tio, o 2' O-CH₃) y
- 2) modificaciones de fosfato (tales como las que se encuentran en fosforotioatos, fosfonatos de metilo y fosforoboratos).

Tales análogos se han creado para conferir estabilidad en los ARN reduciendo o eliminando su capacidad de ser escindidos por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en los ARN, pueden tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de los ARN en animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos se puede usar solo o conjuntamente con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético para cualquier ácido nucleico de la invención.

Nucleótidos modificados

[0146] Los miARN de la invención contemplan específicamente el uso de nucleótidos que se modifican para mejorar sus actividades. Tales nucleótidos incluyen aquellos que están en el terminal 5' o 3' del ARN al igual que aquellos que están internos en la molécula. Los nucleótidos modificados usados en las cadenas complementarias de dichos miARN o bien bloquean el 5' OH o fosfato del ARN o bien introducen modificaciones de azúcar internas que mejoran la absorción de la cadena activa del miARN. Las modificaciones para los miARN incluyen modificaciones de azúcar internas que mejoran la hibridación al igual que estabilizan las moléculas en células y modificaciones terminales que estabilizan adicionalmente los ácidos nucleicos en células. Además, se contemplan modificaciones que se pueden detectar por microscopía u otros métodos para identificar células que contienen los miARN sintéticos.

Preparación de ácidos nucleicos

[0147] Un ácido nucleico puede hacerse mediante cualquier técnica conocida para un experto en la materia, tal como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Aunque los miARN según la invención podrían producirse utilizando métodos recombinantes, se prefiere producir los miARN por síntesis química o producción enzimática. Los miARN se pueden producir mediante una serie de métodos, que incluyen métodos que implican tecnología del ADN recombinante.

[0148] La síntesis de ácidos nucleicos se realiza según métodos estándar. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la patente de EE.UU. 4,704,362, patente de EE.UU. 5,221,619 y patente de EE.UU. 5,583,013 describen cada una varios métodos de preparación de ácidos nucleicos. Ejemplos no limitativos de un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido), incluyen un ácido nucleico hecho por síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas de fase sólida tal como se describe en EP 266,032, o vía intermediarios de desoxinucleósido H fosfonato como se describe por Froehler *et al.*, 1986 y patente de EE.UU. n.º de serie 5,705,629.

En los métodos de la presente invención, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos. Varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos se han divulgado en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4,659,774, 4,816,571, 5,141,813, 5,264,566, 4,959,463, 5,428,148, 5,554,744, 5,574,146, 5,602,24.

[0149] Un ejemplo no limitativo de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR^(TM) (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 4,683,202 y patente de EE.UU. 4,682,195), o la síntesis de un oligonucleótido descrita en la patente de EE.UU. N.º 5,645,897.

[0150] La síntesis de oligonucleótidos es muy conocida para aquellos expertos en la técnica. Varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos se han descrito en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4,659,774, 4,816,571, 5,141,813, 5,264,566, 4,959,463, 5,428,148, 5,554,744, 5,574,146, 5,602,244. Básicamente, la síntesis química se puede conseguir por el método del diéster, el método del triéster, el método de la fosforilasa de polinucleótidos y por química de fase sólida. Estos métodos se discuten con más detalle a continuación.

Método del diéster

[0151] El método del diéster fue el primero en desarrollarse a un estado utilizable, principalmente por Khorana y compañeros de trabajo. (Khorana, 1979). El paso básico es la unión de dos desoxinucleótidos adecuadamente protegidos para formar un didesoxinucleótido con un enlace fosfodiéster. El método del diéster está bien establecido y se ha usado para sintetizar moléculas de ADN (Khorana, 1979).

Método del triéster

[0152] La diferencia principal entre los métodos del diéster y del triéster es la presencia en el último de un grupo protector extra en los átomos de fosfato de los reactivos y productos (Itakura *et al.*, 1975). El grupo protector de fosfato es normalmente un grupo clorofenilo, que hace los nucleótidos y los intermediarios del polinucleótido solubles en solventes orgánicos. Por lo tanto, se hacen purificaciones en las soluciones de cloroformo. Otras mejoras en el método incluyen (i) el acoplamiento en bloque de trómeros y oligómeros más grandes, (ii) el uso extenso de cromatografía en fase líquida de alto rendimiento para la purificación de tanto los productos intermedios como los finales, y (iii) síntesis de fase sólida.

Método de polinucleótido fosforilasa.

[0153] Este es un método enzimático de síntesis de ADN que puede utilizarse para sintetizar muchos oligonucleótidos útiles (Gillam *et al.*, 1978; Gillam *et al.*, 1979). Bajo condiciones controladas, el polinucleótido fosforilasa añade predominantemente un nucleótido único a un oligonucleótido corto.

[0154] La purificación cromatográfica permite que se obtenga el aducto único deseado. Al menos un trómero se requiere para iniciar el procedimiento y este cebador debe obtenerse por algún otro método. El método del polinucleótido fosforilasa funciona y tiene la ventaja de que los procedimientos implicados son familiares para la mayoría de bioquímicos.

Métodos de fase sólida.

[0155] Basándose en la tecnología desarrollada para la síntesis de fase sólida de polipéptidos, ha sido posible fijar el nucleótido inicial al material de soporte sólido y proceder con la adición gradual de nucleótidos. Todos los pasos de mezcla y de lavado se simplifican y el procedimiento se vuelve susceptible de automatización. Estas síntesis se realizan ahora rutinariamente utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos.

[0156] La química de fosforamidita (Beaucage y Lyer, 1992) se ha convertido claramente en la química de acoplamiento más ampliamente usada para la síntesis de oligonucleótidos. Como ya conocen aquellos expertos en la técnica, la síntesis de fosforamidita de oligonucleótidos implica la activación de precursores de monómero de nucleósido fosforamidita por reacción con un agente de activación para formar intermediarios activados, seguido de adición secuencial de los intermediarios activados a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento (generalmente anclados en un extremo a un soporte sólido adecuado) para formar el producto oligonucleótido.

Métodos recombinantes

[0157] Los métodos recombinantes para producir ácidos nucleicos en una célula son muy conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen el uso de vectores, plásmidos, cósmidos y otros vehículos para la administración de un ácido nucleico a una célula, que puede ser la célula objetivo o sencillamente una célula huésped (para producir grandes cantidades de la molécula de ARN deseada). Alternativamente, tales vehículos se pueden usar en el contexto de un sistema libre celular mientras que los reactivos para generar la molécula de ARN estén presentes. Tales métodos incluyen aquellos descritos en Sambrook, 2003, Sambrook, 2001 y Sambrook, 1989. En algunas formas de realización, la presente invención concierne moléculas de ácido nucleico que no son sintéticas. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura química de un ácido nucleico de origen natural y una secuencia de ácido nucleico de origen natural, como la secuencia exacta y total de un miARN primario monocatenario (véase Lee 2002), un miARN precursor monocatenario, o un miARN maduro monocatenario. Además del uso de tecnología recombinante, tales ácidos nucleicos no sintéticos se pueden generar químicamente, tal como empleando tecnología usada para la creación de oligonucleótidos.

Diseño de miARN

[0158] Los miARN típicamente comprenden dos cadenas, una cadena activa que es idéntica en secuencia al miARN maduro que se está estudiando y una cadena complementaria que es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. La cadena activa es la molécula relevante biológicamente y debería ser absorbida preferentemente por el complejo en células que modulan la traducción bien a través de la degradación del ARNm o bien por control traslacional. La absorción preferencial de la cadena activa tiene dos resultados profundos: (1) la actividad observada de dicho miARN aumenta espectacularmente y (2) los efectos desintencionados inducidos por la absorción y la activación de la cadena complementaria se eliminan esencialmente. Según la invención, diferentes diseños de miARN pueden utilizarse para asegurar la absorción preferencial de la cadena activa.

Agente de bloqueo 5'

[0159] La introducción de una fracción estable diferente del fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria afecta a su actividad en la vía del miARN. Esto asegura que solo se usará la cadena activa del miARN para regular la traducción en la célula. Las modificaciones en 5' incluyen, pero de forma no limitativa, NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetílico, 2' O-Me, DMT0, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad.

[0160] Otras modificaciones de cadena sentido. La introducción de modificaciones de nucleótidos como 2'-O Me, 2'-desoxi, T-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), o 2'-O-N-metilacetamida (2'-O-NMA), NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetílico, DMT0, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad en la cadena complementaria del miARN puede eliminar la actividad de la cadena complementaria y mejorar la absorción de la cadena activa del miARN.

[0161] Desapareamientos de bases en la cadena sentido. Como con los ARNip (Schwarz 2003), la estabilidad relativa de los extremos 5' y 3' de la cadena activa del miARN determina aparentemente la absorción y la activación de la activa por la vía del miARN. La desestabilización del extremo 5' de la cadena activa del miARN

mediante la colocación estratégica de desapareamientos de bases en el extremo 3' de la cadena complementaria del miARN sintético mejora la actividad de la cadena activa y elimina esencialmente la actividad de la cadena complementaria.

5 Células huésped y células objetivo

[0162] Las células donde se introduce un miARN o fuente del mismo o donde se evalúa la presencia de un miARN se pueden derivar de o estar contenidas en cualquier organismo. Preferiblemente, la célula es una célula de vertebrado. Más preferiblemente, la célula es una célula mamífera. Aún más preferiblemente, la célula es una

célula humana. Una célula mamífera puede ser de la línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, divisora o no divisora, de epitelio, inmortalizada o transformada, o similares. La célula puede ser una célula no diferenciada, tal como una célula madre, o una célula diferenciada, tal como de una célula de un órgano o tejido. Alternativamente, las células se pueden cualificar como células endoteliales o epiteliales, células estromales, de cerebro, de mama, de

cérvix, de colon, de tracto gastrointestinal, de corazón, de riñón, de intestino de grueso, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de corazón, de próstata, de vejiga, de intestino delgado, de estómago, de testículos o de útero. [0163] Como se utilizan en este documento, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se pueden utilizar de forma intercambiable. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es cualquiera y la totalidad de las generaciones posteriores formadas por división celular. Se entiende que toda progenie no puede ser idéntica debido a mutaciones intencionadas o involuntarias. Una célula huésped puede ser "transfectada" o "transformada", lo que se refiere a un proceso por el cual ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula del sujeto primaria y su progenie. Como se utilizan en este documento, los términos células "diseñadas" o "recombinantes" o células huésped se destinan para referirse a una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácidos nucleicos exógenos, tales como, por ejemplo, un pequeño ARN interferente o un constructo modelo que codifica un gen reportero. Por lo tanto, las células recombinantes se diferencian de las células de origen natural que no contienen un ácido nucleico recombinantemente introducido.

[0164] Un tejido puede comprender una célula huésped o células para ser transformadas o contactadas con una composición de administración de ácido nucleico y/o un agente adicional. El tejido puede ser parte de un organismo o ser independiente. En algunas formas de realización, un tejido y sus células constituyentes pueden comprender, pero de forma no limitativa, cerebro, células madre, hígado, pulmón, hueso, mama, cérvix, colon, endometrio, epitelio, esófago, células caliciformes, riñón, ovarios, páncreas, próstata, vejiga, piel, intestino delgado, estómago, testículos, corazón, vaso sanguíneo.

[0165] En algunas formas de realización, la célula huésped o tejido se puede comprender en al menos un organismo. En algunas formas de realización, el organismo puede ser un mamífero, un humano, un primate o murino. Un experto en la técnica entendería además las condiciones bajo las cuales se deben incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y para permitir su división para formar progenie.

Métodos de administración

[0166] La presente invención implica en algunas formas de realización la administración de un ácido nucleico a una célula. Esto se puede realizar como parte de un método de cribado, o se puede relacionar con una aplicación terapéutica o de diagnóstico.

Las moléculas de ARN se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que una secuencia de ácido nucleico se puede insertar para la introducción en una célula donde se pueda replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es foránea a la célula en la que el vector se introduce o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que no se encuentra habitualmente la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófago, virus animales, lentivirus y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar, que se describen en Sambrook *et al*, 1989 y Ausubel *et al*, 1996. Además de codificar un polipéptido modificado tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tales como una etiqueta o molécula de dirección a objetivo. Una molécula de dirección a objetivo es una que dirige el ácido nucleico deseado a un órgano, tejido, célula u otra ubicación particular en el cuerpo de un sujeto.

[0167] El término "vector de expresión" se refiere a un vector con una secuencia de ácido nucleico codificante para al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante enlazada operativamente en un organismo huésped particular.

Además de las secuencias de control que rigen la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras funciones también y que se describen.

[0168] Hay una serie de maneras en las que se pueden introducir vectores de expresión en células. En algunas formas de realización de la invención, el vector de expresión comprende un virus o vector diseñado derivado a partir de un genoma vírico. La capacidad de ciertos virus para introducir células vía endocitosis mediada por receptor, para integrarse en el genoma de la célula huésped y para expresar genes víricos de forma estable y eficaz, ha hecho de ellos candidatos atractivos para la transferencia de genes foráneos en células mamíferas (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores génicos fueron virus de ADN, que incluyen los papovavirus (virus de simio 40, virus del papiloma bovino y polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Tienen una capacidad relativamente baja para secuencias de ADN foráneas y tienen un espectro de huéspedes restringido. Además, su potencial oncogénico y efectos citopáticos en células permisivas suscitan cuestiones de seguridad. Pueden alojar solo hasta 8 kb de material genético foráneo, pero se pueden introducir fácilmente en una variedad de líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986). Los vectores de expresión pueden contener un casete de expresión de ARNi que comprende un promotor y una o más estructuras de tallo-bucle separadas por una o más regiones separadoras (WO2006/084209).

Otra manera de introducir vectores de expresión en células, usando proteínas de fusión de avidina, se describe en US 6,287,792.

[0169] Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenario caracterizado por una capacidad para convertir su ARN a ADN bicatenario en células infectadas; también se pueden usar como vectores. Otros vectores virales se pueden emplear como constructos de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como virus vacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus adeno-asociado (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984), lentivirus (WO2008/071959, WO2004/054512), virus hemaglutinante de Japón (WO2004/035779), baculovirus (WO2006/048662) y herpesvirus. Ellos ofrecen diversas características atractivas para varias células mamíferas (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

[0170] Se cree que otros métodos adecuados para la administración de ácido nucleico para afectar la expresión de composiciones de la presente invención incluyen prácticamente cualquier método por el cual un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, que incluye vectores víricos y no víricos) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en este documento o como sería conocido para un experto en la técnica. Tales métodos incluyen, pero de forma no limitativa, administración directa de ADN tal como por inyección (patentes de EE.UU. N.º. 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 y 5,580,859), que incluye microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; patente de EE.UU. N.º 5,789,215); por electroporación (patente de EE.UU. N.º 5,384,253); por precipitación de fosfato cálcico (Graham y van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando dextrano DEAE seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfección mediada por liposoma (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991); por internalización fotoquímica (WO2008/007073); por bombardeo de microproyectiles (solicitud PCT N.º. WO 94/09699 y 95/06128; patente de EE.UU. N.º. 5,610,042, 5,322,783 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 y 5,538,880); por agitación con fibras de carburo de silicón (Kaeppeler *et al.*, 1990; patentes de EE.UU. N.º. 5,302,523 y 5,464,765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de EE.UU. N.º 5,591,616 y 5,563,055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh *et al.*, 1993; patentes de EE.UU. N.º 4,684,611 y 4,952,500); por absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985). Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, el (los) orgánulo(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s) se puede(n) transformar de forma estable o transitoriamente.

[0171] Una revisión proporciona diferentes maneras de formular una molécula de ARN para optimizar su internalización en una célula (Kim SS., *et al.*, Trends Mol. Med., 2009, 15: 491-500). Las siguientes otras publicaciones divulgan maneras alternativas de formular una molécula de ARN para mejorar su internalización en una célula: WO 2007/095152, que describe el uso de PTD-DRBD (dominios de transducción de péptidos enlazados a dominio de unión bicatenario) para la administración de oligonucleótidos, WO 2009/086558, que describe el uso de partículas SNALP (partículas de lípido de ácido nucleico estable), que comprende una mezcla de lípidos catiónicos y fusogénicos que habilitan la absorción celular y la liberación endosomal de la carga útil del ácido nucleico de la partícula, WO 2009/149418, que describe emulsiones de ARNi de aceite de fosfolípido, WO 2007/121947, que describe el uso de un vehículo de administración basado en lipoplex, WO 2009/132131, que describe el uso de nuevos lípidos y partículas de lípido de ácido nucleico que proporcionan encapsulación eficaz y administración eficaz del ácido nucleico encapsulado a las células, WO2004/091578 y WO2004/064805 que describen tecnología coclear de alternancia de lípidos que giran en espiral alrededor de una molécula de ácido nucleico, WO2003/047494 y WO2003/047493 que describen micelas inversas que incorporan ácidos nucleicos para administración oral y mucosa, WO 2008/156702, que describe bacterias y partícula terapéutica bacteriana

(BTP), que incluyen oligonucleótidos como vehículo de administración a las células. Cada una de las formulaciones referidas o descritas en estas publicaciones se incluye en la presente invención.

[0172] Una variedad de compuestos se han unido a los extremos de los oligonucleótidos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Se ha descubierto que los péptidos señal cortos encontrados en la proteína HIV TAT, HSV VP22, *Drosophila antennapedia*, y otras proteínas habilitan la rápida transferencia de biomoléculas a través de las membranas (revisado por Schwarze 2000). Estos péptidos señal, referidos como dominios de transducción de proteína (PTD), se han fijado a oligonucleótidos para facilitar su administración en células cultivadas (Eguchi A, Dowdy SF, Trends Pharmacol Sci., 2009,7:341-5). Los colesterol se han conjugado a oligonucleótidos para mejorar su absorción en células en animales (MacKellar 1992). Los grupos de colesterol terminales aparentemente interactúan con receptores o lípidos en las superficies de las células y facilitan la internalización de los oligonucleótidos modificados.

Asimismo, la poli-L-lisina se ha conjugado a oligonucleótidos para reducir la carga negativa neta y mejorar la absorción en células (Leonetti 1990).

[0173] Se ha desarrollado una variedad de compuestos que forman complejos con ácidos nucleicos, los administran a superficies de células, y facilitan su absorción y liberación de los endosomas. Entre ellos están: (1) una variedad de lípidos tales como DOTAP (u otro lípido catiónico), DDAB, DHDEAB y DOPE y (2) polímeros no basados en lípidos como polietilenimina, poliamidoamina, y dendrímeros de estos y otros polímeros. En algunas de estas formas de realización se emplea una combinación de lípidos tales como DOTAP y colesterol o un derivado de colesterol (patente de EE.UU. 6,770,291). Se ha mostrado que diversos de estos reactivos facilitan la absorción de ácido nucleico en animales.

[0174] Los componentes celulares implicados en la vía del miARN se están volviendo conocidos. Las proteínas que estabilizan y/o transportan miARN dentro de células pueden mejorar la estabilidad y la actividad de los miARN porque deberían proteger y guiar los miARN unidos una vez que están en las células. Las mezclas de proteínas transportadoras de miARN y miARN podrían mejorar la eficacia de terapéuticos basados en miARN. Los ARN son moléculas hidrofílicas en virtud de su fosfato aniónico y su esqueleto de azúcar. Aunque las nucleobases son hidrofóbicas, la hidrofiliidad predomina debido a la unión de hidrógeno extensa resultante del fosfato y residuos de azúcar. El carácter hidrofílico y el esqueleto aniónico reducen la permeación celular. Se ha mostrado que la conjugación de grupos lipofílicos como colesterol (Manoharan; 2002) y derivados de ácido láurico y litocólico con funcionalidad de C32 (Lorenz *et al*, 2004) mejora la absorción celular. Además, la unión de oligonucleótidos conjugados esteroides a diferentes lipoproteínas en el flujo sanguíneo, tales como LDL, protege su integridad y rige su biodistribución (Rump *et al*, 2000). También se ha mostrado que el colesterol fijado a moléculas antisentido (Bijsterbosch *et al*, 2001) y aptámeros (Rusconi *et al*, 2004) estabiliza los oligonucleótidos permitiendo la unión a lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol mejora la absorción y la estabilidad del suero de ARN *in vitro* (Lorenz *et al*, 2004) e *in vivo* (Soutschek *et al*, 2004). Adicionalmente, una serie de pequeñas moléculas como SB-435495 (Blackie *et al*, (2002), isradipina (Oravcova *et al*, 1994), amlodipino (Oravcova *et al*, 1994) y 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo (Borlakoglu *et al*, 1990) podrían mejorar la absorción celular y mejorar la resistencia a nucleasa promocionando la asociación de lipoproteínas.

Cribado con bibliotecas de miARN

[0175] Como se usa en la solicitud de patente, el cribado es un proceso donde múltiples reactivos específicos de miARN se administran separadamente en poblaciones de células individuales o animales. En uno o más momentos de tiempo designados después de la administración, las poblaciones de células o animales se evalúan para uno o más fenotipos. Aquellas células o animales que tienen un fenotipo significativamente diferente del de las células o animales en el grupo de control negativo se clasifican como positivas. El miARN que se manipula en la muestra se define como un impacto. Los impactos representan objetivos para investigación adicional y desarrollo terapéutico potencial.

[0176] En algunas formas de realización, hay un proceso multifase de cribado, en algunas formas de realización, hay cuatro pasos generales:

(1) Desarrollar el ensayo cuantitativo para controlar el proceso celular que se está estudiado.

[0177] Los ensayos que miden la intensidad de un fenotipo celular varían de ensayos microscópicos que controlan el tamaño celular, el estado de ciclo celular, la coloración con anticuerpo a ensayos enzimáticos que valoran la producción de un sustrato específico en un lisado celular para mediciones directas de biomoléculas o moléculas pequeñas en lisados, en células o en el medio.

[0178] Resulta crítico para el éxito de un cribado crear un ensayo que mida realmente el fenotipo celular y maximice la proporción de señal y ruido del ensayo. Maximizar la proporción señal y ruido implica ensayar variables como tiempo de ensayo, componentes de ensayo, tipo celular y duración de tiempo entre transfección y ensayo. Cuanto mayor sea la diferencia en los resultados del ensayo entre un fenotipo positivo y un fenotipo de

control negativo, mayor será la extensión en los resultados de selección y mejor será la oportunidad de identificar genes interesantes. Existen métodos de cribado alternativos que usan infección por lotes.

(2) Optimizar las condiciones de transfección para las células deseadas.

[0179] La primera fase de este proceso es identificar un reactivo de transfección y condiciones de revestimiento que maximizan la absorción de miARN sintéticos mientras se mantiene viabilidad celular alta. Encontramos útil ensayar 2-5 reactivos de transfección diferentes cuando se usan líneas celulares o 5-10 condiciones de electroporación cuando se usan células primarias o en suspensión. La transfección se puede optimizar para el reactivo o condición de electroporación que mejor trabajó entre las condiciones evaluadas. El cribado de bibliotecas específicas de miARN requiere condiciones para transfección de alto rendimiento. En este tipo de cribado, se usó la introducción lentiviral en vez de transfección. Esto puede requerir técnicas de optimización alternativas.

(3) Cribado

[0180] Una vez que el ensayo y proceso de transfección se han desarrollado, una biblioteca de miARN sintéticos o miARN expresados por virus se puede introducir consecutivamente en células en una placa de 24 o 96 pocillos. Transfecciones duplicadas o triplicadas para cada reactivo proporcionan datos suficientes para análisis estadístico razonable. El ensayo de MTS como se realiza en la parte experimental es un ejemplo de tal cribado.

(4) Validar impactos

[0181] Validar un impacto implica demostrar que el fenotipo observado se debe al miARN que se tiene como objetivo.

Los impactos se confirman típicamente entregando una serie de diluciones del inhibidor de miARN o miARN sintético que se registró como un impacto en la célula que se evaluó originalmente. La confirmación es ligeramente diferente de la validación. La confirmación es una repetición del fenotipo inducido por miARN, mientras que la validación puede también incluir inversión del fenotipo mediante oposición al fenotipo mediado por miARN.

Etiquetado y técnicas de etiquetado

[0182] En algunas formas de realización, la presente invención concierne a miARN que están etiquetados, tales como para ensayos de cribado para evaluar la relevancia terapéutica o de diagnóstico de unas especies de miARN particulares. Se contempla que el miARN puede primero aislarse (bien a partir de una célula donde el miARN es endógeno a la célula o bien a partir de una célula donde el miARN es exógeno a la célula) y/o purificarse antes del etiquetado. Esto puede conseguir una reacción que etiqueta más eficazmente el miARN, a diferencia de otro ARN en una muestra donde el miARN no se aísla o purifica antes del etiquetado. En muchas formas de realización de la invención, la etiqueta es no radioactiva. Generalmente, los ácidos nucleicos se pueden etiquetar añadiendo nucleótidos etiquetados (proceso de fase única) o añadiendo nucleótidos y etiquetando los nucleótidos adicionados (proceso de dos etapas).

[0183] Además, los miARN se pueden etiquetar como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 60/649,584. Tales nucleótidos incluyen aquellos que pueden etiquetarse con un colorante, con un colorante fluorescente, o con una molécula tal como biotina. Los nucleótidos marcados están fácilmente disponibles; se pueden adquirir comercialmente o se pueden sintetizar por reacciones conocidas para los expertos en la técnica.

Nucleótidos para etiquetado

[0184] Los nucleótidos para etiquetado no son nucleótidos de origen natural, pero en cambio, se refieren a nucleótidos preparados que tienen una fracción reactiva en ellos. Las funcionalidades reactivas específicas de interés incluyen: grupo amino, sulfhidrilo, sulfoxilo, aminosulfhidrilo, azida, epóxido, isotiocianato, isocianato, anhídrido, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina sustituida con mono o dihalógeno, diazina mono o disustituída, maleimida, epóxido, aziridina, haluro de sulfonilo, haluro de ácido, haluro de alquilo, haluro de arilo, alquilsulfonato, éster de N-hidroxisuccinimida, éster de imido, hidrazina, azidonitrofenilo, azida, 3-(2-piridilo ditio)-propionamida, glioxal, aldehído, iodoacetilo, éster de cianometilo, éster de p-nitrofenilo, éster de O-nitrofenilo, éster de hidroxipiridina, imidazol carbonilo, y otros grupos químicos de este tipo. En algunas formas de realización, la funcionalidad reactiva se puede unir directamente a un nucleótido, o se puede unir al nucleótido a través de un grupo de enlace. La fracción funcional y cualquier enlazador no pueden perjudicar sustancialmente la capacidad del nucleótido de ser añadido al miARN o de ser etiquetado. Grupos de enlace representativos incluyen grupos de enlace que contienen carbono, típicamente que varían de aproximadamente 2 a 18, normalmente de aproximadamente 2 a 8 átomos de carbono, donde los grupos de enlace que contienen carbono pueden incluir o no uno o más heteroátomos, por ejemplo, S, O, N, etc., y pueden incluir o no uno o más sitios de insaturación. De interés particular en muchas formas de realización son los grupos de enlace de alquilo, típicamente grupos de enlace de alquilo inferiores de 1 a 16, normalmente de 1 a 4 átomos de carbono, donde

los grupos de enlace pueden incluir uno o más sitios de insaturación. Los nucleótidos funcionales (o cebadores) usados en los métodos anteriores de generación de objetivos funcionales se pueden fabricar utilizando protocolos conocidos o comprados de vendedores comerciales, por ejemplo, Sigma, Roche, Ambion e IDT. Los grupos funcionales se pueden preparar según vías conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen la información representativa encontrada en las patentes de EE.UU. N.º 4,404,289, 4,405,711, 4,337,063 y 5,268,486 y la patente Br. N.º 1,529,202.

[0185] Los nucleótidos modificados con amina se usan en diversas formas de realización de la invención. El nucleótido modificado con amina es un nucleótido que tiene un grupo amino reactivo para la fijación de la etiqueta. Se contempla que cualquier ribonucleótido (G, A, U o C) o desoxirribonucleótido (G, A, T o C) se puede modificar para etiquetado. Ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, los siguientes ribo y desoxirribonucleótidos modificados: 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-ATP; N⁶-(4-amino)butil-ATP, N⁶-(6-amino)butil-ATP, N⁴-[2,2-oxi-bis-(etilamino)]-CTP; N⁶-(6-Amino)hexil-ATP; 8-[(6-Amino)hexil]-amino-ATP; 5-propargilamino-CTP, 5-propargilamino-UTP; 5-(3-aminoalilo)-dUTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-dATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-dATP; N-(4-amino)butil-dATP, N⁶-(6-amino)butil-dATP, N⁴-[2,2-oxi-bis-(etilamino)]-dCTP; N⁶-(6-Amino)hexil-dATP; 8-[(6-Amino)hexil]-amino-dATP; 5-propargilamino-dCTP, y 5-propargilamino-dUTP. Tales nucleótidos se pueden preparar según métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Además, una persona experta en la técnica podría preparar otras entidades de nucleótidos con la misma modificación de amina, tal como una 5-(3-aminoalilo)-CTP, GTP, ATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP en lugar de una 5-(3-aminoalilo)-UTP.

Técnicas de etiquetado

[0186] En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos se etiquetan añadiendo catalíticamente al ácido nucleico un nucleótido o nucleótidos ya etiquetado(s). Uno o más nucleótidos etiquetados se pueden añadir a moléculas de miARN. Véase la patente de EE.UU. 6,723,509.

[0187] En otros ejemplos de realización, un nucleótido o nucleótidos no etiquetado(s) se añade(n) catalíticamente a un miARN, y el nucleótido no etiquetado se modifica con una fracción química que lo habilita para ser etiquetado posteriormente, en formas de realización de la invención, la fracción química es una amina reactiva de manera que el nucleótido es un nucleótido modificado con amina. Ejemplos de nucleótidos modificados con amina son muy conocidos para los expertos en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente tal como de Ambion, Sigma, Jena Bioscience y TriLink.

[0188] A diferencia del etiquetado de ADNc durante su síntesis, la cuestión del etiquetado de miARN es cómo etiquetar la molécula ya existente. Para ello, podemos usar una enzima capaz de utilizar un ribonucleótido o desoxirribonucleótido di o trifosfato o como un sustrato para su adición a un miARN, una molécula de ARN pequeña. Además, en formas de realización específicas, implica utilizar un ribonucleótido di o trifosfato modificado, que se añade al extremo 3' de un miARN. La fuente de la enzima no es limitativa. Ejemplos de fuentes para las enzimas incluyen levadura, bacterias gramnegativas tales como *E. coli*, *Lactococcus lactis*, y virus pox de oveja.

[0189] Las enzimas capaces de añadir tales nucleótidos incluyen, pero de forma no limitativa, poli(A) polimerasa, transferasa terminal, y polinucleótido fosforilasa. En formas de realización específicas de la invención, se contempla que la ligasa NO es la enzima usada para añadir la etiqueta, y en cambio, se emplea una enzima no ligasa.

[0190] La poli(A) polimerasa se ha clonado a partir de una serie de organismos de plantas a humanos. Se ha demostrado que cataliza la adición de tractos de homopolímero a ARN (Martin *et al*, ARN, 4(2):226-30,1998).

[0191] La transferasa terminal cataliza la adición de nucleótidos al terminal 3' de un ácido nucleico.

[0192] El polinucleótido fosforilasa puede polimerizar difosfatos de nucleótido sin la necesidad de un cebador.

Marcas y etiquetas

[0193] Los miARN o sondas de miARN se pueden marcar con una marca o etiqueta de emisión de positrones (que incluye radiactiva), enzimática, colorimétrica (que incluye espectro visible y UV, que incluye fluorescente), luminiscente o de otro tipo para fines de detección o de aislamiento. La marca se puede detectar directa o indirectamente. Las marcas radiactivas incluyen ¹²⁵I, ³²P, ³³P y ³⁵S. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen fosfatasa alcalina, luciferasa, peroxidasa de rábano y β-galactosidasa. Las marcas también pueden ser proteínas con propiedades luminiscentes, por ejemplo, proteína fluorescente verde y ficoeritrina.

Las marcas colorimétricas y fluorescentes contempladas para el uso como conjugados incluyen, pero de forma no limitativa, AMCA, colorantes Alexa Fluor, colorantes BODIPY, tales como BODIPY FL, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY Y-R6G, BODIPY-TRX; Cascade Blue; Cascade Yellow; cumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metilcumarina, aminocumarina e hidroxycumarina; colorantes de cianina, tales como Cy3 y

Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína; quelatos macrocíclicos de iones lantánidos, tales como Quantum Dye^(TM); Marina Blue; Oregon Green; colorantes de rodamina, tales como rojo de rodamina, tetrametilrodamina y rodamina 6G; Texas Red;

Ejemplos específicos de colorantes incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos identificados anteriormente y los siguientes: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, and, Alexa Fluor 750; colorantes BODIPY aminorreactivos, tales como BODIPY 493/503, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR y BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, hexafluoruro de uranio, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, renografin, ROX, SYPRO, TAMRA, 2',4',5',7'-Tetrabromosulfonafluoresceína y TET.

[0194] Ejemplos específicos de ribonucleótidos marcados fluorescentemente están disponibles de sondas moleculares, e incluyen, Alexa Fluor 488-5-UTP, Fluoresceína-12-UTP, BODIPY FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, Tetrametilrodamina-6-UTP, Alexa Fluor 546-14-UTP, Texas Red-5-UTP, y BODIPY TR-14-UTP. Otros ribonucleótidos fluorescentes están disponibles de Amersham Biosciences, tales como Cy3-UTP y Cy5-UTP. Ejemplos de desoxirribonucleótidos fluorescentemente marcados incluyen Dinitrofenilo (DNP)-11-dUTP, Cascade Blue-7-dUTP, Alexa Fluor 488-5-dUTP, Fluoresceína-12-dUTP, Oregon Green 488-5-dUTP, BODIPY FL-14-dUTP, Rhodamine Green-5-dUTP, Alexa Fluor 532-5-dUTP, BODIPY TMR-14-dUTP, Tetrametilrodamina-6-dUTP, Alexa Fluor 546-14-dUTP, Alexa Fluor 568-5-dUTP, Texas Red-12-dUTP, Texas Red-5-dUTP, BODIPY TR-14-dUTP, Alexa Fluor 594-5-dUTP, BODIPY 630/650-14-dUTP, BODIPY 650/665-14-dUTP; Alexa Fluor 488-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 546-16-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 594-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 647-12-OBEA-dCTP. Se contempla que los ácidos nucleicos se pueden marcar con dos marcas diferentes. Además, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) se puede emplear en los métodos de la invención (por ejemplo, Klostermeier *et al.*, 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001). Se pueden utilizar colorantes de transferencia de energía fluorescente, tales como heterodímero de tiazol naranja-etidio, y TOTAB.

Alternativamente, la marca puede no ser detectable *per se*, pero detectable indirectamente o que permita el aislamiento o separación del ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, la marca podría ser biotina, digoxigenina, cationes polivalentes, grupos quelantes y los otros ligandos, que incluyen ligandos para un anticuerpo.

Técnicas de visualización

[0195] Una serie de técnicas para visualizar o detectar ácidos nucleicos marcados están fácilmente disponibles. La referencia de Stanley T. Crooke, 2000 tiene una discusión sobre tales técnicas (capítulo 6). Tales técnicas incluyen microscopía, matrices, fluorometría, cicladores ligeros u otras máquinas a tiempo real PCR^(TM), análisis FACS, contadores de centelleo, generadores de fosfoimágenes, contadores Geiger, MRI, CAT, métodos de detección basados en anticuerpos (Westerns, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey *et al.*, 1997, espectroscopia, electroforesis en gel capilar (Cummins *et al.*, 1996), espectroscopia; espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas de balance de masa. Alternativamente, los ácidos nucleicos se pueden marcar o etiquetar para permitir su aislamiento eficaz. En otras formas de realización de la invención, los ácidos nucleicos son biotinilados.

[0196] Cuando se emplean dos o más etiquetas coloreadas diferencialmente, se puede emplear transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) para caracterizar el ARNbc. Además, una persona experta en la técnica es bien consciente de modos de visualizar, identificar y caracterizar ácidos nucleicos marcados y, por consiguiente, tales protocolos se pueden utilizar como parte de la invención. Ejemplos de herramientas que se pueden utilizar también incluyen microscopía fluorescente, un bioanalizador, un lector de placa, Storm (dinámica Molecular), escáner de matrices, FACS (clasificador de células activadas fluorescentes), o cualquier instrumento que tenga la capacidad de excitar y detectar una molécula fluorescente (citómetro de placa Acumen [TTP Labtech], por ejemplo.

Preparación de matrices

[0197] La presente invención se puede emplear con matrices de miARN, que son macromatrices ordenadas o micromatrices de moléculas de ácido nucleico (sondas) que son completamente o casi complementarias o idénticas a una pluralidad de moléculas de miARN o moléculas de miARN precursor y que se posicionan en un material de soporte en una organización espacialmente separada. Las macromatrices son típicamente hojas de nitrocelulosa o nilón sobre las que se colorean las sondas. Las micromatrices posicionan las sondas de ácido nucleico más densamente de manera que hasta 10.000 moléculas de ácido nucleico puedan ajustarse a una región típicamente de 1 a 4 centímetros cuadrados. Las micromatrices se pueden fabricar colocando moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, genes, oligonucleótidos, etc., sobre sustratos o fabricando secuencias de oligonucleótidos *in situ* en un sustrato. Las moléculas de ácido nucleico colocadas o fabricadas se pueden aplicar en un modelo de matriz de alta densidad de hasta aproximadamente 30 moléculas de ácido nucleico no idénticas por centímetro cuadrado o más, por ejemplo, de hasta aproximadamente 100 o incluso 1000 por centímetro cuadrado. Las micromatrices típicamente usan vidrio recubierto como el soporte sólido, a diferencia del material

basado en nitrocelulosa de las matrices de filtro. Teniendo una matriz ordenada de muestras de ácido nucleico complementarias al miARN, la posición de cada muestra se puede rastrear y enlazar a la muestra original. Una variedad de diferentes dispositivos matriciales donde una pluralidad de sondas de ácido nucleico diferentes se asocian de forma estable a la superficie de un soporte sólido son conocidos para los expertos en la técnica.

[0198] Los métodos y el equipo representativos para la preparación de una micromatriz se han descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N°. 5,143,854; 5,202,231; 5,242,974; 5,288,644; 5,324,633; 5,384,261; 5,405,783; 5,412,087; 5,424,186; 5,429,807; 5,432,049; 5,436,327; 5,445,934; 5,468,613; 5,470,710; 5,472,672; 806; 5,525,464; 5,503,980; 5,510,270; 5,525,464; 5,527,681; 5,529,756; 5,532,128; 5,545,531; 5,547,839; 5,554,501; 5,556,752; 5,561,071; 5,571,639; 5,580,726; 5,580,732; 5,593,839; 5,599,695; 5,599,672; 5,610,287; 5,624,711; 5,631,134; 5,639,603; 5,654,413; 5,658,734; 5,661,028; 5,665,547; 5,667,972; 5,695,940; 5,700,637; 5,744,305; 5,800,992; 5,807,522; 5,830,645; 5,837,196; 5,871,928; 5,847,219; 5,876,932; 5,919,626; 6,004,755; 6,087,102; 6,368,799; 6,383,749; 6,617,112; 6,638,717; 6,720,138, así como en WO 93/17126; WO 95/11995; WO 95/21265; WO 95/21944; WO 95/35505; WO 96/31622; WO 97/10365; WO 97/27317; WO 99/35505; WO 09923256; WO 09936760; WO0138580; WO 0168255; WO 03020898; WO 03040410; WO 03053586; WO 03087297; WO 03091426; WO03100012; WO 04020085; WO 04027093; EP 373 203; EP 785 280; EP 799 897 y UK 8 803 000. Se contempla que las matrices puedan ser matrices de alta densidad, de manera que contengan 100 o más sondas diferentes. Se contempla que puedan contener 1000, 16.000, 65.000, 250.000 o 1.000.000 o más sondas diferentes. Las sondas se pueden dirigir a objetivos en uno o más organismos diferentes. Las sondas de oligonucleótidos varían de 5 a 50, 5 a 45, 10 a 40, o 15 a 40 nucleótidos de longitud en algunas formas de realización, en algunas formas de realización determinadas, las sondas de oligonucleótidos tienen una longitud de 20 a 25 nucleótidos.

[0199] La ubicación y la secuencia de cada secuencia de sonda diferente en la matriz se conocen generalmente. Además, el gran número de sondas diferentes pueden ocupar un área relativamente pequeña y proporcionar una matriz de alta densidad con una densidad de sonda mayor generalmente que de aproximadamente 60, 100, 600, 1.000, 5.000, 10.000, 40.000, 100.000, o 400.000 sondas de oligonucleótidos diferentes por cm². El área de superficie de la matriz puede ser aproximadamente o menor que aproximadamente 1, 1,6, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 cm². Además, una persona experta en la técnica podría fácilmente analizar los datos generados utilizando una matriz. Tales protocolos se han descrito anteriormente e incluyen información encontrada en WO 9743450; WO 03023058; WO 03022421; WO 03029485; WO03067217; WO 03066906; WO 03076928; WO 03093810; WO 03100448A1.

[0200] Recientemente, métodos de elaboración de perfiles alternativos se han vuelto disponibles, basados en hibridación de soluciones e inmovilización e identificación posterior, por ejemplo, la plataforma Illumina.

Preparación de la muestra

[0201] Se contempla que el miARN de una amplia variedad de muestras se puede analizar utilizando ensayos descritos en este documento. Mientras que el miARN endógeno se contempla para el uso con algunas formas de realización, el miARN recombinante o sintético -que incluye ácidos nucleicos que son idénticos al miARN endógeno o miARN precursor- también se puede manejar y analizar como se describe en este documento. Las muestras pueden ser muestras biológicas, en cuyo caso, pueden ser de sangre, LCR, tejido, órganos, tumor, semen, esputo, deposición, orina, saliva, lágrimas, otro fluido corporal, folículos pilosos, piel, o cualquier muestra que contenga o constituya células biológicas. Alternativamente, la muestra puede no ser una muestra biológica, sino ser una mezcla química, tal como una mezcla reactiva libre de células (que puede contener una o más enzimas biológicas).

Ensayos celulares para identificar miARN con vínculos con la enfermedad

[0202] Aplicaciones contempladas específicamente incluyen la identificación de miARN que contribuyen a reducir la neoangiogénesis y/o inducen actividad antiangiogénica que son ellos mismos partes de una enfermedad o condiciones o pueden de otro modo estar asociados con un estado de enfermedad particular. Adicionalmente, una aplicación contemplada incluye la identificación de miARN que son capaces de reducir la neoangiogénesis y/o inducir actividad antiangiogénica. También, las funciones de miARN se pueden comparar entre una muestra que se cree que es susceptible a una enfermedad particular o condición asociada con la neoangiogénesis y una que se cree que no es susceptible o resistente a esa enfermedad o condición. Se contempla específicamente que moléculas de ARN de la presente invención puedan utilizarse para tratar cualquiera de las enfermedades o condiciones discutidas en la sección precedente o modular cualquiera de las vías celulares discutidas en la sección precedente. Aplicaciones contempladas específicamente incluyen la identificación de miARN que contribuyen a procesos celulares de neoangiogénesis y/o inducen una actividad antiangiogénica que son ellos mismos partes de una enfermedad o pueden de otro modo estar asociados con un estado de enfermedad

particular. También, las funciones de miARN se pueden comparar entre una muestra que se cree que es susceptible a una enfermedad particular o condición asociada con la neoangiogénesis y una que se cree que no es susceptible o resistente a esa enfermedad o condición.

[0203] La eficacia de diferentes fármacos terapéuticos se puede alterar mediante miARN tal y como se define y como se usan según la presente invención. La molécula de miARN, equivalente o fuente de la misma que reducen la neoangiogénesis y/o inducen una actividad antiangiogénica pueden mejorar la susceptibilidad a, por ejemplo, quimio e inmunoterapia. Tales fármacos terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, fármacos quimioterapéuticos. Un "agente quimioterapéutico" se utiliza para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento contra el cáncer. Estos agentes o fármacos se categorizan por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afectan o no y en qué medida, al ciclo de la célula. Alternativamente, un agente se puede caracterizar basándose en su capacidad para reticular directamente ADN, para intercalarse en ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas que afectan a la síntesis de ácido nucleico. Muchos agentes quimioterapéuticos se clasifican en las categorías siguientes: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos y nitrosoureas.

[0204] Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reposicionador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; un epotilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK; razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilaminas; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustinas; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosinas; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (por ejemplo, CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

[0205] También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas en tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY1 17018, onapristona, y toremifeno; inhibidores de aromatasa que inhiben la aromatasa enzimática, que regula la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol, exemestano, formestania, fadrozol, vorozol, letrozol, y anastrozol; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC- α , Raf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de expresión VEGF y un inhibidor de expresión HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. Una lista de fármacos oncológicos aprobados por la FDA de EE.UU. con sus indicaciones aprobadas se puede encontrar en la World Wide Web en accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/druglist.cfm. Además, se contempla que las muestras que tienen diferencias en la actividad de algunas vías también se pueden comparar. Tales vías celulares incluyen, pero de forma no limitativa, las siguientes: cualquier adhesión o vía de motilidad que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas que implican AMP cíclico, proteína quinasa A, receptores acoplados a proteína G, adenilciclase, L-selectina, E-selectina, PECAM, VCAM-I, α -actinina, paxilina, cadherinas, AKT, integrina A, integrina- α , RAF-I, ERK, PI-3 quinasa, vinculina, metaloproteinasas matriciales, Rho GTPasas, p85, factores trefol, profilina, FAK, MAP quinasa, Ras, caveolina, calpaína-1, calpaína-2, receptor de factor de crecimiento epidérmico, ICAM-1, ICAM-2, cofilina, actina, gelsolina, Rho A, Rac, quinasa de cadena ligera de la miosina, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas o ezrina; cualquier vía de apoptosis, que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas que implican AKT, ligando Fas, NFkB, caspasa-9, PB quinasa, caspasa-3, caspasa-7, ICAD, CAD, EndoG, Granzima B, Bad, Bax, Bid, Bak, APAF-I, citocromo C, p53, ATM, Bcl-2, PARP, Chk1, Chk2, Rho-21, c-Jun, Rho73, Rad51, Mdm2, Rad50, c-Abl, BRCA-I, perforina, caspasa-4, caspasa-8, caspasa-6, caspasa-1, caspasa-2, caspasa-10, Rho, Jun quinasa, quinasa de Jun quinasa, Rip2, lamina-A, lamina-B1, lamina-B2, receptor Fas, H2O2, Granzima A, oxidasa NADPH, HMG2, CD4, CD28, CD3, TRADD, IKK, FADD, GADD45, receptor de muerte DR3, receptor de muerte DR4/5, FLIP, APO-3, GRB2, SHC, ERK, MEK, RAF-1, AMP cíclico, proteína quinasa A, E2F, proteína de retinoblastoma, Smac/Diablo, receptor ACH, 14- 3-3, FAK, SODD, receptor TNF, RTP, ciclina-D1, PCNA, Bcl-XL, PIP2, PIP3, PTEN, ATM, Cdc2, proteína quinasa C, calcineurina, IKK α , IKK β , IKK γ , SOS-I, c-FOS, Traf-1, Traf-2, Ikb β o el proteasoma; cualquier vía de activación celular, que incluye,

pero de forma no limitativa, aquellas que implican proteína quinasa A, óxido nítrico, caveolina-1, actina, calcio, proteína quinasa C, Cdc2, ciclina B, Cdc25, GRB2, proteína quinasa SRC, factores de ribosilación del ADP (ARF), fosfolipasa D, AKAP95, p68, Aurora B, CDK1, Eg7, histona H3, PKAc, CD80, PI3 quinasa, WASP, Arp2, Arp3, p34, p20, PP2A, angiotensina, enzima de conversión de angiotensina, receptor activado por proteasa 1, receptor-4 activado por proteasa, Ras, RAF-I, PLC β , PLC γ , COX-I, receptores acoplados a proteína G, fosfolipasa A2, IP3, SUMO1, SUMO 2/3, ubiquitina, Ran, Ran-GAP, Ran-GEF, p53, glucocorticoides, receptor de glucocorticoides, componentes del complejo SWI/SNF, RanBP1, RanBP2, importinas, exportinas, RCC1, CD40, ligando CD40, p38, DCK α , IKK β , NFKB, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6, IL-4, receptor IL-4, CDK5, factor de transcripción AP-I, CD45, CD4, receptores de célula T, MAP quinasa, factor de crecimiento de nervio, receptor de factor de crecimiento de nervio, c-Jun, c-FOS, Jun quinasa, GRB2, SOS-I, ERK-I, ERK, JAK2, STAT4, IL-12, receptor IL-12, sintasa de óxido nítrico, TYK2, IFN γ , elastasa, IL-8, epitelinas, IL-2, receptor IL-2, CD28, SMAD3, SMAD4, TGF β o receptor TGF β ; cualquier vía de regulación, señalización o diferenciación de ciclo celular, que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas que implican TNF, proteína quinasa SRC, Cdc2, ciclina B, Grb2, Sos-1, SHC, p68, quinasas Aurora, proteína quinasa A, proteína quinasa C, Eg7, p53, ciclinas, quinasas dependientes de ciclina, factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento epidérmico, proteína de retinoblastoma, ATF-2, ATM, ATR, AKT, CHK1, CHK2, 14-3-3, WEE1, CDC25 CDC6, proteínas de complejo de reconocimiento de origen, p15, p16, p27, p21, ABL, c-ABL, SMAD, ubiquitina, SUMO proteínas de choque térmico, Wnt, GSK-3, angiotensina, p73 cualquier PPAR, TGF α , TGF β , p300, MDM2, GADD45, Notch, cdc34, BRCA-I, BRCA-2, SKP1, el proteasoma, CUL1, E2F, p107, hormonas esteroides, receptores de hormonas esteroides, Ikb α , Ikb β , Sin3A, proteínas de choque térmico, Ras, Rho, ERK, IKK, PI3 quinasa, Bcl-2, Bax, PCNA, MAP quinasas, dineína, RhoA, PKAc, ciclina AMP, FAK, PIP2, PIP3, integrinas, trombopoyetina, Fas, ligando Fas, PLK3, MEK, JAK, STAT, acetilcolina, calcineurina de paxilina, p38, importinas, exportinas, Ran, Rad50, Rad51, polimerasa de ADN, polimerasa de ARN, Ran-GAP, Ran-GEF, NuMA, Tpx2, RCC1, Sonic Hedgehog, Crml, parchado (Ptc-1), MPF CaM quinasas, tubulina, actina, proteínas asociadas a cinetocoro, proteínas de unión de centrómero, telomerasa, TERT, PP2A, c-MYC, insulina, receptores de célula T, receptores de célula B, CBP, 1KB, NFKB, RAC1, RAF1, EPO, diacilglicerol, c-Jun, c-FOS, Jun quinasa, factores inducibles por hipoxia, GATA4, β -catenina, α -catenina, calcio, arrestina, survivina, caspasas, procaspasas, CREB, CREM, cadherinas, PECAM, corticosteroides, factores de estimulación de colonias, calpaínas, adenilciclase, factores de crecimiento, óxido nítrico, receptores de transmembrana, retinoides, proteínas G, canales de iones, activadores transcripcionales, coactivadores transcripcionales, represores transcripcionales, interleucinas, vitaminas, interferones, correpresores transcripcionales, poro nuclear, nitrógeno, toxinas, proteólisis, o fosforilación; o cualquier vía metabólica, que incluye, pero de forma no limitativa, aquellas que implican la biosíntesis de aminoácidos, oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de neurotransmisores y otras células que señalizan moléculas, biosíntesis de poliaminas, biosíntesis de lípidos y esfingolípidos, catabolismo de aminoácidos y nutrientes, síntesis de nucleótidos, eicosanoides, reacciones de transporte de electrones, degradación asociada a ER, glucólisis, fibrinólisis, formación de cuerpos cetónicos, formación de fagosomas, metabolismo de colesterol, regulación de toma de alimento, homeostasis de energía, activación de protrombina, síntesis de lactosa y otros azúcares, resistencia a multifármacos, biosíntesis de fosfatidilcolina, el proteasoma, proteína amiloide precursora, Rab, GTPasas, síntesis de almidón, glicosilación, síntesis de fosfogliceridos, vitaminas, el ciclo de ácido cítrico, receptor IGF-I, el ciclo de urea, transporte vesicular, o vías de salvamento. Además, se contempla que moléculas de ácidos nucleicos de la invención se puedan emplear en el diagnóstico y métodos terapéuticos con respecto a cualquiera de las vías o factores anteriores. Así, en algunas formas de realización de la invención, se contempla como parte de métodos de la invención que una molécula de miARN, equivalente mimético o fuente de la misma inhiba, elimine, active, induzca, aumente o module de otro modo una o más de las vías o factores anteriores. El ácido nucleico se puede utilizar para diagnosticar una enfermedad o condición basándose en la relación de ese miARN con cualquiera de las vías anteriormente descritas.

Otros ensayos

[0206] Además del uso de matrices y micromatrices, se contempla que se podría emplear una serie de ensayos de diferencia para analizar miARN, sus actividades y sus efectos. Tales ensayos incluyen, pero de forma no limitativa, RT-PCR, hibridación *in situ*, ensayo de protección de hibridación (HPA) (GenProbe), ensayo de ADN ramificado (ADNr) (Collins, M. L. et al. (1997). Nucleic Acids Research 25: 2979-2984), amplificación de círculo rodante (RCA), detección de hibridación de molécula única (US Genomics), ensayo Invader (ThirdWave Technologies), y ensayo de litigio de puentes (Qiagen). Se contempla que tales métodos se puedan utilizar en el contexto de matrices, al igual que en el contexto de ensayos de diagnóstico.

Aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico

[0207] Los miARN que afectan los rasgos fenotípicos proporcionan puntos de intervención para aplicaciones terapéuticas al igual que aplicaciones de diagnóstico (mediante cribado para la presencia o ausencia de un miARN particular). Concretamente se contempla que moléculas de ARN de la presente invención se puedan utilizar para tratar cualquiera de las enfermedades o condiciones discutidas en la sección precedente. Además, cualquiera de los métodos descritos anteriormente también se puede emplear con respecto a aspectos terapéuticos y de diagnóstico de la invención. Por ejemplo, métodos con respecto a la detección de miARN o el cribado para éstos también se pueden emplear en un contexto de diagnóstico. En usos terapéuticos, una

cantidad eficaz de los miARN de la presente invención se administra a una célula, que puede estar o no en un animal. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de los miARN de la presente invención se administra a un individuo para el tratamiento de una enfermedad o condición. El término "cantidad eficaz" como se utiliza en este caso se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que son necesarias para dar como resultado el cambio fisiológico deseado en la célula o tejido al que se administra. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en este documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que consigue un efecto deseado respecto a la neoangiogénesis como se ha definido en este documento anteriormente. Un experto en la materia reconoce fácilmente que en muchos casos las moléculas pueden no proporcionar una cura, sino proporcionar un beneficio parcial, tal como alivio o mejora de al menos un síntoma. En algunas formas de realización, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Así, en algunas formas de realización, una cantidad de moléculas que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz".

[0208] En algunas formas de realización, la molécula tiene una secuencia que corresponde a la secuencia de miARN de ese animal particular, en oposición a de otro animal. Así, en algunas formas de realización, una secuencia humana se utiliza en las moléculas de ARN de la presente invención. En experimentos *in vivo*, una secuencia de miARN puede diferir en el animal de prueba en comparación con la secuencia humana. En este caso, un miARN que difiere de la secuencia humana se puede usar para demostrar efecto terapéutico en el animal. Los resultados obtenidos con esta secuencia evaluada en un animal pueden ser resultados previstos extrapolados en humanos con una molécula de miARN correspondiente.

Modos de administración y formulaciones

[0209] Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden administrar a un sujeto solas o en la forma de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición o enfermedad. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más soportes, diluyentes, excipientes o productos auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento del miARN en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la forma de administración elegida. Para administración tópica, los miARN de la invención se pueden formular como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. como se conoce bien en la técnica. Formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para la administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, al igual que aquellas diseñadas para la administración transdérmica, transmucosa, por inhalación, oral o pulmonar. Para inyección, los ácidos nucleicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, de estabilización y/o de dispersión. Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico pueden ser en polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógeno estéril, antes de usar. Para administración transmucosa, penetradores apropiados a la barrera que se ha de penetrar se usan en la formulación. Tales penetradores se conocen generalmente en la técnica. Para administración oral, los ácidos nucleicos se pueden formular fácilmente combinando las moléculas con soportes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales soportes permiten que los ácidos nucleicos de la invención sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que se ha de tratar. Para formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, capsulas y comprimidos, excipientes adecuados incluyen productos de relleno tales como azúcares, por ejemplo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como el almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden adicionar agentes de desintegración, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Si se desea, las formas de dosificación sólidas se pueden recubrir de azúcar o con recubrimiento entérico utilizando técnicas estándar. Para preparaciones líquidas orales tal como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, portadores, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente, se pueden adicionar agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para administración bucal, las moléculas pueden tonar la forma de comprimidos, pastillas, etc. formulados de manera convencional. Para administración por inhalación, las moléculas para el uso según la presente invención se administran convenientemente en forma de un aerosol de embalajes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar mediante una válvula para administrar una cantidad medida. Capsulas y cartuchos de gelatina para el uso en un inhalador o insuflador se pueden formular con una mezcla de polvos de los ácidos nucleicos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, con bases supositorias convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0210] Además de las formulaciones descritas previamente, las moléculas también se pueden formular como una preparación depósito. Tales formulaciones de larga actuación se pueden administrar por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las moléculas se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Alternativamente, otros sistemas de administración farmacéutica se pueden emplear.

[0211] Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de administración que se pueden utilizar para administrar ácidos nucleicos de la invención.

[0212] Un ácido nucleico de la invención se puede administrar en combinación con un portador o lípido para aumentar la absorción celular. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede administrar en combinación con un lípido catiónico. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero de forma no limitativa, lipofectina, DOTMA, DOPE y DOTAP. La publicación de WO0071096 describe formulaciones diferentes, tales como un DOTAP; formulación de colesterol o de derivado de colesterol que se puede usar eficazmente para terapia génica. Otras descripciones también discuten diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas que incluyen nanopartículas y métodos de administración; estas incluyen, pero de forma no limitativa, la publicación de patente de EE.UU. 20030203865, 20020150626, 20030032615, y 20040048787. Los métodos usados para la formación de partículas también se describen en las patentes de EE.UU. N.º. 5,844,107, 5,877,302, 6,008,336, 6,077,835, 5,972,901, 6,200,801 y 5,972,900. Los ácidos nucleicos también se pueden administrar en combinación con una amina catiónica tal como poli-L-lisina.

Los ácidos nucleicos también se pueden conjugar a una fracción química, tal como transferrina y colesteriles. Además, los oligonucleótidos pueden ser dirigidos a ciertos órganos o tejidos enlazando grupos químicos específicos al oligonucleótido. Por ejemplo, enlazar el oligonucleótido a una matriz adecuada de residuos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado. Otros ligandos de dirección se describen en Liu B., Brief Funct. Genomic Proteomic 6:112-119, 2007. Ejemplos adicionales son azúcares carbohidratos tales como galactosa, n-acetilgalactosamina, manosa; vitaminas tales como folatos; moléculas pequeñas que incluyen naproxeno, ibuprofeno u otras moléculas de unión a proteína conocidas, ciclodextrina, que dirige el receptor de transferrina, también llamada ciclodextrina modificada con transferencia (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005), PEI (PEI-PEG dirigido con RGD, Schiffelers *et al.* 2004), anisamida, miméticos de péptido RGD o de RGD, poliarginina, fragmento de anticuerpo de cadena simple anti-TfR/TfRscFv, anexina A5 (que tiene como objetivo membranas que exhiben fosfatidilserina, Gamier B. *et al.*, Bioconjug Chem., 2009, 11:2114-22), WO 2009/126933 que describe composiciones y métodos para la administración específica de sitio de ácidos nucleicos por combinación de estos con ligandos de dirección y componentes endosomolíticos. Los ligandos de dirección que son preferentemente adecuados son proteínas de superficie celular asociada al endotelio. La fijación de objetivos de ácidos nucleicos también se puede realizar usando tecnología de aptámero como se describe en WO2005/111238. Además, fracciones de lípido adicionales, tales como lípidos PEG, colesterol, lípidos o péptidos auxiliares endosomolíticos (WO2009/046220) o la morfología en general de las nanopartículas generadas (caracterizadas por carga y tamaño de partícula) a los vehículos de administración anteriormente mencionados pueden conferir especificidad de fijación de objetivo a las células cancerosas y/o a la vasculatura tumoral.

[0213] Adicionalmente, las moléculas se pueden administrar utilizando un sistema de liberación prolongada, tales como matrices semipermeables de polímeros sólidos con el agente terapéutico. Varios de los materiales de liberación prolongada se han establecido y son bien conocidos para los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación prolongada pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las moléculas durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica de las moléculas químicas, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de moléculas.

[0214] Alternativamente, las moléculas se pueden administrar utilizando un sistema de administración basado en química de coordinación como se describe en WO2007011217.

[0215] Además de lo dicho anteriormente, una molécula de la invención se puede administrar utilizando electroporación para tratamiento local o dirigido. Los métodos de electroporación son conocidos para la persona experta y se describen, por ejemplo, en Daud *et al* (2008) o Bodles-Brakhop (2009).

[0216] Los ácidos nucleicos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como los ácidos libres o bases o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que retienen sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos que las formas de base libre correspondientes.

[0217] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas de miARN disueltas o dispersas en un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen o producen reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial aceptable cuando se administran a

un animal, tal como, por ejemplo, un humano, como sea apropiado. Si ciertos efectos adversos son aceptables o no se determina basándose en la gravedad de la enfermedad. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido quimérico o ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990. Además, por administración a animal (por ejemplo; humano), se entiende que las preparaciones deberían cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Como se utiliza en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera o la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores farmacológicos, geles, ligantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales semejantes y combinaciones de los mismos, como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Excepto en el caso en que cualquier portador convencional sea incompatible con la sustancia activa, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas o terapéuticas.

[0218] Los miARN pueden comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si son para administrarse en forma sólida, líquida o en aerosol, y de si necesitan ser estériles para tales vías de administración como la inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intraarticular, por vía intraprostática, por vía intrapleuraleal, por vía intratraqueal, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía rectal, tópicamente, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, subcutáneamente, por vía subconjuntival, por vía intravascular, mucosamente, por vía intrapericardial, por vía intraumbilical, por vía intraocular, por vía oral, tópicamente, localmente, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, directamente por células objetivas de baño de perfusión localizada, vía un catéter, vía un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo; liposomas), o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990).

[0219] La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un animal o un paciente se puede determinar por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de condición, el tipo de enfermedad que se esté tratando, intervenciones terapéuticas precedentes o concurrentes, idiopatía del paciente y la forma de administración. El médico responsable de la administración determinará, de cualquier manera, la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y dosis apropiada(s) para el sujeto individual.

[0220] En algunas formas de realización, composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % de un compuesto activo. En otras formas de realización, un compuesto activo puede comprender de 2 % a 75 % del peso de la unidad, o de 25 % a 60 %, por ejemplo, y cualquier rango derivable de los mismos. En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender menos de 1 microgramo/kg/peso corporal, o 1 microgramo/kg/peso corporal, de 5 microgramos/kg/peso corporal, 10 microgramos/kg/peso corporal, 50 microgramos/kg/peso corporal, 100 microgramos/kg/peso corporal, 200 microgramos/kg/peso corporal, 350 microgramos/kg/peso corporal, 500 microgramos/kg/peso corporal, 1 miligramo/kg/peso corporal, 5 miligramos/kg/peso corporal, 10 miligramos/kg/peso corporal, 50 miligramos/kg/peso corporal, 100 miligramos/kg/peso corporal, 200 miligramos/kg/peso corporal, 350 miligramos/kg/peso corporal, o 500 miligramos/kg/peso corporal, a 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier rango derivable de los mismos. En ejemplos no limitativos de un rango derivable a partir de los números enumerados en este documento, se puede administrar un rango de 5 mg/kg/peso corporal a 100 mg/kg/peso corporal, 5 microgramos/kg/peso corporal a 500 miligramos/kg/peso corporal, etc., basándose en los números anteriormente descritos.

[0221] En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos se puede causar mediante conservantes tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero de forma no limitativa, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

[0222] Las moléculas se pueden formular en una composición en una forma de base libre, neutral o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o tales ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos; o tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina.

[0223] En formas de realización donde la composición es en una forma líquida, un portador puede ser un solvente o medio de dispersión que comprende, pero de forma no limitativa, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en portadores tales como, por ejemplo, poliol o lípidos líquidos; por el uso de surfactantes tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

[0224] En otras formas de realización, se pueden usar gotas oculares, soluciones o espráis nasales, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido objetivo. En un ejemplo no limitativo, las soluciones nasales son soluciones normalmente acuosas diseñadas para ser administradas en los pasajes nasales en gotas o espráis. Las soluciones nasales se preparan de modo que sean similares en muchos aspectos a secreciones nasales, de modo que se mantenga la acción ciliar normal. Así, en formas de realización preferidas, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas o ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, conservantes antimicrobianos, similares a aquellos usados en preparaciones oftálmicas, fármacos, o estabilizadores de fármaco apropiados, si es necesario, se pueden incluir en la formulación. Por ejemplo, varias preparaciones nasales comerciales se conocen e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistaminas. En algunas formas de realización, las moléculas se preparan para administración por vías tales como ingestión oral. En estas formas de realización, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, capsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina sin cáscara duras o blandas), formulaciones de liberación prolongada, composiciones bucales, tabletas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Los portadores preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, portadores comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral se puede preparar como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, puede comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un colorante, un conservante, o combinaciones de los mismos.

[0225] En algunas formas de realización preferidas, una composición oral puede comprender uno o más ligantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un ligante, tal como, por ejemplo, goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente de desintegración, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, aromatizante de cereza, aromatizante de naranja, etc. o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, esta puede contener, además de materiales del tipo anterior, portadores tales como un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos.

[0226] La composición debe ser estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación de endotoxina debería mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

[0227] En formas de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede causar por el uso en las composiciones de agentes de retraso de absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

[0228] Cualquier forma de realización mencionada anteriormente con respecto a la administración o el transporte a células también se puede emplear con respecto a la implementación de la administración de compuestos medicinales discutidos en esta sección.

Dosificaciones eficaces

[0229] Las moléculas de la invención se usarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el fin deseado. Para el uso para tratar o prevenir una condición de enfermedad, las moléculas de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del paciente que se esté tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está

dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la vista de la divulgación detallada proporcionada en este documento.

[0230] Para administración sistémica, una dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un rango de concentración circulante que incluye el EC50 como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

[0231] Las dosificaciones iniciales también se pueden estimar a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en la técnica. Un experto en la técnica podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en los datos de animales.

[0232] La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de plasma de las moléculas que son suficientes para mantener un efecto terapéutico. Las dosificaciones para pacientes habituales para la administración por inyección varían de 0,01 a 0,1 mg/kg/día, o de 0,1 a 5 mg/kg/día, preferiblemente de 0,5 a 1 mg/kg/día o más. Niveles de suero terapéuticamente eficaces se pueden conseguir administrando múltiples dosis cada día.

[0233] En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local eficaz de las proteínas puede no estar relacionada con la concentración de plasma. Un experto en la técnica será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación excesiva.

[0234] La cantidad de moléculas administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, el modo de administración y la decisión del médico prescriptor.

[0235] La terapia se puede repetir intermitentemente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no sean detectables. La terapia se puede prever sola o en combinación con otros fármacos o tratamiento (incluida cirugía).

Toxicidad

[0236] Preferiblemente, una dosis terapéuticamente efectiva de las moléculas descritas en este documento proporcionará beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad de las moléculas descritas en este documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población) o la LD100 (la dosis letal para el 100 % de la población). La proporción de dosis entre efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren las proteínas que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un rango de dosificación que no es tóxico para el uso en humanos. La dosificación de las proteínas descritas en este documento se extiende preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la dosis efectiva con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la forma de administración utilizada. La formulación exacta, la forma de administración y la dosificación se pueden elegir por el médico individual en función de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al*, 1975, en: The Pharmacological Basis of Therapeutics, C.1, p.1).

Grupos pendientes

[0237] Un "grupo pendiente" se puede unir o conjugar al ácido nucleico. Los grupos pendientes pueden aumentar la absorción celular del ácido nucleico. Los grupos pendientes se pueden enlazar a cualquier porción del ácido nucleico, pero se enlazan comúnmente al extremo (los extremos) de la cadena oligonucleótida. Ejemplos de grupos pendientes incluyen, pero de forma no limitativa: derivados de acridina (es decir, 2-metoxi-6-cloro-9-aminoacridina); enlazadores cruzados tales como derivados de psoraleno, azidofenacilo, proflavina y azidoproflavina; endonucleasas artificiales; complejos metálicos tales como EDTA-Fe(II), o-fenantrolina-Cu(I), y porfirina-Fe(II); fracciones alquilantes; nucleasas tales como nucleasa amino-1-hexanoilestafilocócica y fosfatasa alcalina; transferasas terminales; abzimaz; fracciones de colesterol; portadores lipofílicos; conjugados de péptido; alcoholes de cadena larga; ésteres de fosfato; amino; grupos mercapto; marcadores radiactivos; marcadores no radiactivos tales como colorantes; y polilisina u otras poliaminas. En un ejemplo, el ácido nucleico se conjuga a un carbohidrato, carbohidrato sulfatado o glicano.

Equipos

[0238] Cualquiera de las composiciones descritas en este documento se pueden comprender en un equipo. En un ejemplo no limitativo, miARN individuales se incluyen en un equipo. El equipo puede incluir además uno o más miARN sintéticos de control negativo que pueden utilizarse para controlar los efectos de la administración de miARN sintéticos. El equipo puede incluir además agua y tampón de hibridación para facilitar la hibridación de las

dos cadenas de los miARN sintéticos. El equipo también puede incluir uno o más reactivo(s) de transfección para facilitar la administración del miARN a células.

[0239] En otro ejemplo no limitativo, múltiples miARN sintéticos se incluyen en un equipo. El equipo puede incluir además uno o más miARN sintéticos de control negativo que pueden utilizarse para controlar los efectos de la administración de miARN sintético. El equipo también puede incluir uno o más reactivos de transfección para facilitar la administración en células.

[0240] Los componentes de los equipos se pueden empaquetar bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada. Los medios contenedores de los equipos incluirán generalmente por lo menos un frasco, probeta, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en donde un componente se puede colocar, y preferiblemente, dividido en partes alícuotas adecuadamente. Donde haya más de un componente en el equipo (el reactivo de etiquetado y la marca se pueden empaquetar juntos), el equipo también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro contenedor adicional en donde los componentes adicionales se pueden colocar separadamente. Sin embargo, varias combinaciones de componentes se pueden comprender en un frasco. Los equipos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los ácidos nucleicos, y cualquier otro contenedor de reactivo confinado cercanamente para venta comercial. Tales contenedores pueden incluir contenedores plásticos moldeados por soplado o inyección en donde se retienen los frascos deseados.

[0241] Cuando los componentes del equipo se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, donde se prefiere particularmente una solución acuosa estéril.

[0242] Sin embargo, los componentes del equipo pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un solvente adecuado. Se prevé que el solvente también pueda proporcionarse en otro medio contenedor.

[0243] El medio contenedor incluirá generalmente por lo menos un frasco, probeta, matraz, botella, jeringa y/u otro medio contenedor, en donde las formulaciones de ácido nucleico se colocan, preferiblemente, adecuadamente asignadas. Los equipos también pueden comprender un segundo medio contenedor para contener un tampón estéril farmacéuticamente aceptable y/u otro diluyente. Los equipos de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener los frascos confinados cercanamente para la venta comercial, tal como, por ejemplo, contenedores plásticos moldeados por soplado y/o inyección en donde se retienen los frascos deseados.

[0244] Tales equipos también pueden incluir componentes que preservan o mantienen el miARN o que protegen contra su degradación. Tales componentes pueden estar libres de RNAsa o proteger contra RNAsas. Tales equipos comprenderán generalmente, en un medio adecuado, distintos contenedores para cada reactivo o solución individual.

[0245] Un equipo también incluirá instrucciones para utilizar los componentes del equipo, así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el equipo. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar.

[0246] Los equipos de la invención también pueden incluir uno o más de los siguientes: miARN, biblioteca de miARN, biblioteca de combinación de miARN, miARN de control negativo, agua sin nucleasa; contenedores sin RNAsa, tales como tubos de 1,5 ml; tampón de hibridación; y reactivo(s) de transfección.

[0247] Se contempla que tales reactivos son formas de realización de equipos de la invención. Tales equipos, sin embargo, no se limitan a los elementos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o caracterización de miARN.

Identidad de secuencia

[0248] La "identidad de secuencia" se define en este documento como una relación entre dos o más secuencias de ácido nucleico (nucleótido, polinucleótido, ARN, ADN) determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de ácido nucleico, si procede, determinado por la correspondencia entre cadenas de tales secuencias. "Identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds. Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988). En una forma de realización, la identidad se evalúa en una longitud entera de una SEQ ID N.º determinada.

[0249] Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la correspondencia más grande entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, el paquete del programa GCG (Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El conocido algoritmo de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

[0250] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias=+10; desapareamientos=0; penalización de espacio: 50; penalización de longitud de espacio: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, con sede en Madison, Wis. Arriba se dan los parámetros por defecto para las comparaciones de ácidos nucleicos.

[0251] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra se incluyen, pero los elementos no mencionados específicamente no se excluyen. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" y significa que un miARN, un equivalente, un mimético o una fuente o un antagomir del mismo o una composición tal y como se define en este documento puede comprender componente(s) adicional(es) a aquellos específicamente identificados, donde dicho(s) componente(s) adicional(es) no altera(n) la característica singular de la invención. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea uno y solo uno de los elementos.

El artículo indefinido "un" o "una" significa, por lo tanto, normalmente "al menos uno". Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para uso ilustrativo y no se destinan para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

[0252]

Figura 1

Para valorar el potencial angiogénico de los miARN en células endoteliales, se realizaron cribados funcionales por transducción de la biblioteca de miARN lentivirales completa en las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células RF24 (línea celular endotelial immortalizada). Los siguientes parámetros se optimizaron para rendimiento de ensayo óptimo utilizando un lentivirus de control con proteína verde fluorescente (lenti-copGFP): número celular, dosis de partícula de lentivirus (MOI, para eficiencia y expresión de miARN óptima), tiempo entre transducción lentiviral y lectura del ensayo de MTS. Un ejemplo representativo de la eficiencia de transducción en función de MOI y tiempo después de la transducción lentiviral se muestra para células HUVEC con 8 µg/ml de polibreno (figura 1A) y para células RF24 con 6 µg/ml de polibreno (figura 1B). Estos ejemplos muestran que tanto las HUVEC como las células RF24 son altamente transducibles (> 95 %) con lenti-copGFP.

Figura 2

Las condiciones de ensayo óptimas (ventana de ensayo; factor Z') se establecieron utilizando el vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro que expresa miR-92a (proliferación/supervivencia) como un control positivo, y un vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro vacío como un control negativo. Se muestra en la figura 2 que la ventana más grande entre control negativo y positivo se observa entre MOI de 30 y 100 para tanto las células RF24 (figura 2b) como para las HUVEC (figura 2a).

Figura 3

Esta figura representa un ejemplo de los resultados de cribados y muestra los datos de absorbancia media de MTS de la placa 7. La figura superior representa los datos de absorbancia media de la placa 7 con células RF24 mientras que la figura inferior representa los datos de absorbancia media con células HUVEC. Los impactos que se seleccionaron para la confirmación de impacto se indican mediante esferas.

Figura 4

La transfección en HUVEC con miméticos de miARN-7 (miR-7) y miARN-574 (miR-574-5p) muestra una reducción dependiente de la dosis en la viabilidad celular representada por una reducción en la absorbancia en la lectura del MTS (n=3 por condición; +/- dt). El control positivo es ARNip PLK1 (PLK1 es una quinasa con actividad antiproliferación). El control negativo se indica por el control mimético, un miARN con secuencia de nucleótidos revuelta.

Figura 5

La transfección en HUVEC con simuladores de miARN-190b (miR-190b) muestra una reducción dependiente de la dosis en la viabilidad celular representada por una reducción en la absorbancia en la lectura del MTS (n=3 por condición; +/- dt). El control positivo es ARNip PLK1 (PLK1 es una quinasa con actividad antiproliferación). El control negativo se indica por el control mimético, un miARN con secuencia de nucleótidos mezclados.

Figura 6

La transfección en HUVEC con miméticos de miARN-142-3p y miR-142-5p muestra que miR-142-3p tiene una reducción dependiente de la dosis más fuerte en la viabilidad celular en comparación con miR-142-5p representada por una reducción en la absorbancia en la lectura del MTS (n=3 por condición; +/- dt). El control positivo es ARNip PLK1 (PLK1 es una quinasa con actividad antiproliferación). El control negativo se indica mediante el control mimético, un miARN con secuencia de nucleótidos mezclados.

Figura 7

Los ensayos de formación de tubos endoteliales *in vitro* emplearon Matrigel™ como una matriz extracelular tridimensional. HUVEC en el medio de cultivo completo ($7,5 \times 10^4$) se sembraron en placas de 96 pocillos con Matrigel™ (5 mg/ml). HUVEC primitivas sembradas en medio de cultivo completo muestran la formación de tubos robustos, al igual que células tratadas con lipofectamina y ARNip mezclado. Las células transfectadas con ARNip-VEGFR2 y miARN-190b muestran una formación de tubos espontánea marcadamente revocada de HUVEC sembrada en medio de cultivo completo.

Figura 8

Los ensayos de formación de tubos endoteliales *in vitro* emplearon Matrigel™ como una matriz extracelular tridimensional. HUVEC en el medio de cultivo completo ($7,5 \times 10^4$) se sembraron en placas de 96 pocillos con Matrigel™ (5 mg/ml). HUVEC primitivas sembradas en el medio de cultivo completo muestran la formación de tubos robustos, al igual que células tratadas con lipofectamina y ARNip mezclado. Las células transfectadas con ARNip-VEGFR2; miR-142-3p muestran una formación de tubos espontánea claramente revocada de HUVEC sembrada en medio de cultivo completo. La inhibición de la formación de tubos después de la transfección con miR-142-3p muestra un efecto fenotípico mucho más fuerte en comparación con miR-142-5p.

Figura 9

Los ensayos de formación de tubos endoteliales *in vitro* emplearon Matrigel™ como una matriz extracelular tridimensional. HUVEC en el medio de cultivo completo ($7,5 \times 10^4$) se sembraron en placas de 96 pocillos con Matrigel™ (5 mg/ml). HUVEC primitivas sembradas en medio de cultivo completo muestran la formación de tubos robustos, al igual que células tratadas con X-tremeGene y ARNip mezclado. Las células transfectadas con miR-9* muestran una formación de tubos espontánea marcadamente revocada de HUVEC sembradas en medio de cultivo completo en comparación con células tratadas solo con X-tremeGene. El revocamiento de la formación de tubos espontánea por miR-9* es más fuerte que el revocamiento de la formación de tubos por ARNip-VEGFR2. El umbral es de 400 μ m.

Figura 10

La transfección en HUVEC con miméticos de miARN-9* (miR-9*) muestra una reducción dependiente de la dosis en la viabilidad celular representada por una reducción en la absorbancia en la lectura del MTS (n=3 por condición; +/- dt). El control positivo es ARNip PLK1 (PLK1 es una quinasa con actividad antiproliferación). El control negativo se indica mediante el control mimético, un miARN con secuencia de nucleótidos mezclados (mezcla de miR) y mediante el control de ARNip, una agrupación de ARNip con secuencia de nucleótidos mezclados)

Figura 11

Ensayo de angiogénesis con brotes *in vitro* inducidos por bFGF realizado con esferoides de HUVEC que están sin tratar o transfectados con un mimético. A) De izquierda a derecha y de arriba a abajo: imágenes de contraste de fases de esferoides de HUVEC sin transfectar; HUVEC sin transfectar estimulada con bFGF; HUVEC sin transfectar tratada con Xtremegene y bFGF; HUVEC transfectada mezclada con miR tratada con bFGF; HUVEC con miR-7 tratada con bFGF; HUVEC transfectada con miR-27 tratada con bFGF; y HUVEC transfectada con miR-574-5p tratada con bFGF. B) La longitud de brote acumulativa por esferoide de 10 esferoides por grupo de tratamiento como se enumera en (A). C) El número medio de brotes por esferoide de 10 esferoides por grupo de tratamiento como se enumera en (A). Umbrales de error, DT; (a) $P < 0,001$, prueba ANOVA.

Figura 12

Curvas de crecimiento del tumor de ratones que portan el tumor Neuro2A tratados localmente con PBS (n=6) o con mezcla de miR (n=6) o con miARN antiangiogénicos sintéticos o con siVEGFR2. A) Tumores tratados con miR-7 (n= 7). B) Tumores tratados con miR-574-5p (n=7). C) Tumores tratados

localmente con miR-27a (n=7). D) Tumores tratados con el control positivo siVEGFR-2 (n=7). E) Tumores tratados con miR-9* (n=8). Los resultados representados en la figura 12E se originan a partir de una cohorte de ratones diferente de los resultados representados en las figuras 12A-D. La curva de crecimiento del tumor con PBS se generó con n=8 ratones, mientras que la curva de crecimiento del tumor mezclado con miR se generó con n=10 ratones. Los volúmenes del tumor se representan como media $\pm$ desviación típica.

Figura 13

Cuantificación de densidad de microvasos (MVD) de tumores Neuro2A coloreados con CD31 tratados con PBS, mezcla de miR, miR-574-5p, miR-7, miR-27a o siVEGFR2. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación típica. **P< 0,01 frente a mezcla de miR. Prueba ANOVA de 1 vía.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivo celular y sustancias químicas

[0253]

Células endoteliales vasculares EC-RF24 (ABM#T0003)
Se usan HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) P4 (Lonza#cc-2519) en todos los ejemplos a menos que se indique lo contrario.
Medio M199 (Gibco#22340-087)
Suero bovino fetal (FBS) (Sigma#F7524; Lot#059K3395)
Suero humano (HS) (Sigma# 1 18K0494, Lot#H6914-100ml)
10.000 U/ml de penicilina/estreptavidina (P/S) (Biochrom AG#A2213)
200 NM L-glutamina (Sigma#G7513; Lot#RNBB0722)
1 % (m/V) de gelatina (Sigma)
10x PBS (Gibco#14200-067)
TrypLE Express (Gibco#12605)
0,4 % de colorante azul de tripán (Lonza#17-942E)
1 Mg/ml de polibreno (Sigma) en 1x PBS
Biblioteca de (sobre)expresión de microARN basados en lentivirus (14 placas)
Solución de ensayo de proliferación celular de (MTS) CellTiter 96® AQUEOUS One Solution (Promega#G3580)
Multifuge X3R (Thermo Scientific)
Multiskan FC (Thermo Scientific)

Medio

[0254]

HUVEC de medio de cultivo específico: M199 + 100 U/ml de P/S + 2 mM de L-glutamina + 10 % + 10 % de HS.
Células RF24 de medio de cultivo específico: M199 + 100 U/ml de P/S + 2 mM de L-glutamina + 10 % de FBS.

Ejemplo 1. Generación de la biblioteca lentiviral que codifica los miARN

[0255] Los miARN humanos se seleccionaron tanto del repositorio de miARN público (www.mirbase.org) como de datos de secuenciación profunda de pequeños ARN registrados (véase WO 2007/081204). Las secuencias de miARN se amplificaron a partir de su ubicación genómica con amplicones que contienen la horquilla de pre-miARN en toda su longitud y una secuencia flanqueante en ambos lados de los 50-150 pares de bases. Los cebadores para los amplicones se diseñaron utilizando una implementación adaptada del software Primer3 (www.geneious.com). Si el programa de diseño de cebadores no pudo encontrar cebadores apropiados en las secuencias designadas, los requisitos para las secuencias flanqueantes se ajustaron a 0-200 pares de bases. Los cebadores diseñados se complementaron con una proyección 5' GCGC y un sitio de restricción para clonación direccional. Por defecto, el cebador aguas arriba del miARN se complementó con un sitio de restricción BamHI (GGATCC) y el cebador aguas abajo del miARN se complementó con un sitio de restricción EcoRI (GAATTC). Los cebadores de los amplicones con sitios de restricción BamHI o EcoRI internos (es decir, que ocurren en la secuencia genómica) se complementaron o bien con un sitio BglII (AGATCT) o bien con un sitio XbaI (TCTAGA) respectivamente. Los miARN se amplificaron utilizando los cebadores anteriormente mencionados de ADN genómico humano de un individuo único en la siguiente reacción de PCR:

constituyente	concentración	volumen	proveedor / cat. #
tampón	10X	1 μ l	Stratagene / 600159

dNTP	10 mM cada uno	0,2 µl	GE Healthcare/27-18(58) 0-04
cebador directo	10 µM	0,2 µl	Integrated DNA Technologies
cebador inverso	10 µM	0,2 µl	Integrated DNA Technologies
ADNg	100 ng/µl	0,1 µl	fuentes privadas
pol. de ADN Pfu	2,5 u/µl	0,1 µl	Stratagene / 600159
H ₂ O	8,2 µl		

temp. (°C)	tiempo	ciclos	
95	2 min _		
95	15 s	40	
59*	15 s	40	* -0,1 °C / ciclo
72	90 s	40	
72	15 min		
4	∞		

[0256] Todos los locus de miARN se amplificaron en reacciones de PCR de 10 µl separadas. Los productos se purificaron utilizando el conjunto de tampón PCR Clean-Up de Qiagen y placas de filtro Whatman Unifilter GF/C (cat. # 7700-1101). ADN se eluyó con 17 µl de H₂O por pocillo. Los eluatos separados se usaron en la siguiente reacción de restricción:

Constituyente	concentración	volumen	proveedor / cat. #
tampón	E 10X	2 µl	Promega / R005A
EcoRI*	12 u/µl	0,1 µl	Promega / R6017
BamHI*	10 u/µl	0,1 µl	Promega / R6025
Eluato	N/D	16 µl	N/D
H ₂ O	N/D	1,8 µl	N/D

*Los amplicones con sitios de restricción internos para EcoRI o BamHI se cortaron con XbaI o BglII respectivamente en su lugar. La reacción EcoRI+BglII se hizo con tampón D de Promega.

[0257] La reacción BamHI+XbaI se hizo con tampón E de Promega.

Constituyente	concentración	volumen	proveedor / cat. #
tampón	10X	2 µl	Promega / C1263
T4 ADN ligasa	1-3 u/µl	0,2 µl	Promega / M1804
pCDH* restringido CD510B-1	1 ng/µl	7,8 µl	System Biosciences /
eluato	N/D	10 µl	N/D
Ligamiento durante toda la noche a	4 °C		

*Para clonación direccional, pCDH se cortó tanto con EcoRI como con BamHI. Un constructo alterno llamado pCDH- se hizo con sitios de restricción de EcoRI y BamHI inversos de modo que los amplicones con 5' BamHI y 3' EcoRI se clonaron en la dirección apropiada.

[0258] Los amplicones con un sitio EcoRI interno se cortaron con XbaI y se ligaron a un vector pCDH que se restringió con XbaI y BamHI.

[0259] Los ligados resultantes se transformaron separadamente en bacterias (células competentes Promega Single Step (KRX), cat. # L3002). 50 µl de células competentes se diluyeron con 950 µl de tampón II de transformación (10 mM de MOPS, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de RbCl, 15 % de glicerol, esterilizado con filtro). Por 20 µl de ligado, se añadieron 20 µl de células competentes diluidas. La mezcla se incubó durante 15 minutos en hielo, se sometió a choque térmico a 37 °C durante 30 segundos, se volvió a poner en hielo. Después de 2 minutos, las bacterias transformadas se reconstituyeron en 150 µl de caldo Luria (LB). Las bacterias se dejaron recuperar durante 20 minutos a 37 °C, después de lo cual se colocaron en placas separadamente en placas de LB-agar con ampicilina (50 ug/mL) y se cultivaron durante toda la noche a 37 °C.

[0260] Las colonias individuales de cada placa se escogen y subcultivan durante toda la noche en 400 µl de LB con ampicilina (50 ug/mL). 1 µl de subcultivo se lisa en 100 µl de agua para fines de secuenciación. El lisado bacteriano se usa en la siguiente reacción de PCR:

constituyente	concentración	volumen	proveedor / cat. #
tampón	5X	1 µl	fuentes privadas
dNTP	10 mM cada uno	0,1 µl	GE Healthcare/27-18(5-8)0-04
pCDH-directo	10 uM	0,1 µl	Integrated DANN Technologies
pPCDH-inverso	10 uM	0,1 µl	" "
lisado	1:100	1 µl	N/D
pol. de ADN Taq	desconocida	0,02 µl	fuentes privadas
H ₂ O	N/D	2,68 µl	N/D

temp. (°C)	tiempo	ciclos	
95	2 min	—	
95	15 s	40	
59*	15 s	40	* -0,1 °C / ciclo
72	90 s	40	
72	15 min		
4	∞		

pCDH-directo CACGCTGTTTTGACCTCCATAGA

pCDH-inverso CACTGACGGGACACCGGAG

5

(SEQ ID N.º: 311 y 312)

[0261] Los productos de PCR se diluyeron 25X. 1 µl de producto de PCR diluido se usó en la siguiente reacción de secuenciación de Sanger:

10

constituyente	concentración	volumen	proveedor / cat. #
tampón	N/D	1,9 µl	fuelle privada
BigDye v3.1	N/D	0,1 µl	ABI / 4336921
pCDH-seq	10 uM	0,1 µl	IDT (Integrated DNA Technologies)
producto de PCR	1:25	1 µl	N/D
H ₂ O	N/D	1,9 µl	N/D

temp. (°C)	tiempo	ciclos
94	10 s	—
50	5 s	40
60	2 min	40
10	∞	

pCDH-seq GACCTCCATAGAAGATTCTAGAGCTAGC (SEQ ID N.º: 313)

15

[0262] 30 µl de mezcla de precipitación (80 % de etanol, 50 mM de acetato sódico pH 5,5) se añadieron a cada uno de los productos reactivos de secuenciación. Las mezclas se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se centrifugaron a 5000 fcr (fuerza centrífuga relativa) durante 45 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y gránulos de ADN se lavaron con 30 µl de etanol 80 % helado y se centrifugaron a 5000 fcr durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y el granulado de ADN se secó en un bloque térmico durante 10 minutos. El granulado de ADN seco se disolvió en 10 µl de H₂O.

20

[0263] La solución de ADN resultante se secuenció en un analizador de ADN ABI 3730XL.

25

[0264] Las secuencias se compararon con las secuencias genómicas previstas. Los clones correctos se añadieron a la biblioteca. Para los clones incorrectos, se escogieron 4 colonias bacterianas adicionales y se analizaron para secuencia de inserción.

30

[0265] Los constructos de la biblioteca se subcultivaron durante toda la noche en 50 mL de LB con ampicilina (100 ug/mL) y se aislaron con el QIAfilter Plasmid Midi Kit de Qiagen (cat. # 12245) suplementado con el EndoFree Plasmid Buffer Set de Qiagen (cat. # 19048) según las instrucciones del fabricante. Se disolvió ADN en el tampón TE suministrado y se llevó a una concentración final de 500 ng/µl.

35

[0266] Pedimos constructos que no fuimos capaces de clonar nosotros mismos como minigenes de Integrated DNA Technologies. En estos casos, se clonaron la horquilla en toda su longitud más 20 pares de bases flanqueando cada sitio en nuestro vector como un servicio por IDT.

[0267] El embalaje y la producción viral se realizaron por System Biosciences como se describe en el manual del usuario de CD-500B1-CD523-A1.

Ejemplo 2. Transducción vírica y cribado

40

[0268] Día -8: Iniciar el cultivo celular de células RF24 y HUVEC en un matraz de cultivo T25

Revestir un matraz de cultivo T25 por tipo de célula con 2 ml de gelatina 1 % durante una hora a 37 °C. Descongelar las células (estas células estaban congeladas en 95 % de medio correspondiente y 5 % de DMSO) obtenidas a partir del congelador de -80 °C a 37 °C en un baño de agua. Limpiar el frasco con 70 % de etanol y transferir las células a los matraces de cultivo con 5 ml del medio de cultivo apropiado y colocar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. 4 horas después de la siembra, el medio que contiene DMSO se debe sustituir por

45

nuevo medio de cultivo caliente. Las células se incuban posteriormente durante tres días a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂.

[0269] *Día -5: Transferencia de células RF24 y HUVEC a un matraz de cultivo T75*

5 Revestir un matraz de cultivo T75 por línea celular con 6 ml de gelatina 1 % durante una hora a 37 °C. Eliminar la gelatina.

Lavar el matraz de cultivo T25 con células una vez con 1x PBS.

Extender 0,5 ml de TrypLE Express uniformemente sobre la superficie celular y eliminar el exceso. Incubar a temperatura ambiente hasta que todas las células se hayan separado.

10 Resuspender las células en 15 ml de medio de cultivo específico celular (como se ha hecho antes) e incubar las células en un matraz de cultivo T75 a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂.

[0270] *Día -1: Siembra de células RF24 y HUVEC en placas de 96 pocillos*

Protocolo por placa (todo se realiza por duplicado):

15 Revestir las placas de 96 pocillos con 30 µl/pocillo de gelatina 1 % durante una hora a 37 °C.

Lavar el matraz de cultivo T75 con células una vez con 1x PBS.

20 Extender 1,0 ml de TrypLE Express uniformemente sobre la superficie celular y eliminar el exceso. Incubar a temperatura ambiente hasta que todas las células se hayan separado.

Inactivar el proceso de tripsina mediante la adición de 5 ml/T75 de nuevo medio de cultivo específico.

Añadir 20 µl de solución de azul de tripán 0,4 % al mismo volumen de suspensión celular y contar las células utilizando la cámara de Fuchs-Rosenthal. Esto se hace contando 3 de los 16 cuadrados que consisten en 16 cuadrados cada uno. Para calcular la cantidad de células (n) por ml, el número medio de células se corrige para dilución y se multiplica por 5000 ($c/ml = n \times 2 \times 5000$).

25 Para sembrar una placa de 96 pocillos con células RF24 a una concentración de 1500 células/pocillo, se necesita suspender 1,8E+5 células en un volumen final de 18 ml. 150 µl de suspensión se deben añadir a cada pocillo.

Para sembrar una placa de 96 pocillos con HUVEC a una concentración de 2000 células/pocillo, se necesita suspender 2,4E+5 células en un volumen final de 18 ml. 150 µl de suspensión se deben adicionar a cada pocillo.

30 Las células colocadas en placas se incubarán a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂ durante toda la noche. Nota: una placa sembrada se llevará al filtro sin transducción de las células, para obtener una mejor comprensión de los efectos de la placa.

[0271] *Día 0: Transducción de células RF24 y HUVEC por la mañana*

35 Primero se añade polibreno a las placas de 96 pocillos. Las HUVEC serán expuestas a 6 µg/ml y las células RF24 a 8 µg/ml de polibreno en PBS. Por placa:

40 HUVEC: a 1270 µl de PBS, 200 µl de polibreno (1 mg/ml en PBS) se añaden para obtener 136 µg/ml de polibreno. $10 \times 136 = 170 \times 8$. Concentración final: 8 µg/ml de polibreno en 170 µl.

Células RF24: a 1320 µl de PBS, 150 µl de polibreno (1 mg/ml en PBS) se añaden para obtener 96 µg/ml de polibreno. $10 \times 102 = 170 \times 6$. Concentración final: 6 µg/ml de polibreno en 170 µl.

45 Para cada una de las 14 placas virales, dependiendo del título, un volumen específico se añadirá a las células. Esto difiere por línea celular debido a la diferencia en la concentración de la siembra.

Idealmente, la cantidad de virus adicionada debería ser alrededor de una multiplicidad de infección (MOI) de no más de 100 y no menos de 50 en ambas líneas celulares (véase figura 1 y 2). Debido a que cada placa contiene una matriz de títulos totalmente diferentes, la MOI debería ser no menos de 50. Todas las placas se diluirán 10 veces en 1x PBS antes de la adición. Esto se hace para minimizar errores de pipeteo. Debido a que la concentración de polibreno se establece para un volumen de 170 µl, y el volumen diferirá ligeramente por pocillo, ligeras diferencias de concentración de polibreno serán inevitables.

50 Añadir x µl de virus a las células (dos placas por virus) para facilitar una MOI de 50 o superior e incubar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂ durante 24 horas.

55 Después de la transducción, desinfectar la cabina de flujo mediante radiación UV antes de manipular las células de nuevo.

Como un control para los efectos de las placas, dos placas no tratadas se incubarán durante 8 días junto con las placas transducidas.

[0272] *Día 1: Renovación del medio de las células RF24 y HUVEC 24 horas después de la transducción. Eliminar todo el medio que contiene virus utilizando un multicanal y desecharlo según el procedimiento MLII.*

60 Añadir 150 µl de medio nuevo y caliente (37 °C) a las células e incubar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. También renovar el medio de la(s) placa(s) no transducida(s).

[0273] *Día 4: Renovación del medio de las células RF24 y HUVEC 96 horas después de la transducción. Eliminar 100 µl del medio que contiene virus utilizando un multicanal y desecharlo según los protocolos MLII.*

65 Añadir 100 µl de medio nuevo y caliente (37 °C) a las células e incubar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂.

También renovar el medio de la(s) placa(s) no transducida(s).

[0274] *Día 7:* Renovación del medio de las células RF24 y HUVEC 168 horas después de la transducción. Eliminar todo el medio que contiene virus utilizando un multicanal y desecharlo según los protocolos MLII.

- 5 Añadir 150 µl de medio nuevo y caliente (37°C) a las células e incubar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. También renovar el medio de la(s) placa(s) no transducida(s).

[0275] *Día 8:* Ensayo de viabilidad celular, 8 días después de la transducción usando MTS

Añadir 20 µl/pocillo de solución MTS a 150 µl de medio.

- 10 Incubar a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂ durante 4 horas. Agitar las placas de modo que todos los cristales no disueltos se disuelvan y medir la absorbancia a 492 nm utilizando el Multiskan FC.

Ejemplo 3. Selección y confirmación de impactos

- 15 [0276] Para seleccionar los miARN que afectan al cultivo celular, la puntuación Z se eligió. Para evaluar la distribución normal por placa y de placas combinadas, un gráfico de distribución se hizo con la media y la desviación típica calculadas y con los valores reales. Diversos métodos para calcular la puntuación Z se evaluaron con cortes diferentes:

Método 1:

[0277] Este método calcula la puntuación Z de miARN individual por placa. La puntuación Z estándar usa la media y la DT de la población de miARN.

Método 2:

[0278] Este método calcula la puntuación Z robusta de miARN individual por placa. La puntuación a Z robusta usa la media y, en vez de la DT, la desviación absoluta media (DAM) multiplicada con un número dado (1,48) para simular una población normal (Chung N. *et al.*, J Biomol Screea 13:149-58, 2008).

- 30 [0279] Los métodos anteriormente mencionados se usaron para seleccionar los inhibidores significativos y estimuladores significativos para el cribado de MTS. Para evaluar la distribución normal por placa y de placas combinadas, un gráfico de distribución se hizo con la media y la desviación típica calculadas y con los valores reales. La correlación entre los resultados de MTS individuales de las pruebas por duplicado fue 0,85 y se hizo una selección de impactos utilizando el valor medio.

- 40 [0280] La biblioteca contiene aproximadamente 1120 miARN. Todos los miARN se colocaron en placas en catorce placas de 96 pocillos, dejando las columnas externas 1 y 12 vacantes para vector positivo (miR-92a-1) y un vector pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro vacío como un control negativo. La biblioteca se cribó por duplicado con un umbral de MOI de 50 con línea celular endotelial HUVEC y RF24 (figura 3). Un total de 110 impactos se seleccionaron. La etapa siguiente fue realizar la confirmación de impacto con títulos normalizados por placa. Esto resultó en 39 impactos reconfirmados, de los cuales 6 fueron proproliferativos. Estos impactos se confirmaron nuevamente por normalización de los títulos por miARN (MOI 100 y 200) para excluir toxicidad vírica o efectos dependientes de la dosis de miARN individuales. En este experimento usamos un grupo de control de población de vector vacío diferente y miARN no sensibles, por duplicado y reflejados en placas, para excluir adicionalmente los efectos de la placa. Esto resultó en los impactos de miARN finales que regulan la proliferación en células HUVEC y RF24 (tabla 1).

- 50 Tabla 1. Impactos de miARN de ensayo de MTS normalizado representados en absorbancia delta. La población del vector vacío se usó como grupo de control.

miARN	Efecto	HUVEC Absorbancia delta MOI 100	HUVEC Absorbancia delta MOI 200	RF24 Absorbancia delta MOI 100	RF24 Absorbancia delta MOI 200
hsa-mir-7-3	Inhibitorio	-0,73	-0,79	-0,82	-0,90
hsa-mir-26b	Inhibitorio	-0,53	-0,64	-0,49	-0,68
hsa-mir-574	inhibitorio	-0,52	-0,54	-0,13	-0,02
hsa-mir-27a	Inhibitorio	-0,07	-0,17	-0,21	-0,26
hsa-mir-92a-1	Inhibitorio	0,36	-0,22	0,65	0,30
hsa-	Inhibitorio	-0,49	-0,56	-0,43	-0,45

mir-190b					
hsa-mir-142	Inhibitorio	-0,64	-0,72	-0,21	-0,30
hsa-mir-9-2	Inhibitorio	-0,52	-0,59	-0,26	-0,56

Ejemplo 4. Aislamiento de ARN total

5 [0281] Las células HUVEC y RF24 se sembraron en una placa de 24 pocillos y se transdujeron a una MOI de 50 según los protocolos de transducción precedentes. En las células del día 8, las células se lavaron con PBS helado, 1 ml de PBS se añadió y la placa se puso en hielo. Las células se recogieron utilizando un raspador celular y se pipetearon en un tubo de Eppendorf. Las células se granularon, se aspiró PBS y las células se congelaron a -80 °C.

10 [0282] Para aislamiento de ARN, las células se descongelaron en hielo, 200 µl de Trizol (Invitrogen; 15596-026) se adicionaron seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. 40 µl de cloroformo se añadieron y los tubos se agitaron e incubaron durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y dos tercios de la capa acuosa superior fueron transferidos a un tubo sin RNAsa no adhesivo. La capa acuosa restante se transfirió a un tubo diferente como reserva.

15 [0283] 1 µl de Glycoblue (Applied Biosystems, AM9510) se añadió a todas las muestras junto con 100 µl de isopropanol sin RNAsa y el ARN se precipitó a -20 °C durante toda la noche para el primer lote y durante dos semanas para el lote de reserva. Las muestras se centrifugaron a velocidad máxima durante mínimamente 45 minutos a 4 °C y el granuloso se lavó con 200 µl de etanol 70 % sin RNAsa. Las muestras se centrifugaron a 20 7400 x g durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se quitó. El granuloso se secó y se disolvió en 25 µl de H₂O para el primer lote y 15 µl de nucleasa sin H₂O para el lote de reserva.

[0284] El equipo de ARN para el Qubit (Invitrogen) se usó según el protocolo para medir la concentración de ARN final.

Ejemplo 5. RT-PCR y qPCR de tallo-bucle

[0285] La expresión de microARN se determinó mediante RT-PCR de tallo-bucle como se ha descrito (Chen, C. *et al* Nucleic Acids Res. 33: E179 (2005)). Para la RT-PCR de tallo-bucle, cebadores de tallo-bucle se diseñaron para cada miARN individual según las secuencias maduras en miRBase 15 y 16 y, si está presente, una isoforma de las mismas.

Para la qPCR, cebadores directos individuales se diseñaron también según la secuencia de miARN maduro en miRBase 15 y 16 (véase a continuación). El cebador inverso universal se diseñó para la secuencia de tallo-bucle (véase a continuación). Se usó U6 como un gen hogar.

35 SL-hsa-miR-7 (SEQ ID N.º: 314)
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGAACAACA
forward_hsa-miR-7 (SEQ ID N.º: 315)
GCCCCGCTTGGGAAGACTAGTGATTTTG
40 SL_hsa-miR-26b (SEQ ID N.º: 316)
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACACCTAT
forward_hsa-miR-26b (SEQ ID N.º: 317)
TGCCAGTTCAAGTAATTCAGGAT
SL_hsa-miR-26b* (SEQ ID N.º: 318)
45 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGAGCCA
forward_hsa-miR-26b* (SEQ ID N.º: 319)
TGCCAGCCTGTTCTCCATTACTTG
SL_hsa-miR-574-5p (SEQ ID N.º: 320)
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACACACAC
50 forward_hsa-miR-574-5p (SEQ ID N.º: 321)
TGCCAGTGAGTGTGTGTGTGTGAGT
SL_hsa-miR-574-3p (SEQ ID N.º: 322)
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACTGTGGG
forward_hsa-miR-574-3p (SEQ ID N.º: 323)
55 TGCCAGCACGCTCATGCACACACC
SL_hsa-miR-27a (SEQ ID N.º: 324)
GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGCGGAA
forward_hsa-miR-27a (SEQ ID N.º: 325)
TGCCAGTTCACAGTGGCTAAGTT
60 SL_hsa-miR-27a* (SEQ ID N.º: 326)

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCTCA
 forward_hsa-miR-27a* (SEQ ID N.º: 327)
 TGCCAGAGGGCTTAGCTGCTTGTG
 SL_hsa-miR-92a-1 (SEQ ID N.º: 328)
 5 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAACAGGC
 forward_hsa-miR-92a-1 (SEQ ID N.º: 329)
 TGCCAGTATTGCACTTGTCCCGGC
 SL_hsa-miR-190b (SEQ ID N.º: 330)
 10 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAAACCCA
 forward_hsa-miR-190b (SEQ ID N.º: 331)
 GCGCGCTAAGCCCTTACCCCAAAAA
 SL_hsa-miR-142-5p (SEQ ID N.º: 332)
 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGTAGT
 forward_hsa-miR-142-5p (SEQ ID N.º: 333)
 15 GCGCGCCATAAAGTAGAAAGCAC
 SL_hsa-miR-142-3p (SEQ ID N.º: 334)
 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCCATA
 forward_hsa-miR-142-3p (SEQ ID N.º: 335)
 TGCCAGTGTAGTGTTCCTACTTTA
 20 SL_hsa-miR-9 (SEQ ID N.º: 336)
 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCATAC
 forward_hsa-miR-9 (SEQ ID N.º: 337)
 TGCCAGTCTTTGGTTATCTAGCTGT
 SL_hsa-miR-9* (SEQ ID N.º: 338)
 25 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACTTTC
 forward_hsa-miR-9* (SEQ ID N.º: 339)
 TGCCAGATAAAGCTAGATAACCGA
 qPCR inverso (SEQ ID N.º: 340)
 GTGCAGGGTCCGAGGT
 30 cebador de tallo-bucle U6 (SEQ ID N.º: 341)
 GTCATCCTTGCGCAGG
 cebador directo U6 (SEQ ID N.º: 342)
 CGCTTCGGCAGCACATATAC
 cebador inverso U6 (SEQ ID N.º: 343)
 35 AGGGGCCATGCTAATCTTCT

[0286] Para la qPCR, 1 µl de producto de RT-PCR se usó en una reacción con 25 pmol directo en cebador
 inverso, H₂O y supermezcla 2X iQ SYBR Green (Bio-rad, 170-8880). La reacción de PCR se hizo en un BioRad
 CFX96 con una etapa inicial de 5 minutos de 95 °C, 45 ciclos de 10 segundos 95 °C, 20 segundos 60 °C y 10
 40 segundos 72 °C, después de lo cual se realizó un análisis de curva de fusión. Los niveles de expresión de
 miARN relativos se calcularon. Los valores de CT para muestras de vector inducido y vacío de miARN se
 obtuvieron y el correspondiente valor U6 CT fue sustraído. La diferencia entre los niveles de miARN de vector
 vacío y niveles de miARN en muestras transducidas se calculó como una medida para la sobreexpresión.

45 [0287] Cálculos ΔCt :

1. El ΔCt = Ct medio de miARN - Ct medio de gen de control U6.
2. Calcular $\Delta\Delta Ct$ (el $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt transducido - ΔCt no transducido).
3. Estos cálculos pueden producir números negativos o positivos.
- 50 4. Calcular el cambio de veces: si el $\Delta\Delta Ct$ es negativo, hay un aumento de cambio de veces y la
 ecuación es: $2^{-[\Delta\Delta Ct \text{ medio}]}$ o si el $\Delta\Delta Ct$ es positivo, hay una reducción de cambio de veces y la
 ecuación es: $-(2^{[\Delta\Delta Ct \text{ medio}]})$.

Los impactos finales se reconfirmaron mediante qPCR. Las HUVEC se transdujeron con miARN lentiviral con
 55 una MOI de 50. ARN se aisló y se realizó RT y qPCR de tallo-bucle. Los resultados se representan en la tabla 2.

Tabla 2. Impactos finales confirmados por qPCR en HUVEC.

Los resultados se representan en aumento de veces.			
HUVEC	Aumento de veces	HUVEC	Aumento de veces
miR-7	248,46	miR-92a-1	2,55
miR-7 no transducido	1,00	miR-92a-1 no transducido	1
miR-26b	7,47	Frasco miR-92a-1	0,90
miR-26 no transducido	1,00	miR-92a-1 no transducido	1
miR-26b*	0,00	miR-27a	81,70
miR-26b* no transducido	1,00	miR-27a no transducido	1

miR-142-5p	224,64	hsa-miR-27a*	1,58
miR-142-5p no transducido	1,00	miR-27a* no transducido	1,00
miR-142-3p	1727,70	miR-190b	694760
miR-142-3p no transducido	1,00	miR-190b no transducido	1
miR-574-5p	48,17		
miR-574-5p no transducido	1,00		
miR-574-3p	1,60		
miR-574-3p no transducido	1,00		
miR-9	1048,5		
miR-9 no transducido	1,00		
miR-9*	2864,33		
miR-9* no transducido	1,00		

Ejemplo 6. Análisis de secuencia de ADN

[0288] La secuencia de los miARN clonados en los vectores lentivirales para los impactos se verificó de la siguiente manera. ADN proviral se amplificó por PCR en la fracción de ADN genómico en las muestras de ARN, usando 1 µl de muestra de ARN como entrada, y cebadores específicos de vector lentiviral pCDH 15 (directo: 5'-CACGCTGTTTTGACCTCCATAGA- 3', inverso: 5'-CACTGACGGGCACCGGAG-3', (SEQ ID N.º: 344, 345)) durante 30 ciclos a una temperatura de recodio de 58 °C. El análisis de secuencia de ADN se realizó utilizando 0,1-1 µl de producto de PCR, 0,5 ul de 10 uM de cebador específico de pCDH (5'-GACCTCCATAGAAGATTCTAGAGCTAGC-3', (SEQ ID N.º: 313)), y el Big Dye v3.1 kit (Applied Biosystems). Los productos se analizaron en un 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Los datos se recogieron utilizando el Collection Software v3.0 y se analizaron utilizando el programa Sequencing Analysis v5.3.1 (Applied Biosystems). Esta secuencia de ADN de Sanger confirmó la secuencia del miARN transducido en las células (tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de ADN de Sanger de lentivirus transducido en HUVEC.

HUVEC	Entrada	ID	Búsqueda	Búsqueda	Sujeto	Sujeto	Cadena	Puntuación	Valor E
			inicio	final	inicio	final			
hsa-mir-7-3	MI0000265	hsa-mir-7-3	30	139	1	110	+	550	5,00E-39
hsa-mir-26b	MI0000084	hsa-mir-26b	10	86	1	77	+	385	2,00E-25
hsa-mir-574	MI0003581	hsa-mir-574	32	127	1	96	+	480	3,00E-33
hsa-mir-27a	MI0000085	hsa-mir-27a	44	120	1	78	+	341	1,00E-21
hsa-mir-92a-1	MI0000093	hsa-mir-92a-1	50	127	1	78	+	390	8,00E-26
hsa-mir-190b	MI0005545	hsa-mir-190b	10	88	1	79	+	395	3,00E-26
hsa-mir-142	MI0000458	hsa-mir-142	55	141	1	87	+	435	2,00E-29
hsa-mir-9-2	MI0000467	hsa-mir-9-2	5	91	1	87	+	435	1,00E-29

Ejemplo 7. Transfección de mimético sintético

[0289] Para validar los miARN seleccionados, se realizó transfección utilizando un mimético sintético utilizando X-tremeGENE (Roche, 04476093001) según el protocolo del fabricante (0,5 µl de X-tremeGENE para cada uno de los 96 pocillos). Los miméticos (precursores de miARN pre-miR™) y ARNip (ON-TARGET plus SMARTpool) se pidieron respectivamente a Ambion y Dharmacon y se evaluaron en concentraciones diferentes. Las secuencias miméticas usadas son secuencias maduras de moléculas de miARN correspondientes identificadas en la tabla 5. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTS como se ha descrito anteriormente.

Materiales:

[0290]

Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-574-5p (PM13081)
Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-7 (PM 10047)
Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-190b (PM13035)
Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-142-3p (PM10398)
Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-142-5p (PM10979)
Control negativo de precursor de miARN Pre-miR™ #1 (AM17110)

PLK1 ON-TARGETplus SMARTpool (L-003290-00-0005)

[0291] Para convalidar adicionalmente la función de los miARN seleccionados, se usó una molécula mimética sintética para miR-7, miR-574-5p, miR-190b, miR-142-3p y miR-142-5p. En el mismo ensayo de MTS, un mimético sintético, así como un miARN de control y, como un control positivo, un ARNip PLK1 se añadió a células HUVEC en concentraciones en aumento (figura 4, 5 y 6). El control de miARN negativo no mostró ningún efecto en el cultivo celular. El ARNip para PLK1 mostró una inhibición de la viabilidad celular en una manera dependiente de la dosis. De forma similar, el mimético para miR-7, miR-574-5p, miR-190b, miR-142-3p y miR-142-5p también mostró una reducción del cultivo celular en una manera dependiente de la dosis. Además, los resultados para miR-190b, miR-142-3p y miR-142-5p se representan en la tabla 9.

Tabla 9. HUVEC transfectadas con miméticos en un ensayo de MTS representadas en absorbancia relativa al X-tremeGene. Absorbancia relativa media $\pm$ desviación típica.

Concentración (nM)	miARN mezclado	ARNip-PLK	miR-190b	miR-142-3p	miR-142-5p
10	0,90 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,02
30	0,86 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01
50	0,79 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03

Ejemplo 8. Ensayo de formación de tubos (Matrigel) (ejemplo de referencia)

[0292] Para confirmar el efecto antiangiogénico de miR-190b, miR-142-3p y miR-142-5p, realizamos un ensayo de formación de tubos con HUVEC, ya que las HUVEC forman capilares como los vasos sanguíneos en Matrigel. Como se muestra en las figuras 7 y 8, miR-190b, miR-142-3p y miR-142-5p inhiben la formación de tubos capilares por HUVEC en comparación con los grupos de control, lipofectamina y miARN mezclado.

Materiales y métodos:

[0293] Membrana basal de matriz BD Matrigel; número de catálogo de BD Bioscience 356237

[0294] Las HUVEC se sembraron en una placa de 12 pocillos (45.000 células por pocillo) y se transfectaron el día siguiente con XtremeGene y mimético correspondiente. Las células se incubaron durante 48 horas. Mientras que la placa recubierta de Matrigel se incubaba durante 30 minutos a 37 °C, las HUVEC transfectadas se contaron y prepararon en una suspensión celular de 7.500 células/100 μ l en el medio de cultivo de HUVEC completo. 100 μ l de suspensión celular se añadieron a cada uno de los pocillos recubiertos de Matrigel de los 96 pocillos. La placa se incubó en 37 °C humedecidos con 5 % de CO₂.

Las placas se examinaron después de 3 horas. Los cultivos se puntuaron en ese momento para formación de tubos capilares, y de nuevo después de 16-20 horas. Los datos en las figuras 7 y 8 representan la formación de tubos después de 16-20 horas.

Ejemplo 9. Ensayo de formación de tubos (Matrigel) con HUVEC transfectadas con mimético sintético (ejemplo de referencia)

[0295] Para convalidar los miARN seleccionados, se realizó transfección utilizando un mimético sintético utilizando X-tremeGENE (Roche, 04476093001) según el protocolo del fabricante (6 μ l de X-tremeGENE para cada 12 pocillos). Miméticos (precursores de miARN Pre-miR™) y ARNip (ON-TARGET plus SMARTpool) se pidieron a Ambion y Dharmacon, respectivamente. Las secuencias miméticas usadas son secuencias maduras de moléculas de miARN correspondientes identificadas en la tabla 5.

[0296] Para confirmar el efecto antiangiogénico de un miR-9 tal como un miR-9*, realizamos un ensayo de formación de tubos con HUVEC, ya que forman capilares como los vasos sanguíneos en Matrigel. Las HUVEC se sembraron en una placa de 12 pocillos (45.000 células por pocillo) y se transfectaron el día siguiente con X-tremeGene y el mimético o ARNip correspondiente. Las células se incubaron durante 48 horas.

Mientras la placa recubierta de Matrigel se incubaba durante 30 minutos a 37 °C, las HUVEC transfectadas se contaron y se prepararon en una suspensión celular de 7.500 células/100 μ l en el medio de cultivo de HUVEC completo. 100 μ l de suspensión celular se añadieron a cada pocillo recubierto de Matrigel de los 96 pocillos. La placa se incubó en 37 °C humedecidos con 5 % de CO₂ y después de tres horas se examinó. Los cultivos se puntuaron en este momento para la formación de tubos capilares, y de nuevo después de 16-20 horas.

Como se muestra en la figura 9; miR-9* inhibe fuertemente la formación de tubos capilares por HUVEC en comparación con los grupos de control, X-tremeGene y ARNip mezclado. Este ensayo muestra que miR-9* muestra una fuerte inhibición de la formación de tubos.

Materiales y métodos:

[0297]

Membrana basal de matriz BD Matrigel; Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® de número de catálogo de BD Bioscience 356237 hsa-miR-9* (PM13072)
Control negativo de ARNip personalizado (Ambion)
Sentido: CAUCGUCAUCGUAGCGCAtt (SEQ ID N.º: 346)
Antisentido: UGCGCUACGAUCGACGAUGtt (SEQ ID N.º: 347)
PLK1 ON-TARGETplus SMARTpool (L-003290-00-0005)

Ejemplo 10. Transfección de mimético sintético (ejemplo de referencia)

[0298] Para confirmar adicionalmente los resultados descritos en el ejemplo 9, que muestra que miR-9* inhibe la formación de tubos *in vitro*, se realizó un ensayo de MTS de viabilidad celular.

Materiales y métodos:

[0299] Las HUVEC cultivadas en medio EGM-2 se transfectaron con un mimético sintético usando X-tremeGENE (Roche, 04476093001) según el protocolo de los fabricantes (0,5 µl de X-tremeGENE para cada uno de los 96 pocillos).

Miméticos (precusores de miARN Pre-miR™) y ARNip (ON-TARGET plus SMARTpool) se pidieron respectivamente a Ambion y Dharmacon y se evaluaron en concentraciones diferentes. Las secuencias miméticas usadas son secuencias maduras de moléculas de miARN correspondientes identificadas en la tabla 5. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTS como se ha descrito anteriormente.

Materiales:

[0300]

Precusores de miARN Pre-miR™ de Ambion® hsa-miR-9* (PM13072)
Control negativo de precursor de miARN Pre-miR™ #1 (AM17110)
ARNip mezclado ON-TARGETplus SMARTpool (D-001810-10-05)
PLK1 ON-TARGETplus SMARTpool (L-003290-00-0005)
Medio EGM-2, Lonza (CC-3162)

Resultados:

[0301] La figura 10 muestra que la viabilidad celular de HUVEC se inhibe de manera dependiente de la dosis por miR-9*. En el mismo ensayo de MTS, un mimético sintético, un miARN de control y un control positivo, un ARNip PLK1 se añadió a células HUVEC en concentraciones en aumento. El control de miARN negativo y el control de ARNip no mostraron ningún efecto en el cultivo celular hasta una concentración de 15 nM. El tratamiento con ARNip para PLK1 inhibe la viabilidad celular en una manera dependiente de las dosis. De forma similar, el tratamiento con el mimético para miR-9* muestra una reducción de la viabilidad celular similar a la inhibición de la viabilidad celular por siPLK1.

Ejemplo 11. Ensayo de angiogénesis *in vitro*: Ensayo de germinación

[0302] El ensayo de germinación de célula endotelial tridimensional se usó como un modelo para investigar el papel de miR-7 y miR-574-5p en la proliferación y migración celular endotelial. Transfectamos HUVEC con miméticos y cosechamos las células cuatro días después de la transfección para formar esferoides durante toda la noche con el método de gota pendiente. Los esferoides se colocaron en un gel y se estimularon con bFGF para formar activamente brotes capilares.

Materiales y métodos:

[0303] Las HUVEC se transfectaron con 50 nM de miméticos (véase el ejemplo 7) y se suspendieron en el medio de cultivo que contenía 20 % (v/v) de metocel y 10 % de suero humano inactivado por calor, a una densidad final de 40.000 células/ml. El metocel se diluyó a partir de una solución madre obtenida por disolución de 6 g de carboximetilcelulosa (viscosidad 4.000 cp; Sigma-Aldrich) en 500 ml de medio 199.

[0304] Un esferoide único se prepara a partir de 1.000 células endoteliales. Una gota de 25 µl se pipetea en el interior de la tapa invertida de un plato de petri cuadrado de 12x12 cm La tapa se coloca cuidadosamente en su posición normal sobre el plato que contiene 10 ml de PBS y se coloca durante toda la noche en una incubadora a 37 °C (5 % de CO₂). Las gotas se pipetea con una pipeta multicanal para asegurar esferoides de igual tamaño y un máximo de 100-120 esferoides se colocan en el interior de un plato.

[0305] Los esferoides se cosecharon enjuagando la tapa suavemente con 2x 5 ml de PBS con 10 % de FCS inactivado por calor, se recogieron en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 300 g durante 5 min. El medio se aspira y el granulado de esferoides se suelta suavemente raspando sobre una superficie áspera.

[0306] Los geles de colágeno para la incrustación de esferoides se prepararon a partir de colágeno de tipo I bovino PureCol (Nutacon) en el medio 199, pH 7,4, por combinación, en hielo, de 2/3 de volumen final de colágeno y 1/12 de volumen final de 10x M199, que se neutraliza con 0,2 M de NaOH helado (solución A). En otro tubo (B), NBCS (1/10 de volumen final) y heparina (0,1 % de volumen final) se mezclan con materia prima methocell (15 % de volumen final). Posteriormente, A y B se mezclan suavemente y se usan para cubrir los esferoides.

[0307] Los esferoides de HUVEC se absorbieron en esta mezcla completa. Luego, 400 µl de gel se dividieron en partes alícuotas en µ-láminas precalentadas (Ibidi, Alemania) y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37 °C (5 % de CO₂) para que los geles polimericen. Después de este paso, 100 µl de medio de revestimiento que contiene bFGF (100 ng/ml; 20 ng/ml de concentración final) se añadieron para incubación durante toda la noche a 37 °C (5 % de CO₂). Aproximadamente 20 esferoides deberían estar presentes en un pocillo. Las imágenes de contraste de fases se capturaron utilizando una cámara (Hitachi GiGE, 1,4 MB) enlazada a un microscopio invertido (Leica DMI3000). El brote capilar *in vitro* se cuantificó midiendo la longitud de brote acumulativa y el número de brotes por esferoide usando software ImageJ. Para cada grupo de tratamiento, la longitud de brote acumulativa media y el número medio de brotes se calculó obteniendo la media de estos parámetros sobre 10 esferoides.

Resultados:

[0308] La figura 11A muestra un ejemplo de las imágenes que se usaron para la cuantificación de las propiedades de germinación del esferoide de HUVEC. Las imágenes muestran que bFGF indujo la formación de brotes. Las imágenes también muestran que los esferoides de HUVEC generados a partir de HUVEC que han sido tratadas con miR-7, miR-574-5p y miR-27a forman menos brotes y más cortos en comparación con las HUVEC de control tratadas con X-tremegene (simulación) o con mezcla de miR. Las figuras 11B y C representan la cuantificación de los brotes por grupo de tratamiento y muestran que miR-7, miR-574-5p y miR-27a inhiben significativamente la formación de brotes y la longitud de brote ($p < 0,001$ unidireccional Anova). MiR-27a se usó como control positivo, ya que se ha descrito en la bibliografía que este miARN interviene en el proceso de angiogénesis.

Ejemplo 12. Prueba *in vivo* de miARN en el modelo de tumor N2A

Materiales y métodos:

[0309] Para probar la eficacia de los miARN antiproliferativos *in vivo*, usamos una configuración *in vivo* adaptada de Vader *et al.* (Angiogenesis. 2011 (4):457-66). Ratones A/J machos normales de seis a ocho semanas de edad (Harlan, Países Bajos) fueron inyectados subcutáneamente con 100 µl de células Neuro2A (1×10^7 células/ml). Los tamaños del tumor se midieron a diario con un calibrador digital y el volumen del tumor se calculó usando la fórmula siguiente: longitud x anchura² x 0,52. El tratamiento comenzó con un volumen de tumor de entre 40-70 mm³ por inyección intratumoral de 10 µg de miARN o ARNip en los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 seguido de electroporación con un ajuste de 200 V/cm utilizando un electroporador ECM 830 (BTX, San Diego, CA) establecido para administrar impulsos 2x2 en ángulos perpendiculares. En el día 12, los ratones fueron sacrificados y se extirparon los tumores. Los miméticos de miARN se pidieron a Ambion basándose en la secuencia listada en la tabla 5. La mezcla de miR se pidió a Ambion como se describe en el ejemplo 7. siVEGFR2 se pidió a Ambion y contenía la siguiente secuencia:

Sentido: 5'-CCGGAAAUUCUGGAGAAUCAAtt-3' (SEQ ID N.º: 397)
Antisentido 5'-UGAUUCUCCAGAUUUCCGGtt-3' (SEQ ID N.º: 398)
Los miARN y ARNip se disolvieron en tampón fosfato (PBS).

Resultados:

[0310] La figura 12 muestra las curvas de crecimiento del tumor para grupos de animales que fueron tratados con tampón fosfato (PBS), mezcla de miR, miR-7, miR-574-5p, miR-9*, miR-27a o siVEGFR-2. Las curvas muestran que la curva de crecimiento del tumor de los animales tratados con mezcla de miR (n=6) es similar a la de los animales tratados con PBS (n=6), lo que indica baja toxicidad de miARN no funcional. Las curvas también muestran que los animales tratados con miR-7 (n=7) muestran un crecimiento del tumor reducido de aproximadamente el 50 % en comparación con el grupo tratado con mezcla de miR (n=6) (figura 12A). El mismo efecto se observó entre el día 6 y 10 para los ratones (n=7) tratados con mimético de miR-574-5p (figura 12B). Sorprendentemente, los animales tratados con el miARN miR-27a antiangiogénico de referencia (n=7, figura 12C) mostraron menos reducción en el crecimiento del tumor en comparación con miR-7 y miR-574-5p. Como un control positivo en el experimento *in vivo*, animales fueron tratados con siVEGFR-2 (n=7, figura 12D). Este grupo mostró una represión del crecimiento del tumor significativa a partir del día 7 hasta el final del experimento en comparación con los grupos de PBS (n=6) y de la mezcla de miR (n=6). Las curvas de crecimiento del tumor de la figura 12E se generaron utilizando una cohorte diferente de ratones. Los tumores tratados con miR-9*

mimético (n=8) muestran una represión de crecimiento del tumor significativa a partir del día 7 hasta el final del experimento en comparación con los ratones tratados con PBS (n=8) y con mezcla de miR (n=10).

Ejemplo 13. Inmunohistoquímica: Coloración con anticuerpo CD31

[0311] Para examinar si la inhibición del crecimiento del tumor (véase el ejemplo 12) se puede asignar o no a una reducción en la vasculatura tumoral, los tumores se colorearon con el marcador de célula endotelial CD31. La densidad microvascular (MVD) se calculó por cuantificación de la coloración con CD31.

Materiales y métodos:

[0312] Las secciones tumorales incrustadas con parafina de 6 µm se inmunocolorearon para CD-31. Las secciones de tumor incrustadas con parafina se desparafinaron en xileno y se hidrataron en una serie graduada de baños de alcohol. Después de lavar las secciones en agua desmineralizada, las secciones se hirvieron durante 15 min en 10 mM de tampón de citrato (pH 6). Después de alcanzar la temperatura ambiente, las secciones se lavaron con 1x PBS seguido de incubación de las mismas en 5 % de suero de cabra normal (Dako x090710) en 1 % de BSA/PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Luego los tejidos se incubaron con anticuerpo primario CD31 de conejo antirratón en 1 % de BSA/PBS a 4 °C durante toda la noche. El día siguiente después de alcanzar la temperatura ambiente, los tejidos se lavaron 3x con PBS. Para inactivar la peroxidasa endógena, los tejidos tumorales se incubaron en 0,3 % de H₂O₂/PBS (1 parte 30 % de H₂O₂ en 9 partes de PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Después del lavado 3x con PBS, las secciones se incubaron con poliHRP de cabra anticonejo Bright Vision (Immunologic) durante 30 min a temperatura ambiente. Las láminas se lavaron de nuevo y posteriormente se incubaron en solución de DAB (3,3'-diaminobencidina) (500 µg/ml) durante 1 min seguido de lavado dos veces con agua desmineralizada. Las láminas se transfirieron a hematoxilina (Mayers, J.T. Baker, Países Bajos) durante 15 s seguido de otros 2 pasos de lavado con agua desmineralizada y finalmente con agua del grifo. Las láminas se deshidrataron de nuevo transfiriéndolas posteriormente a 70 %, 90 %, 95 %, y 100 % de etanol y xileno. Las secciones se secaron seguido de adición de 3 gotas de Pertex en la lámina y se cubrieron con cubierta de vidrio para análisis adicional.

[0313] La cuantificación de la densidad de los microvasos (MVD) se hizo contando las estructuras lumenales coloreadas positivamente en cuatro o cinco imágenes representativas por animal. Se analizaron cuatro animales por grupo de tratamiento.

Resultados:

[0314] La coloración con CD31 de tejidos de tumor tratados con miR-7 muestra una reducción significativa en la MVD en comparación con los tumores tratados con mezclas de miR (figura 13). La reducción en la MVD es similar a la observada tras el tratamiento con siVEGFR2. Esto muestra que miARN-7 inhibe la microvascularización y actúa como un miARN antiangiogénico.

Tabla 4. Secuencias precursoras de miARN identificados en el cribado o referidos en la solicitud

Listado de secuencias precursoras de miARN (dirección 5' a 3'). Todas las secuencias se obtuvieron de miRBase (versión 16: septiembre 2010; www.mirbase.org).

SEQ ID N.º	miARN	secuencia del precursor
1	hsa-mir-7-1	UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG UUUUUAGAUAAACUAAAUCGACAACAAUCACAGUCUGCCAU AUGG CACAGGCCAUGCCUCUACAG
2	hsa-mir-7-2	CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCAUCUGGAAGACUAGUGA UUUUGUUGUUGUCUUACUGCGCUCAACAACAAAUCCCAGUCUACCU AAUGGUGCCAGCCAUCGCA
3	hsa-mir-7-3	AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAAGACUAGUGAU UUUGUUGUUCUGAUGUACUACGACAACAAGUCACAGCCGCCUCAU AGCGCAGACUCCCUUCGAC
4	hsa-mir-26b	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUUGUGUGCUGUCCA GCCUGUUCUCCAUAUACUUGGCUCGGGGACCGG

5	hsa-mir-574	GGGACCUGCGUGGGUGCGGGCGUGUGAGUGUGUGUGUGAGUGU GUGUCGCUCCGGGUCCACGCUCAUGCACACACCCACACGCCACAC UCAGG
6	hsa-mir-27a	CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGGGUCCACACCAAG UCGUGUUCACAGUGGCUAAGUUCCGCCCCCAG
7	hsa-mir-92a-1	CUUUCUACACAGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAU GGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUUGAGUUUGG
8	hsa-mir-132	CCGCCCCCGCGUCUCCAGGGCAACCGUGGCUUUCGAUUGUUACUGU GGGAACUGGAGGUAACAGUCUACAGCCAUGGUCGCCCCGCAGCACG CCCACGCGC
9	hsa-mir-126	CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACU UCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA
10	hsa-mir-21	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGG CAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA
11	hsa-mir-145	CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCUUAGAUGCU AAGAUGGGGAUUCCUGGAAAUACUGUUCUUGAGGUCAUGGUU
12	hsa-let-7a-1	UGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUAGGGUCACACCCACCA CUGGGAGAUAAUAUACAAUCUACUGUCUUUCCUA
13	hsa-let-7a-2	AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUAGAAUUAUCAAGGGAG AUAACUGUACAGCCUCCUAGCUUUCU
14	hsa-let-7a-3	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGGCUCUGCCCUGCUAUG GGAUAAUAUACAAUCUACUGUCUUUCCU
15	hsa-mir-221	UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCUGGCAUACAAUGUAGAUU UCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUCAGG CUACCUGGAAACAUGUUCUC
16	hsa-mir-222	GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUCAAUGGCUCAGUAGCCAGUGU AGAUCUGUCUUUCGUAAUCAGCAGCUACAUCUGGCUACUGGGUCU CUGAUGGCAUCUUCUAGCU
17	hsa-mir-190b	UGCUCUGUGUGAUUAUGUUUGAUUAUUGGGUUGUUUAAUUAGGAAC CAACUAAAUGUCAAAACAUAUUCUACAGCAGCAG
18	hsa-mir-142	GACAGUGCAGUCACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAAACAGCACUG GAGGGUGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGAGUGUACUGUG
19	hsa-mir-9-1	CGGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGGUGU GGAGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACGAAAGUAAAAUAACCCCA

20	hsa-mir-9-2	GGAAGCGAGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGUAUU GGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAACUCCUUA
21	hsa-mir-9-3	GGAGGCCCGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGCCAC AGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAGAAAUGAUUCUCA

Tabla 5. Secuencias de miARN maduros y miméticos identificados en el cribado o referidos en la solicitud
Listado de secuencias de miARN maduros (dirección 5' a 3'). Todas las secuencias se obtuvieron de miRBase (versión 16: septiembre 2010; www.mirbase.org).

microARN	miARN maduro	semilla (SEQ ID N.º)	SEQ miARN maduro (SEQ ID)
hsa-mir-7-1 hsa-mir-7-2 hsa-mir-7-3	hsa-miR-7	GGAAGAC (348)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (22)
hsa-mir-7-1	hsa-miR-7-1*	AACAAAU (349)	CAACAAAUACAGUCUGCCAUA (23)
hsa-mir-7-2	hsa-miR-7-2*	AACAAAU (350)	CAACAAAUCCCAGUCUACCUAA (24)
hsa-mir-26b	hsa-miR-26b	UCAAGUA (351)	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU (25)
hsa-mir-26b	hsa-miR-26b*	CUGUUCU (352)	CCUGUUCUCCAUUACUUGGCUC (26)
hsa-mir-574	hsa-miR-574-5p	GAGUGUG (353)	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU (27)
hsa-mir-574	hsa-miR-574-3p	ACGCUCA (354)	CACGCUCAUGCACACACCCACA (28)
hsa-mir-27a	hsa-miR-27a	UCACAGU (355)	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC (29)
hsa-mir-27a	hsa-miR-27a*	GGGCUUA (356)	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA (30)
hsa-mir-92a-1 hsa-mir-92a-2	hsa-miR-92a	AUUGCAC (357)	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU (31)
hsa-mir-92a-1	hsa-miR-92a-1*	GGUUGGG (358)	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU (32)
hsa-mir-132	hsa-miR-132	AACAGUC (359)	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG (33)
hsa-mir-132	hsa-miR-132*	CCGUGGC (360)	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUAU (34)
hsa-mir-126	hsa-miR-126	CGUACCG (361)	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (35)
hsa-mir-126	hsa-miR-126*	AUUUUUA (362)	CAUUUUUACUUUUGGUACGCG (36)
hsa-mir-21	hsa-miR-21	AGCUUUA (363)	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA (37)
hsa-mir-21	hsa-miR-21*	AACACCA (364)	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU (38)
hsa-mir-145	hsa-miR-145	UCCAGUU (365)	GUCCAGUUUCCCAGGAUCCCU (39)
hsa-mir-145	hsa-miR-145*	GAUUCCU (366)	GGAUUCCUGGAAUACUGUUCU (40)
hsa-let-7a-1 hsa-let-7a-2 hsa-let-7a-3	hsa-let-7a	GAGGUAG (367)	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU (41)
hsa-let-7a-1 hsa-let-7a-3	hsa-let-7a*	UAUACAA (368)	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC (42)
hsa-let-7a-2	hsa-let-7a-2*	UGUACAG (369)	CUGUACAGCCUCCUAGCUUUC (43)
hsa-mir-221	hsa-miR-221	GCUACAU (370)	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC (44)
hsa-mir-221	hsa-miR-221*	CCUGGCA (371)	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU (45)
hsa-mir-222	hsa-miR-222	GCUACAU (372)	AGCUACAUUGGCUACUGGGU (46)
hsa-mir-222	hsa-miR-222*	UCAGUAG (373)	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU (47)
hsa-mir-190b	hsa-miR-190b	GAUAUGU (374)	UGAUUAUGUUUGAUUUUGGGUU (48)
hsa-mir-142	hsa-miR-142-5p	AUAAAGU (375)	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU (49)
hsa-mir-142	hsa-miR-142-3p	GUAGUGU (376)	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (50)
hsa-mir-9-1 hsa-mir-9-2 hsa-mir-9-3	hsa-miR-9	CUUUGGU (377)	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA (51)
hsa-mir-9-1 hsa-mir-9-2 hsa-mir-9-3	hsa-miR-9*	UAAAGCU (378)	AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU (52)

--	--	--

Tabla 6. Secuencias de ADN de miARN identificados en el cribado (véase la tabla 1)

Seq ID	miARN	Secuencia clonada en vector lentiviral
53	hsa-mir-7-3	TCATAGCTTGGCTCAGGTGAGAAGGAGGAGCTGGGCAGGGGTCTCAGA CATGGGGCAGAGGGTGGTGAAGAAGATTAGAGTGGCTGTGGTCTAGTG CTGTGTGGAAGACTAGTGATTTTGTGTTCTGATGTACTACGACAACAA GTCACAGCCGGCCTCATAGCGCAGACTCCCTTCGACCTTCGCCCTCAAT GGGCTGGCCAGTGGGGGAGAACCGGGGAGGTTCGGGAAGAATCGCTT CCACTCGGAGTGGGGGGGCTGGCTCACTCCAGGCGATACAG
54	hsa-mir-26b	GGGCTCCTCCTCTAGGCTCCCCGTGCTGTGCTCCCTCGCCCCACCCTG CCCGGGACCCAGTTCAAGTAATTCAGGATAGGTTGTGTGCTGTCCAGC CTGTTCTCCATTACTTGGCTCGGGGACCGGTGCCCTGCAGCCTTGGGGT GAGGGGGCTGCCCCGTGATTCCCTGCACTAGGCTGAGGTTGAGGCAGGG GAAGGGATTGGGAATTAGGGACCTC
55	hsa-mir-574	TCTGCGTTAGTGAGAAGCAGTGGTCAGGGAGGACCCGGCTCTGGGGTG AGGGTCTGGGGCGGCGCGGCCGAGGGACCTGCGTGGGTGCGGGCGTGT GAGTGTGTGTGTGTGAGTGTGTGCTCGCTCCGGGTCCACGCTCATGCACA CACCCACACGCCCACACTCAGGGTCTGCCCCCTCGGCCTGCGTGAACCT CCGCGGAGCCTGCCTGGATCTCCCAAAGTATCC
56	hsa-mir-27a	CCTGTCACAAATCACATTGCCAGGGATTTCCAACCGACCCTGAGCTCTG CCACCGAGGATGCTGCCCGGGGACGGGGTGGCAGAGAGGCCCCGAAG CCTGTGCCTGGCCTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTC CACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCCCCCAGGCCCTCA CCTCCTCTGGCCTTGCCGCCTGTCCCCTGCTGCCGCCTGTCTGCCTGCCA TCCTGCTGCCTGGCCTCCCTGGGCTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTG AAACACA
57	hsa-mir-92a-1	CCAGCTGTGTGATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAACTGACTGTGG TAGTGAAAAGTCTGTAGAAAAGTAAGGGAAACTCAAACCCCTTTCTAC ACAGGTTGGGATCGGTTGCAATGCTGTGTTTCTGTATGGTATTGCATT GTCCCGCCTGTTGAGTTTGGTGGGGATTGTGACCAGAAGATTTTGAA AATTAAATATTACTGAAGATTTCGACTTCCACT
58	hsa-mir-190b	TCTTTGCAACTGGAAGGAAGGCAGATGACCCCCAAAGCTCTCCTGCCT GCTTCTGTGTGATATGTTTGATATTGGGTTGTTTAATTAGGAACCAACT AAATGTCAAACATATTCTTACAGCAGCAGGTGATTGAGCACCACCCTCT TTCATACTCAATCTCTGGGGCTCCTGTCTCTTTACTGAACCTCTTCTC TCCAGG
59	hsa-mir-142	TCTTAGGAAGCCACAAGGAGGGCTGGGGGGCTCTTGGAGCAGGAGTCA GGAGGCCTGGGCAGCCTGAAGAGTACACGCCGACGGACAGACAGACA
		GTGCAGTCACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTAACAGCACTGGAGGGT GTAGTGTTTCTACTTTATGGATGAGTGTACTGTGGGCTTCGGAGATCA CGCCACTGCTGCCGCCGCTGCCGCCACCATCTTCTCGGCGCTCGGG GACCTCGTGTGACAGGTGA

60	hsa-mir-9-2	ATCAGGACCTGGAGTCTGGCAAGAGGAAGACAGAGGCCTGTGTGGGA AGCGAGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGTATTGGTCTTC ATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAAAACTCCTTCAAGATCGCCGGGGA GCGTGTGAGAAATGAAAGACTACAGCCG
----	-------------	---

Tabla 7. Secuencias de isomiR y semilla de miARN identificados en el cribado (véase la tabla 1) o referidos en la solicitud.

Estas secuencias de isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeño, y se obtuvieron después de combinar los datos de 87 muestras de tejido humano.		
miARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia de isomiR (SEQ ID N.º)
hsa-miR-7	GGAAGAC (61)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (116)
	GAAGACU (62)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG (117)
	AAGACUA (63)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGU (118)
	AGACUAG (64)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (119)
	GACUAGU (65)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUU (120)
	ACUAGUG (66)	GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (121)
	CUAGUGA (67)	GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (122)
	UGGAAGA (68)	UGGAAGACUAGUGAUUUUG (123)
	GUGGAAG (69)	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUC (124)
		UGGAAGACUAGUGAUUUU (125)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (126)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (127)
		UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (128)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (129)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUG (130)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (131)
		AGACUAGUGAUUUUGUUGUU (132)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGU (133)
		GACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU (134)
		GACUAGUGAUUUUGUUGUU (135)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGUUG (136)
		UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUGU (137)
		UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUG (138)
		UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGA (139)
		AGACUAGUGAUUUUGUUGU (140)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGUU (141)
		GACUAGUGAUUUUGUUGUUUUUA (142)
		GACUAGUGAUUUUGUUGU (143)
		GACUAGUGAUUUUGUUGUUU (144)
		GUGGAAGACUAGUGAUUUUGUU (145)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (146)
		GUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU (147)
		GACUAGUGAUUUUGUUGUUU (148)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (149)
		AACAAAUACAGUCUGCCAU (150)
		GUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (151)
		UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU (152)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (153)
		ACUAGUGAUUUUGUUGUU (154)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUG (155)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUG (156)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGUUG (157)
		UGUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (158)
		UGUGGAAGACUAGUGAUUUUGU (159)
		CUGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU (160)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (161)
		GGAAGACUAGUGAUUUUGU (162)
		GAAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUU (163)
		AGACUAGUGAUUUUGUUG (164)
		AAGACUAGUGAUUUUGUUGUUUUU (165)

		AGACUAGUGAUUUUGUUGUUU (166)
hsa-miR-7-1*	AACAAAU (70) CAAAUCA (71) ACAAAU (72) AACAAGU (73) ACAAGUC (74)	AACAAAUACAGUCUGCCAU (167)
		CAACAAAUACAGUCUGCCAU (168)
		CAACAAGUCACAGCCGGCCUCA (169)
		CAACAAAUACAGUCUGCCA (170)
		AACAAAUACAGUCUGCCAU (171)
		AACAAAUACAGUCUGCCAU (172)
		CAACAAGUCACAGCCGGCCUCA (173)
		CAACAAAUACAGUCUGCCAU (174)
		ACAAAUACAGUCUGCCAU (175)
		CAACAAGUCACAGCCGGCCUC (176)
		AACAAGUCACAGCCGGCCUCA (177)
hsa-miR-26b	UCAAGUA (75) CAAGUAA (76)	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU (178)
		UCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU (179)
		UUCAAGUAAUUCAGGAUAGG (180)
hsa-miR-574-5p	GAGUGUG (77) AGUGUGU (78) UGAGUGU (79) UGCGUGG (80)	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGU (181)
		UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGUGU (182)
		UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUG (183)
		UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUG (184)
		UGAGUGUGUGUGUGUGAGUG (185)
		UGAGUGUGUGUGUGUGAGU (186)
		GAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU (187)
		GAGUGUGUGUGUGUGAGUGU (188)
		GUGAGUGUGUGUGUGAGUGU (189)
		GAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGUGU (190)
		GAGUGUGUGUGUGUGAGUGUG (191)
		GUGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU (192)
		GAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGUG (193)
		UGAGUGUGUGUGUGAG (194)
		CUGCGUGGUGCGGGCGUG (195)
		GAGUGUGUGUGUGAGU (196)
hsa-miR-574-3p	ACGCUCA (81) CGCUCAU (82) GCUCAUG (83) CACGCUC (84)	CACGCUCAUGCACACCCAC (197)
		CACGCUCAUGCACACCCCA (198)
		ACGCUCAUGCACACCCACA (199)
		CACGCUCAUGCACACCCC (200)
		CACGCUCAUGCACACCCACAC (201)
		CACGCUCAUGCACACACC (202)
		CGCUCAUGCACACCCACA (203)
		ACGCUCAUGCACACCCAC (204)
		CCACGCUCAUGCACACCCAC (205)
hsa-miR-27a	UCACAGU (85)	UUCACAGUGGCUAAGUCCG (206)
		UUCACAGUGGCUAAGUCC (207)
		UUCACAGUGGCUAAGUUC (208)
		UUCACAGUGGCUAAGUU (209)
hsa-miR-92a	AUUGCAC (86)	UAUUGCACUUGUCCGGCCUG (210)
		UAUUGCACUUGUCCGGCCU (211)
hsa-miR-132	AACAGUC (87) ACAGUCU (88)	UAACAGUCUACAGCCAUGGUC (212)
		UAACAGUCUACAGCCAUGGU (213)
		AACAGUCUACAGCCAUGGUCG (214)
		UAACAGUCUACAGCCAUGG (215)
hsa-miR-126	GUACCGU (89)	CGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (216)
hsa-miR-21	AGCUUUAU (90)	UAGCUUUAUCAGACUGAUGUUGAC (217)
		UAGCUUUAUCAGACUGAUGUUG (218)
hsa-miR-145	UCCAGUU (91)	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCC (219)
		GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCC (220)
		GUCCAGUUUUCCCAGGAAUC (221)
		GUCCAGUUUUCCCAGGAU (222)
hsa-miR-221	GCUACAU (92)	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU (223)
		AGCUACAUUGUCUGCUGGGUU (224)
		AGCUACAUUGUCUGCUGGG (225)
hsa-miR-222	GCUACAU (93)	AGCUACAUCUGGCUACUGGGGUCU (226)
		AGCUACAUCUGGCUACUGGGGUC (227)
		AGCUACAUCUGGCUACUGGGGUCUCU (228)

		AGCUACAUCUGGCUACUGGG (229)
		AGCUACAUCUGGCUACUGGGUC (230)
Let-7a	GAGGUAG (94)	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGU (231)
		UGAGGUAGUAGGUUGUAUAG (232)
		UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUU (233)
hsa-miR-190b	GAUAUGU (95)	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUUG (234)
	AUAUGUU (96)	UGAUAUGUUUGAUAUUGGGUUGU (235)
		UGAUAUGUUUGAUAUUGGGU (236)
		GAUAUGUUUGAUAUUGGGUUG (237)
		UGAUAUGUUUGAUAUUGGG (238)
		GAUAUGUUUGAUAUUGGGUUGU (239)
		GAUAUGUUUGAUAUUGGGUU (240)
hsa-miR-142-5p	CCAUAAA (97)	CCCAUAAAAGUAGAAAGCACUA (241)
	AUAAAGU (98)	CCCAUAAAAGUAGAAAGCACU (242)
	UAAAGUA (99)	CAUAAAAGUAGAAAGCACUA (243)
	CAUAAAG (100)	CAUAAAAGUAGAAAGCACUACUA (244)
	AAAGUAG (101)	CCCAUAAAAGUAGAAAGCACUAC (245)
	CCCAUAA (102)	AUAAAGUAGAAAGCACUACUAA (246)
	AGUAGAA (103)	CAUAAAAGUAGAAAGCACUAC (247)
		CAUAAAAGUAGAAAGCACUACUAA (248)
		AUAAAGUAGAAAGCACUACUA (249)
	AAGUAGA (104)	CCCAUAAAAGUAGAAAGCAC (250)
		CCCAUAAAAGUAGAAAGCA (251)
		CAUAAAAGUAGAAAGCACU (252)
		AUAAAGUAGAAAGCACUACU (253)
		UAAAGUAGAAAGCACUACUAA (254)
		CCAUAAAAGUAGAAAGCACUA (255)
		CCAUAAAAGUAGAAAGCACUAC (256)
		AUAAAGUAGAAAGCACUA (257)
		CCAUAAAAGUAGAAAGCACU (258)
		ACCCAUAAAAGUAGAAAGCACUA (259)
		UAAAGUAGAAAGCACUACUA (260)
		CCCAUAAAAGUAGAAAGCACUACU (261)
		AUAAAGUAGAAAGCACUAC (262)
		ACCCAUAAAAGUAGAAAGCACU (263)
		UAAAGUAGAAAGCACUACU (264)
		CAUAAAAGUAGAAAGCACUACUAA (265)
		AAAGUAGAAAGCACUACUAA (266)
		AUAAAGUAGAAAGCACUACUAA (267)
		AAGUAGAAAGCACUACUA (268)
hsa-miR-142-3p	UAGUGUU (105)	GUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (269)
	AGUGUUU (106)	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGG (270)
	GUGUUUC (107)	GUAGUGUUUCCUACUUUAUGG (271)
	GAGUGUA (108)	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUG (272)
	UGAGUGU (109)	UGUAGUGUUUCCUACUUUAU (273)
	UGUAGUG (110)	GUAGUGUUUCCUACUUUAUG (274)
	GUAGUGU (111)	UAGUGUUUCCUACUUUAUGGA (275)
		UGUAGUGUUUCCUACUUU (276)
		UGUAGUGUUUCCUACUUUA (277)
		UAGUGUUUCCUACUUUAUGG (278)
		GUAGUGUUUCCUACUUUAUGGAU (279)
		UGAGUGUACUGUGGGCUUCGG (280)
		GUAGUGUUUCCUACUUUAU (281)
		AGUGUUUCCUACUUUAUGGAU (282)
		AGUGUUUCCUACUUUAUGGA (283)
		UGAGUGUACUGUGGGCUUCGGA (284)
		GUGUAGUGUUUCCUACUUUAUG (285)
		AUGAGUGUACUGUGGGCUUCGGA (286)
		UAGUGUUUCCUACUUUAUG (287)
		AGUGUUUCCUACUUUAUGGAUGA (288)
		AGUGUUUCCUACUUUAUGGAUG (289)
hsa-miR-9	CUUUGGU (112)	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG (290)
	UUUGGUU (379)	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUA (291)

	UUGGUUA (380) UCUUUGG (381)	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAU (292)
		UCUUUGGUUAUCUAGCUGU (382)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA (383)
		UCUUUGGUUAUCUAGCUG (384)
		UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAG (385)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG (386)
		UUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA (387)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGUAU (388)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGUA (389)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAG (390)
		AUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUG (391)
		UUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAG (392)
		AUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA (393)
		CUUUUGGUUAUCUAGCUGU (394)
		UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGU (395)
		AUCUUUGGUUAUCUAGCUGUA (396)
hsa-miR-9*	UAAAGCU (113) AAAGCUA (114) AAGCUAG (115)	UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUA (293)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU (294)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAA (295)
		AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUA (296)
		AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAG (297)
		AUAAAGCUAGAUAAACCGAAA (298)
		AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAA (299)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAAG (300)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAAA (301)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAA (302)
		UAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAG (303)
		AAAGCUAGAUAAACCGAAAGU (304)

Tabla 8. Secuencias de anti-miARN (dirección 5' a 3') basadas en las secuencias de miARN maduros (dirección 5' a 3') obtenidos de mirBase (versión 16: septiembre 2010; www.mirbase.org).

microARN	miARN maduro	SEQ ID N.º	SEQ anti-miARN (5' - 3')
hsa-mir-132	hsa-miR-132	305	CGACCAUGGCUGUAGACUGUUA
hsa-mir-132	hsa-miR-132*	306	AGUAACAAUCGAAAGCCACGGU
hsa-mir-126	hsa-miR-126	307	CGCAUUAUACUCACGGUACGA
hsa-mir-126	hsa-miR-126*	308	CGCGUACCAAAGUAAUAAUG
hsa-mir-21	hsa-miR-21	309	UCAACAUCAGUCUGAUAAAGCUA
hsa-mir-21	hsa-miR-21*	310	ACAGCCCAUCGACUGGUGUUG

5 Listado de referencias

[0315]

- Adams R.H. y Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6):464-478, 2007.
- Anand S., Majeti B.K., Acevedo L.M., Murphy E.A., Mukthavaram R., Schepke L., Huang M., Shields D.J., Lindquist J.N., Lapinski P.E., King P.D., Weis S.M. y Cheres D.A. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med* 16(8):909-914, 2010.
- Aravin, A. & Tuschl, T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett* 579:5830-40, 2005.
- Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M. e Isner J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85(3):221-228, 1999.
- Beijnum, J.R., Rousch, M., Castermans, K., van der Linden, E & Griffioen, AW. Isolation of endothelial cells from fresh tissues, *Nature Protocols* 3(6):1085-1091, 2008.
- Berezikov, E., Cuppen, E., y Plasterk, R. H. Approaches to microRNA discovery, *Nat Genet* 38 Suppl, S2-7, 2006.
- Berezikov, E., Liu, N., Flynt, A. S., Hodges, E., Rooks, M., Hannon, G. J., y Lai, E. C. Evolutionary flux of canonical microRNAs and mirtrons in *Drosophila*, *Nat Genet* 42:6-9; respuesta del autor 9-10, 2010.
- Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J. O., Naqvi, A., Hung, J. H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., Zhao, Y., Zamore, P. D., Hannon, G. J., Marra, M. A., Weng, Z.,

- Perrimon, N., y Lai, E. C. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence, *Genome Res* 21:203-215, 2011.
- Bodles-Brakhop A M, Heller R y Draghia-Akli R. Electroporation for the Delivery of DNA-based Vaccines and Immunotherapeutics: Current Clinical Developments. *Molecular Therapy* vol. 17 n.º 4:585-592, abril 2009
- Bonnet, E., Wuyts, J., Rouze, P. y Van De, P.e.Y. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20:2911-2917, 2004.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070):932-936, 2005.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(4):389-395, 2000.
- Carmeliet P. y Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-257, 2000.
- Chang T.C. y Mendell J.T. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8:215-239, 2007.
- Chen C.Z., Li L., Lodish H.F. y Bartel D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303(5654):83-86, 2004.
- Creighton, C.J., Reid, J.G. y Gunaratne, P.H. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Briefings in Bioinformatics*. VOL 10. N.º 5:490-497, 2009.
- Daud, A.I., DeConti, R.C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A.I., Sondak, V.K., Munster, P.N., Sullivan, D.M., Ugen, K.E., Messina, J.L. y Heller, R. Phase I Trial of Interleukin-12 Plasmid Electroporation in Patients With Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology* 26(36):5896-903, 2008.
- Fish J.E., Santoro M.M., Morton S.U., Yu S., Yeh R.F., Wythe J.D., Ivey K.N., Bruneau B.G., Stainier D.Y. y
- Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15(2):272-284, 2008.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285, 21:1182-1186, 1971.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1):27-31, 1995.
- Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6(4):273-286, 2007.
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29 (6 Suppl 16):15-18, 2002.
- Griffioen A.W. y Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52(2):237-268, 2000.
- Hanahan D. y Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3):353-364, 1996.
- Harris T.A., Yamakuchi M., Ferlito M., Mendell J.T. y Lowenstein C.J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(5):1516-1521, 2008.
- Helisch A. y Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 10(1):83-97, 2003.
- Heusschen R, van Gink M, Griffioen AW, Thijssen VL. MicroRNAs in the tumor endothelium: novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochim Biophys Acta*. 1805, 1:87-96, 2010
- Hofacker, I. L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31:3429-31, 2003.
- Kuehbach A., Urbich C., Zeiher A.M. and Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101(1):59-68, 2007.
- KUEHBACHER A. *et al.*: "Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis", *Trends Pharm. Sci.*, vol. 29, n.º 1, 2008, págs. 12-15
- le Sage C., Nagel R., Egan D.A., Schrier M., Mesman E., Mangiola A., Anile C., Maira G., Mercatelli N., Ciafre S.A., Farace M.G. y Agami R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 26(15):3699-3708, 2007.
- Linsen, SEV., de Wit, E., de Bruijn, E. & Cuppen, E. Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics* 11:249, 2010.
- LIQIN DU *et al.*, *CANCER AND METASTASIS REVIEWS*, vol. 29, n.º. 1, 4 febrero 2010, págs. 109-122 & Erratum (vol. 29, n.º. 4, 10 junio 2010, págs. 801-802)
- MA LI *et al.* *NATURE CELL BIOLOGY*, vol. 12, n.º 3, marzo 2010, págs. 247-256 y métodos e información en línea complementarios.
- Miki K., Miki A., Matsuoka M., Muramatsu D., Hackett S.F., Campochiaro P.A. Effects of Intraocular Ranibizumab and Bevacizumab in Transgenic Mice Expressing Human Vascular Endothelial Growth Factor. *Ophthalmology* 116(9):1748-1754, septiembre 2009.
- NAKASHIMA TAJI *et al.*, *PLOS ONE*, vol. 5, n.º 12, diciembre 2010, e14334
- Obad, S., dos Santos, C.O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, M.,

Straarup, E. M., Frydenlund Hansen, F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J., and Kauppinen, S. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics* 43,371-378, 2011.

Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A., Hammond S. y Rainaldi G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108(9):3068-3071, 2006.

Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald P.E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P. y Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432(7014):226-230, 2004.

Ribatti D., Vacca A. and Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 35(5):227-231, 2000.

van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Hill J. y Olson E.N. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316(5824):575-579, 2007.

Shen *et al.* Suppression of ocular neovascularization with ARNip targeting VEGF receptor 1. *Gene therapy* 13:225-234, 2006.

Steffen P., Voss B., Rehmsmeier M., Reeder J., Giegerich R. RNashapes: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics*, 22:500-503, 2006.

Suarez Y., Fernandez-Hernando C., Pober J.S. y Sessa W.C. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100(8):1164-1173, 2007.

SUAREZ YAJAIRA and SESSA W.C.: "MicroRNAs As novel regulators of angiogenesis", *Circ. Res.*, vol. 104, nº. 4, 2009, págs. 442-454.

URBICH C. *et al.*: Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis", *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, nº. 4, 2008, págs. 581-588.

Vader P, van der Meel R, Symons MH, Fens MH, Pieters E, Wilschut KJ, Storm G, Jarzabek M, Gallagher WM, Schiffelers RM, Byrne AT. Examining the role of Rac1 in tumor angiogenesis and growth: a clinically relevant RNAimediated approach. *Angiogenesis*. Dic 2011; 14(4):457-66, 2011.

Wang S., Aurora A.B., Johnson B.A., Qi X., McAnally J., Hill J.A., Richardson J.A., Bassel-Duby R. y Olson E.N. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15(2):261-271, 2008.

WANG & OLSON: "AngiomiRs-Key regulators of angiogenesis", *current opinion in genetics & development*, vol. 19, n.º 3, 2009, págs. 205-211.

de Wit, E., Linsen, S. E., Cuppen, E., y Berezikov, E. Repertoire and evolution of miRNA genes in four divergent nematode species, *Genome Res* 19:2064-2074, 2009.

WU *et al.*: "Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 386, n.º 4, 2009, págs. 549-553.

WÜRDINGER T. *et al.*: "Glioma angiogenesis: Towards novel RNA therapeutics.", *CELL ADHESION & MIGRATION*, vol. 3, n.º 2, abril 2009, págs. 230-235.

Listado de secuencias

[0316]

<110> InteRNA Technologies BV

<120> mir para el tratamiento de la neoangiogénesis

<130> P6033987PCT

<150> EP 11150645.7

<151> 2011-01-11

<150> US 61/431,656

<151> 2011-01-11

<150> US 61/431,667

<151> 2011-01-11

<150> US 61/521,917

<151> 2011-08-10

<150> US 61/521,931

<151> 2011-08-10

	<150> US 61/522,346	
	<151> 2011-08-11	
5	<150> US 61/540,640	
	<151> 2011-09-29	
	<160> 398	
10	<170> Versión de PatentIn 3.3	
	<210> 1	
	<211> 110	
	<212> ARN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
20	<400> 1	
	uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa	60
	aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag	110
	<210> 2	
25	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del precursor	
	<400> 2	
	cuggauacag aguggaccgg cuggcccau cuggaagacu agugauuuug uguugucuu	60
	acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca	110
35	<210> 3	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
	<400> 3	
	agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug	60
45	uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgagac ucccuucgac	110
	<210> 4	
50	<211> 77	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
55	<400> 4	
	ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua	60
	cuuggcucgg ggaccgg	77

5	<210> 5 <211> 96 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 5 gggaccugcg ugggugcggg cgugugagug ugugugugug aguguguguc gcuccggguc 60 cacgcucaug cacacacca cacgcccaca cucagg 96	
15	<210> 6 <211> 78 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 6 cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60 cuaaguuccg cccccag 78	
25	<210> 7 <211> 78 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 7 cuuucuaacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugggau ugcacuuguc 60 ccggccuguu gaguuugg 78	
35	<210> 8 <211> 101 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia del precursor	
45	<400> 8 ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcg c 101	
50	<210> 9 <211> 85 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 9	

	cgcugggcgac gggacauuau uacuuuuggu acgcgcugug acacucaaa cucguaccgu	60
	gaguaaauau gcgccgucca cggca	85
5	<210> 10 <211> 72 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 10	
	ugucggguag cuuauagac ugauguugac uguugaauu cauggcaaca ccagucgaug	60
	ggcugucuga ca	72
15	<210> 11 <211> 88 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 11	
	caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc	60
25	uggaaauacu guucuugagg ucaugguu	88
30	<210> 12 <211> 80 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 12	
	ugggaugagg uaguagguug uauaguuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau	60
	acaauacu gucuuucca	80
40	<210> 13 <211> 72 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia del precursor <400> 13	
	agguugaggu aguagguugu auaguuuaga auuacauca gggagauaac uguacagccu	60
50	ccuagcuuuc cu	72
55	<210> 14 <211> 74 <212> ARN <213> Artificial <220>	

	<223> Secuencia del precursor	
	<400> 14	
	gggugaggua guagguugua uaguugggg cucugcccug cuaugggaua acuaauacaau	60
5	cuacugucuu uccu	74
	<210> 15	
	<211> 110	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
15	<400> 15	
	ugaacaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaangu agauuucugu guucguuagg	60
	caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa acauguucuc	110
	<210> 16	
20	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia del precursor	
	<400> 16	
	gcugcuggaa gguguaggua cccucaaugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuucg	60
	uaaucagcag cuacaucugg cuacuggguc ucugauggca ucuucuagcu	110
30	<210> 17	
	<211> 79	
	<212> ARN	
35	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
	<400> 17	
40	ugcuucugug ugauauguuu gauauugggu uguuuauua ggaaccaacu aaauucaaa	60
	cauauucuua cagcagcag	79
	<210> 18	
	<211> 87	
45	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del precursor	
50	<400> 18	
	gacagugcag ucacccaaua aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguguguu	60
	uccuacuuua uggaugagug uacugug	87
55	<210> 19	
	<211> 89	

	<212> ARN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Secuencia del precursor		
	<400> 19		
	cgggguuggu uguuauuuu gguuauauag cuguauagagu gguguggagu cuucauaaag	60	
10	cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca	89	
	<210> 20		
	<211> 87		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia del precursor		
	<400> 20		
20	ggaagcgagu uguuauuuu gguuauauag cuguauagagu guauuggucu ucauaaagcu	60	
	agauaaccga aaguaaaaac uccuuc	87	
	<210> 21		
	<211> 90		
25	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del precursor		
30	<400> 21		
	ggaggcccgu uucucucuuu gguuauauag cuguauagagu gccacagagc cgucauaaag	60	
	cuagauaacc gaaaguagaa augauucua	90	
35	<210> 22		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Secuencia madura		
	<400> 22		
45	uggaagacua gugauuuugu ugu	23	
	<210> 23		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Secuencia madura		
	<400> 23		
55	caacaaauca cagucugcca ua	22	
	<210> 24		
	<211> 22		
	<212> ARN		
60	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia madura		
5	<400> 24		
	caacaaaucc cagucuaccu aa	22	
	<210> 25		
10	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia madura		
15	<400> 25		
	uucaaguaau ucaggauagg u	21	
	<210> 26		
20	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Secuencia madura		
	<400> 26		
	ccuguucucc auuacuuggc uc	22	
30	<210> 27		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Secuencia madura		
	<400> 27		
40	ugagugugug ugugugagug ugu	23	
	<210> 28		
	<211> 22		
	<212> ARN		
45	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia madura		
	<400> 28		
50	cacgcucaug cacacacca ca	22	
	<210> 29		
	<211> 21		
55	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia madura		
60	<400> 29		
	uucacagugg cuaaguuccg c	21	
	<210> 30		
65	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		

	<220> <223> Secuencia madura	
5	<400> 30 agggcuuagc ugcuuugag ca	22
10	<210> 31 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 31 uauugcacuu gucccggccu gu	22
20	<210> 32 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 32 agguugggau cgguugcaau gcu	23
30	<210> 33 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia madura	
40	<400> 33 uaacagucua cagccauggu cg	22
45	<210> 34 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
50	<400> 34 accguggcuu ucgauuguua cu	22
55	<210> 35 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
60	<400> 35 ucguaccgug aguaauaauug cg	22
65	<210> 36 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	

	<220> <223> Secuencia madura	
5	<400> 36 cauuauuacu uuugguacgc g	21
10	<210> 37 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 37 uagcuuauca gacugauguu ga	22
20	<210> 38 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 38 caacaccagu cgaugggcug u	21
30	<210> 39 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia madura	
40	<400> 39 guccaguuuu cccaggaauc ccu	23
45	<210> 40 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
50	<400> 40 ggauuccugg aaauacuguu cu	22
55	<210> 41 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
60	<400> 41 ugagguagua gguuguauag uu	22
65	<210> 42 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	

	<220> <223> Secuencia madura	
5	<400> 42 cuauacaauc uacugucuuu c	21
10	<210> 43 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 43 cuguacagcc uccuagcuuu cc	22
20	<210> 44 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 44 agcuacauug ucugcugggu uuc	23
30	<210> 45 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia madura	
40	<400> 45 accuggcaua caauguagau uu	22
45	<210> 46 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
50	<400> 46 agcuacauu ggcuacuggg u	21
55	<210> 47 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
60	<400> 47 cucaguagcc aguguagau cu	22
65	<210> 48 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	

	<220> <223> Secuencia madura	
5	<400> 48 ugauauguuu gauauugggu u	21
10	<210> 49 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 49 cauaaaguag aaagcacuac u	21
20	<210> 50 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia madura	
	<400> 50 uguaguguuu ccuacuuuau gga	23
30	<210> 51 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia madura	
40	<400> 51 ucuuugguua ucuagcugua uga	23
45	<210> 52 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia madura	
50	<400> 52 auaaagcuag auaaccgaaa gu	22
55	<210> 53 <211> 282 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia clonada en vector lentiviral	
60	<400> 53	

ES 2 672 124 T3

	tcatagcttg gctcaggtga gaaggaggag ctgggcaggg gtctcagaca tggggcagag	60
	ggtggtgaag aagattagag tggctgtggt ctagtgtgt gtggaagact agtgattttg	120
	ttgttctgat gtactacgac aacaagtcac agccggcctc atagcgcaga ctcccttcga	180
	ccttcgcctt caatgggctg gccagtgggg gagaaccggg gaggtcgggg aagaatcgct	240
	tccactcgga gtgggggggc tggctcactc caggcgatac ag	282
5	<210> 54 <211> 219 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia clonada en vector lentiviral	
	<400> 54	
	gggctcctcc tctaggctcc ccggtgctgt gctccctcgc cccaccctgc ccgggaccca	60
	gttcaagtaa ttcaggatag gttgtgtgct gtccagcctg ttctccatta cttggctcgg	120
	ggaccggtgc cctgcagcct tggggtgagg gggctgcccc tggattcctg cactaggctg	180
	aggttgaggc aggggaaggg attgggaatt agggacctc	219
15	<210> 55 <211> 227 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia clonada en vector lentiviral	
	<400> 55	
	tctgcgttag tgagaagcag tggtcagggg ggaccgggct ctggggtgag ggtctggggc	60
	ggcgcgcccg agggacctgc gtgggtgcgg gcgtgtgagt gtgtgtgtgt gagtgtgtgt	120
	cgctccgggt ccacgctcat gcacacaccc acacgcccac actcagggtc tgccccctcg	180
25	gcctgcgtga acctccgagg agcctgcctg gatctcccaa agtatcc	227
30	<210> 56 <211> 299 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia clonada en vector lentiviral	
35	<400> 56	
	cctgtcacaa atcacattgc cagggatttc caaccgaccc tgagctctgc caccgaggat	60
	gctgcccggg gacggggtgg cagagaggcc ccgaagcctg tgcctggcct gaggagcagg	120
	gcttagctgc ttgtgagcag ggtccacacc aagtcgtgtt cacagtggct aagtccgcc	180
	cccaggccc tcacctctc tggccttgcc gcctgtcccc tgcctgcgcc tgtctgcctg	240
	ccatcctgct gcctggcctc cctgggctct gcctcccgtg cctactgagc tgaaacaca	299

5	<210> 57		
	<211> 227		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Secuencia clonada en vector lentiviral		
	<400> 57		
	ccagctgtgt gatattctgc tgtgcaaadc catgcaaaac tgactgtggt agtgaaaagt	60	
	ctgtagaaaa gtaagggaac ctcaaacccc tttctacaca ggttgggacg ggttgcaatg	120	
	ctgtgtttct gtatggtatt gcacttgtcc cggcctgttg agtttgggtg ggattgtgac	180	
15	cagaagattt tgaaaattaa atattactga agatttcgac ttccact	227	
	<210> 58		
	<211> 202		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia clonada en vector lentiviral		
	<400> 58		
	tctttgcaac tggaaggaag gcagatgacc cccaaagctc tcctgcctgc ttctgtgtga	60	
	tatgtttgat attgggttgt ttaattagga accaactaaa tgcacacatc attcttacag	120	
25	cagcaggtga ttcagcacca ccctctttca tacttcaatc tctggggctc ctgtctcttt	180	
	tactgaacct cttctctcca gg	202	
	<210> 59		
	<211> 260		
	<212> ADN		
30	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia clonada en vector lentiviral		
	<400> 59		
	tcttaggaag ccacaaggag ggctgggggg ctcttgagac aggagtcagg aggcctgggc	60	
35	agcctgaaga gtacacgccg acggacagac agacagtgca gtcacccata aagtagaaag	120	
	cactactaac agcactggag ggtgtagtgt ttctactttt atggatgagt gtactgtggg	180	
	cttcggagat cagccactg ctgccgcccg ctgccgccca ccatcttcct cggcgctcgg	240	
	ggacctcgtg tgacaggtga	260	
	<210> 60		
40	<211> 171		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia clonada en vector lentiviral		
45	<400> 60		

ES 2 672 124 T3

	atcaggacct ggagtctggc aagaggaaga cagaggcctg tgtgggaagc gattgttat	60
	ctttggttat ctagctgtat gattgtattg gtcttcataa agctagataa ccgaaagtaa	120
	aaactccttc aagatcgccg gggagcgtgt gagaatgaaa gactacagcc g	171
5	<210> 61 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia semilla	
	<400> 61 ggaagac 7	
15	<210> 62 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia semilla	
	<400> 62 gaagacu 7	
25	<210> 63 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia semilla	
35	<400> 63 aagacua 7	
40	<210> 64 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia semilla	
45	<400> 64 agacuag 7	
50	<210> 65 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia semilla	
55	<400> 65 gacuagu 7	
60	<210> 66 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 66 acuagug	7
10	<210> 67 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia semilla	
20	<400> 67 cuaguga	7
25	<210> 68 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia semilla	
35	<400> 68 uggaaga	7
40	<210> 69 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia semilla	
50	<400> 69 guggaag	7
55	<210> 70 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> Secuencia semilla	
65	<400> 70 aacaaau	7
	<210> 71 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia semilla	
	<400> 71 caaaauca	7
	<210> 72 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 72	
	acaaauc	7
	<210> 73	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 73	
	aacaagu	7
	<210> 74	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 74	
	acaaguc	7
	<210> 75	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 75	
	ucaagua	7
40	<210> 76	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 76	
50	caaguaa	7
	<210> 77	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 77	
60	gagugug	7
	<210> 78	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 78	
	agugugu 7	
	<210> 79	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 79	
	ugagugu 7	
	<210> 80	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 80	
	ugcgugg 7	
	<210> 81	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 81	
	acgcuca 7	
40	<210> 82	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 82	
50	cgcucau 7	
	<210> 83	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 83	
60	gcucaug 7	
	<210> 84	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 84	
	cacgcuc	7
	<210> 85	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 85	
	ucacagu	7
	<210> 86	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 86	
	auugcac	7
	<210> 87	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 87	
	aacaguc	7
40	<210> 88	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 88	
50	acagucu	7
	<210> 89	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 89	
60	guaccgu	7
	<210> 90	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 90 agcuuau	7
	<210> 91 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 91 uccaguu	7
	<210> 92 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 92 gcuacau	7
	<210> 93 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
35	<400> 93 gcuacau	7
	<210> 94 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
45	<400> 94 gagguag	7
50	<210> 95 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
60	<400> 95 gauaugu	7
	<210> 96 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
65		

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 96	
	auauguu	7
	<210> 97	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 97	
	ccaauaa	7
	<210> 98	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 98	
	auaaagu	7
	<210> 99	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 99	
	uaaagua	7
40	<210> 100	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 100	
50	cauaaag	7
	<210> 101	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 101	
60	aaaguag	7
	<210> 102	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 102 cccauaa	7
10	<210> 103 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> Secuencia semilla	
20	<400> 103 aguagaa	7
25	<210> 104 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> Secuencia semilla	
35	<400> 104 aaguaga	7
40	<210> 105 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia semilla	
50	<400> 105 uaguguu	7
55	<210> 106 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> Secuencia semilla	
65	<400> 106 aguguuu	7
	<210> 107 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia semilla	
	<400> 107 guguuuc	7
	<210> 108 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 108 gagugua	7
	<210> 109 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 109 ugagugu	7
	<210> 110 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 110 uguagug	7
	<210> 111 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
35	<400> 111 guagugu	7
	<210> 112 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
45	<400> 112 cuuuggu	7
	<210> 113 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
50		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
55	<400> 113 uaaagcu	7
	<210> 114 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
60		
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
65	<400> 113 uaaagcu	7
	<210> 114 <211> 7 <212> ARN <213> Artificial	
65		

	<220>		
	<223> Secuencia semilla		
5	<400> 114		
	aaagcua	7	
	<210> 115		
	<211> 7		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia semilla		
15	<400> 115		
	aagcuag	7	
	<210> 116		
	<211> 24		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 116		
	uggaagacua gugauuuugu uguu	24	
	<210> 117		
30	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 117		
	uggaagacua gugauuuugu ug	22	
40	<210> 118		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 118		
50	uggaagacua gugauuuugu	20	
	<210> 119		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 119		
60	uggaagacua gugauuuugu uguuu	25	
	<210> 120		
	<211> 21		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 120 uggaagacua gugauuuugu u	21	
	<210> 121		
	<211> 23		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 121 ggaagacuag ugauuuuguu guu	23	
	<210> 122		
	<211> 22		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 122 ggaagacuag ugauuuuguu gu	22	
	<210> 123		
30	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 123 uggaagacua gugauuuug	19	
40	<210> 124		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 124 uggaagacua gugauuuugu uguuc	25	
50	<210> 125		
	<211> 18		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 125 uggaagacua gugauuuu	18	
60	<210> 126		
	<211> 22		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 126 gaagacuagu gauuuuguug uu	22	
	<210> 127		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 127 gaagacuagu gauuuuguug u	21	
	<210> 128		
	<211> 26		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 128 uggaagacua gugauuuugu uguuuu	26	
	<210> 129		
	<211> 24		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 129 ggaagacuag ugauuuuguu guuu	24	
	<210> 130		
	<211> 23		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 130 gaagacuagu gauuuuguug uug	23	
50	<210> 131		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 131 aagacuagug auuuuguugu u	21	
60	<210> 132		
	<211> 20		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 132 agacuaguga uuuuguuguu	20	
	<210> 133 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 133 aagacuagug auuuuguugu	20	
	<210> 134 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 134 gacuagugau uuuguuguuu uu	22	
	<210> 135 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 135 gacuagugau uuuguuguu	19	
	<210> 136 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 136 ggaagacuag ugauuuuguu g	21	
	<210> 137 <211> 26 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 137 uggaagacua gugauuuugu uguugu	26	
	<210> 138 <211> 27 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 138 uggaagacua gugauuuugu uguucug	27	
	<210> 139 <211> 28 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 139 uggaagacua gugauuuugu uguucuga	28	
	<210> 140 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 140 agacuaguga uuuguugu	19	
	<210> 141 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 141 ggaagacuag ugauuuuguu	20	
	<210> 142 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 142 gacuagugau uuuguuguu uua	23	
	<210> 143 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 143 gacuagugau uuuguugu	18	
	<210> 144 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 144 gacuagugau uuuguuguuu	20	
	<210> 145 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
10	<220> <223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 145 guggaagacu agugauuuug uu	22	
	<210> 146 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
20	<220> <223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 146 gaagacuagu gauuuuguug uuu	23	
	<210> 147 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial		
30	<220> <223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 147 guggaagacu agugauuuug uuguu	25	
	<210> 148 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
40	<220> <223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 148 gacuagugau uuuguuguuu u	21	
	<210> 149 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
50	<220> <223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 149 aagacuagug auuuuguugu uu	22	
	<210> 150 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 150 aacaaucac agucugccau	20	
	<210> 151 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
10	<220> <223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 151 guggaagacu agugauuuug uugu	24	
	<210> 152 <211> 27 <212> ARN <213> Artificial		
20	<220> <223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 152 uggaagacua gugauuuugu uguuuuu	27	
	<210> 153 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
30	<220> <223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 153 aagacuagug auuuuguugu uuu	23	
	<210> 154 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
40	<220> <223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 154 acuagugauu uuguuguu	18	
	<210> 155 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
50	<220> <223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 155 ggaagacuag ugauuuuguu guug	24	
	<210> 156 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 156 gaagacuagu gauuuuguug	20	
	<210> 157 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 157 aagacuagug auuuuguugu ug	22	
	<210> 158 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 158 uguggaagac uagugauuuu guugu	25	
	<210> 159 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 159 uguggaagac uagugauuuu gu	22	
	<210> 160 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 160 cuggaagacu agugauuuug uugu	24	
	<210> 161 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 161 ggaagacuag ugauuuuguu guuuu	25	
	<210> 162 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 162		
	ggaagacuag ugauuuugu	19	
	<210> 163		
	<211> 24		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 163		
	gaagacuagu gauuuuguug uuuu	24	
	<210> 164		
	<211> 18		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 164		
	agacuaguga uuuuguug	18	
	<210> 165		
30	<211> 24		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 165		
	aagacuagug auuuuguugu uuuu	24	
40	<210> 166		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 166		
50	agacuaguga uuuuguuguu u	21	
	<210> 167		
	<211> 21		
	<212> ARN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 167		
60	aacaaucac agucugccau a	21	
	<210> 168		
	<211> 21		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 168 caacaaauca cagucugcca u	21	
	<210> 169		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 169 caacaaguca cagccggccu ca	22	
	<210> 170		
	<211> 20		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 170 caacaaauca cagucugcca	20	
	<210> 171		
30	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 171 aacaaucac agucugccau au	22	
40	<210> 172		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 172 aacaaucac agucugccau	20	
50	<210> 173		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 173 caacaaguca cagccggccu cau	23	
60	<210> 174		
	<211> 23		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 174 caacaaauca cagucugcca uau	23	
	<210> 175 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 175 acaaauca gucugcca u	21	
	<210> 176 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 176 caacaaguca cagccggccu c	21	
	<210> 177 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 177 aacaagucac agccggccuc a	21	
	<210> 178 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 178 uucaaguaau ucaggauagg uu	22	
	<210> 179 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 179 ucaaguaau caggauagg u	21	
	<210> 180 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 180 uucaaguaau ucaggauagg	20	
	<210> 181		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 181 ugagugugug ugugugagug u	21	
	<210> 182		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 182 ugagugugug ugugugagug ugugu	25	
	<210> 183		
	<211> 22		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 183 ugagugugug ugugugagug ug	22	
	<210> 184		
	<211> 24		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 184 ugagugugug ugugugagug ugug	24	
50	<210> 185		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 185 ugagugugug ugugugagug	20	
60	<210> 186		
	<211> 19		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 186 ugagugugug ugugugagu	19	
	<210> 187		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 187 gagugugugu gugugagugu gu	22	
	<210> 188		
	<211> 20		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 188 gagugugugu gugugagugu	20	
	<210> 189		
	<211> 22		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 189 gugagugugu gugugagugu gu	22	
	<210> 190		
	<211> 24		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 190 gagugugugu gugugagugu gugu	24	
50	<210> 191		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 191 gagugugugu gugugagugu g	21	
60	<210> 192		
	<211> 24		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 192 gugagugugu gugugugagu gugu	24	
	<210> 193 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 193 gagugugugu gugugagugu gug	23	
	<210> 194 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 194 ugagugugug ugugugag	18	
	<210> 195 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 195 cugcgugggu gcgggcgug	19	
	<210> 196 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 196 gagugugugu gugugagu	18	
	<210> 197 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 197 cacgcucaug cacacacca c	21	
	<210> 198 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 198 cacgcucaug cacacacca	20	
	<210> 199 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 199 acgcucaugc acacaccac a	21	
	<210> 200 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 200 cacgcucaug cacacacc	19	
	<210> 201 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 201 cacgcucaug cacacacca cac	23	
	<210> 202 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 202 cacgcucaug cacacacc	18	
	<210> 203 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 203 cgcucaugca cacaccaca	20	
	<210> 204 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

<220>
 <223> Secuencia del isomiR

5 <400> 204
 acgcucaugc acacaccac 20

10 <210> 205
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del isomiR

15 <400> 205
 ccacgcucau gcacacacc ac 22

20 <210> 206
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia del isomiR

25 <400> 206
 uucacagugg cuaaguuccg 20

30 <210> 207
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia del isomiR

35 <400> 207
 uucacagugg cuaaguucc 19

40 <210> 208
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia del isomiR

50 <400> 208
 uucacagugg cuaaguuc 18

50 <210> 209
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia del isomiR

60 <400> 209
 uucacagugg cuaaguu 17

65 <210> 210
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
5	<400> 210 uauugcacuu gucccggccu g	21
	<210> 211 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
15	<400> 211 uauugcacuu gucccggccu	20
	<210> 212 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
25	<400> 212 uaacagucua cagccauggu c	21
	<210> 213 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
35	<400> 213 uaacagucua cagccauggu	20
	<210> 214 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
45	<400> 214 aacagucuac agccaugguc g	21
50	<210> 215 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Secuencia del isomiR	
60	<400> 215 uaacagucua cagccaugg	19
	<210> 216 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
65		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 216 cguaccguga gaaauaau g	21	
	<210> 217		
	<211> 23		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 217 uagcuuauca gacugauguu gac	23	
	<210> 218		
	<211> 21		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 218 uagcuuauca gacugauguu g	21	
	<210> 219		
30	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 219 guccaguuuuu cccaggauc cc	22	
40	<210> 220		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 220 guccaguuuuu cccaggauc c	21	
50	<210> 221		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 221 guccaguuuuu cccaggauc	20	
60	<210> 222		
	<211> 19		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 222		
	guccaguuuu cccaggaau	19	
	<210> 223		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 223		
	agcuacauug ucugcugggu uu	22	
	<210> 224		
	<211> 21		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 224		
	agcuacauug ucugcugggu u	21	
	<210> 225		
30	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 225		
	agcuacauug ucugcuggg	19	
40	<210> 226		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 226		
50	agcuacauu ggcuaucuggg ucu	23	
	<210> 227		
	<211> 24		
	<212> ARN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 227		
60	agcuacauu ggcuaucuggg ucuc	24	
	<210> 228		
	<211> 25		
65	<212> ARN		
	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 228 agcuacau cu ggcua cu ggg ucucu	25	
	<210> 229		
	<211> 20		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 229 agcuacau cu ggcua cu ggg	20	
	<210> 230		
	<211> 22		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 230 agcuacau cu ggcua cu ggg uc	22	
	<210> 231		
30	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 231 ugagguagua gguuguau ag u	21	
40	<210> 232		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 232 ugagguagua gguuguau ag	20	
50	<210> 233		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 233 ugagguagua gguuguau ag uuu	23	
60	<210> 234		
	<211> 22		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 234 ugauauguuu gauauugggu ug	22	
	<210> 235 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 235 ugauauguuu gauauugggu ugu	23	
	<210> 236 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 236 ugauauguuu gauauugggu	20	
	<210> 237 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 237 gauauguuug auauuggguu g	21	
	<210> 238 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 238 ugauauguuu gauauuggg	19	
	<210> 239 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 239 gauauguuug auauuggguu gu	22	
	<210> 240 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 240 gauauguuug auauuggguu	20	
	<210> 241		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 241 cccauaaagu agaaagcacu a	21	
	<210> 242		
	<211> 20		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 242 cccauaaagu agaaagcacu	20	
	<210> 243		
30	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 243 cauaaaguag aaagcacua	19	
40	<210> 244		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 244 cauaaaguag aaagcacuac ua	22	
50	<210> 245		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 245 cccauaaagu agaaagcacu ac	22	
60	<210> 246		
	<211> 22		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 246 auaaaguaga aagcacuacu aa	22	
	<210> 247 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 247 cauaaaguag aaagcacuac	20	
	<210> 248 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 248 cauaaaguag aaagcacuac uaa	23	
	<210> 249 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 249 auaaaguaga aagcacuacu a	21	
	<210> 250 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 250 cccauaaagu agaaagcac	19	
	<210> 251 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 251 cccauaaagu agaaagca	18	
	<210> 252 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
60			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
65	<400> 251 cccauaaagu agaaagca	18	
	<210> 252 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 252 cauaaaguag aaagcacu	18	
	<210> 253 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 253 auaaaguaga aagcacuacu	20	
	<210> 254 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 254 uaaaguagaa agcacuacua a	21	
	<210> 255 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 255 ccaauaagua gaaagcacua	20	
	<210> 256 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 256 ccaauaagua gaaagcacua c	21	
	<210> 257 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 257 auaaaguaga aagcacua	18	
	<210> 258 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
60			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
65	<400> 257 auaaaguaga aagcacua	18	
	<210> 258 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 258 ccaauaaagua gaaagcacu	19	
	<210> 259		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 259 acccaauaaag uagaaagcac ua	22	
	<210> 260		
	<211> 20		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 260 uaaaguagaa agcacuacua	20	
	<210> 261		
30	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 261 ccaauaaagu agaaagcacu acu	23	
40	<210> 262		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 262 auaaaguaga aagcacuac	19	
50	<210> 263		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 263 acccaauaaag uagaaagcac u	21	
60	<210> 264		
	<211> 19		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 264 uaaaguagaa agcacuacu	19	
	<210> 265 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 265 cauaaaguag aaagcacuac uaac	24	
	<210> 266 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 266 aaaguagaaa gcacuacuaa	20	
	<210> 267 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 267 auaaaguaga aagcacuacu aac	23	
	<210> 268 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 268 aaguagaaag cacuacua	18	
	<210> 269 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 269 guaguguuuc cuacuuuug ga	22	
	<210> 270 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
60			
65			

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 270 uguaguguuu ccuacuuuau gg	22	
	<210> 271		
	<211> 21		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 271 guaguguuuc cuacuuuau g	21	
	<210> 272		
	<211> 21		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 272 uguaguguuu ccuacuuuau g	21	
	<210> 273		
30	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 273 uguaguguuu ccuacuuuau	20	
40	<210> 274		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 274 guaguguuuc cuacuuuau g	20	
50	<210> 275		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 275 uaguguuucc uacuuuau g a	21	
60	<210> 276		
	<211> 18		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 276 uguaguguuu ccuacuuu	18	
	<210> 277 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 277 uguaguguuu ccuacuuu	19	
	<210> 278 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 278 uaguguuucc uacuuuau	20	
	<210> 279 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 279 guaguguuuc cuacuuuau gau	23	
	<210> 280 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 280 ugaguguacu gugggcuucg g	21	
	<210> 281 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 281 guaguguuuc cuacuuuau	19	
	<210> 282 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
60			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
65	<400> 281 guaguguuuc cuacuuuau	19	
	<210> 282 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 282 aguguuuuccu acuuuaugga u	21	
	<210> 283		
	<211> 20		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 283 aguguuuuccu acuuuaugga	20	
	<210> 284		
	<211> 22		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 284 ugaguguacu gugggcuucg ga	22	
	<210> 285		
30	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 285 guguaguguu uccuacuuua ug	22	
40	<210> 286		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 286 augaguguac ugugggcuuc gga	23	
50	<210> 287		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 287 uaguguuucc uacuuuaug	19	
60	<210> 288		
	<211> 23		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 288 aguguuuccu acuuuaugga uga	23	
	<210> 289		
	<211> 22		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 289 aguguuuccu acuuuaugga ug	22	
	<210> 290		
	<211> 22		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 290 ucuuugguua ucuagcugua ug	22	
	<210> 291		
30	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 291 ucuuugguua ucuagcugua	20	
40	<210> 292		
	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 292 ucuuugguua ucuagcugua u	21	
50	<210> 293		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 293 uaaagcuaga uaaccgaaag ua	22	
60	<210> 294		
	<211> 21		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 294 uaaagcuaga uaaccgaaag u	21	
	<210> 295 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 295 uaaagcuaga uaaccgaaag uaa	23	
	<210> 296 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 296 auaaagcuag auaaccgaaa gua	23	
	<210> 297 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
35	<400> 297 auaaagcuag auaaccgaaa g	21	
	<210> 298 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
45	<400> 298 auaaagcuag auaaccgaaa	20	
	<210> 299 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
55	<400> 299 auaaagcuag auaaccgaaa guaa	24	
	<210> 300 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
60			
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
65	<400> 299 auaaagcuag auaaccgaaa guaa	24	
	<210> 300 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		

	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
5	<400> 300		
	uaaagcuaga uaaccgaaag	20	
	<210> 301		
	<211> 24		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
15	<400> 301		
	uaaagcuaga uaaccgaaag uaaa	24	
	<210> 302		
	<211> 19		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
25	<400> 302		
	uaaagcuaga uaaccgaaa	19	
	<210> 303		
30	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 303		
	uaaagcuaga uaaccgaaag uag	23	
40	<210> 304		
	<211> 20		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del isomiR		
	<400> 304		
50	aaagcuagau aaccgaaagu	20	
	<210> 305		
	<211> 22		
	<212> ARN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del antagomir		
	<400> 305		
60	cgaccauggc uguagacugu ua	22	
	<210> 306		
	<211> 22		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

<220>
 <223> Secuencia del antagomir

 5 <400> 306
 aguaacaau c gaaagccacg gu 22

 10 <210> 307
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia del antagomir

 20 <400> 307
 cgcauuauua cucacggua c ga 22

 <210> 308
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia del antagomir

 30 <400> 308
 cgcguaacaa aaguaauaa u g 21

 <210> 309
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Secuencia del antagomir

 40 <400> 309
 ucaacaucag ucugauaagc ua 22

 <210> 310
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia del antagomir

 50 <400> 310
 acagcccauc gacugguguu g 21

 <210> 311
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 60 <400> 311
 cacgctgttt tgacctccat aga 23

 <210> 312
 <211> 18
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador

5 <400> 312
 cactgacggg caccggag 18

10 <210> 313
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del cebador

20 <400> 313
 gacctcata gaagattcta gagctagc 28

25 <210> 314
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia del cebador

35 <400> 314
 gtcgtatcca gtcagggtc cgaggatttc gactggata cgaacaaca 49

40 <210> 315
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia del cebador

50 <400> 315
 gcccgttgg aagactagtg attttg 26

55 <210> 316
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia del cebador

65 <400> 316
 gtcgtatcca gtcagggtc cgaggatttc gactggata cgacacctat 50

70 <210> 317
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> Secuencia del cebador

80 <400> 317
 tgccagtcca agtaattcag gat 23

85 <210> 318
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador

5 <400> 318
gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgacgagcca 50

10 <210> 319
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia del cebador

20 <400> 319
tgccagcctg ttctccatta ctg 24

25 <210> 320
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia del cebador

35 <400> 320
gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgacacacac 50

40 <210> 321
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia del cebador

50 <400> 321
tgccagttag tgtgtgtgtg tgagt 25

55 <210> 322
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Secuencia del cebador

65 <400> 322
gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgactgtggg 50

70 <210> 323
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

75 <220>
<223> Secuencia del cebador

80 <400> 323
tgccagcacg ctcatgcaca cacc 24

85 <210> 324
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

	<220>		
	<223> Secuencia del cebador		
5	<400> 324		
	gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgacgcggaa	50	
	<210> 325		
	<211> 23		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del cebador		
15	<400> 325		
	tgccagtcca cagtggtctaa gtt	23	
	<210> 326		
	<211> 50		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia del cebador		
25	<400> 326		
	gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgactgtca	50	
	<210> 327		
30	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia del cebador		
	<400> 327		
	tgccagaggg ctagctgct tgtg	24	
40	<210> 328		
	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia del cebador		
	<400> 328		
50	gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gactggata cgaacaggc	49	
	<210> 329		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Secuencia del cebador		
	<400> 329		
60	tgccagtatt gactgtgcc cggc	24	
	<210> 330		
	<211> 49		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

<220>
 <223> Secuencia del cebador

5 <400> 330
 gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gcactggata cgaaaccca 49

10 <210> 331
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del cebador

20 <400> 331
 gcccgctaag cccttacctt aaaaa 25

 <210> 332
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia del cebador

30 <400> 332
 gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gcactggata cgacagtagt 50

 <210> 333
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia del cebador

40 <400> 333
 gcccgccata aagtagaaag cac 23

 <210> 334
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Secuencia del cebador

50 <400> 334
 gtcgtatcca gtcagggtc cgagggtatc gcactggata cgactccata 50

 <210> 335
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Secuencia del cebador

60 <400> 335
 tgccagtgtg gtgttccta ctta 25

65 <210> 336
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador

5 <400> 336
gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gcactggata cgactcatac 50

10 <210> 337
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia del cebador

20 <400> 337
tgccagtctt tggttatcta gctgt 25

25 <210> 338
<211> 50
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia del cebador

35 <400> 338
gtcgtatcca gtcagggtc cgaggtattc gcactggata cgacactttc 50

40 <210> 339
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia del cebador

50 <400> 339
tgccagataa agctagataa ccga 24

55 <210> 340
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Secuencia del cebador

65 <400> 340
gtgcagggtc cgaggt 16

<210> 341
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del cebador

<400> 341
gtcatccttg cgcagg 16

<210> 342
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia del cebador

 5 <400> 342
 cgcttcggca gcacatatac 20

 10 <210> 343
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 <400> 343
 aggggccatg ctaattctt 20

 20 <210> 344
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 <400> 344
 cacgctgtt tgacctccat aga 23

 30 <210> 345
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 <400> 345
 cactgacggg caccggag 18

 40 <210> 346
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 <400> 346
 caucgucgau cguagcgc t 21

 50 <210> 347
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia del cebador

 <400> 347
 ugcgcuacga ucgacgaugt t 21

 60 <210> 348
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 65

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 348	
	ggaagac	7
	<210> 349	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 349	
	aacaaau	7
	<210> 350	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 350	
	aacaaau	7
	<210> 351	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 351	
	ucaagua	7
40	<210> 352	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 352	
50	cuguucu	7
	<210> 353	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 353	
60	gagugug	7
	<210> 354	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 354	
	acgcuca	7
	<210> 355	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 355	
	ucacagu	7
	<210> 356	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 356	
	gggcuaa	7
	<210> 357	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 357	
	auugcac	7
40	<210> 358	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 358	
50	gguuggg	7
	<210> 359	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 359	
60	aacaguc	7
	<210> 360	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 360	
	ccguggc	7
	<210> 361	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 361	
	cguaccg	7
	<210> 362	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 362	
	auuauua	7
	<210> 363	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 363	
	agcuuau	7
40	<210> 364	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 364	
50	aacacca	7
	<210> 365	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 365	
60	uccaguu	7
	<210> 366	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 366	
	gauuccu	7
	<210> 367	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 367	
	gagguag	7
	<210> 368	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 368	
	uauacaa	7
	<210> 369	
30	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia semilla	
	<400> 369	
	uguacag	7
40	<210> 370	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 370	
50	gcuacau	7
	<210> 371	
	<211> 7	
	<212> ARN	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 371	
60	ccuggca	7
	<210> 372	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
5	<400> 372	
	gcuacau	7
	<210> 373	
	<211> 7	
10	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
15	<400> 373	
	ucaguag	7
	<210> 374	
	<211> 7	
20	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
25	<400> 374	
	gauaugu	7
	<210> 375	
	<211> 7	
30	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
35	<400> 375	
	auaaagu	7
40	<210> 376	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 376	
50	guagugu	7
	<210> 377	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia semilla	
	<400> 377	
60	cuuuggu	7
	<210> 378	
	<211> 7	
	<212> ARN	
65	<213> Artificial	

	<220>		
	<223> Secuencia semilla		
5	<400> 378		
	uaaagcu	7	
	<210> 379		
	<211> 7		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia semilla		
15	<400> 379		
	uuugguu	7	
	<210> 380		
	<211> 7		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia semilla		
25	<400> 380		
	uugguua	7	
	<210> 381		
30	<211> 7		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Secuencia semilla		
	<400> 381		
	ucuuugg	7	
40	<210> 382		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> isomir		
	<400> 382		
50	ucuuugguua ucuagcugu	19	
	<210> 383		
	<211> 22		
	<212> ARN		
55	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> isomir		
	<400> 383		
60	cuuugguuau cuagcuguau ga	22	
	<210> 384		
	<211> 18		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> isomir		
5	<400> 384 ucuuugguua ucuagcug	18	
	<210> 385 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
10			
	<220>		
	<223> isomir		
15	<400> 385 ucuuugguua ucuagcugua ugag	24	
	<210> 386 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
20			
	<220>		
	<223> isomir		
25	<400> 386 cuuugguuau cuagcuguau g	21	
	<210> 387 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		
30			
	<220>		
	<223> isomir		
35	<400> 387 uuugguuau uagcuguau g a	21	
	<210> 388 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial		
40			
	<220>		
	<223> isomir		
45	<400> 388 cuuugguuau cuagcuguau	20	
	<210> 389 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial		
50			
	<220>		
	<223> isomir		
55	<400> 389 cuuugguuau cuagcugua	19	
	<210> 390 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
60			
	<220>		
	<223> isomir		
65			

	<220>		
	<223> isomir		
5	<400> 390 cuuugguuau cuagcuguau gag	23	
10	<210> 391 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial		
15	<220> <223> isomir		
20	<400> 391 aucuuugguu aucuagcugu aug	23	
25	<210> 392 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial		
30	<220> <223> isomir		
35	<400> 392 uuugguuau uagcuguau ag	22	
40	<210> 393 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial		
45	<220> <223> isomir		
50	<400> 393 aucuuugguu aucuagcugu auga	24	
55	<210> 394 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial		
60	<220> <223> isomir		
65	<400> 394 cuuugguuau cuagcugu	18	
	<210> 395 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial		
	<220> <223> isomir		
	<400> 395 ucuuugguua ucuagcugua ugagu	25	
	<210> 396 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial		

	<220>		
	<223> isomir		
5	<400> 396		
	aucuuugguu aucuagcugu a	21	
	<210> 397		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
15	<400> 397		
	ccggaaaucu ggagaauca t	21	
	<210> 398		
	<211> 21		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido		
25	<400> 398		
	ugauucucca gauuuccggt t	21	

REIVINDICACIONES

1. Molécula de miARN-7, mimético, isomiR o fuente de la misma o composición que comprende dicha molécula de miARN-7, dicho mimético, dicho isomiR o dicha fuente de la misma para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar la neoangiogénesis.
2. Composición para el uso según la reivindicación 1, que comprende además otra molécula de miARN, un mimético, un isomiR o fuente de la misma seleccionado de:
 - a) una molécula de miARN-9, de miARN-190b, de miARN-574 y/o de miARN-142, un mimético, un isomiR y/o una fuente de la misma,
 - b) opcionalmente al menos una molécula de miARN-26b, miARN-27a, miARN-92a, miARN-221, miARN-222, miARN-145 y una let7al, un mimético, un isomiR y/o una fuente de la misma,
 - c) y opcionalmente al menos un antagomir de un miARN-132, miARN-126 y miARN-21 y/o una fuente del mismo.
3. Método *ex vivo* para el diagnóstico de neoangiogénesis en un sujeto, donde el método incluye las etapas de:
 - (a) determinar el nivel de expresión de una molécula de miARN-7, un isomiR o una fuente de la misma en una muestra de un sujeto, y
 - (b) comparar el nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma tal y como se define en (a) con un valor de referencia para el nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma, donde el valor de referencia es preferiblemente el valor medio para el nivel de expresión de dicha molécula, isomiR o fuente de la misma en un sujeto sano.
4. Método según la reivindicación 3, que comprende en la etapa (a) determinar el nivel de expresión de otra molécula de miARN, isomiR o fuente de la misma como se identifica en la reivindicación 2.
5. Método según la reivindicación 3, donde la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7, isomiR o una fuente de la misma.
6. Método según la reivindicación 4 o 5, donde la neoangiogénesis se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7, isomiR o una fuente de la misma y una reducción del nivel de expresión de al menos una de otra molécula de miARN, isomiR o una fuente de la misma como se identifica en la reivindicación 2 a) y/o b) y/o un aumento del nivel de expresión de al menos una de otra molécula de miARN, isomiR o una fuente de la misma como se identifica en la reivindicación 2 c).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde el nivel de expresión de dicho miARN se determina indirectamente cuantificando la cantidad de la secuencia de nucleótidos.
8. Método para la identificación de una sustancia capaz de prevenir, tratar, revertir y/o retrasar la neoangiogénesis en un sujeto, donde el método incluye las etapas de:
 - (a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-7 o isomiR de la misma, donde preferiblemente la población de prueba comprende células de la vejiga, más preferiblemente la población de células de prueba comprende células de mamíferos, aún más preferiblemente células humanas;
 - (b) contactar o incubar la población de células de prueba con la sustancia;
 - (c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-7 o isomiR de la misma o la actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR de la misma en la población de células de prueba contactada o incubada con la sustancia;
 - (d) comparar la expresión, actividad o nivel estable determinado en (c) con la expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR en una población de células de prueba que no se contacta con la sustancia; y,
 - (e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, actividad o nivel estable de dicha molécula de miARN-7 o isomiR, entre la población de células de prueba que se contacta con la sustancia y la población de células de prueba que no se contacta con la sustancia.
9. Método según la reivindicación 8, mediante el cual los niveles de expresión, actividades o niveles estables de al menos otra molécula de miARN, isomiR o fuente de la misma se comparan, preferiblemente donde la otra molécula de miARN, isomiR o fuente de la misma es como se identifica en la reivindicación 2.

Fig 1a

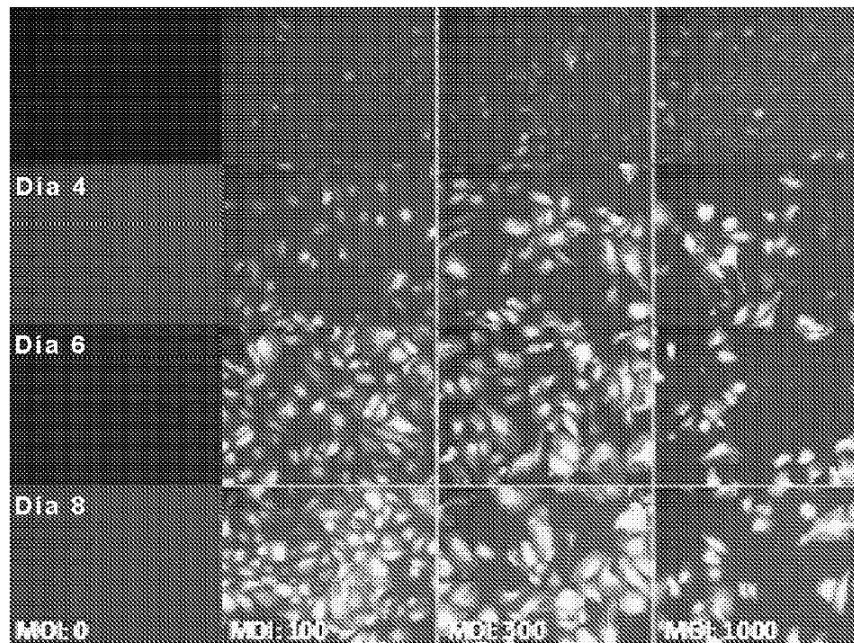


Fig 1b

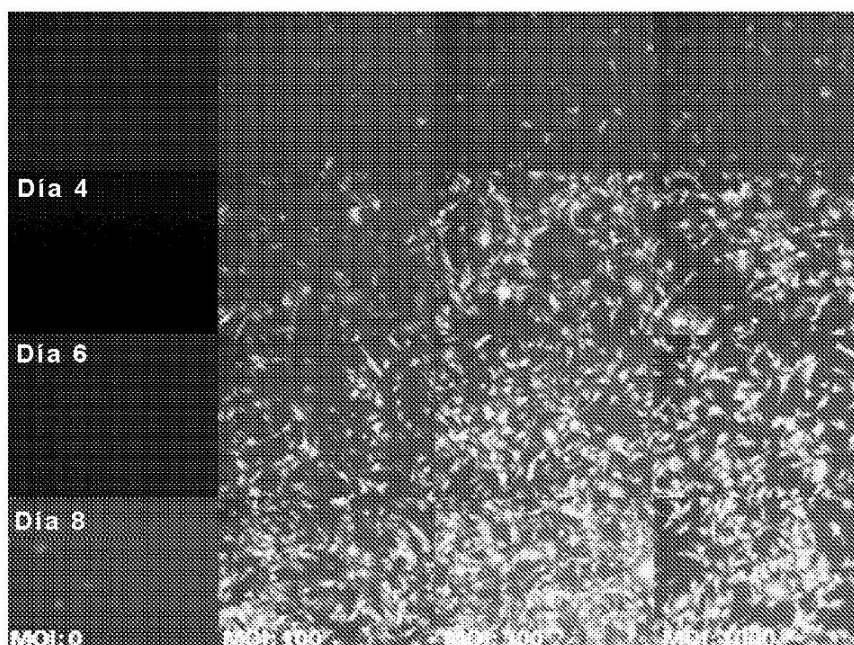


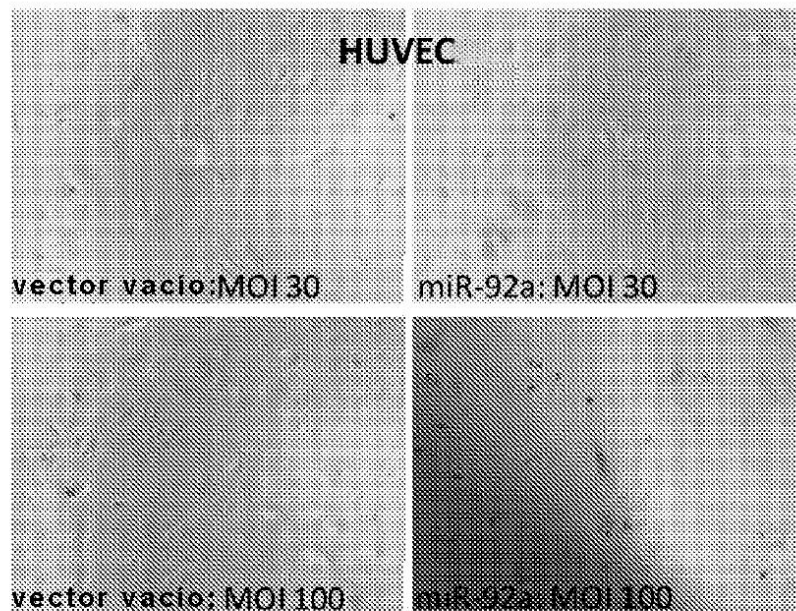
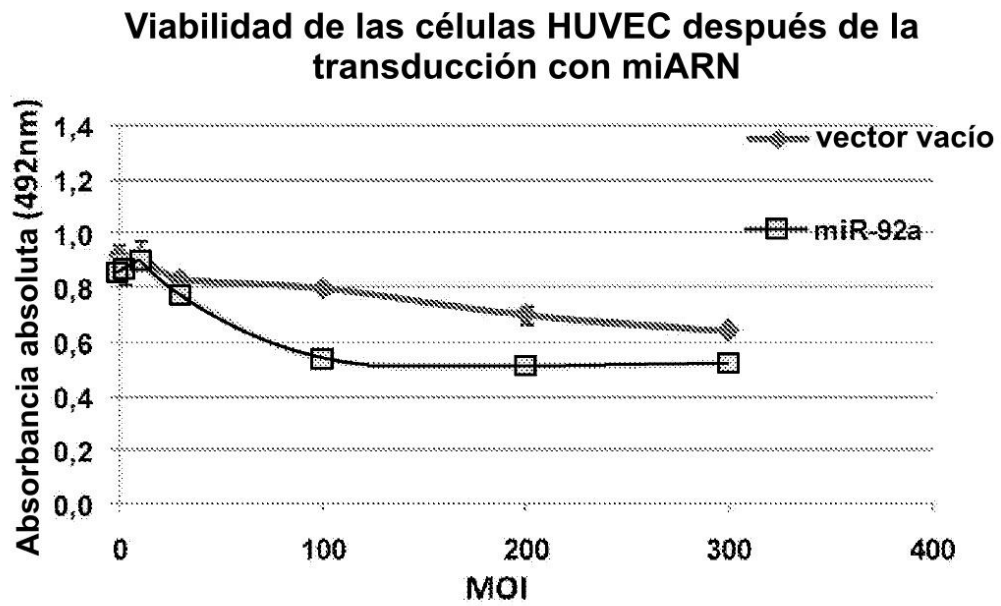
Fig. 2a

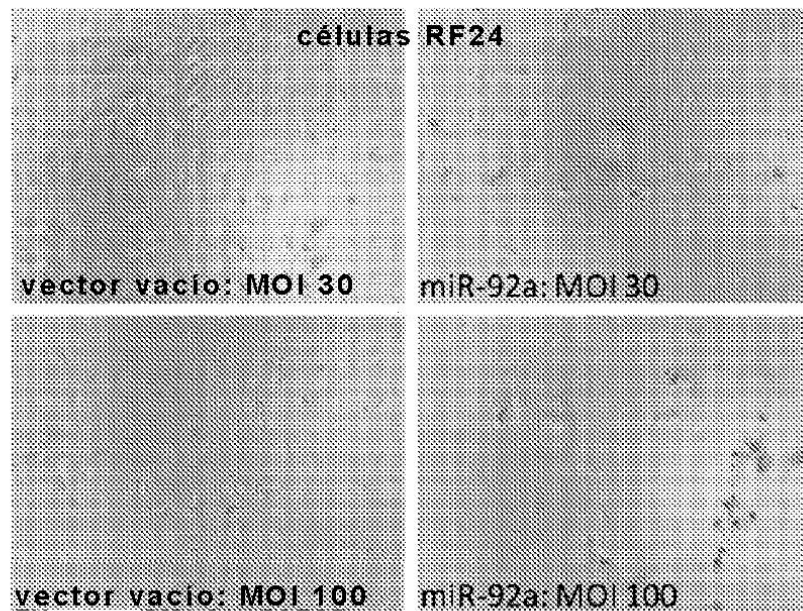
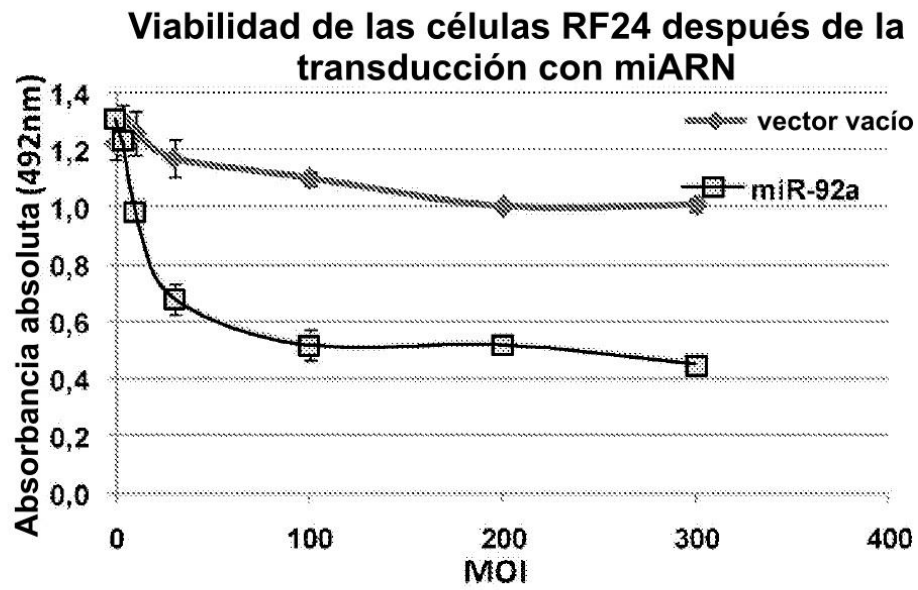
Fig. 2b

Fig. 3a

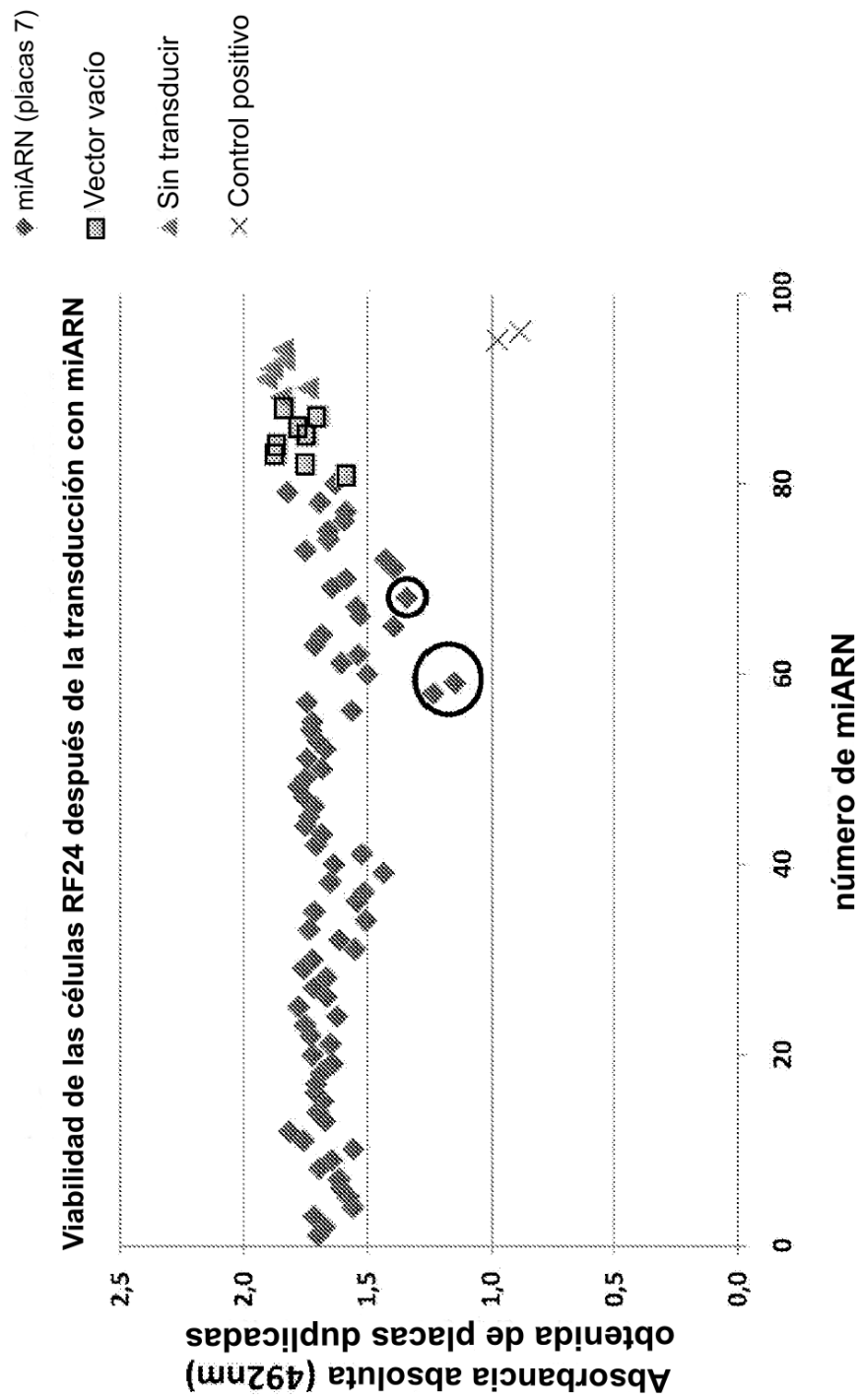


Fig. 3b

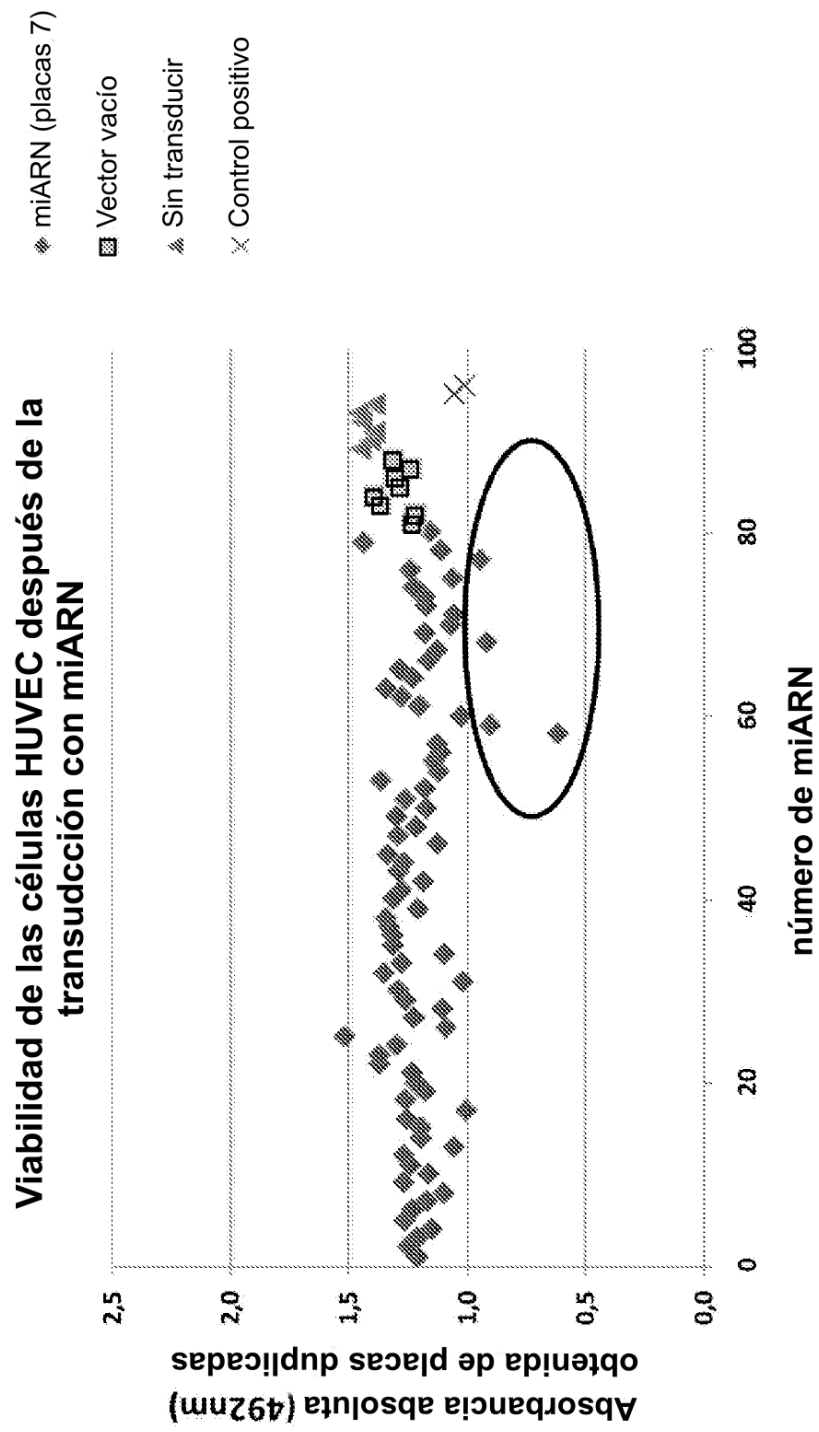
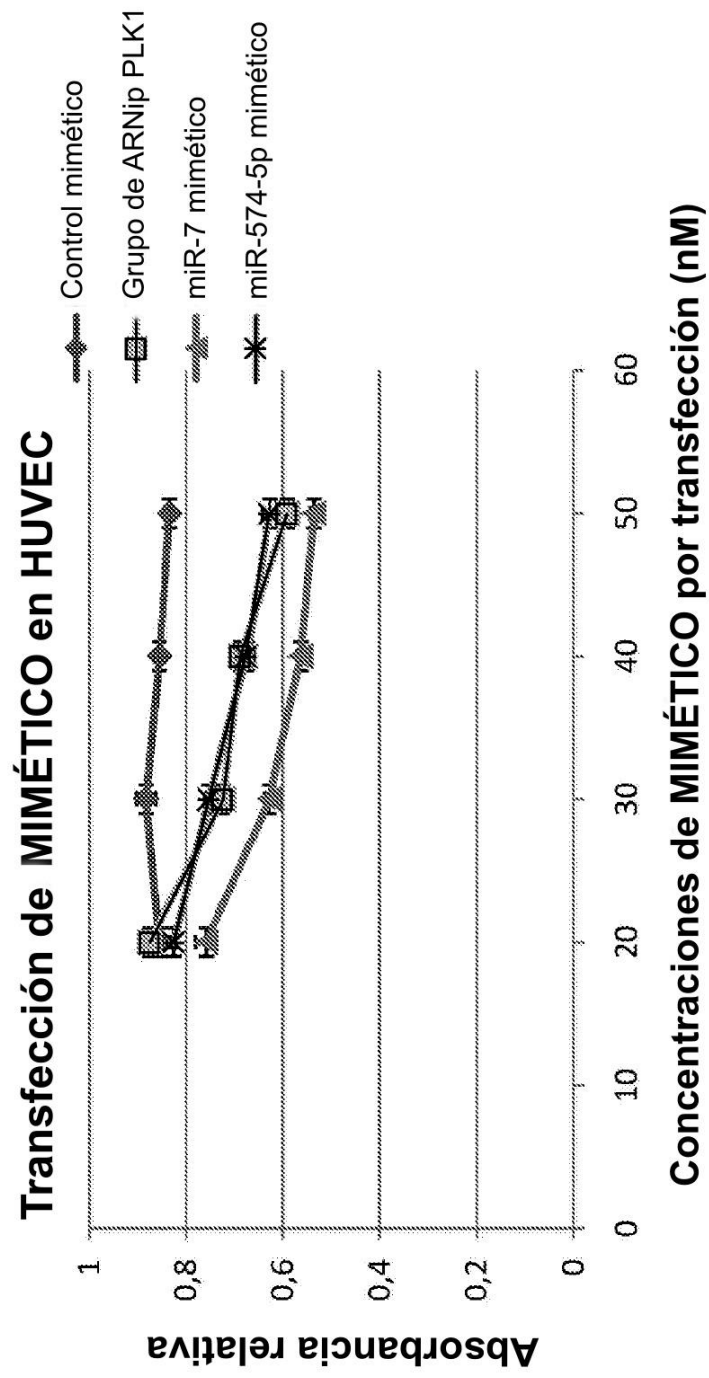


Fig. 4



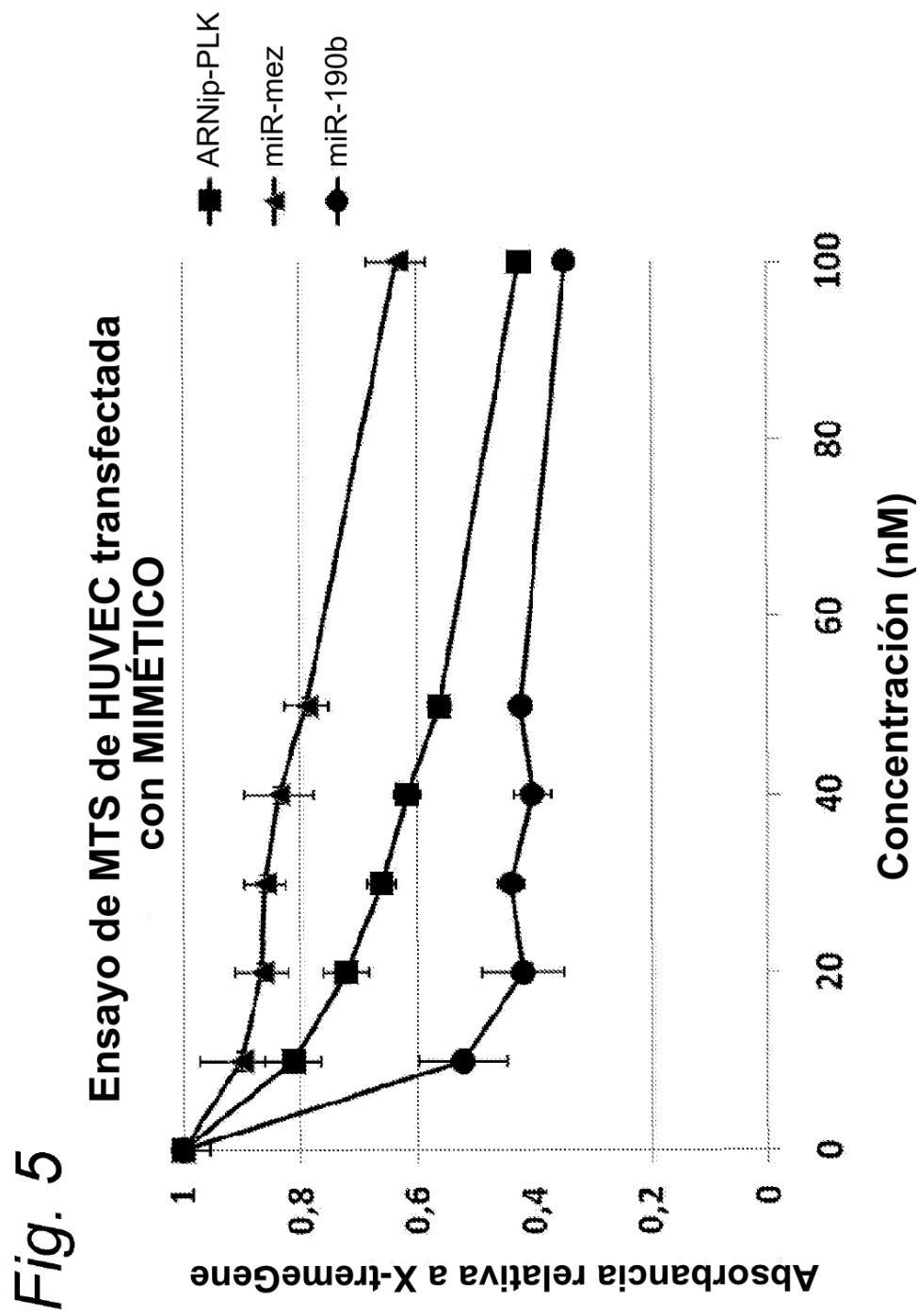


Fig. 6

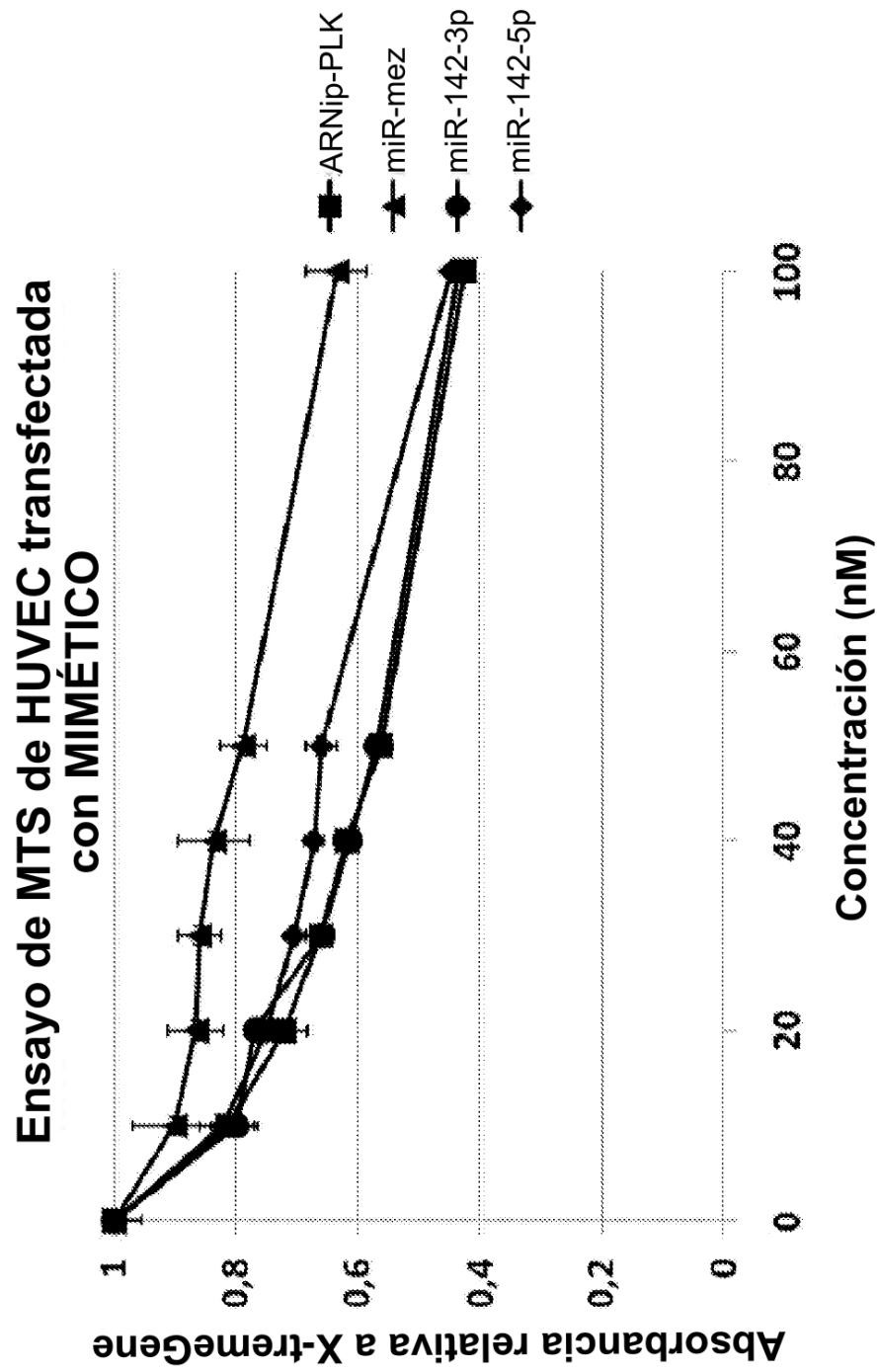


Fig. 7

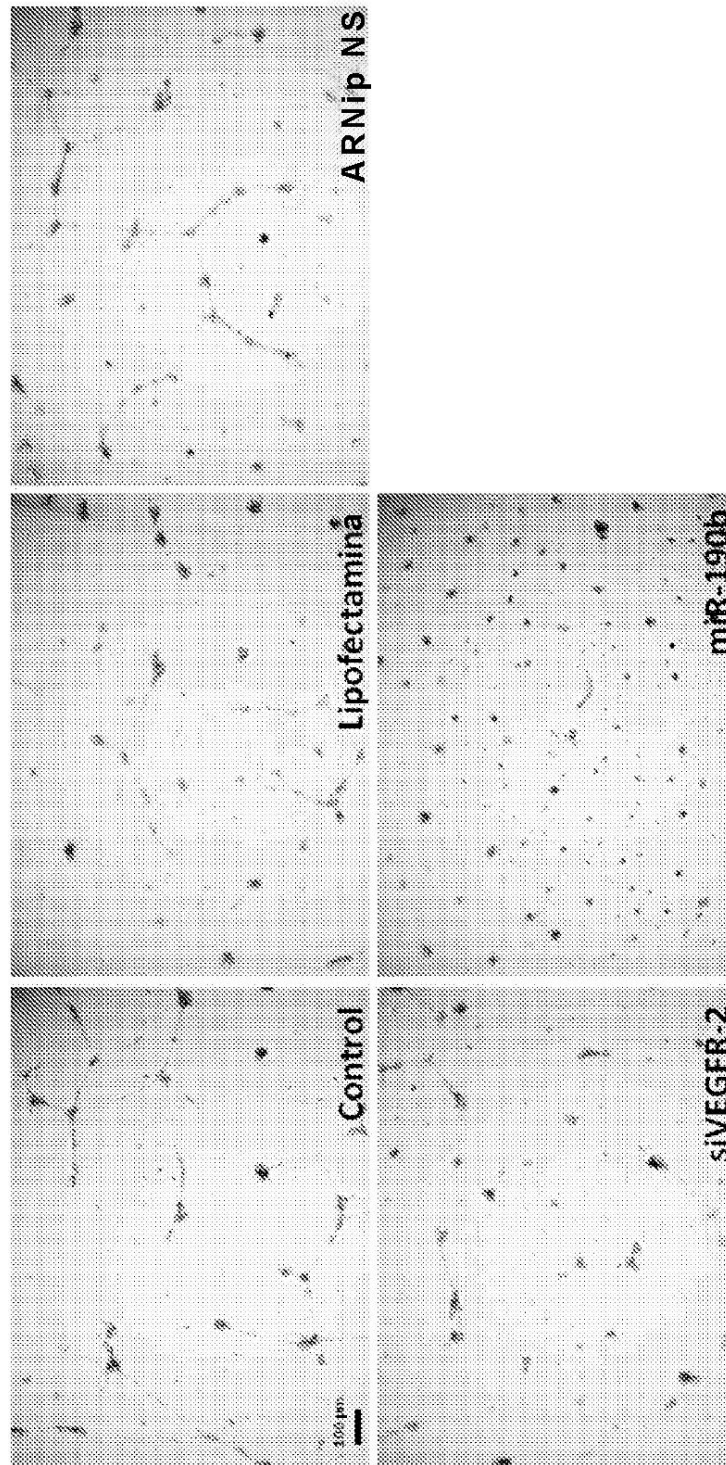


Fig. 8

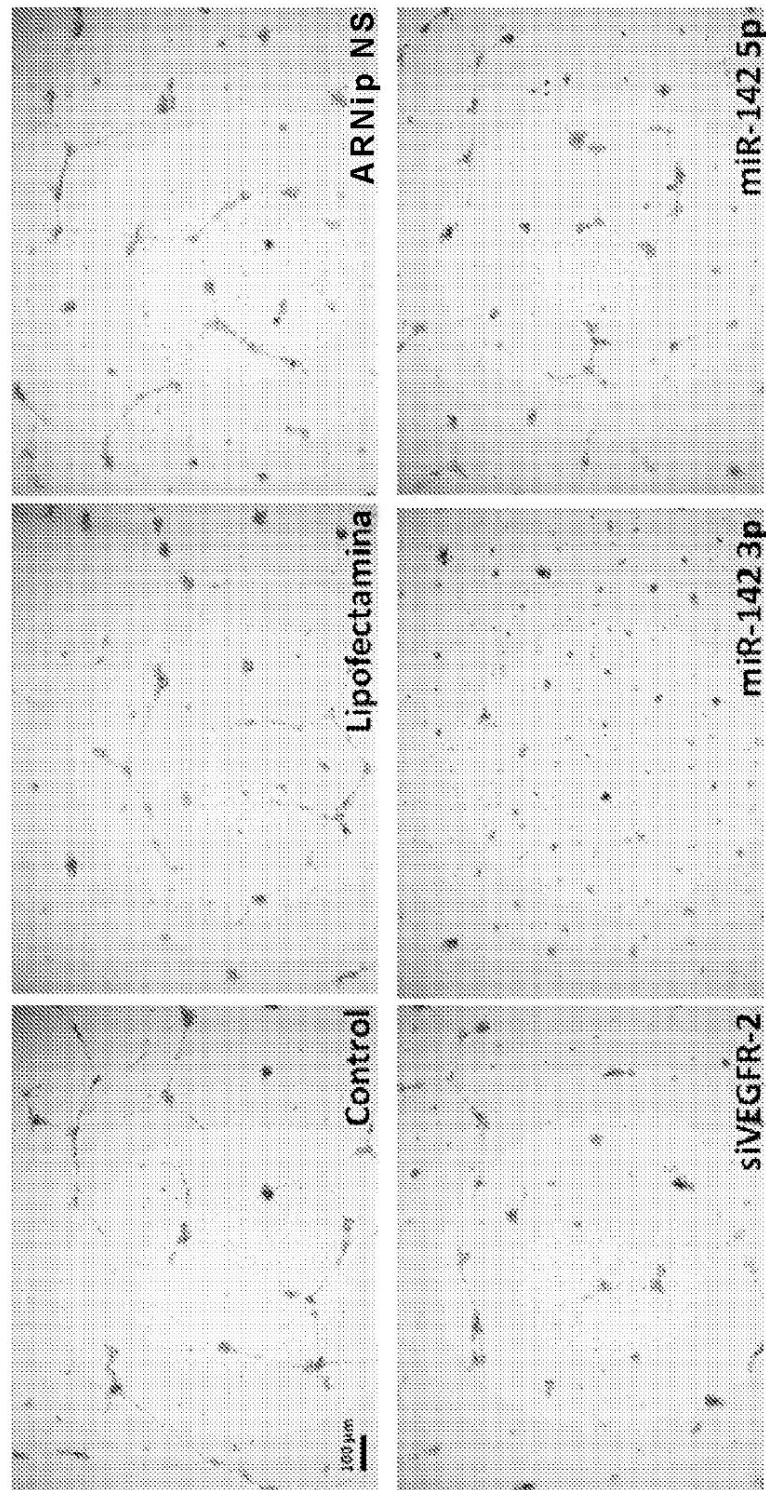


Fig. 9

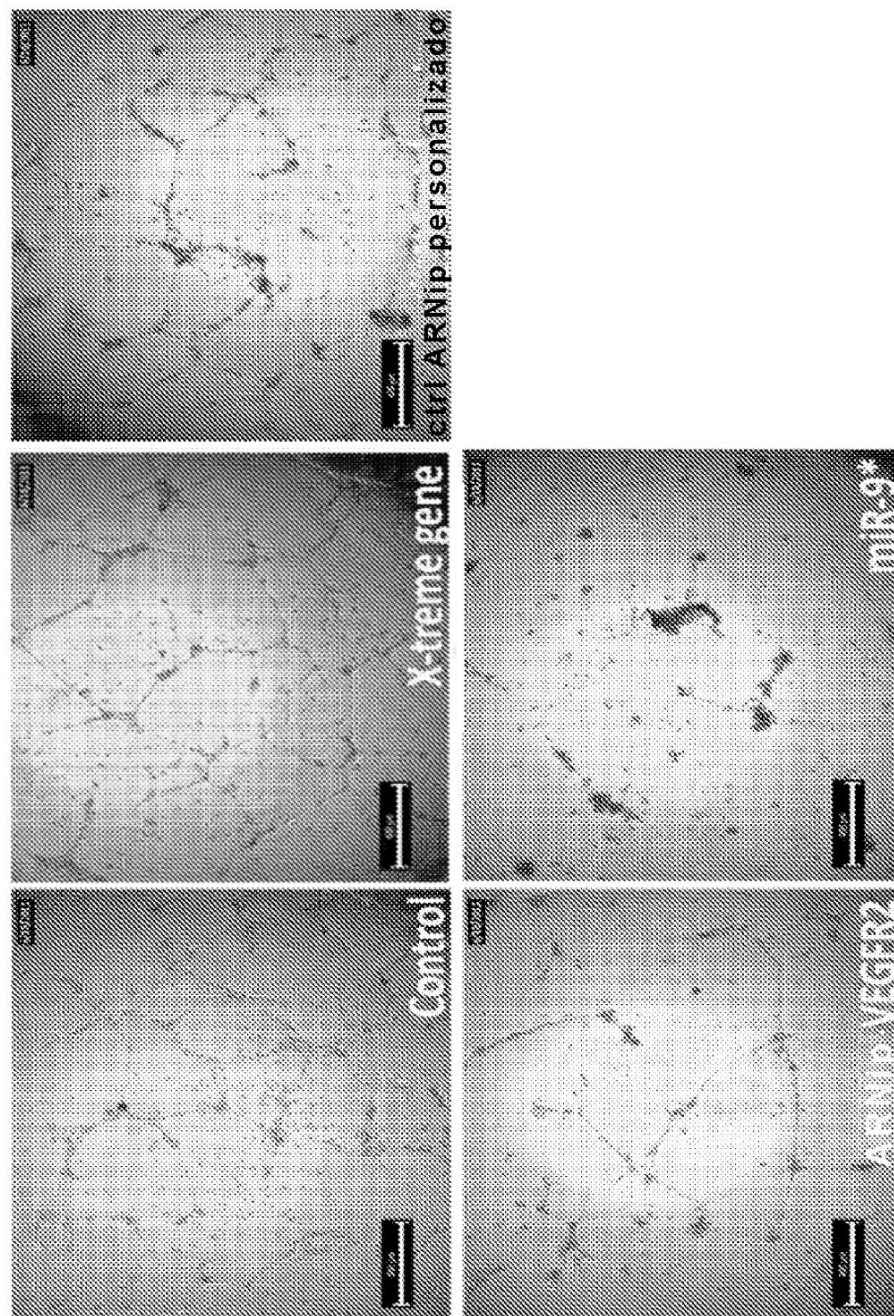


Fig 10

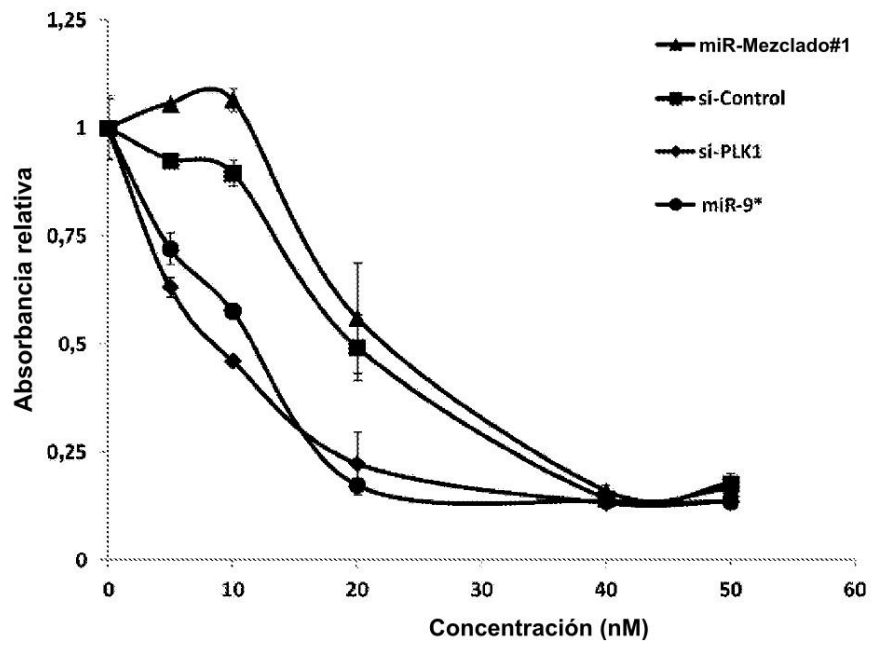


Fig 11a

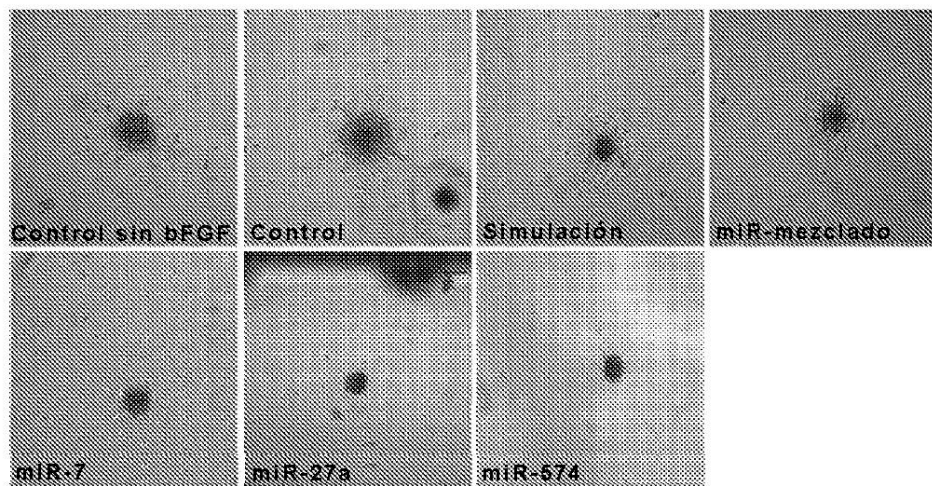


Fig 11b

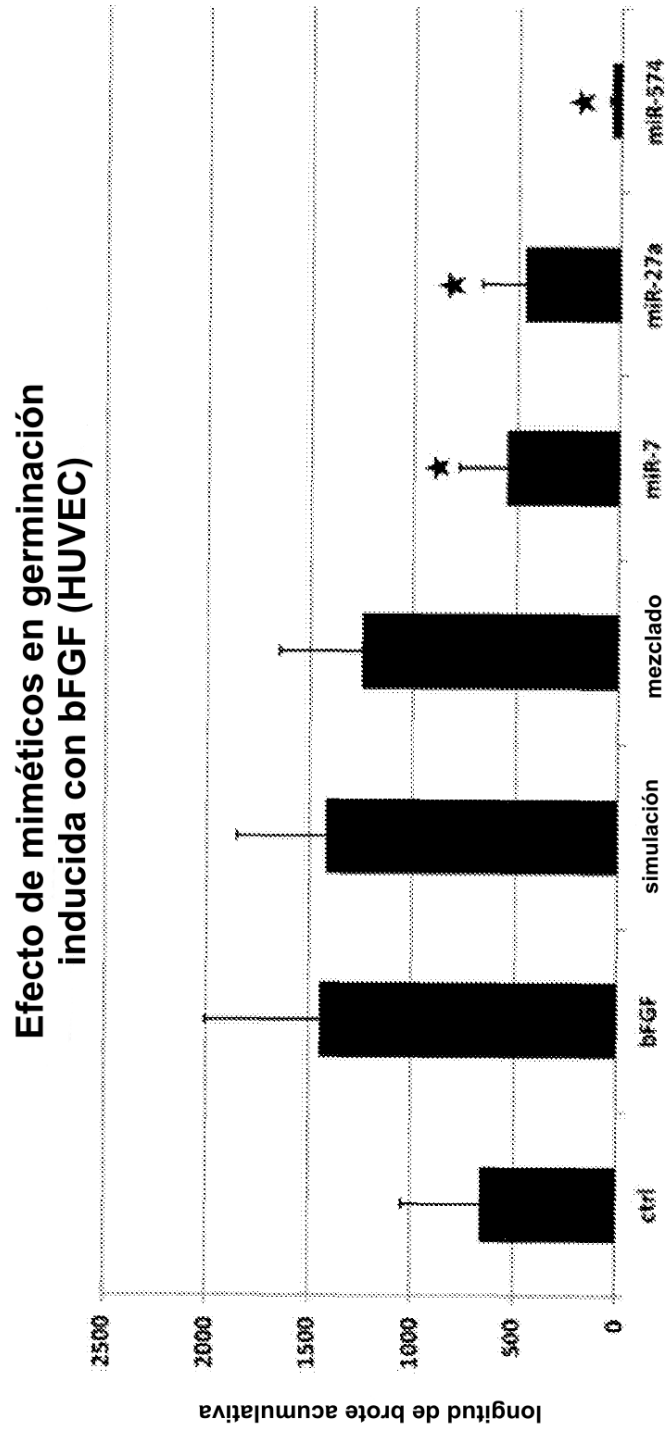


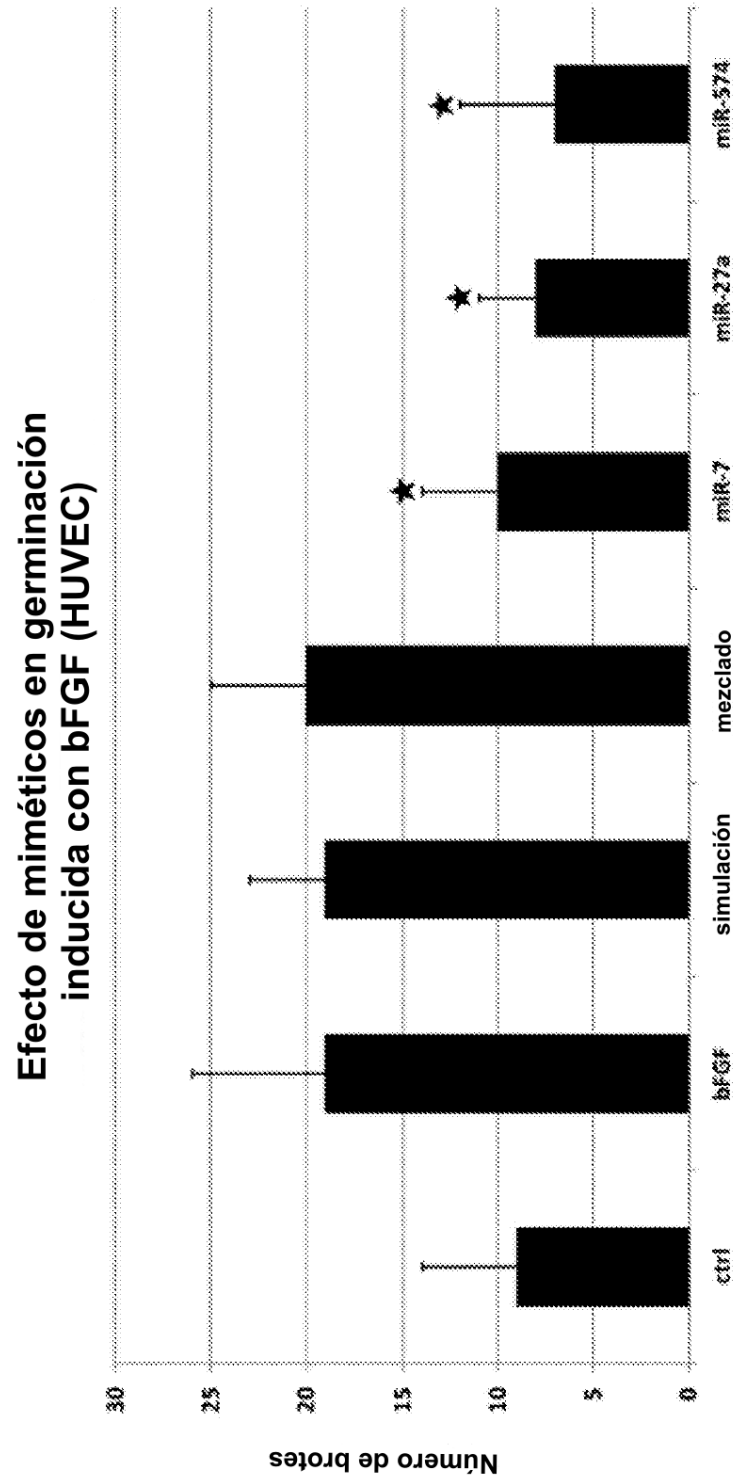
Fig 11c

Fig 12a Controles vs. miR-7

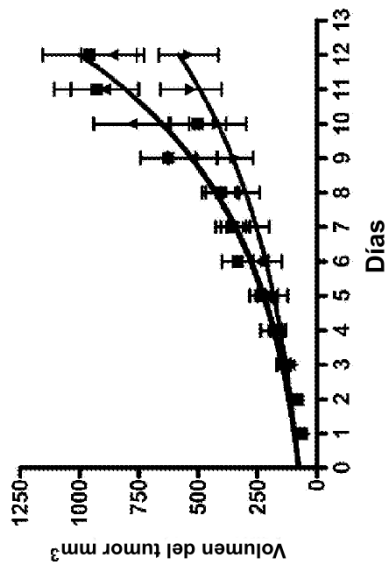


Fig 12b Controles vs. miR-574-5p

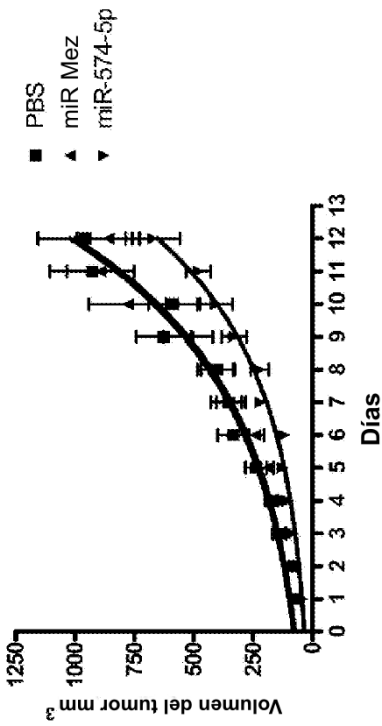


Fig 12c Controles vs. miR-27a

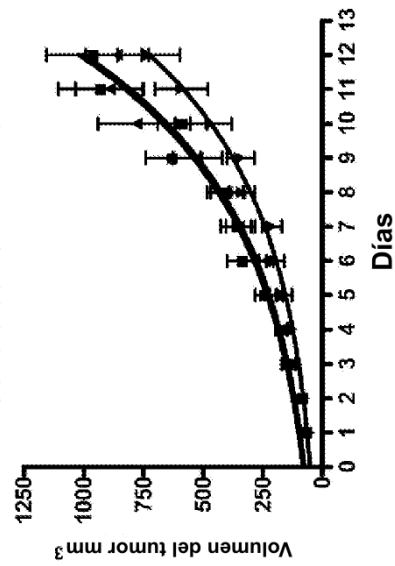


Fig 12d Controles vs. siVEGFR2

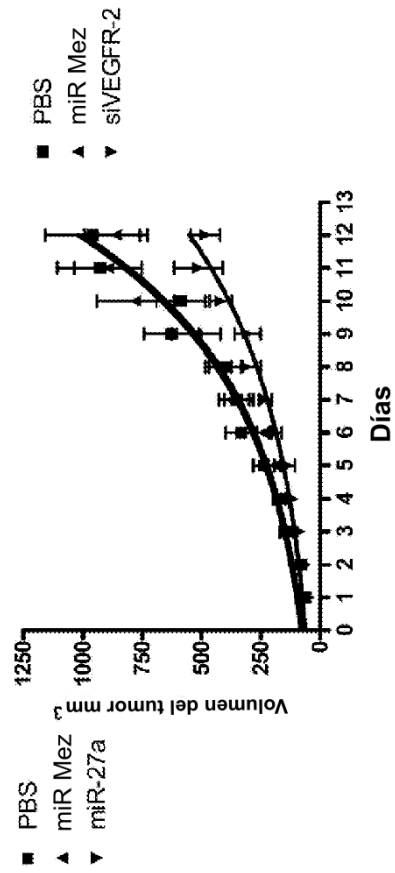


Fig 12e

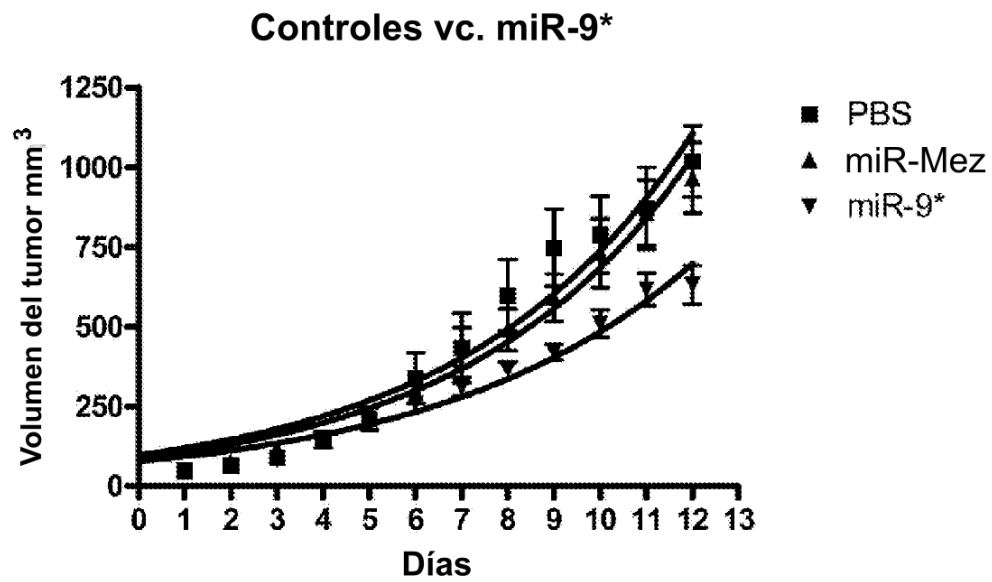


Fig 13

