

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 638**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7088** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2014 PCT/PL2014/000092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026249**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2014 E 14766010 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3035941**

54 Título: **Uso de una molécula de MIR172 para reducir la inflamación**

30 Prioridad:

**23.08.2013 PL 40512513**

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

**04.03.2019**

73 Titular/es:

**INSTYTUT BIOCHEMII I BIOFIZYKI PAN (50.0%)  
Adolfa Pawinskiego 5A  
02-106 Warszawa, PL y  
UNIERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W  
POZNANIU (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LUKASIK, ANNA;  
ZIELENKIEWICZ, PIOTR;  
SZWEYKOWSKA-KULINSKA, ZOFIA;  
PACZEK, LESZEK y  
NOWACZYK, MARIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 702 638 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

Uso de una molécula de MIR172 para reducir la inflamación

5 Se describe el uso de una molécula de miR172 derivada de plantas o su equivalente sintético, seleccionada entre miR172a o miR172b, para reducir procesos inflamatorios en el organismo, un procedimiento para reducir la proliferación de linfocitos B y T, así como un procedimiento para reducir el nivel de proteína FAN (factor asociado con la activación de esfingomielinasa neutra). El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento terapéutico novedoso basado en moléculas de miARN, que a través de la interacción con el ARNm que codifica la proteína FAN, regule negativamente su expresión y reduzca la respuesta inflamatoria del organismo.

15 Los microARN (miARN) son una clase de ARN reguladores monocatenarios que están ampliamente conservados de forma evolutiva entre muchas especies conocidas [1-3]. Estas moléculas cortas (18-24 nt) no codificantes median la regulación de la expresión génica postranscripcional promoviendo la escisión o inhibiendo la traducción del ARNm diana [4-6]. Como formas de secuencia madura, los miARN se generan en un proceso de múltiples etapas que comienza con la transcripción del gen de miARN dando un transcrito primario largo con muchas unidades de tallo-bucle (pri-miARN). El pri-miARN se procesa posteriormente dando el precursor de horquilla (pre-miARN) y se escinde para generar el dúplex miARN:miARN\* con dos alerones de nucleótidos en el extremo 3'. Como se ha descrito, las etapas individuales del procesamiento de precursores de miARN son ligeramente diferentes en organismos animales y vegetales [7-10]; sin embargo, la etapa final del proceso de maduración de miARN es similar en ambos casos. A saber, una de las cadenas del dúplex (cadena \*) está habitualmente degradada; mientras que la segunda cadena se carga en el multicomplejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), que se une al transcrito de ARNm específico [9-13]. Mediante esta hibridación, los miARN regulan negativamente la expresión de genes diana controlando así el desarrollo, la apoptosis, la proliferación, la diferenciación celular y otras funciones importantes en los organismos vivos [9, 14, 15]. En los seres humanos, diversos informes han asociado los perfiles de expresión de miARN específicos con determinadas etapas fisiológicas y patológicas, tumorigénesis o incluso la respuesta del paciente al tratamiento. Así, en medicina, los miARN se han convertido en nuevos biomarcadores de diagnóstico y pronóstico [16, 17] y se han incorporado en algunas terapias novedosas para el tratamiento de diversos trastornos humanos [18, 19]. En el contexto médico, los miARN también son bien conocidos por su implicación en la regulación de la respuesta inmunitaria del organismo, la inmunidad o la inflamación. El efecto de los miARN en estos procesos se relaciona, entre otros, con: (1) las vías de señalización de interferón y citoquinas, (2) la regulación del desarrollo y la diferenciación de linfocitos B y T, macrófagos, monocitos, células NK y granulocitos o (3) la activación de algunas de estas células, que forman parte del sistema inmunitario innato y adaptativo [20-23]. Los linfocitos T y B mencionados anteriormente y factores tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) desempeñan un papel importante, de hecho, crítico, en una serie de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple [24-31]. En la actualidad, existen varios procedimientos conocidos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la terapia anti-TNF- $\alpha$ ; no obstante, debido a sus efectos adversos significativos (incluido el aumento de la susceptibilidad a infecciones), se están realizando investigaciones adicionales para descubrir terapias novedosas que permitan reducir o incluso evitar estos efectos negativos [32, 33]. Una de estas dianas terapéuticas recientemente propuestas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias es la proteína FAN (factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra) codificada por el gen NSMAF [34]. La FAN es una molécula adaptadora que, por medio de su interacción con el dominio NSD del receptor de TNF-R1, modula la expresión de genes inducida por el TNF- $\alpha$ ; es decir, genes que codifican proteínas inflamatorias, tales como la interleucina 6 (IL-6) y quimiocinas, por ejemplo, CCL5, CCL9, CCL20 y CXCL-2 [34-36]. Una investigación realizada en ratones mostró que en individuos FAN<sup>-/-</sup> la expresión inducida por TNF- $\alpha$  de las moléculas proinflamatorias mencionadas anteriormente se alteró selectivamente. Esto produjo como consecuencia una alteración de la población de leucocitos en órganos linfoides secundarios, como se observó por medio de la reducción del número de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células linfoides en el bazo [34, 36].

50 Aparte de todos los tratamientos farmacológicos, también hay muchos procedimientos conocidos domésticamente para gestionar la inflamación y las respuestas inmunitarias [37-39]. Uno de los procedimientos más eficaces y antiguos es el uso del repollo (*Brassica oleracea var. capitata*), y más exactamente aplicando compresas de hojas de repollo o bebiendo el jugo de repollo. Debido a sus propiedades específicas, el repollo se ha utilizado en medicina natural principalmente para el dolor reumático, la inflamación de venas y vasos linfáticos, hematomas, esguinces, mastitis o problemas gastrointestinales. No obstante, su "espectro" de uso es mucho más amplio y abarca el tratamiento de enfermedades tanto internas como externas [40-42]. Tal como sugiere la investigación más reciente, el efecto de las plantas consumidas en el organismo humano puede atribuirse no solo a los minerales, antioxidantes, vitaminas o polipéptidos que contienen, sino también a la presencia de pequeñas moléculas de ARN: los miARN. El estudio de Zhang *et al.* proporcionó evidencias no solo de que los miARN derivados de alimentos son abundantes en el suero humano, sino también de que pueden regular negativamente la expresión de genes específicos en mamíferos. Por ejemplo, el MIR168a inhibe la expresión de la proteína adaptadora del receptor de lipoproteína de baja densidad 1 (LDLRAP1) en el hígado y, por lo tanto, altera la homeostasis en plasma de LDL [43]. Los miARN derivados de plantas también se identificaron por Wang *et al.*, que demostraron que las moléculas de miARN constituyen una fracción significativa de ARNp en plasma humano [44]. Estos informes recientes sobre la regulación de forma cruzada entre reinos por miARN de plantas abren una nueva puerta para la medicina natural y el

tratamiento de muchas enfermedades conocidas.

En la solicitud de patente CN102887948 (publ. 23/01/2013) se describe una medicina polipeptídica antibacteriana y de inmunorregulación. La invención pertenece a la biotecnología, y se refiere a una medicina de péptido mimético de apoE antibacteriana y de inmunorregulación. El péptido mimético de apoE ApoE23 tiene una estructura representada por la secuencia 1. Los ensayos *in vivo* e *in vitro* demuestran que el péptido mimético de apoE puede reducir la expresión de TNF-alfa, IL-6 e IL-10 inducida por LPS en células THP-1 y células mononucleares de sangre periférica humana, obviamente reduce la tasa de mortalidad en ratones con septicopemia, reduce las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-6 y LPS en el plasma sanguíneo de los ratones con septicopemia, alivia la inflamación en los pulmones, el hígado, el intestino delgado y el bazo de los ratones con septicopemia, y pueden destruir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* resistente a todos los fármacos y *Staphylococcus aureus*. El péptido mimético de apoE se puede utilizar para preparar medicinas polipeptídicas resistentes a bacilos gram-negativos y resistentes a bacilos gram-negativos resistentes a todos los fármacos y medicinas polipeptídicas de inmunorregulación y medicinas anti-septicopiohemia.

La solicitud de patente WO2012153854 (publ. 15/11/2012) proporciona y se describen medios novedosos para modular la expresión de los genes de citocinas-quimiocinas asociados con la inflamación y la infección. Específicamente, la invención proporciona un nucleótido antisentido que comprende la secuencia complementaria a la 3'UTR del gen CCL2, CCL20, CX3CL1, IL-23A, CD69, NF- $\kappa$ B p65, TNF- $\alpha$  Fam89a, Grk5, Phospholipid Scramblase 1, Runx1, Semaphorin 4A, Steap4, lymphotoxin  $\beta$  Psmb10 o TLR2 inducido por IL-1 $\beta$  y que es capaz de modular la expresión del gen; oligonucleótido sentido que contiene la secuencia complementaria al producto de transcripción antisentido endógeno que contiene la secuencia complementaria a la 3'UTR del gen y que es capaz de modular la expresión del gen; y un agente que previene y/o trata la enfermedad o infección inflamatoria y contiene el nucleótido sentido o antisentido.

En la solicitud de patente AU2012201409 (publ. 29-03-2012) se proporciona ARN de interferencia para la inhibición del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) silenciando la expresión del ARNm del receptor I de TNF (TNFRI) del receptor de superficie celular de TNF- $\alpha$  o silenciando la expresión de ARNm de la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  5 (TACE/ADAM17). El silenciamiento de estas dianas de TNF- $\alpha$ , en particular, es útil para tratar pacientes que tienen una afección relacionada con TNF- $\alpha$  o el riesgo de desarrollar una afección relacionada con TNF- $\alpha$  tal como las afecciones oculares ojo seco, conjuntivitis alérgica o inflamación ocular, o tal como dermatitis, rinitis o asma, por ejemplo.

La solicitud de patente WO2012115469 (publ. 30/08/2012) se refiere a una composición alimenticia funcional antiinflamatoria para administración oral, y más en particular, a un procedimiento para extraer, de granos y frutas, ingredientes activos que sean eficaces para prevenir la inflamación y mejorar los síntomas, y a una composición alimenticia funcional antiinflamatoria que comprende los extractos para administración oral. Con este fin, la composición alimenticia funcional antiinflamatoria para administración oral según la invención se prepara mediante la obtención de extractos de *Morus alba* L. (morera), frijoles negros (*Phaseolus vulgaris*) y cebollas, y el mezclado de dichos extractos en una proporción apropiada. La composición alimenticia funcional así preparada se puede utilizar como una composición para analgésicos antiinflamatorios, y tiene los efectos de prevenir y aliviar los síntomas de la artritis, dado que muestra, en un rango de capacidad apropiado, efectos antioxidantes de gran nivel, efectos de alivio del edema inflamatorio, efectos inhibidores de la inflamación aguda y la inflamación crónica, efectos de inhibición de la expresión de lipoxigenasa, ciclooxigenasa-2, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y colagenasa de tipo I, que son enzimas proinflamatorias, y efectos de inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) y prostaglandinas, que son factores proinflamatorios.

En una solicitud de patente KR101090177 (publ. 06/12/2011) se proporciona un aptámero de ARN antagonista de IL-32 para suprimir la expresión de TNF- $\alpha$  y para desarrollar un agente terapéutico para enfermedades inflamatorias. Un aptámero de ARN tiene una secuencia de la secuencia número 7 y se une a IL-32 como antagonista. El aptámero de ARN bloquea la función de IL-32 intrínseca. El aptámero de ARN tiene una alta afinidad por IL-32. El aptámero de ARN se aplica para desarrollar un agente terapéutico para tratar una inflamación crónica tal como la artritis reumática.

La solicitud de patente JP2003267880 (publ. 25-09-2003) describe una composición para antialérgicos y antiinflamatorios, que tiene una estabilidad y un coste excelentes y es segura. El inhibidor de la producción de interleucina-4 comprende extracto de *Brassica oleracea acephala* y/o *Brassica orelacea acephala*. La composición para antialérgicos y la composición para antiinflamatorios comprenden el inhibidor de la producción de interleucina-4 y tienen un excelente efecto sobre alergias tales como rinitis alérgica, polinosis, etc. Estas composiciones se administran por vía oral o se usan como preparaciones para el cuidado de la piel.

La solicitud de patente WO03070897 (publ. 28/08/2003) se refiere a procedimientos y reactivos útiles en la modulación de la expresión de genes de la superfamilia de TNF y de la superfamilia de receptores de TNF en una diversidad de aplicaciones, incluido su uso en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de validación de dianas y de descubrimiento genómico. Específicamente, la invención se refiere a moléculas pequeñas de ácido nucleico, tales como ácido nucleico de interferencia corto (ANic), ARN de interferencia corto (ARNic), ARN bicatenario

(ARNbc), micro-ARN (miARN) y ARN de horquilla corta (ARNhc) moléculas capaces de mediar ARN de interferencia (ARNi) frente a la expresión y/o actividad de los genes de la superfamilia de TNF y la superfamilia de receptores de TNF. Las moléculas pequeñas de ácido nucleico son útiles en el tratamiento de choque séptico, artritis reumatoide, VIH y SIDA, psoriasis, trastornos inflamatorios o autoinmunitarios y cualquier otra enfermedad o afección que responda a la modulación de la expresión o actividad de TNF y/o el receptor de TNF.

En la solicitud de patente US2008279862 (publ. 13/11/2008) se describen procedimientos para tratar una afección inflamatoria o inmunitaria. La invención se refiere a procedimientos para tratar una afección inflamatoria o inmunitaria con inhibidores de IL-1 y un inhibidor de la activación de células B o células T. Se describen procedimientos para tratar una afección inflamatoria o inmunitaria con inhibidores de TNF y un inhibidor de la activación de células B o células T.

En la solicitud de patente US2012301484 (publ. 29/11/2012) se describen proteínas reguladoras de células T novedosas y usos de las mismas. Una proteína, denominada PD-L3, se parece a los miembros de la familia de PD-L1 y coestimula con  $\alpha$ CD3 la proliferación de células T *in vitro*. Una segunda proteína, similar a la de TNF, también se ha identificado que se regula al alza mediante la estimulación con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ GITR. Esta proteína ha sido designada T<sup>reg</sup>-sTNF. Se describen proteínas, anticuerpos, células T activadas y procedimientos para utilizar los mismos. En particular, se describen procedimientos de uso de estas proteínas y compuestos, preferentemente anticuerpos, que se unen o modulan (agonizan o antagonizan) la actividad de estas proteínas, tales como moduladores inmunitarios y para el tratamiento del cáncer, enfermedades autoinmunitarias, alergias, infecciones y afecciones inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple.

La solicitud de patente DE4006768 (publ. 05/09/1991) se relaciona con el agente antirreumático (I) obtenido del jugo de hojas de repollo, que también contiene aceite de oliva para dar a la mezcla la consistencia adecuada. Preferentemente, se encuentra en forma de un ungüento, que contiene (además del aceite de oliva) un emulsionante y un conservante. Una proporción preferida: el 10-80 % en peso de extracto de hoja/jugo y el 10-80 % en peso de aceite de oliva; de forma ideal, el ungüento contiene un total del 5-80 (10-40) % en peso de aceite de oliva y emulsionante. Preferentemente, el aceite de oliva está prensado en frío. El agente antirreumático (I) alivia la inflamación y el dolor asociado con reumatismo. También se puede utilizar en casos de lumbago, migraña, cefalea, inflamación del tendón, dislocación e hinchazón. Si es necesario, el ungüento puede envolverse en pañuelos y usarse durante la noche como una compresa.

En la solicitud de patente PL397846 (publ. 18/07/2003) se describe un procedimiento para tratar enfermedades relacionadas con TNF- $\alpha$ , que comprende la administración de inhibidores de TNF- $\alpha$ , incluidos anticuerpos contra TNF- $\alpha$ .

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento novedoso para tratar diversos tipos de trastornos y afecciones, que reduzca la respuesta inflamatoria del organismo mediante el uso de una molécula miR172 derivada de plantas o su equivalente sintético. En la presente invención, las moléculas miR172 derivadas de plantas están representadas, respectivamente, por moléculas bol-miR172a o bol-miR172b derivadas de *Brassica oleracea* var. *capitata* (repollo). Informes anteriores sobre el uso del repollo en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones no asociaron sus propiedades medicinales con la presencia de moléculas de miARN. Para los fines de la presente invención, se llevó a cabo el análisis bioinformático de los resultados obtenidos por secuenciación de alto rendimiento de ARNp de *Brassica oleracea*, que confirmó la presencia y determinó la cantidad relativa de moléculas de miARN en hojas de repollo maduras. En la siguiente etapa de realización de la invención, se llevó a cabo la predicción de genes diana humanos para los miARN de repollo identificados.

La predicción bioinformática de genes diana para miARN de *B. oleracea* mencionada anteriormente reveló que las moléculas bol-miR172a y bol-miR172b, presentes en cantidades considerables en hojas de repollo, pueden interactuar con ARNm que codifica la proteína FAN y, por lo tanto, regular negativamente su expresión. La proteína FAN media respuestas inflamatorias mediante interacción con el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNF-R1) y, por este motivo, se convierte en una diana terapéutica potencial novedosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias [34, 36]. Las mediciones de la cantidad de proteína FAN, llevadas a cabo para los fines de la presente invención, realizadas en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con el uso del ensayo ELISA confirmaron que la presencia de bol-miR172a o bol-miR172b reduce el nivel de proteína FAN. Además, un ensayo *in vitro* que evaluó la función de linfocitos T y B bajo la estimulación de mitógenos específicos reveló que la abundancia de las moléculas de miARN mencionadas anteriormente (en una concentración apropiada) reduce la proliferación de linfocitos T y B. La evaluación fenotípica de PBMC, también realizada para fines de la presente invención, mostró adicionalmente que la presencia de bol-miR172a, así como la presencia simultánea de bol-miR172a y mitógeno específico, altera ligeramente la fracción de células CD25+ en la población de linfocitos CD3+.

A pesar de la técnica anterior existente y el conocimiento relacionado con los miARN, las investigaciones realizadas hasta la fecha no proporcionan pruebas que respalden la influencia de las moléculas de miARN de plantas en la regulación de procesos inflamatorios en el organismo humano ni proporcionan procedimientos para utilizar dichas moléculas con fines terapéuticos.

La realización del objetivo así especificado, así como la presentación de pruebas de que moléculas de miARN específicas son responsables de determinadas propiedades médicas de algunas plantas, se han logrado en la presente invención.

5 El objeto de la invención es la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético, seleccionada entre miR172a o miR172b, en la que miR172a está representada por la secuencia SEQ ID NO: 1 y miR172b por la secuencia SEQ ID NO: 2, y en la que dicha molécula tiene al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la región "semilla" representada por la secuencia GAAUCUU y tiene al menos un 75 % de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, para su uso en la reducción de la respuesta inflamatoria o para prevenir un aumento en la respuesta inflamatoria del organismo.

Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético es para reducir la proliferación de los linfocitos T y B.

15 Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético es para reducir el nivel de proteína FAN (factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra).

Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético interactúa con el ARNm que codifica la proteína FAN regulando negativamente su expresión y, por lo tanto, reduciendo la proliferación de los linfocitos T y B.

Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético interactúa con el ARNm que codifica la proteína FAN regulando negativamente su expresión y, por lo tanto, reduciendo el nivel de la proteína FAN.

Preferentemente, la expresión de la proteína FAN se regula negativamente y el nivel de la proteína FAN se reduce.

Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético tiene 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos de longitud.

Preferentemente, la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético tiene metilación 2'- o 3'-O de la ribosa del último nucleótido en el extremo 3'.

Preferentemente, la respuesta inflamatoria del organismo disminuye al reducir la proliferación de linfocitos T y B.

Preferentemente, la respuesta inflamatoria del organismo disminuye al reducir el nivel de proteína FAN.

Las figuras adjuntas permiten una mejor comprensión de la esencia de la presente invención.

40 **Figura 1** El sitio de unión del ARNm que codifica la proteína FAN (marcada como "Ref" (Referencia)) predicho para la molécula bol-miR172a (marcada como "Query" (Consulta)). En el alineamiento "I" se refiere a una complementariedad perfecta entre bases, "-" representa un hueco, mientras que ":" representa un par oscilante G:U. La puntuación calculada para el alineamiento presentado es 177, mientras que la energía libre mínima de la estructura (MFE) era de -24,16 kcal/mol.

45 **Figura 2** Resultados de las mediciones de la concentración de proteína FAN (ng/ml) en función de la molécula bol-miR172a (presencia en 3 concentraciones diferentes). El ensayo ELISA *in vitro* se realizó en MNC de sangre periférica humana. Los resultados presentados son valores medios (ng/ml) calculados a partir de dos repeticiones.

50 **Figura 3** Resultados del ensayo *in vitro* para la función de los linfocitos T y B humanos, en el que la figura 3a muestra la influencia de la molécula bol-miR172a (presente en 3 concentraciones diferentes) sobre la proliferación de linfocitos T estimulada mediante fitohemaglutinina (PHA), la figura 3b muestra la influencia de bol-miR172a (presente en 3 concentraciones diferentes) sobre la proliferación de linfocitos B estimulada mediante *Staphylococcus aureus* (cepa de Cowan, SAC), la figura 3c muestra la influencia de bol-miR172a (presente en 3 concentraciones diferentes) sobre la proliferación de linfocitos T estimulada mediante anticuerpos anti-CD3 (OKT3) y la figura 3d muestra la influencia de bol-miR172a (presente en 3 concentraciones diferentes) sobre la proliferación de linfocitos B en caso de su autoestimulación. Los resultados presentados son valores cpm medios calculados a partir de tres repeticiones.

60 **Figura 4** Resultados de la evaluación fenotípica de PBMC humanas utilizando citometría de flujo, en la que la figura 4a muestra los resultados de la evaluación fenotípica de PMNC incubadas con miARN y miARN + mitógeno de PHA durante 3 horas, la figura 4b muestra los resultados de la evaluación fenotípica de PMNC incubadas con miARN y miARN + mitógeno de PHA durante 6 horas, y la figura 4c muestra los resultados de la evaluación fenotípica de PMNC incubadas con miARN y miARN + mitógeno de PHA durante 24 horas. Los resultados presentados constituyen la fracción (%) de células CD25+ en la población de linfocitos CD3+, los valores medios se calculan a partir de tres repeticiones.

A continuación en el presente documento se muestran modos ejemplares de llevar a cabo la invención definida anteriormente.

## 5 EJEMPLOS

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Ejemplo 1

#### 10 Identificación de secuenciación de alto rendimiento de moléculas de miARN de hojas de *Brassica oleracea* maduras

15 Usando el procedimiento de Trizol modificado tal como se describe por Szarzynska *et al.* [45], se aisló ARN total enriquecido con ARNp de hojas de repollo maduras (*Brassica oleracea* var. capitata, cultivar Balbro) en tres réplicas biológicas independientes. La secuenciación de próxima generación (NGS) se realizó utilizando la tecnología Illumina HiSeq según el protocolo del fabricante. Las lecturas de secuenciación se generaron a partir de tres bibliotecas de ARN pequeño construidas. Cada conjunto de datos de ARNp sin procesar se analizó bioinformáticamente para limpiar, eliminar etiquetas innecesarias e identificar secuencias que representan miARN conservados y novedosos. Las cantidades relativas de moléculas de miARN de repollo descubiertas se estimaron sobre la base de valores medios, calculados a partir del número normalizado de etiquetas de miARN en las tres bibliotecas [46]. Los datos obtenidos a partir de la secuenciación de ARN pequeños se han depositado en el repositorio del ómnibus de expresión génica de NCBI con el número de acceso GSE45578.

#### 25 Ejemplo 2

#### Predicción de genes diana humanos putativos para miARN de *Brassica oleracea*

30 Las secuencias de los miARN de repollo conservados y novedosos identificados se utilizaron para predecir sus potenciales genes diana humanos. Las secuencias 3'UTR, 5'UTR y CDS de *Homo sapiens*, que se descargaron del sitio de UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) y la base de datos NCBI CCDS ([www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi)) [47], respectivamente, sirvieron como conjunto de datos de genes diana de referencia. La predicción de las dianas bioinformática se realizó utilizando el procedimiento miRanda ([www.microrna.org/microrna/getDownloads.do](http://www.microrna.org/microrna/getDownloads.do)). El procedimiento de búsqueda miRanda examina la complementariedad de secuencias, la conservación entre especies y la estabilidad termodinámica del dúplex miARN:ARNm [48]. Los parámetros de predicción fueron los siguientes: (1) Se permitió el emparejamiento de bases G:U pero se le asignó una puntuación inferior (puntuación +2) que a los pares de bases canónicas (puntuación +5), (2) las alineaciones con huecos y pares de bases no canónicas en la región "semilla" (2-8 nt en el extremo 5' de la molécula) se descartaron y (3) se seleccionaron alineamientos con puntuaciones superiores a 130 y una energía libre mínima (MFE) de la estructura inferior a -17 kcal/mol. La lista generada de genes diana humanos putativos se clasificó por medio de la puntuación de alineamiento más elevada y la MFE de la estructura más reducida. Para designar procesos potenciales que involucren las secuencias de ARNm predichas y para sugerir una probable influencia de miARN de repollo en el organismo humano, las dianas seleccionadas se mapearon sobre la base de datos UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) y se anotaron utilizando el programa informático Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) [49]. El conjunto de datos obtenido se analizó manualmente y, se seleccionó el gen diana humano más interesante, para la invención, para bol-miR172 de repollo, a saber, el ARNm que codifica la proteína FAN representada por la secuencia SEQ ID NO: 3.

#### 50 Ejemplo 3

#### Medición de la cantidad de proteína FAN utilizando un ensayo ELISA

55 Se aislaron células mononucleares (MNC) de sangre periférica de donantes sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad durante 12 min (2500 rpm, temperatura ambiente) utilizando Ficoll-Histopaque (1077 g/l). Las MNC aisladas se lavaron dos veces con una solución de NaCl al 0,9 % (1800 rpm, 10 min) y se cultivaron en medio Parker suplementado con L-glutamina (2 mM), 3- $\beta$ -mercaptoetanol, HEPES (0,23 %), suero de ternera fetal (FCS, 10 %) y gentamicina (0,1 mg/ml). Se añadió a los cultivos el volumen apropiado de miARN para producir concentraciones de 15 pM, 30 pM y 60 pM. Se utilizó LPS en una concentración de 1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich) para estimular las células. Después de la adición de LPS, las células se incubaron a 37 °C, en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 h. A continuación, se recogieron las células, se centrifugaron (1800 rpm, 10 min) y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células centrifugadas se volvieron a suspender en 200  $\mu$ l de PBS y se congelaron a -20 °C. Según el protocolo del fabricante del kit de ELISA (Cloud-Clone Corp.), las células se congelaron y se descongelaron tres veces antes del marcado de la proteína FAN. El nivel de proteína FAN se determinó en el sobrenadante recogido utilizando el lector de placas LEDETECT96 a una longitud de onda de 450 nm.

**Ejemplo 4****Ensayo de proliferación *in vitro* para determinar la función de linfocitos**

5 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC):

Se aislaron células mononucleares (MNC) de sangre periférica de donantes sanos mediante centrifugación por gradiente utilizando Gradisol (Ficoll) (1077 g/l). A continuación, se realizó un recuento de las mismas en una cámara Bürker utilizando solución de Türk. Las MNC aisladas se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo. Las líneas celulares se cultivaron en medio Parker suplementado con L-glutamina (2 mM), 3-β-mercaptoetanol, HEPES (0,23 %), suero de ternera fetal (FCS, 10 %) y gentamicina (0,1 mg/ml).

Ensayo de proliferación:

15 Los cultivos de linfocitos se sembraron en una placa de 96 pocillos a  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se estimularon por medio de mitógenos específicos: anticuerpos monoclonales anti-CD3 (OKT3, 1 µg/ml), fitohemaglutinina (PHA, 20 µg/ml, Sigma-Aldrich) y suspensión de la cepa de Cowan de *Staphylococcus aureus* (SAC, 0,004 %). Se añadió a cada pocillo el volumen apropiado de miARN para producir concentraciones de 15 pM, 30 pM y 60 pM. Los cultivos de control contenían el volumen equivalente de medio de cultivo solamente. Los cultivos preparados se incubaron a 20 37 °C, en atmósfera humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 h. Después de la adición de la [<sup>3</sup>H]timidina, la incubación se continuó durante 17 h en las condiciones mencionadas anteriormente. Los cultivos celulares con [<sup>3</sup>H]timidina incorporada en el ADN se transfirieron de la placa a papel de filtro mediante un recolector automático. Para el recuento de células se utilizó el contador de centelleo. Los resultados se comunican como recuentos por minuto (cpm).

25

**Ejemplo 5****Evaluación del fenotipo de PBMC bajo estimulación de mitógeno de PHA y abundancia de miARN**

30 La evaluación de la subpoblación de células CD25+ (una cadena del receptor de IL-2) en la población de MNC se realizó utilizando técnica de inmunofluorescencia y citometría de flujo. Se aislaron células mononucleares (MNC) de sangre periférica de donantes sanos mediante centrifugación por gradiente utilizando Gradisol L (1077 g/l). A continuación, las MNC aisladas (a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml) se incubaron durante 3 h, 6 h y 24 h con miARN a una concentración de 30 pM, después de la estimulación con PHA (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 µg/ml y 30 µg/ml. El fenotipo celular se marcó con los anticuerpos monoclonales apropiados CD25-FITC y CD3-PE (Becton-Dickinson) mediante una técnica de inmunofluorescencia bicolor. Las MNC se incubaron con los anticuerpos durante 15 min a temperatura ambiente, sin acceso a la luz. Las células marcadas se lavaron dos veces con PBS suplementado con el 0,1 % de FCS. A continuación, se resuspendieron en 500 µl de FACSCFlow y se detectaron mediante el citómetro de flujo F ACSCalibur (Becton-Dickinson). La adquisición, el almacenamiento y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa informático CellQuest (Becton-Dickinson). Los resultados se presentaron como fracción de células CD25+ en la población de células CD3+ (linfocitos T).

40

**RESULTADOS****45 Identificación se moléculas de miARN en hojas de repollo maduras**

Para identificar un conjunto más grande de moléculas de miARN en las hojas de *Brassica oleracea* var. *capitata* maduras se realizó la secuenciación de alto rendimiento de tres bibliotecas de ARNp independientes. Las lecturas brutas generadas se procesaron bioinformáticamente. Como resultado del análisis mencionado anteriormente, se descubrieron 261 miARN conservados (pertenecientes a 62 familias) (junto con sus cantidades estimadas) [46]. Entre las moléculas más abundantes, se encontraron la bol-miR172a (SEQ ID NO: 1) y la bol-miR172b (SEQ ID NO: 2), que son el objeto de la invención.

50

**Predicción de genes diana humanos potenciales para miARN de *Brassica oleracea* identificados**

55 En la siguiente etapa de realización de la invención, se llevó a cabo la predicción de genes diana humanos putativos para moléculas de miARN de repollo. Los resultados generados por el procedimiento miRanda se clasificaron sobre la base de la puntuación de alineamiento más elevada y la MFE más reducida de la estructura. Entre las dianas humanas predichas, la más interesante para la invención y asociada con los procesos inflamatorios fue la molécula de ARNm que codifica la proteína FAN (SEQ ID NO: 3). Las moléculas bol-miR172a (SEQ ID NO: 1) y bol-miR172b (SEQ ID NO: 2), que están presentes en grandes cantidades en hojas de repollo, se seleccionaron para que interactuaran con el ARNm que codifica la proteína FAN. La hibridación mencionada se produce, según el procedimiento utilizado, en la región CDS del ARNm diana. La complementariedad de secuencia del sitio de unión de miARN y ARNm se determinó al 89,4 %. La puntuación de alineamiento calculada fue de 177, mientras que la energía libre mínima de la estructura fue de -24,16 kcal/mol (figura 1).

65

**Influencia de la abundancia de miARN sobre el nivel de proteína FAN**

Una etapa importante en la implementación de la invención fue la determinación de la influencia de la molécula bol-miR172a o bol-miR172b sobre el nivel de proteína FAN. Realizado sobre PBMC humanas, el análisis *in vitro* utilizando el procedimiento ELISA mostró que la abundancia de bol-miR172a a una concentración de 15 pM, 30 pM, así como de 60 pM, reduce significativamente el nivel de la proteína FAN en la preparación analizada. La mayor disminución de la cantidad de proteína FAN se observó en presencia de bol-miR172a a una concentración de 30 pM (figura 2).

**Efecto de la abundancia de miARN y la estimulación por mitógenos sobre la proliferación de linfocitos T y B**

La evaluación *in vitro* de la función de los linfocitos T y B humanos asociada con su autoestimulación o la estimulación mediante mitógenos específicos, tales como PHA, SAC y OKT3, mostró que la abundancia de bol-miR172a a una concentración de 30 pM reduce significativamente la proliferación de linfocitos B y T en el caso de su autoestimulación o la presencia de un mitógeno específico (figuras 3a, b, c y d).

**Evaluación fenotípica de MNC por citometría de flujo**

El análisis por citometría de flujo de PBMC humanas incubadas durante 3 h, 6 h y 24 h con la molécula bol-miR172a (a una concentración de 30 pM) confirmó la fracción ligeramente alterada de células CD25+ en la población de linfocitos CD3+ con respecto al control.

Además, se observaron cambios secundarios similares en la fracción de células CD25+ en la población de linfocitos CD3+ con respecto al control en el caso de la presencia simultánea de la molécula bol-miR172a (a una concentración de 30 pM) y el mitógeno de PHA a una concentración de 30 µg/ml (figuras 4a, b y c).

**En resumen:**

El ensayo de proliferación de linfocitos *in vitro* realizado, que mide la capacidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a diversos estímulos, mostró que la presencia de la molécula bol-miR172a reduce la proliferación de linfocitos B, así como de linfocitos T, en el caso de su autoestimulación o la estimulación mediante SAC, OKT3 y mitógeno de PHA, respectivamente. Además, la evaluación fenotípica de PBMC utilizando el procedimiento de citometría de flujo reveló que la abundancia de la molécula bol-miR172a, con o sin la presencia simultánea del mitógeno de PHA, cambia ligeramente la fracción de las células CD25+ en la población de células T. Los resultados mencionados anteriormente mostraron que las moléculas bol-miR172a y bol-miR172b son capaces de modular la proliferación de linfocitos B y T sin afectar a la subpoblación de células T activadas (CD25+). El mecanismo responsable de las acciones presentadas de las moléculas bol-miR172a y bol-miR172b está relacionado con su interacción con el ARNm que codifica la proteína FAN. La influencia de la molécula bol-miR172a en el nivel de proteína FAN en PBMC se evaluó mediante ensayo ELISA *in vitro*. El análisis realizado reveló que la abundancia de bol-miR172a (en todas las concentraciones sometidas a ensayo) tiene como consecuencia una reducción significativa del nivel de proteína FAN.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**SEQ ID NO: 1**

**miR172a, molécula de ARN, 21 nt**

AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU

**SEQ ID NO: 2**

**miR172b, molécula de ARN, 21 nt**

AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU

**SEQ ID NO: 3**

**NM\_003580.3, factor asociado a la activación de la esfingomielinasa neutra (N-SMasa) (NSMAF) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm, 3582 pb**

ES 2 702 638 T3

GCCGGAGUCCCCACGCGAGGAUGCUGCGGUGAGCGCGGGGACGCCGCGUCGGGCUCUCG  
GCCGCCAGCGGGCGCCGACGGGGAAGCCAGGCCGGCAGCCGCGCUCGCCAGCCGGCCACCA  
AUCCCCGCCUCCCCGGCUCUCCGGACCUCUCGGCAGCGGGCGGGGCCUGCCUGUGCGC  
UCUGCGCCCCGCCGCGCUACCCUCCAUGGCGUUUAUCCGGAAGAAGCAGCAGGAGCAGCAGC  
UGCAGCUCUACUCCAAGGAGAGAUUUUCCUUGCUGCUCUUAACUUGGAGGAGUACUACUUU  
GAACAGCAUAGAGCCAAUCACAUUUUGCACAAGGGCAGUCACCAUGAAAGGAAAAUCAGAGG  
CUCUUAAAAAUUGUUCAAAAUCGGUGAUUUUUAACCAGAUUCAAUUCCAGCCCAUCA  
UCAAGAUUCCUUUGAGAGACUGUAUAAAAUAGGAAAGCAUGGAGAAAAUGGAGCCAAUAG  
ACACUUCACAAAGGCAAAAUCUGGGGGUAUUUCACUCAUUUUCAGUCAGGUUAUUUCAUUA  
AAGAACAUAUUGUUGUCACCAUAUAAAAUAGAAAGGGGCAAAAUGGAAUAUGUUUUUGA  
AUUGGAUGUUCGGGAAAGUGGAAGAUGUUGUGGAGACGUUGCUUCAGCUUCACAGAGCA  
UCCUGCCUUGACAAAUUGGGUGACCAAACCGCCAUGAUAAACAGCUAUUUUGCAGUCUCGUUU  
AGCUAGAACAUAUUUGACAAAAACAGGUUCCAAAACAUUUCUGAAAAGCUCGACAUUGAAU  
GCAAAGCAGAAUUGGUGACGCCUCUGGUGACUAAUCCUGGACACGUGUGCAUCACGGACACA  
AACCUGUUUUUCAGCCCCUCAACGGCUACCCGAAACCUUGGGUCCAGAUAAACAUCCAAGA  
UGUCCGCCGCAUCUACAAAAGGAGGCACGGCCUCAUGCCUCUGGGCUUGGAAGUAUUUGCA  
CAGAAGAUAUCUGUGUCCGACAUCUACCUAAAGUUCUAUGAACCUCAAGAUAGAGAUUGAU  
CUCUAAUUUUACAUUGCCACAUACCUAGAGCACC AUGUGGGCGGAGCACACUGCUGAGAGCUA  
CAUGCUGCAGUUGGACGUGGACACCUUUCCAACUAUCAGUACCUCCUUCACCUCAACAACC  
UGGCCGACCGCAGCUGCAACGACCUCUCCAGUACCCUGUGUUUCAUGGAUAAUACAUGAU  
UAUUCCAGCUCAGAACUAGAUUUUGUCAAAUCCAGGAACCUCCGGGAUCUCAGUAAGCCAGU  
AGGGGCCCUAAAUAAGGAACGGCUGGAGAGACUACUGACACGCUACCAGGAAUUGCCUGAAC  
CAAAGUUCAGUAUUGGGAGUCACUACUCUUCGGGUUAUGUACUUUUUAUCUUGUUAGG  
AUUGCACCAGAGUAUUGCUGUGCCUGCAGAAUGGAAGAUUUGAUAAUGCAGAUAGAAUGU  
UCAACAGUAUUGCAGAAACUUGGAAAAACUGUCUGGAUGGGUCAACGGAUUUUAAAAGAGUU  
AAUUCAGAAUUCUAUGGUGAUGAUGUGAGCUUUCUAGUCAAUAGCCUGAAGUUGGAUUUG  
GGAAAAGAGACAAGGAGGACAGAUUGGUUGACGACGUGGAGCUUCCCCUUGGGCUUCCAGUCC  
CGAGGACUUUCAGGAGCAAGAGCAUUGGAAAGCAUUAUGUGUCUGAACACCUUC  
ACGAGUGGAUUGAUCUAAUUAUUUGGCUACAAACAAAAAGGGAGUGAUGCAGUUGGGGCCA  
UAAUGUAUUUCAUCCCCGACCUAUGAAGGAGGUGUAGACUUGAACAGCAUCCAGGAUCCUG  
AUGAGAAGGUAGCCAUGCUUACGCAAAUCUUGGAAUUUGGGCAGACACCAAAACAACUAAU  
GUGACACCACAUCCUCGAAGAUACCCCAAAGUUUAAAAGUUUGUCCAGACCUCAGUUA  
UAAUGCUUCUAUGGCAGAUUCCCGAGGUAAGAGUCUUUUUAGAACCCUGACCGAAGAAAGCA  
  
AAACACUGGCCUGGAAUAACAUACCAAACUGCAGUUACACGAGCACUAUAAAAUCCACAAA  
GAAGCAGUUACUGGAAUCACGGUCUCUCGCAAUGGAUCUUCAGUAUUCACAACAUCCCAAGA  
UUCACCUUGAAGAUGUUUUCUAAAGAAUCAAAAUGCUACAAGAAGUAUAUCAUUUUUCA  
AAUAGGCUUUUACGUCUUGUUUACUUUACAGGAGAUCCACUGCUAUAACUUCUUAUG  
GGAAUAAUUGUCUAAUUUUUACUAGCAUUUGGAAGACGCCAGGACACGUUAAUGGGA  
CAUGAUGAUGCUGUUAAGAUUCUUGGCAUGACAACAGGCUAAUUCUGCAUCUGGG  
ACUCUACAGUGAAGGUGUGGUCUGGUGUCCUGCAGAGAUGCCAGGCACCAAAAGACACCAC  
UUUGACUUGCUGGCCGAGCUGGAACAUGAUGUCAGUGUAGAUACAUCAGUUAAAUGCUGC  
AAGCACACUGUUAGUUCCGGCACAAAAGGACACAGUGAAUAAUUGGGACCUCACAACGG  
CCACCUAAUUGCACCAGAUUCCAUGCCAUCAGGGAUUGUAUGUGACACUGCUUUUAGCCCA  
GAUAGUCGCCAUGUCCUCAGCACAGGAACAGAUUGGCUUCUAAUGUCAUUGAUGUGCAGAC  
AGGAAUGCUCUUCUCCUCAUGACAUCAGAUAGAGCCCGAGGGUGCUUUGUCUGGGAUUGAA  
AUUCCGUUUUAUCUGGCAGUCAGUCUGGUGAACUGCUCGUUUGGGACCUCUUGGAGCAAAA  
AUCAGUGAGAGAAUACAGGGCCACACAGGUGCUGUGACAUGUAUUGGAUGAAUGAACAGU  
GUAGCAGUAUCAUCACAGGAGGGGAAGACAGACAAAUAUUAUUCUGGAAAUUGCAGUAUUA  
AGUGCCUUUUCCUCUCCUGAAUAUUAUUUGAACUCUAUUUAAUGCAUUUUUAAACCAAAACU  
UUUAAACGGACUGGUGAAUGUGCAAUGUUAGUAAUUAAGAUUUUACCACAUGGAAAAUUU  
GUGGUUUUAAACUUUCUAAAUCAUGGUGACUUCUUAUGAAAGCCAUUAGUUGCUAUUCUCU  
AGGGCAGAUAAAUGCGGCUGUGUUAGGAAAAACUGUUACACUGUAAGGCAGAUAGUCGU  
CCCCGUAUGAUGAUUGUCAGAAAGACAGGACUAAGUAGCAGAGAAUAGCUAAGAGAUAAA  
GGGCUUGGGAAACUUGUCAGAAAACUGAACAAUUAAGAAUUUCCAAGAAAAUUGGCA  
GUUUUCUGCUACUUCUGAAUCUGUUUUGUCUCCUAAUCUAUCACAAUUGCCACCCAUCG  
GGUUUUUGGGUGUGUUUUAUAGCGUGGUACUUCUUAUAAUGCUGUACCCAGAUUCUAA  
GAACCUGGAGAAGGAUAGCAGUUCUUAAGUAAUUUACUGUGUAUAGGAACGGUUUGUAUU  
UCAUUACAGCUAUUCAUUUUUCACAUUAAAAUAAUUUUUCUCUAAAGAAAAA  
AAA

**REFERENCIAS:**

- 5 1. Liu N, Okamura K, Tyler DM, Phillips MD, Chung WJ, Lai EC: **The evolution and functional diversification of animal microRNA genes.** *Cell research* 2008, **18**(10):985-996.
2. Jones-Rhoades MW: **Conservation and divergence in plant microRNAs.** *Plant molecular biology* 2012, **80**(1):3-16.
- 10 3. Niwa R, Slack FJ: **The evolution of animal microRNA function.** *Current opinion in genetics & development* 2007, **17**(2):145-150.
4. Djuranovic S, Nahvi A, Green R: **miARN-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay.** *Science* 2012, **336**(6078):237-240.
- 15 5. Hu W, Collier J: **What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function.** *Cell research* 2012, **22**(9):1322-1324.
- 20 6. Ying SY, Chang DC, Lin SL: **The microRNA (miARN): overview of the RNA genes that modulate gene function.** *Molecular biotechnology* 2008, **38**(3):257-268.
7. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X: **HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide.** *Nucleic acids research* 2006, **34**(2):667-675.
- 25 8. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
9. Chen X: **MicroRNA biogenesis and function in plants.** *FEBS letters* 2005, **579**(26):5923-5931.
- 30 10. Kim VN, Han J, Siomi MC: **Biogenesis of small RNAs in animals.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(2):126-139.
11. Khraiweh B, Arif MA, Seumel GI, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W: **Transcriptional control of gene expression by microRNAs.** *Cell* 2010, **140**(1):111-122.
- 35 12. Kawamata T, Tomari Y: **Making RISC** *Trends in biochemical sciences* 2010, **35**(7):368-376.
13. Sontheimer EJ: **Assembly and function of RNA silencing complexes.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2005, **6**(2):127-138.
- 40 14. Zhang B, Wang Q, Pan X: **MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants.** *Journal of cellular physiology* 2007, **210**(2):279-289.
15. Wienholds E, Plasterk RH: **MicroRNA function in animal development.** *FEBS letters* 2005, **579**(26):5911-5922.
- 45 16. Esteller M: **Non-coding RNAs in human disease.** *Nature reviews Genetics* 2011, **12**(12):861-874.
17. De Guire V, Robitaille R, Tetreault N, Guerin R, Menard C, Bambace N, Sapieha P: **Circulating miARNs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges.** *Clinical biochemistry* 2013, **46**(10-11):846-860.
- 50 18. Broderick JA, Zamore PD: **MicroRNA therapeutics.** *Gene therapy* 2011, **18**(12):1104-1110.
19. Mack GS: **MicroRNA gets down to business.** *Nature biotechnology* 2007, **25**(6):631-638.
- 55 20. Xiao C, Rajewsky K: **MicroRNA control in the immune system: basic principles.** *Cell* 2009, **136**(1):26-36.
21. Hukowska-Szematowicz B, Tokarz-Deptula B, Deptula W: **MicroRNA (miARN) and the immune system.** *Centr Eur J Immunol* 2012, **37**(4):387-390.
- 60 22. Liu G, Abraham E: **MicroRNAs in immune response and macrophage polarization.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013, **33**(2):170-177.
23. Filkova M, Jungel A, Gay RE, Gay S: **MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy.** *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2012, **26**(3):131-141.
- 65 24. Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saldenberg-Kermanac'h N, Falgarone G: **Rheumatoid arthritis: from**

**autoimmunity to synovitis and joint destruction.** *Journal of autoimmunity* 2012, **39**(3):222-228.

25. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A: **Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality?** *Clinical and experimental immunology* 2013, **171**(1):8-19.

26. Fournier C: **Where do T cells stand in rheumatoid arthritis?** *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme* 2005, **72**(6):527-532.

27. Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV: **Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease.** *Immunological reviews* 2011, **244**(1):115-133.

28. Stinissen P, Raus J, Zhang J: **Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies.** *Critical reviews in immunology* 1997, **17**(1):33-75.

29. Krueger JG, Bowcock A: **Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis.** *Annals of the rheumatic diseases* 2005, **64 Suppl. 2**:ii30-36.

30. Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skafien MD, Fuster V, McNamara CA: **Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis.** *Circulation research* 2012, **110**(6):889-900.

31. Youinou P, Jamin C, Saraux A: **B-cell: a logical target for treatment of rheumatoid arthritis.** *Clinical and experimental rheumatology* 2007, **25**(2):318-328.

32. Huseyin TE Ozer, Ozbalkan Z: **Clinical Efficacy of TNF- $\alpha$  Inhibitors: An Update.** *International Journal of Clinical Rheumatology* 2010, **5**(1):101-115.

33. Croft M, Benedict CA, Ware CF: **Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies.** *Nature reviews Drug discovery* 2013, **12**(2):147-168.

34. Montfort A, Martin PG, Levade T, Benoist H, Segui B: **FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation), a moonlighting protein in TNF-R1 signaling.** *Journal of leukocyte biology* 2010, **88**(5):897-903.

35. Palin K, Bluthe RM, McCusker RH, Levade T, Moos F, Dantzer R, Kelley KW: **The type 1 TNF receptor and its associated adapter protein, FAN, are required for TNF $\alpha$ -induced sickness behavior.** *Psychopharmacology* 2009, **201**(4):549-556.

36. Montfort A, de Badts B, Douin-Echinard V, Martin PG, Iacovoni J, Nevoit C, Therville N, Garcia V, Bertrand MA, Bessieres MH *et al.*: **FAN stimulates TNF( $\alpha$ )-induced gene expression, leukocyte recruitment, and humoral response.** *J Immunol* 2009, **183**(8):5369-5378.

37. Challem J: **The Inflammation Syndrome: The Complete Nutritional Program to Prevent and Reverse Heart Disease, Arthritis, Diabetes, Allergies, and Asthma:** John Wiley & Sons; 2003.

38. Pizzorno JEJ, Murray MT, Joiner-Bey H: **The Clinician's Handbook of Natural Medicine:** Elsevier Health Sciences; 2008.

39. Torkos S: **The Canadian Encyclopedia of Natural Medicine:** John Wiley & Son; 2012.

40. Carper J: **Apteka zywnosci. Nowe i niezwykle odkrycia leczniczego dzialania zywnosci:** Vesper; 2008.

41. Gornicka J: **Apteka natury: poradnik zdrowia: ziololecznictwo, akupresura, masaz shiatsu:** AWM; 1997.

42. Munns A: **Cabbage leaves: cabbage leaves can help inflammation of any body part.** *BMJ* 2003, **327**(7412):451.

43. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X *et al.*: **Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA.** *Cell Res* 2012, **22**(1):107-126.

44. Wang K, Li H, Yuan Y, Etheridge A, Zhou Y, Huang D, Wilmes P, Galas D: **The complex exogenous RNA spectra in human plasma: an interface with human gut biota?** *PLoS One* 2012, **7**(12):e51009.

45. Szarzynska B, Sobkowiak L, Pant BD, Balazadeh S, Scheible WR, Mueller-Roeber B, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z: **Gene structures and processing of Arabidopsis thaliana HYL1-dependent pri-miRNAs.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(9):3083-3093.

- 5 46. Lukasik A, Pietrykowska H, Paczek L, Szweykowska-Kulinska Z, Zielenkiewicz P: **High-throughput sequencing identification of novel and conserved miARNs in the Brassica oleracea leaves.** *BMC genomics* 2013, 14:801.
- 10 47. Pruitt KD, Harrow J, Harte RA, Wallin C, Diekhans M, Maglott DR, Searle S, Farrell CM, Loveland JE, Ruff BJ *et al.*: **The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes.** *Genome research* 2009, 19(7):1316-1323.
- 15 48. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS: **MicroRNA targets in Drosophila.** *Genome biology* 2003, 5(1):R1.
49. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M: **Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.** *Bioinformatics* 2005, 21(18):3674-3676.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético, seleccionada entre miR172a o miR172b, en la que miR172a está representada por la secuencia SEQ ID NO: 1 y miR172b por la secuencia SEQ ID NO: 2, y en la que dicha molécula tiene al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la región "semilla" representada por la secuencia GAAUCUU y tiene al menos un 75 % de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, para su uso en la reducción de la respuesta inflamatoria o para prevenir un aumento en la respuesta inflamatoria del organismo.
- 10 2. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1 para reducir la proliferación de linfocitos T y B.
- 15 3. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1 para reducir el nivel de proteína FAN (factor asociado con la activación de la esfingomielinasa neutra).
- 20 4. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético interactúa con el ARNm que codifica la proteína FAN regulando negativamente su expresión y, por lo tanto, reduciendo la proliferación de los linfocitos T y B.
- 25 5. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético interactúa con el ARNm que codifica la proteína FAN regulando negativamente su expresión y, por lo tanto, reduciendo el nivel de la proteína FAN.
- 30 6. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 5, en la que la expresión de la proteína FAN está regulada negativamente y el nivel de proteína FAN se reduce.
- 35 7. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la molécula tiene una longitud de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos.
- 40 8. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la molécula tiene metilación 2' o 3'-O de la ribosa del último nucleótido en el extremo 3'.
9. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la respuesta inflamatoria del organismo disminuye al reducir la proliferación de linfocitos T y B.
10. La molécula de miARN derivada de plantas o su equivalente sintético para su uso según la reivindicación 1, en la que la respuesta inflamatoria del organismo disminuye al reducir el nivel de proteína FAN.

ES 2 702 638 T3

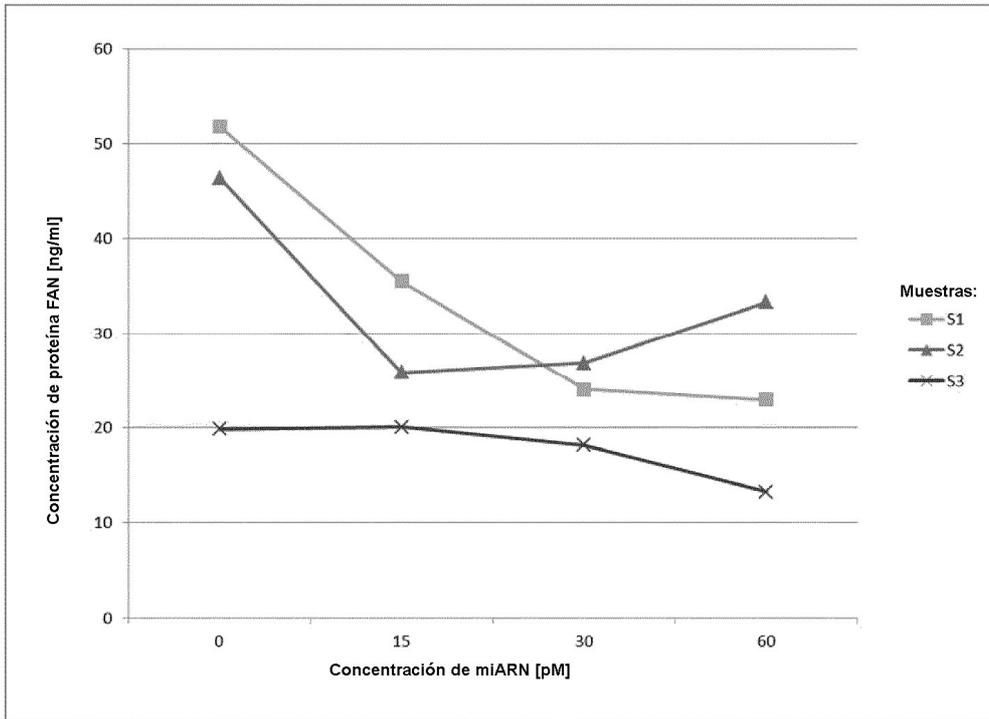
```
Read Sequence:bol-miR172a (21 nt)
Read Sequence:gi|221554488|ref|NM_003580.3| Homo sapiens neutral
sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor (NSMAF),
transcript variant 1, mRNA(3582 nt)
=====20=====
Performing Scan: bol-miR172a vs gi|221554488|ref|NM_003580.3|
=====

Forward:Score: 177.000000 Q:2 to 19 R:425 to 447 Align Len (19)
(89.47%) (89.47%)

Query:    3' UACGUC--GUAGUAGUUCUAAGA 5'
          ||| |||35
Ref:      5' UCCCAGCCCAUCAUCAAGAUUCC 3'

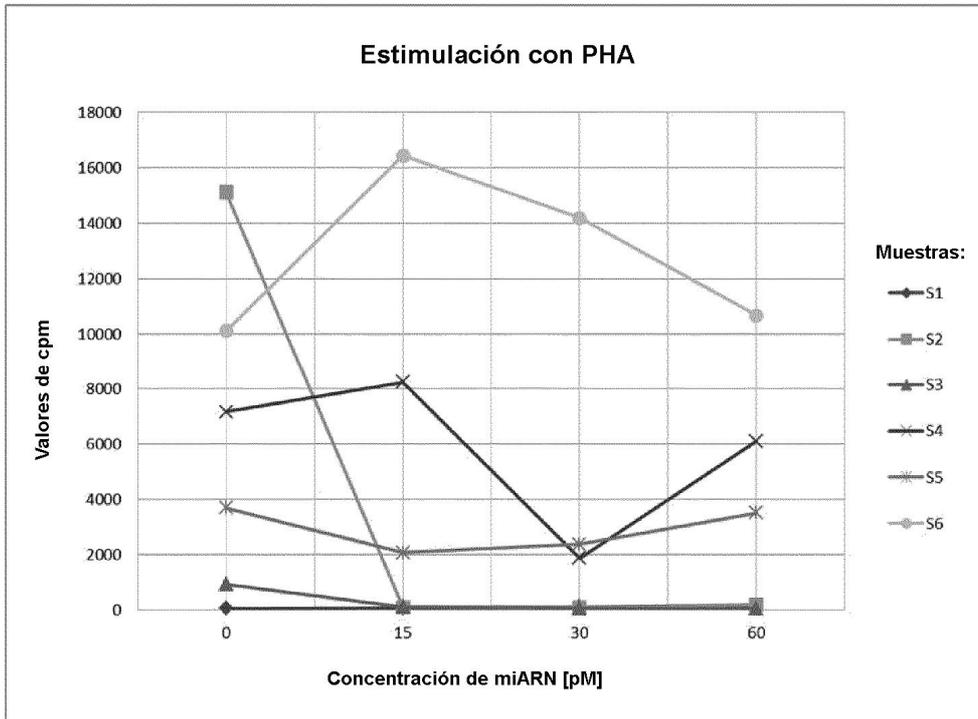
Energy:   -24.160000 kCal/Mol
```

**Fig. 1**



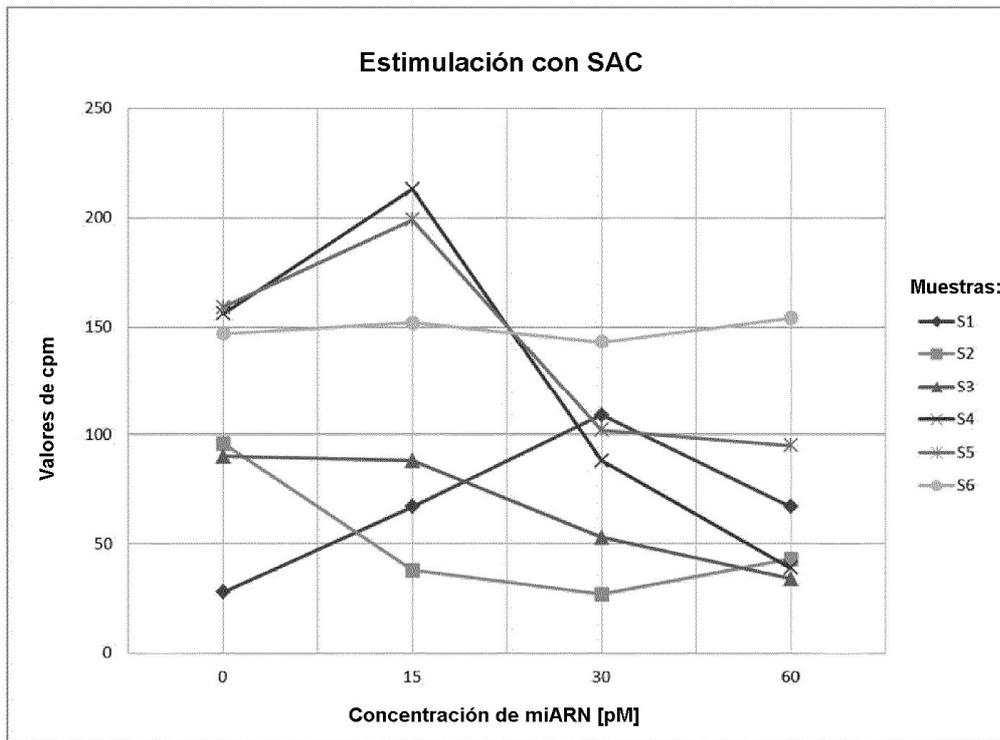
		Concentración de miARN [pM]				
		Muestra	0	15	30	60
Concentración de proteína FAN [ng/ml]	S1		51,8	35,5	24,0	22,9
	S2		46,4	25,8	26,8	33,3
	S3		19,8	20,0	18,1	13,2

Fig. 2



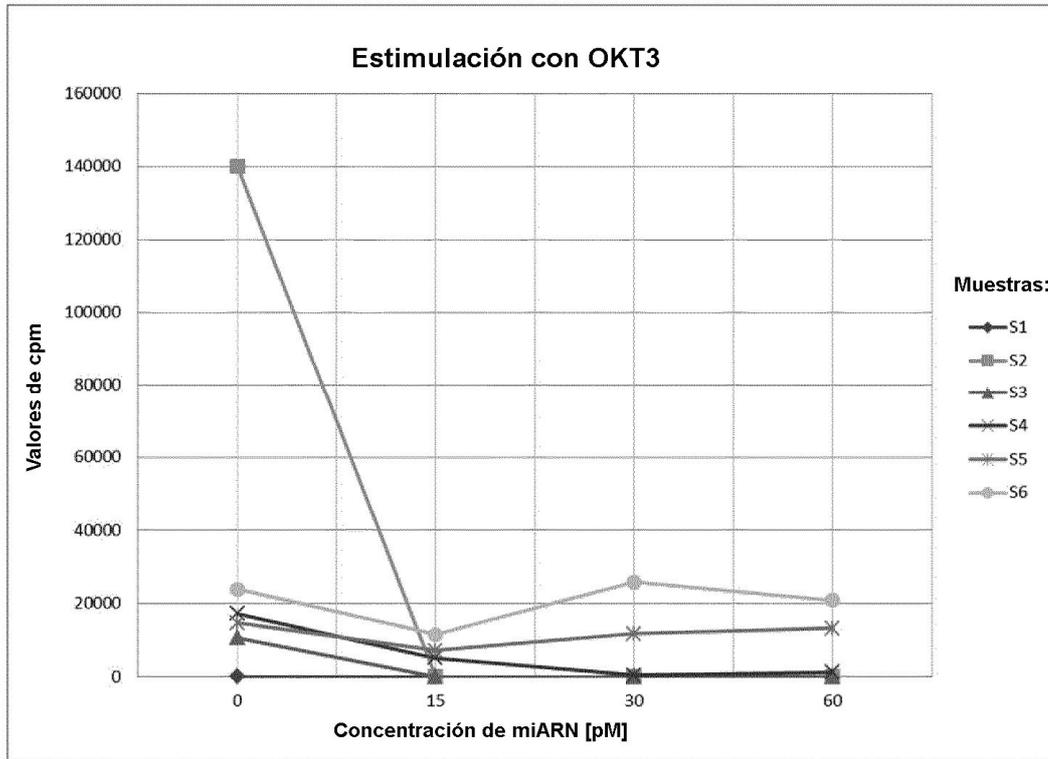
		Concentración de miARN [pM]				
		Muestra	0	15	30	60
Valores de cpm	S1		48	57	112	90
	S2		15129	88	91	177
	S3		928	107	59	44
	S4		7162	8238	1873	6105
	S5		3681	2069	2362	3510
	S6		10123	16445	14195	10682

Fig. 3a



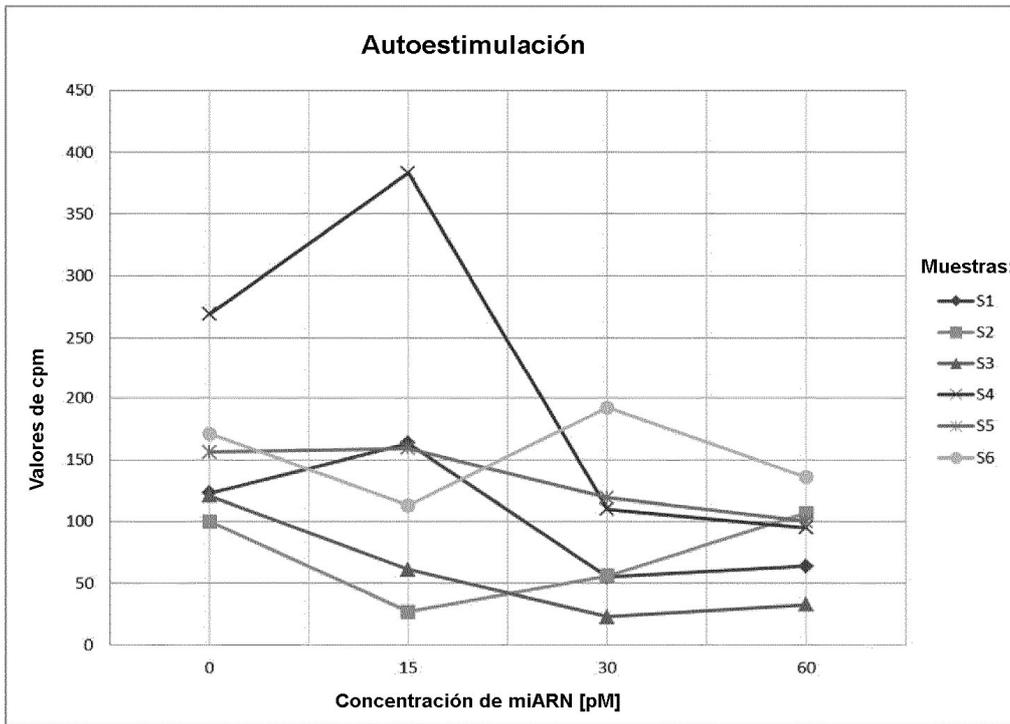
		Concentración de miARN [pM]				
		Muestra	0	15	30	60
Valores de cpm	S1		28	67	109	67
	S2		96	38	27	43
	S3		90	88	53	34
	S4		156	213	88	39
	S5		159	199	102	95
	S6		147	152	143	154

Fig. 3b



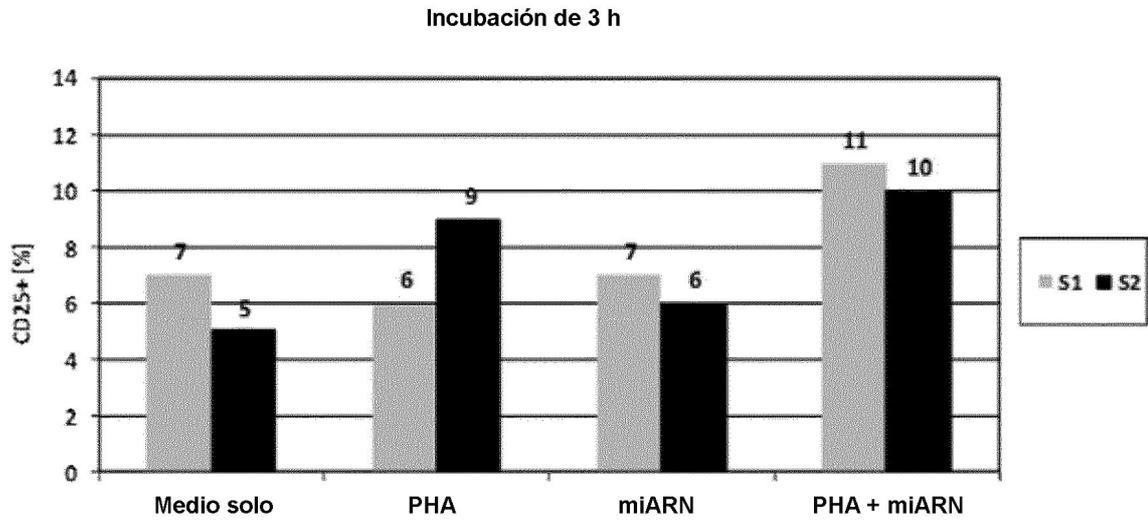
		Concentración de miARN [pM]				
		Muestra	0	15	30	60
Valores de cpm	S1		54	69	45	59
	S2		140125	46	38	70
	S3		10753	76	53	51
	S4		17287	5094	396	1253
	S5		14774	7257	11863	13258
	S6		23983	11622	25916	20921

Fig. 3c



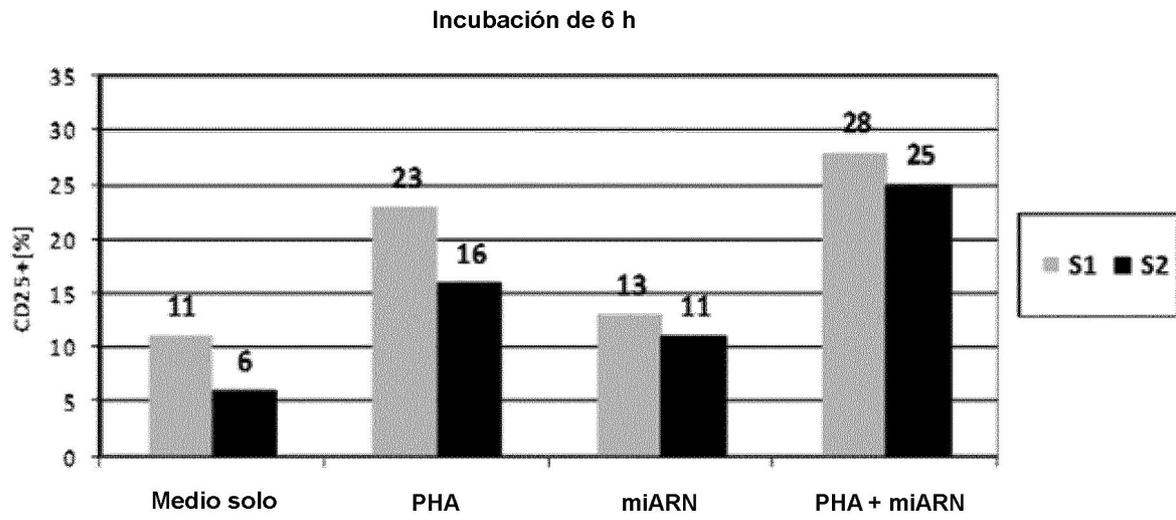
		Concentración de miARN [pM]			
		Muestra	0	15	30
Valores de cpm	S1	123	163	55	64
	S2	100	27	56	107
	S3	121	61	23	33
	S4	269	383	110	95
	S5	156	159	119	100
	S6	171	113	192	136

Fig. 3d



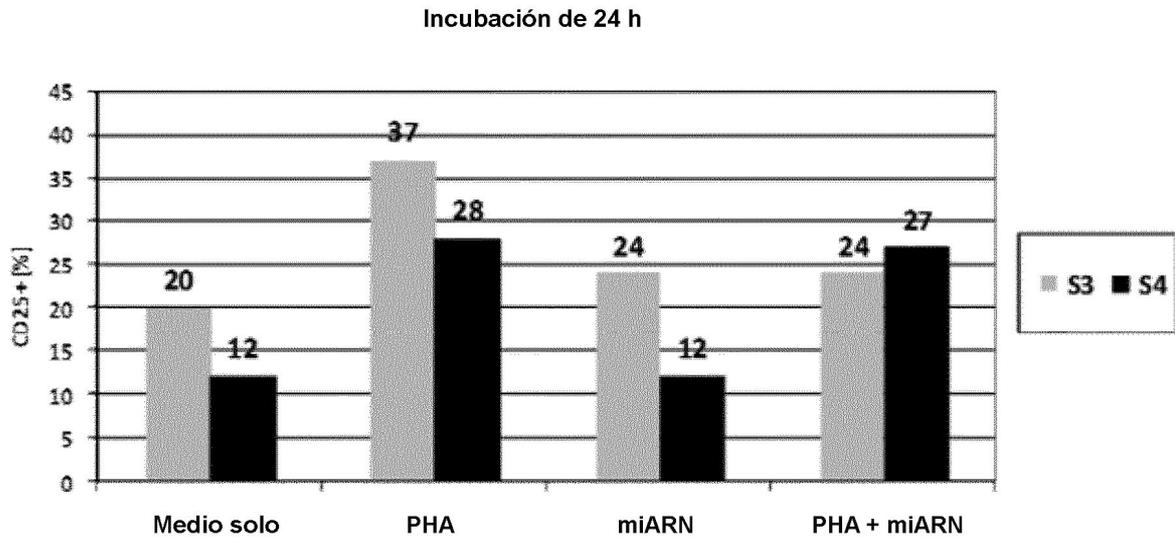
		Medio de cultivo				
		Muestra	Medio solo	PHA	miARN	PHA + miARN
Fracción de CD25+ [%]	S1		7	6	7	11
	S2		5	9	6	10

Fig. 4a



		Medio de cultivo				
		Muestra	Medio solo	PHA	miARN	PHA + miARN
Fracción de CD25+ [%]	S1		11	23	13	28
	S2		6	16	11	25

Fig. 4b



		Medio de cultivo				
		Muestra	Medio solo	PHA	miARN	PHA + miARN
Fracción de CD25+ [%]	S1		20	37	24	24
	S2		12	28	12	27

**Fig. 4c**