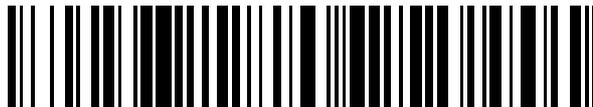


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 624**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2013 PCT/US2013/055184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14028762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2013 E 13829411 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2885008**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar la enfermedad arterial periférica**

30 Prioridad:

15.08.2012 US 201261683281 P

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

10.04.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION
(100.0%)**

**250 West Main Street, Suite 300
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**ANNEX, BRIAN, H.;
FARBER, CHARLES, R. y
HAZARIKA, SUROVI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 624 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

Composiciones y métodos para tratar la enfermedad arterial periférica

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud tiene derecho de prioridad conforme al 35 U.S.C. § 119(e) a la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº 61/683.281, presentada el 15 de agosto de 2012.

Declaración respecto a investigación o desarrollo patrocinado federalmente

Esta invención se hizo con apoyo gubernamental con el nº de subvención HL101200, otorgada por los Institutos Nacionales de la Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes

10 La enfermedad arterial periférica (EAP) afecta aproximadamente a 8-12 millones de adultos en los Estados Unidos, y a pesar de su impacto significativo sobre la morbilidad y la mortalidad, no se dispone de una terapia médica definitiva para mejorar la perfusión en la extremidad inferior isquémica. En respuesta a la isquemia tisular, una cascada compleja de eventos conduce al brote de vasos sanguíneos nuevos a partir de capilares existentes cerca del tejido isquémico para formar vasos sanguíneos nuevos. Este proceso de angiogénesis es un mecanismo adaptativo para
15 estimular el suministro de sangre en el tejido isquémico. La angiogénesis terapéutica, la estimulación del crecimiento de vasos sanguíneos nuevos en posición distal respecto de la localización de la oclusión, es una estrategia terapéutica de investigación para crear una derivación médica en la extremidad isquémica y para ayudar a mejorar la perfusión en el tejido isquémico. Se ha estudiado exhaustivamente una multitud de factores de crecimiento angiogénicos tanto en modelos preclínicos de EAP como en pacientes clínicos con EAP. A pesar del éxito inicial en
20 los ámbitos preclínicos, la mayoría de factores de crecimiento tienen resultados clínicos finales inciertos. Es necesaria una mejor comprensión de la regulación de la expresión génica tras la isquemia tisular.

En la última década, los micro-ARNs han surgido como reguladores endógenos fuertes de la expresión génica, especialmente importantes en estados de enfermedad/lesión. Los micro-ARNs (miRs) son ARNs no codificantes de
25 16-25 nucleótidos que son reguladores endógenos de la expresión génica, especialmente en estados de enfermedad/lesión. Los micro-ARNs funcionan en general dirigiendo la degradación del mRNA o mediante represión traduccional directa, y pueden regular un único gen o rutas completas (1, 2). Ciertos micro-ARNs desempeñan papeles cruciales en la vasculogénesis del desarrollo (3) y en la angiogénesis tumoral (4-7). Sin embargo, la información sobre el papel de los micro-ARNs en la angiogénesis inducida por isquemia, tal como en la isquemia miocárdica y EAP, es limitada. Bonauer et al. demostró que los antagomirs administrados de manera sistémica hacia
30 miR-92a mejoraron la recuperación de la perfusión en un modelo de ratón de EAP (8). La selección de miR-92a se basó en el papel conocido del agrupamiento miR-17~92 en la angiogénesis, y su elevado nivel de expresión en las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (8). Grundman et al. demostró que la inhibición de miR-100 incrementó la recuperación de la perfusión en el mismo modelo de isquemia de extremidades posteriores (HLI) (9). La selección de miR-100 se basó en su inhibición en las extremidades posteriores isquémicas en una única cepa de
35 ratones (C57B1/6J) (9). Finalmente, Yin et al. seleccionó miR-15a basándose en su papel conocido en la regulación de Bcl-2 y su inducción en células endoteliales cerebrales privadas de oxígeno-glucosa, y la inactivación de miR-15a mejoró la angiogénesis en HLI (10).

40 XIANGYU ZHOU, "Role of microRNAs in peripheral artery disease (Review)", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, GR, (20120705), doi:10.3892/mmr.2012.978, ISSN 1791-2997, XP055244886 [A] discute el papel de los microARNs en la cardiopatía periférica.

El documento US2012165392 se refiere a la identificación de miARNs que están implicados en la insuficiencia cardiaca y en el proceso de remodelación tras infarto de miocardio en el tejido cardiaco. Se describe la modulación de estos miARNs identificados como tratamiento para el infarto de miocardio, la remodelación cardiaca, y la insuficiencia cardiaca.

45 Existe la necesidad en la técnica, percibida durante mucho tiempo, de composiciones y métodos útiles para incrementar la supervivencia de las células endoteliales y los miocitos, para inducir la angiogénesis, para tratar la isquemia, y para tratar enfermedades, afecciones, y trastornos tales como EAP.

Sumario de la invención

50 Los experimentos y la descripción proporcionados en la presente memoria se basan en una estrategia sin distorsión, y se basan en diferentes resultados fenotípicos tras HLI inducida quirúrgicamente en cepas endogámicas de ratón. En un modelo preclínico establecido de EAP, se ha demostrado que los ratones C57B1/6J se recuperan notablemente bien, mientras los ratones BALB/cJ muestran una escasa recuperación de la perfusión tras HLI (11, 12). Esta respuesta dependiente de la cepa se ha atribuido al grado de vasos colaterales preformados, la expresión de VEGF-A, y los genes localizados en locus de rasgos cuantitativos entre las dos cepas (11-13).

5 La presente descripción utilizó ratones C57BL/6J y BALB/cJ para examinar la expresión de micro-ARN en músculos de extremidades posteriores isquémicas en un momento en el que las dos cepas tuvieron una recuperación similar para identificar los micro-ARNs que se regulan de manera diferencial. Se usaron técnicas computacionales para identificar, y PCR cuantitativa en tiempo real para confirmar, que el micro-ARN-93 fue el micro-ARN más coherente regulado de manera diferencial basándose en la cepa e isquemia. Se examinó el papel de miR-93 *in vitro* e *in vivo*, y en la presente memoria se describe que miR-93 es un modulador potente de la proliferación celular, limita la muerte celular, y modula la recuperación de la perfusión tras HLI modulando la expresión de múltiples genes de la ruta del ciclo celular.

10 En la presente memoria se describe además que la estimulación de miR-93 es beneficiosa para la recuperación de la perfusión en la isquemia de las extremidades inferiores. La presente solicitud describe composiciones y métodos para regular la expresión y los niveles de miR-93.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, y dicha composición farmacéutica comprende:

15 un agonista de la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93, en el que dicho agonista de miR-93 se selecciona del grupo de ácidos nucleicos aislados que consiste en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro; y un vehículo farmacéuticamente aceptable como se reivindica más adelante en la presente memoria.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector de expresión para el uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, y dicho vector de expresión comprende una secuencia que codifica un agonista de miR-93 seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro como se reivindica más adelante en la presente memoria.

Se exponen otras realizaciones preferidas de la invención en las reivindicaciones dependientes.

En la presente memoria también se describen métodos asociados para ayudar a comprender la invención, pero no forman parte de la invención reivindicada.

25 Los ejemplos o realizaciones descritas en la presente memoria que no se hallan bajo la definición de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

30 Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que se puede variar la cantidad de miARN administrada, el momento de la administración, etc., basándose en variables tales como la lesión, enfermedad, trastorno, o afección que se está tratando, y la edad, sexo, y salud del sujeto que se está tratando. Los métodos de la presente descripción son útiles para mejorar, incrementar, estimular, aumentar, e incluso prevenir múltiples respuestas biológicas, y proporcionar resultados clínicos mejorados. En un aspecto, el agonista incrementa la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93 en una célula o tejido objetivo. En un aspecto, el ácido nucleico aislado se une de manera operable a un promotor específico de una célula.

35 En una realización, las composiciones de la invención son útiles para provocar una expresión disminuida de al menos un gen de la ruta del ciclo celular. En un aspecto, los genes de la ruta del ciclo celular se seleccionan del grupo que consiste en p21, E2F-1, y p53.

Los datos y la invención en la que se basa la presente solicitud, y que fueron la materia de la sol. de pat. provisional de EE.UU. nº 61/683.281, dieron como resultado la publicación de Hazarika et al., 2013, *Circulation*, 127:1818-1828.

Algunas secuencias de la invención

40 SEQ ID N°:1

CTGGGGGCTCCAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAGTGTGATTACCCAAC

CTACTGCTGAGCTAGCACTTCCCGAGCCCCCGG

secuencia de ADN de premiR-93 precursor de 80 residuos de longitud completa (nº de acceso del NCBI NR_029510.1)

SEQ ID N°:2 AAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG

45 una secuencia de ADN de miR-93 maduro de 22 residuos (fragmento de SEQ ID N°:1; nº de acceso de GenBank AF48053.1)

SEQ ID N°:3 CUACCUGCACGAACAGCACUUUG

Antagomir-93

SEQ ID N°:4 AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU

Secuencia inespecífica (Bonauer et al.⁸)

SEQ ID N°:5

CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAGUGUGAUUACCCA
 ACCUACUGCUGAGCUAGCACUCCCCGAGCCCCCGG

5 equivalente de miARN de 80 nucleótidos de SEQ ID N°:1

SEQ ID N°:6 AAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG

equivalente de miARN de 22 residuos de nucleótidos de SEQ ID N°:2

SEQ ID N°:7 CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG

10 "PremiR-93" equivalente de miARN de 23 residuos de nucleótidos de un fragmento de SEQ ID N°:1 (un C en 5' extra en comparación con SEQ ID N°:6; véanse también los números de acceso MIMAT0000093)

SEQ ID N°:8 ACUGCUGAGCUAGCACUCCCCG

equivalente de miARN de 22 residuos de nucleótidos de un fragmento de SEQ ID N°:1 (véanse los n°s de acceso MIMAT0004509 y MIMAT0004636, y el n° de acc. de miRBase MI0000095)

SEQ ID N°:9 SEQ ID N°:1 transcrita

CUGGGGGCUCCAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAGUGUGAUUACCCA

15 ACCUACUGCUGAGCUAGCACUCCCCGAGCCCCCGG

SEQ ID N°:10 SEQ ID N°:2 transcrita

AAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG

La invención se describe adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1. El micro-ARN-93 se expresa de manera diferencial en los ratones C57B1/6J y BALB/cJ. Los ratones C57BL/6J (B6) tienen niveles mayores de miR-93 en comparación con BALB/cJ(BC). (a) La expresión relativa de miR-93 en músculo gastrocnemio (GA) no isquémico de ratones C57BL/6J es mayor en comparación con la de los ratones BALB/cJ. (b) La expresión relativa de miR-106b en el músculo GA no isquémico de ratones C57B1/6J y BALB/cJ no fue significativamente diferente. (c) Tras la inducción de isquemia de las extremidades posteriores, el músculo GA isquémico de los ratones C57BL/6J mostró una estimulación de miR-93 a $5,6 \pm 1,4$ veces en el día 3 y $3,3 \pm 0,5$ veces en el día 7 en comparación con el músculo GA no isquémico. Los ratones BALB/cJ no mostraron estimulación de miR-93 ($1,4 \pm 0,5$ veces en el día 3, $1,1 \pm 0,3$ veces en el día 7 tras la isquemia de las extremidades posteriores). Los datos representan la media \pm EEM; n=5/grupo); No isq=músculo GA no isquémico.

30 Figura 2. Efecto de la modulación de miR-93 en la apoptosis y proliferación celular (a) En células endoteliales (HUVEC) y células de músculo esquelético (C2C12), miR-93 se estimula tras la exposición a 6 horas de hipoxia y privación de suero (6 h HSS). Los datos son representativos de tres experimentos diferentes, n=3-5 pocillos/grupo. Las barras representan la media \pm EEM. (b) En HUVECs y células C2C12, la inactivación de miR-93 dio como resultado la estimulación del gen apoptótico caspasa-9 incluso en ausencia de lesión externa. (c) En HUVECs, la sobreexpresión de miR-93 (PremiR-93) atenúa, y la inactivación de miR-93 (AntimiR-93) incrementa la apoptosis inducida por hipoxia y privación de suero (HSS, exposición de 48 horas) en comparación con los controles tratados con secuencia inespecífica. (d) De forma similar, en las células C2C12, la sobreexpresión de miR-93 (PremiR-93) atenúa, mientras la inactivación de miR-93 (AntimiR-93) incrementa la apoptosis inducida por HSS (exposición de 3 horas). (e) La sobreexpresión de miR-93 incrementó la proliferación celular en HUVEC y células C2C12 48 horas tras la transfección. Los datos son la media \pm EEM, n=6-8 pocillos/grupo, datos representativos de tres experimentos diferentes. (f) Cuarenta y ocho horas tras la transfección con molécula mimética de miR inespecífica o PremiR-93, las HUVECs se colocaron en placas de matrigel con factor de crecimiento reducido, y se incubaron durante 6 horas en medio basal con o sin un 5% de suplemento de cultivo bajo en suero (LSGS). Las HUVECs tratadas con premiR-93 mostraron una formación de túbulos incrementada, que se cuantificó como el número de túbulos completos por área (representado mediante un gráfico de barras). (g) De forma similar, cuarenta y ocho horas tras la transfección con secuencias de siARN AntimiR-93 o secuencia inespecífica, las HUVECs se colocaron en placas de Matrigel enriquecido en factores de crecimiento y se incubaron durante 6 horas en medio basal con o sin una mezcla de

factores de crecimiento (GF) de células endoteliales. La formación de túbulos se cuantificó como el número de túbulos completos por área. Tal como se representa mediante el gráfico de barras, la formación de túbulos se redujo en las HUVECs tratadas con antimir-93. Los datos son la media \pm EEM, n=4 pocillos/grupo, datos representativos de dos experimentos diferentes.

5 Figura 3. La modulación de miR-93 regula la recuperación de la perfusión en los ratones C57BL/6J (B6) y BALB/cJ (BC). (a) Una única dosis intravenosa de antagomir-93 (8 mg/kg p.c.) administrada antes de la isquemia de las extremidades posteriores (HLI) inactivó de manera eficaz miR-93 en el músculo GA isquémico en comparación con los ratones tratados con una secuencia inespecífica. Este efecto ya se observó en el día 1, y fue persistente hasta al menos el día 7 tras HLI. Los datos son la media \pm EEM, n=3/grupo en los días 1 y 7, n=6 en el día 3; *p<0,01 en todos los puntos temporales. (b) Los ratones C57B1/6J recibieron tres dosis intravenosas de antagomir-93 o secuencia inespecífica (8 mg/kg de p.c. antes de HLI, y se repitió en el día 7 y 14 tras HLI). La recuperación de la perfusión en la extremidad posterior se monitorizó mediante el uso de formación de imágenes por Doppler. Los ratones tratados con antagomir-93 mostraron una recuperación de la perfusión significativamente alterada en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica en el día 14 y el día 21 tras HLI (n=8-12/grupo, los datos representan la media \pm EEM). (c) Las inyecciones intramusculares locales de premiR-93 o control negativo de molécula mimética de miR (100 nM en 25 μ l en dos sitios en GA y 100 nM en 25 μ l en un sitio en TA) se realizaron antes de la inducción de HLI. Tras la HLI, el tejido isquémico de los ratones tratados con premiR-93 mostró una estimulación significativa de miR-93 en el día 4, y este efecto fue persistente hasta el día 10 tras HLI. (n=3/grupo/punto temporal; los datos son la media \pm EEM). (d) Los ratones BALB/cJ recibieron una única inyección intramuscular de premiR-93 antes de la inducción de HLI, y tras la HLI se monitorizó la recuperación de la perfusión mediante el uso de formación de imágenes por Doppler. Los ratones tratados con premiR-93 mostraron una recuperación de la perfusión significativamente mejorada en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica en el día 14 y el día 21 tras HLI (n=9-12/grupo, los datos representan la media \pm EEM). (e) En el día 21 tras HLI, el músculo gastrocnemio isquémico de los ratones tratados con premiR-93 mostró una densidad capilar significativamente mayor en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica (capilares medios/fibra muscular, secuencia inespecífica frente a PremiR: 1,2 \pm 0,1 frente a 1,8 \pm 0,1, p=0,004, los datos representan la media \pm EEM. IGA=músculo gastrocnemio isquémico 21 días tras HLI).

Figura 4. Cambios en genes en músculos isquémicos con modulación de miR-93 in vivo en ratones C57BL/6J y BALB/cJ. (a) En el músculo gastrocnemio (GA) de ratones C57BL/6J en el día 3 tras HLI, la inactivación de miR-93 dio como resultado niveles de mRNA incrementados de p21 y p53 en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica, mientras los niveles de E2F-1 no fueron diferentes a nivel de mRNA. (b) En el músculo GA de ratones C57BL/6J en el día 3 tras HLI, la inactivación de miR-93 dio como resultado niveles de proteínas incrementados de p21, E2F-1 y P53 en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica tal como se analiza mediante transferencia de Western. (n=6/grupo; los datos representan la media \pm EEM). En el día 3 tras la isquemia de extremidades posteriores, el GA isquémico de ratones BALB/cJ con sobreexpresión de miR-93 mostró una inhibición de p21, E2F-1 y p53 a nivel tanto del mRNA (c) como de proteínas (d) en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica (n=6/grupo; los datos representan la media \pm EEM; cuantificación de la transferencia de Western realizada mediante el uso de densitometría, niveles de expresión normalizados respecto de actina). (e) Mapa térmico de los genes de la ruta del ciclo celular en músculo gastrocnemio isquémico (IGA) frente a no isquémico (NGA) de ratones BALB/cJ sin tratar en el día 3 tras la isquemia de las extremidades posteriores. P21, E2F-1, y p53, los tres genes inhibidos por la sobreexpresión de miR-93 en ratones BALB/cJ, estuvieron estimulados en los músculos isquémicos de ratones BALB/cJ sin tratar. Los otros genes resaltados son objetivos conocidos y/o predichos de miR-93 basándose en la bibliografía y predicciones informáticas, pero no se descubrió que cambiasen con la modulación de miR-93 en los presentes experimentos.

45 Figura Suplementaria 1. Para validar los resultados de la micromatriz de micro-ARN, se escogió miR-26b como control negativo (un micro-ARN que no se regulaba de manera diferencial por cepa basándose en los datos de la matriz), y se midió su expresión mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real. De forma coherente con los datos de la matriz, la expresión relativa de miR-26b fue similar entre los ratones C57B1/6 y BALB/C (n=5/grupo, los datos representan la media \pm EEM; p=NS).

50 Figura Suplementaria 2. Inactivación in vitro y sobreexpresión de miR-93 en HUVECs y células C2C12. Se transfectaron HUVECs con 15 nM de AntimiR-93 o control negativo inhibidor de miARN (secuencia inespecífica) para la inactivación de miR-93, y premiR-93 o control negativo de molécula mimética de miR (secuencia inespecífica) para la sobreexpresión de miR-93. Se transfectaron células C2C12 con las mismas secuencias a una dosis de 120 nM. Se midieron los niveles de micro-ARN-93 48 horas tras la transfección. AntimiR-93 inactivó la expresión de miR-93 en un 80 \pm 2% en HUVECs (a) y en un 60 \pm 1% en las células C2C12 (b) en comparación con los controles tratados con secuencia inespecífica. PremiR-93 dio como resultado una sobreexpresión de miR-93 >100 veces en HUVECs (c) y células C2C12 (d). Los datos representan la media \pm EEM). Datos representativos de tres experimentos.

60 Figura Suplementaria 3. La expresión de VEGF-A se cuantificó mediante el uso de RT-PCR en tiempo real en HUVECs con inactivación o sobreexpresión de miR-93. La expresión relativa de VEGF-A no fue diferente con la

inactivación o sobreexpresión de miR-93 en comparación con las HUVECs respectivas tratadas con la secuencia inespecífica. Los datos representan la media \pm EEM, p=ns; datos representativos de tres experimentos diferentes mediante el uso de muestras de HUVEC mezcladas.

5 Figura Suplementaria 4. Para investigar la especificidad del antagomiR-93 sistémico, se comprobó la expresión de otros dos micro-ARNs con similitud de secuencias y secuencia original idéntica hacia miR-93, concretamente miR-17 (a) y miR-106b (b). La inducción de miR-17 y miR-106b tras la isquemia de las extremidades posteriores fue similar entre los ratones tratados con la secuencia inespecífica y AntagomiR-93 a las 24 horas tras la isquemia de las extremidades posteriores, lo que indica que antagomiR-93 inactivaba de manera específica miR-93. IGA=GA isquémico, NGA=GA no isquémico N=3/grupo. Los datos representan la media \pm EEM).

10 **Descripción Detallada**

Abreviaturas y Siglas

p.c.- peso corporal

C2C12- una línea celular inmortalizada de músculo de ratón

FDR- tasa de falsos descubrimientos

15 GA- músculo gastrocnemio

GF- factor de crecimiento

GSEA- análisis de enriquecimiento en grupos de genes

HLI- isquemia de extremidades posteriores

HSS- hipoxia y privación de suero

20 HUVEC- célula endotelial de vena umbilical humana

IGA- músculo gastrocnemio isquémico

LNA- ácido nucleico bloqueado

LSGS- suplemento de cultivo bajo en suero

miR- micro-ARN (también denominado miARN)

25 miARN- micro-ARN (también denominado miR)

NGA- músculo gastrocnemio no isquémico

EAP- enfermedad arterial periférica

PremiR- un miARN precursor

RISC- complejo de silenciamiento inducido por ARN

30 EEM- error estándar de la media

TA- tibial anterior

VEGF- factor de crecimiento endotelial vascular

Definiciones

35 Al describir y reivindicar la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas más adelante.

Los artículos "un(a)" y "uno" se usan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

40 La expresión "alrededor de", tal como se usa en la presente memoria, significa aproximadamente, en la región de, más o menos, o en torno a. Cuando la expresión "alrededor de" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo prolongando los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, la

- 5 expresión "alrededor de" se usa en la presente memoria para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado mediante una varianza del 10%. En un aspecto, la expresión "alrededor de" significa más o menos un 20% del valor numérico del número con el que se usa. Por lo tanto, alrededor de un 50% significa en el intervalo de un 45%-55%. Los intervalos numéricos enumerados en la presente memoria mediante los extremos incluyen todos los números y fracciones incluidos en ese intervalo (p.ej. 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4, y 5). También se debe entender que se supone que todos los números y fracciones de los mismos se modifican mediante la expresión "alrededor de".
- 10 Las expresiones "compuesto terapéuticamente activo adicional" o "agente terapéutico adicional", tal como se usan en el contexto de la presente descripción, se refieren al uso o la administración de un compuesto para un uso terapéutico adicional para una lesión, enfermedad, o trastorno particular que se está tratando. Tal compuesto, por ejemplo, podría incluir uno que se está usando para tratar una enfermedad o trastorno no relacionado, o una enfermedad o trastorno que puede no ser sensible al tratamiento primario para la lesión, enfermedad o trastorno que se está tratando.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia que genera una respuesta inmunitaria incrementada al usarla en combinación con un antígeno específico.
- Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "administración de" y/o "administrar" un compuesto se debería entender que significan proporcionar un compuesto de la invención o un profármaco de un compuesto de la descripción a un sujeto que necesita tratamiento.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "aerosol" se refiere a una suspensión en aire. En particular, un aerosol se refiere a la particulación o atomización de una formulación de la descripción y su suspensión en el aire.
- 25 Tal como se usa en la presente memoria, un "agonista" es una composición de materia que, cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano, incrementa o prolonga una actividad biológica atribuible al nivel o presencia de un compuesto objetivo o molécula de interés en el mamífero. Por ejemplo, un agonista de la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93 puede incluir cualquier compuesto que genere el efecto deseado sobre el miR-93 endógeno, así como la transfección o adición de pre-miR-93 exógeno o un miR-93 maduro.
- La expresión "alteraciones de la estructura peptídica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cambios que incluyen, pero sin limitación, los cambios en la secuencia, y la modificación postraduccional.
- Tal como se usa en la presente memoria, "aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno" significa reducir la gravedad del síntoma o la frecuencia con la que un paciente experimenta tal síntoma, o ambos.
- 30 Tal como se usa en la presente memoria, los aminoácidos se representan mediante el nombre completo de los mismos, mediante el código de tres letras correspondiente a ellos, o mediante el código de una letra correspondiente a ellos, tal como se indica en la siguiente tabla:

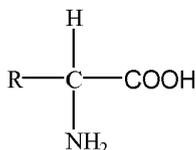
| Nombre Completo | Código de Tres Letras | Código de Una Letra |
|-----------------|-----------------------|---------------------|
| Ácido Aspártico | Asp | D |
| Ácido Glutámico | Glu | E |
| Lisina | Lys | K |
| Arginina | Arg | R |
| Histidina | His | H |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Cisteína | Cys | C |
| Asparagina | Asn | N |
| Glutamina | Gln | Q |
| Serina | Ser | S |
| Treonina | Thr | T |
| Glicocola | Gly | G |
| Alanina | Ala | A |
| Valina | Val | V |
| Leucina | Leu | L |

| | | |
|--------------|-----|---|
| Isoleucina | Ile | I |
| Metionina | Met | M |
| Prolina | Pro | P |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Triptófano | Trp | W |

El término "aminoácido" se usa de manera intercambiable con "residuo de aminoácido", y se puede referir a un aminoácido libre y a un residuo de aminoácido de un péptido. Será evidente a partir del contexto en el que se usa el término si se refiere a un aminoácido libre o a un residuo de un péptido.

- 5 La expresión "aminoácido", tal como se usa en la presente memoria, pretende incluir los aminoácidos naturales y sintéticos, y los aminoácidos D y L. "Aminoácido estándar" significa cualquiera de los veinte L-aminoácidos estándar hallados habitualmente en los péptidos naturales. "Residuo de aminoácido no estándar" significa cualquier aminoácido distinto de los aminoácidos estándar, independientemente de si se prepara de manera sintética o si se obtiene de una fuente natural. Tal como se usa en la presente memoria, "aminoácido sintético" también abarca los
- 10 aminoácidos modificados químicamente, que incluyen, pero sin limitación, las sales, los derivados de aminoácidos (tales como amidas), y las sustituciones. Los aminoácidos contenidos en los péptidos de la presente descripción, y especialmente en el extremo carboxilo o amino, se pueden modificar mediante metilación, amidación, acetilación o sustitución con otros grupos químicos que pueden cambiar la semivida en la circulación del péptido sin afectar adversamente a su actividad. Además, puede existir o no existir una unión disulfuro en los péptidos de la presente
- 15 descripción.

Los aminoácidos tienen la siguiente estructura general:



- Los aminoácidos se pueden clasificar en siete grupos basándose en la cadena lateral R: (1) cadenas laterales alifáticas, (2) cadenas laterales que contienen un grupo hidroxílico (OH), (3) cadenas laterales que contienen átomos de azufre, (4) cadenas laterales que contienen un grupo ácido o amida, (5) cadenas laterales que contienen un
- 20 grupo básico, (6) cadenas laterales que contienen un anillo aromático, y (7) prolina, un imino ácido en el que la cadena lateral está unida al grupo amino.

- La nomenclatura usada para describir los compuestos peptídicos de la presente descripción sigue la práctica convencional, en la que el grupo amino se presenta a la izquierda y el grupo carboxilo a la derecha de cada residuo de aminoácido. En las fórmulas que representan realizaciones específicas seleccionadas de la presente descripción, los grupos amino- y carboxi-terminales, aunque no se muestran de manera específica, se entenderá que están en la forma que asumirían a los valores de pH fisiológico, a menos que se especifique de otra manera.
- 25

- El término aminoácido "básico" o "cargado positivamente", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a los aminoácidos en los que los grupos R tienen una carga positiva neta a pH 7,0, e incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos estándar lisina, arginina, e histidina.
- 30

Tal como se usa en la presente memoria, un "análogo" de un compuesto químico es un compuesto que, a modo de ejemplo, se parece a otro en su estructura, pero no es necesariamente un isómero (p.ej., 5-fluorouracilo es un análogo de timina).

- El término "antagomir" se refiere a una molécula de ARN o ADN pequeña (o quimérica) para antagonizar los reguladores de ARN pequeños endógenos, como el microARN (miARN). Estos antagonistas albergan secuencias de nucleótidos complementarias en su mayor parte, lo que significa que los antagomirs deberían hibridar al microARN (miARN) maduro. Impiden que otras moléculas se unan en una localización deseada de una molécula de mARN, y se usan para silenciar el microARN (miR) endógeno. Los antagomirs se diseñan, por lo tanto, para bloquear la actividad biológica de estos interruptores moleculares postranscripcionales. Al igual que los ligandos objetivo preferidos (microARN, miARN), los antagomirs tienen que cruzar las membranas para entrar en una célula. Los antagomirs también se conocen como anti-miRs o blockmirs.
- 35
- 40

Un "antagonista" es una composición de materia que cuando se administra a un mamífero, tal como un ser humano, inhibe una actividad biológica atribuible al nivel o la presencia de un compuesto o molécula de interés en el mamífero.

- El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse de manera específica a un epítipo específico de un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, y pueden ser las porciones inmunorreactivas de las inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos son en general tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la presente descripción pueden existir en una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena simple y anticuerpos humanizados.
- Una "cadena pesada de anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo.
- Una "cadena ligera de anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al menor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo.
- La expresión "anticuerpo sintético", tal como se usa en la presente memoria, significa un anticuerpo que se genera mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en la presente memoria. También se debería considerar que la expresión significa un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo, y cuya molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en la que la secuencia de ADN o de aminoácidos se ha obtenido mediante el uso de tecnología de secuencias sintéticas de ADN o de aminoácidos que está disponible y se conoce bien en la técnica.
- El término "antígeno", tal como se usa en la presente memoria, se define como una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Esta respuesta inmunitaria puede implicar la producción de anticuerpos, o la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambos. Se puede obtener un antígeno a partir de organismos, subunidades de proteínas/antígenos, células completas destruidas o inactivadas o lisados.
- La expresión "determinante antigénico", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la porción de un antígeno que entra en contacto con un anticuerpo particular (es decir, un epítipo). Cuando se usa una proteína o fragmento de una proteína, o resto químico, para inmunizar a un animal hospedador, numerosas regiones del antígeno pueden inducir la producción de anticuerpos que se unen de manera específica a una región o estructura tridimensional concreta de la proteína; estas regiones o estructuras se denominan determinantes antigénicos. Un determinante antigénico puede competir con el antígeno intacto (es decir, el "inmunógeno" usado para generar la respuesta inmunitaria) por la unión a un anticuerpo.
- La expresión "agentes antimicrobianos", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier composición o compuesto natural, sintético, o semisintético o mezcla de los mismos, que es seguro para el uso humano o animal tal como se pone en práctica en los métodos de la presente descripción, y es eficaz para destruir o inhibir sustancialmente el crecimiento de microbios. "Antimicrobiano", tal como se usa en la presente memoria, incluye agentes antibacterianos, antifúngicos, y antivirales.
- Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "oligonucleótido inverso" o ácido nucleico inverso significa un polímero de ácido nucleico, al menos una porción del cual es complementaria a un ácido nucleico que está presente en una célula normal o en una célula afectada. "Inverso" se refiere especialmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante. Como se define en la presente memoria, una secuencia inversa es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína. No es necesario que la secuencia inversa sea complementaria únicamente a la porción codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia inversa puede ser complementaria a las secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica una proteína, cuyas secuencias reguladoras controlan la expresión de las secuencias codificantes. Los oligonucleótidos inversos de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos de fosforotioato y otras modificaciones de oligonucleótidos.
- Un "aptámero" es un compuesto que se selecciona in vitro para unirse preferentemente a otro compuesto (por ejemplo, las proteínas identificadas en la presente memoria). A menudo, los aptámeros son ácidos nucleicos o péptidos, ya que se pueden generar fácilmente secuencias aleatorias a partir de nucleótidos o aminoácidos (producidas de manera natural o sintética) en un gran número, pero por supuesto no es necesario limitarse a estos.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "unir", o "unión", o "unido", o "que une", usado en la presente memoria de manera intercambiable, se refiere a cualquier relación física entre moléculas que da como resultado la formación de un complejo estable, tal como una relación física entre un ligando, tal como un péptido o una molécula pequeña, con una "molécula de unión" o "molécula receptora". La relación puede estar mediada por interacciones fisicoquímicas que incluyen, pero sin limitación, una asociación no covalente selectiva, atracción iónica, enlace de hidrógeno, enlace covalente, fuerzas de Van der Waals o atracción hidrófoba.
- Tal como se usa en la presente memoria, el término "avidéz" se refiere a la fuerza de unión total de un ligando con

una molécula receptora, de forma que la fuerza de una interacción comprende múltiples interacciones de unión independientes entre las moléculas, que se puede obtener a partir de las múltiples interacciones de afinidad baja o un pequeño número de interacciones de afinidad alta.

5 El término "unión" se refiere a la adherencia de moléculas entre sí, tal como, pero sin limitación, enzimas a sustratos, ligandos a receptores, anticuerpos a antígenos, dominios de unión al ADN de proteínas al ADN, y cadenas de ADN o ARN a las cadenas complementarias.

"Molécula de unión", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula capaz de unirse a otra molécula.

10 El término "biocompatible", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un material que no genera una respuesta perjudicial sustancial en el hospedador.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "fragmentos biológicamente activos" o "fragmento bioactivo" de los polipéptidos abarca porciones naturales o sintéticas de la proteína de longitud completa que son capaces de unirse de manera específica a su ligando natural, o de llevar a cabo la función de la proteína.

15 La expresión "muestra biológica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las muestras obtenidas de un sujeto, que incluyen, pero sin limitación, piel, pelo, tejido, sangre, plasma, células, sudor y orina.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "tejido de biopsia" se refiere a una muestra de tejido que se extrae de un sujeto con el fin de determinar si la muestra contiene tejido canceroso. En alguna realización se obtiene tejido de biopsia, ya que se sospecha que un sujeto tiene cáncer. En el tejido de biopsia se examina después la presencia o ausencia de cáncer.

20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula portadora" se refiere a cualquier molécula que se conjuga químicamente a una molécula de interés.

25 Las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular", tal como se usan en la presente memoria, se pueden usar de manera intercambiable. Todas estas expresiones también incluyen a su progenie, que son todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que la progenie puede no ser idéntica, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "químicamente conjugado", o "conjugado químicamente", se refiere a unir el antígeno a la molécula portadora. Esta unión se puede dar a nivel genético mediante el uso de la tecnología recombinante, en la que se puede producir una proteína híbrida que contiene las secuencias de aminoácidos, o porciones de las mismas, del antígeno y de la molécula portadora. Esta proteína híbrida se produce mediante una secuencia oligonucleotídica que codifica el antígeno y la molécula portadora, o porciones de las mismas. Esta unión también incluye los enlaces covalentes creados entre el antígeno y la proteína portadora mediante el uso de otras reacciones químicas, tales como, pero sin limitación, reacciones con glutaraldehído. Los enlaces covalentes también se pueden crear mediante el uso de una tercera molécula que actúa como puente entre el antígeno y la molécula portadora. Estos entrecruzadores son capaces de reaccionar con grupos, tales como, pero
35 sin limitación, aminas primarias, sulfhidrilos, carbonilos, carbohidratos, o ácidos carboxílicos, del antígeno y de la molécula portadora. La conjugación química también incluye la unión no covalente entre el antígeno y la molécula portadora.

40 Una "región codificante" de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente, a la región codificante de una molécula de mRNA que se produce mediante la transcripción del gen.

La expresión "secuencia competitiva" se refiere a un péptido o una modificación, fragmento, derivado, u homólogo del mismo que compite con otro péptido por su sitio de unión afín.

45 "Complementario", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al concepto amplio de complementariedad de secuencias de subunidades entre dos ácidos nucleicos, p.ej., dos moléculas de ADN. Cuando una posición de nucleótidos de las dos moléculas está ocupada por nucleótidos normalmente capaces de formar pares de bases entre sí, los ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esta posición. Así, dos ácidos nucleicos son complementarios entre sí cuando un número sustancial (al menos un 50%) de posiciones correspondientes en cada una de las moléculas están ocupadas por nucleótidos que normalmente forman pares de bases entre sí (p.ej., pares de nucleótidos A:T y G:C). Así, se sabe que un residuo de adenina de una primera región de ácido nucleico es capaz
50 de formar enlaces de hidrógeno específicos ("formación de pares de bases") con un residuo de una segunda región de ácido nucleico que es antiparalela a la primera región si el residuo es timina o uracilo. De forma similar, se sabe que un residuo de citosina de una primera cadena de ácido nucleico es capaz de formar un par de bases con un residuo de una segunda cadena de ácido nucleico que es antiparalela a la primera cadena si el residuo es guanina. Una primera región de un ácido nucleico es complementaria a una segunda región del mismo o de un ácido nucleico

5 diferente si, cuando las dos regiones se disponen de forma antiparalela, al menos un residuo de nucleótido de la primera región es capaz de formar un par de bases con un residuo de la segunda región. Preferiblemente, la primera región comprende una primera porción y la segunda región comprende una segunda porción, por lo cual, cuando la primera y segunda porciones se disponen de una manera antiparalela, al menos alrededor del 50%, y preferiblemente al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 90%, o al menos alrededor del 95% de los residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de formar pares de bases con los residuos de nucleótidos de la segunda porción. Más preferiblemente, todos los residuos de nucleótidos de la primera porción son capaces de formar pares de bases con los residuos de nucleótidos de la segunda porción.

10 Un "compuesto", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de sustancia o agente que habitualmente se considera un fármaco, o un candidato para el uso como fármaco, así como las combinaciones y mezclas de los anteriores. Un "compuesto de la invención" se refiere a un miR o agonista de miR como se describe en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustitución conservativa de aminoácido" se define en la presente memoria como un intercambio de aminoácidos en uno de los siguientes cinco grupos:

15 I. Residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares pequeños:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Residuos polares, cargados positivamente:

20 His, Arg, Lys;

IV. Residuos alifáticos, apolares grandes:

Met Leu, Ile, Val, Cys

V. Residuos aromáticos, grandes:

Phe, Tyr, Trp

25 Una célula de "control" es una célula que es del mismo tipo celular que una célula de ensayo. La célula de control se puede examinar, por ejemplo, exactamente o prácticamente al mismo tiempo que se examina la célula de ensayo. La célula de control también se puede examinar, por ejemplo, en un momento distante del momento en el que se examina la célula de ensayo, y los resultados del examen de la célula de control se pueden registrar de forma que los resultados registrados se puedan comparar con los resultados obtenidos mediante el examen de una célula de ensayo.

30 Una célula de "ensayo" es una célula que se examina.

"Citocina", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de señalización intercelular, de las cuales las mejor conocidas están implicadas en la regulación de las células somáticas mamíferas. Se han caracterizado varias familias de citocinas, con efecto de estimulación del crecimiento e inhibición del crecimiento, que incluyen, por ejemplo, interleucinas, interferones, y factores de crecimiento transformantes. Los expertos en la técnica conocen otras diversas citocinas. Se han descrito las fuentes, características, objetivos y actividades efectoras de estas citocinas.

40 Tal como se usa en la presente memoria, un "derivado" de un compuesto se refiere a un compuesto químico que se puede producir a partir de otro compuesto de estructura similar en una o más etapas, como en la sustitución de H por un grupo alquilo, acilo, o amino.

El uso de la palabra "detectar" y sus variantes gramaticales se refiere a la medida de la especie sin cuantificación, mientras el uso de la palabra "determinar" o "medir", con sus variantes gramaticales, pretende referirse a la medida de la especie con cuantificación. Los términos "detectar" e "identificar" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

45 Tal como se usa en la presente memoria, un "marcador detectable" o una "molécula indicadora" es un átomo o una molécula que permite la detección específica de un compuesto que comprende el marcador en presencia de compuestos similares sin un marcador. Los marcadores detectables o moléculas indicadoras incluyen, p.ej., isótopos radiactivos, determinantes antigénicos, enzimas, ácidos nucleicos disponibles para hibridación, cromóforos, fluoróforos, moléculas quimioluminiscentes, moléculas detectables electroquímicamente, y moléculas que posibilitan una polarización de fluorescencia alterada o una dispersión de luz alterada.

50

Una "enfermedad" es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si no se mejora la enfermedad, la salud del animal continúa deteriorándose.

5 En contraste, un "trastorno" en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no provoca necesariamente una disminución adicional del estado de salud del animal.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "dominio" se refiere a una parte de una molécula o estructura que comparte características fisicoquímicas comunes, tales como, pero sin limitación, dominios hidrófobos, polares, globulares y helicoidales, o propiedades tales como unión a ligandos, transducción de señales, penetración en células y similares. Los ejemplos específicos de dominios de unión incluyen, pero sin limitación, dominios de unión al ADN y dominios de unión al ATP.

Tal como se usa en la presente memoria, "célula ductal", en referencia a un páncreas, se refiere a cualquier célula que se forma o tiene la capacidad de formarse u originarse a partir del epitelio de los conductos y salir del páncreas.

15 Tal como se usa en la presente memoria, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para producir un efecto seleccionado, tal como aliviar los síntomas de una enfermedad o trastorno. En el contexto de la administración de compuestos en forma de una combinación, tal como múltiples compuestos, la cantidad de cada compuesto, cuando se administra en combinación con otro(s) compuesto(s), puede ser diferente que cuando ese compuesto se administra solo. Así, una cantidad eficaz de una combinación de compuestos se refiere colectivamente a la combinación en conjunto, aunque las cantidades reales de cada compuesto pueden variar. La expresión "más eficaz" significa que el efecto seleccionado se alivia en un mayor grado mediante un tratamiento respecto del segundo tratamiento con el que se compara.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "dominio efector" se refiere a un dominio capaz de interactuar directamente con una molécula efectora, producto químico, o estructura en el citoplasma, que es capaz de regular una ruta bioquímica.

25 El término "elixir", tal como se usa en la presente memoria, se refiere en general a un líquido claro, endulzado, que contiene alcohol, normalmente hidroalcohólico, que contiene sustancias aromatizantes y a veces agentes medicinales activos.

30 "Codificar" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos de un polinucleótido, tal como un gen, un cADN, o un mRNA, de servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, rARN, tARN y mRNA) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ella. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del mRNA que corresponde a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de mRNA y se proporciona normalmente en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o cADN, se pueden denominar como codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o cADN.

Un "potenciador" es un elemento regulador de ADN que puede incrementar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia o de la orientación del potenciador respecto del sitio de inicio de la transcripción.

40 El término "epítipo", tal como se usa en la presente memoria, se define como grupos químicos pequeños de la molécula de antígeno que pueden generar y reaccionar con un anticuerpo. Un antígeno puede tener uno o más epítipos. La mayoría de antígenos tienen muchos epítipos; es decir, son multivalentes. En general, un epítipo tiene un tamaño de aproximadamente cinco aminoácidos o carbohidratos. Un experto en la técnica entiende que en general la estructura tridimensional global, en vez de la secuencia lineal específica de la molécula, es el criterio principal de la especificidad antigénica.

45 Tal como se usa en la presente memoria, una preparación "básicamente pura" de una proteína o péptido particular es una preparación en la que al menos alrededor del 95%, y preferiblemente al menos alrededor del 99%, en peso, de la proteína o péptido de la preparación es la proteína o péptido particular.

50 Un "fragmento" o "segmento" es una porción de una secuencia de aminoácidos, que comprende al menos un aminoácido, o una porción de una secuencia de ácido nucleico que comprende al menos un nucleótido. Los términos "fragmento" y "segmento" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "fragmento", como se aplica a una proteína o péptido, puede tener en general una longitud de al menos alrededor de 3-15 aminoácidos, al menos alrededor de 15-25 aminoácidos, una longitud de al menos alrededor de 25-50 aminoácidos, una longitud de al menos alrededor de 50-75 aminoácidos, una longitud de al menos alrededor de 75-100 aminoácidos, y una longitud de más de 100

aminoácidos.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "fragmento", como se aplica a un ácido nucleico, puede tener en general una longitud de al menos alrededor de 20 nucleótidos, en general, al menos alrededor de 50 nucleótidos, más en general, de alrededor de 50 a alrededor de 100 nucleótidos, preferiblemente, al menos alrededor de 100 a
10 alrededor de 200 nucleótidos, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 200 nucleótidos a alrededor de 300 nucleótidos, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 300 a alrededor de 350, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 350 nucleótidos a alrededor de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 500 a alrededor de 600, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 600 nucleótidos a alrededor de 620 nucleótidos, incluso más preferiblemente, al menos alrededor de 620 a alrededor de 650, y lo más preferiblemente, el fragmento de ácido nucleico tendrá una longitud de más de alrededor de 650 nucleótidos. Por supuesto, estos fragmentos se deben considerar en el contexto del tipo de ácido nucleico que se está usando, o el tamaño del ácido nucleico que tiene el ácido nucleico inicial.

15 Tal como se usa en la presente memoria, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad por la que se caracteriza. Una enzima funcional, por ejemplo, es una que exhibe la actividad catalítica característica por la que se caracteriza la enzima.

20 "Homólogo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la similitud de secuencias de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p.ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, p.ej., dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de una subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, p.ej., si una posición de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, p.ej., si la mitad (p.ej., cinco posiciones en un polímero con una longitud de diez subunidades) de las posiciones de dos secuencias de compuestos son homólogas, las dos secuencias son un 50% homólogas, si el 90% de las posiciones, p.ej., 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten un 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten un 50% de homología.

Tal como se usa en la presente memoria, "homología" se usa de manera sinónima con "identidad".

30 La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede llevar a cabo mediante el uso de un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410), y se puede acceder a él, por ejemplo, en la página de Internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponiendo del localizador universal de recursos mediante el uso de la herramienta BLAST en la página de Internet del NCBI. Las búsquedas de nucleótidos en BLAST se pueden llevar a cabo con el programa NBLAST (denominado "blastn" en la página de Internet del NCBI), mediante el uso de los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por emparejamiento incorrecto = 3; recompensa por coincidencia = 1; valor esperado 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en la presente memoria. Las búsquedas de proteínas en BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST (denominado "blastn" en la página de Internet del NCBI) o el programa "blastp" del NCBI, mediante el uso de los siguientes parámetros: valor esperado 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente memoria. Para obtener las alineaciones con huecos para la comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast o PHI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre moléculas (Id.) y las relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast, y PHI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p.ej., XBLAST y NBLAST).

Se puede determinar la identidad en porcentaje entre dos secuencias mediante el uso de técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o no los huecos. Al calcular la identidad en porcentaje, en general se cuentan las coincidencias exactas.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "hibridación" se usa con respecto al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ven afectadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la longitud del híbrido formado, y la proporción G:C en los ácidos nucleicos.

55 Tal como se usa en la presente memoria, el término "inhalador" se refiere a los dispositivos para la administración nasal y pulmonar de un fármaco, p.ej., en disolución, polvo y similares. Por ejemplo, el término "inhalador" pretende abarcar un inhalador impulsado por un propelente, tal como se usa para administrar antihistamínicos para los ataques agudos de asma, y botellas de espray de plástico, tal como se usan para administrar descongestionantes.

El término "inhibir", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un compuesto, agente, o método de reducir o impedir una función descrita, nivel, actividad, tasa, etc., basándose en el contexto en el que se usa el término "inhibir". Preferiblemente, la inhibición es de al menos un 10%. El término "inhibir" se usa de manera intercambiable con "reducir" y "bloquear".

- 5 La expresión "inhibir un complejo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a inhibir la formación de un complejo o la interacción de dos o más proteínas, así como a inhibir la función o actividad del complejo. La expresión también abarca alterar un complejo formado. Sin embargo, la expresión no implica que todas y cada una de estas funciones se deban inhibir al mismo tiempo.

- 10 La expresión "inhibir una proteína", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier método o técnica que inhibe la síntesis, los niveles, la actividad, o la función de la proteína, así como los métodos de inhibición de la inducción o la estimulación de la síntesis, los niveles, la actividad, o la función de la proteína de interés. La expresión también se refiere a cualquier ruta metabólica o reguladora que pueda regular la síntesis, los niveles, la actividad, o la función de la proteína de interés. La expresión incluye la unión con otras moléculas y la formación de complejos. Por lo tanto, la expresión "inhibidor de una proteína" se refiere a cualquier agente o compuesto cuya aplicación da como resultado la inhibición de la función de la proteína o la función de la ruta de la proteína. Sin embargo, la expresión no implica que todas y cada una de estas funciones se deban inhibir al mismo tiempo.

- 15 Tal como se usa en la presente memoria, "inyectar, o aplicar, o administrar" incluye la administración de un compuesto de la presente descripción mediante cualquier número de vías y medios que incluyen los medios tópico, oral, bucal, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmico, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópico, sublingual, vaginal, oftálmico, pulmonar, o rectal.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, un "material instructivo" incluye una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se puede usar para comunicar la utilidad del péptido de la presente descripción en el kit para llevar a cabo el alivio de las diversas enfermedades o trastornos enumerados en la presente memoria. Opcionalmente, o alternativamente, el material instructivo puede describir uno o más métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero. El material instructivo del kit de la presente descripción se puede fijar, por ejemplo, a un recipiente que contiene el compuesto identificado de la presente descripción, o se puede enviar junto con un recipiente que contiene el compuesto identificado. De manera alternativa, el material instructivo se puede enviar por separado del recipiente con la intención de que el receptor use conjuntamente el material instructivo y el compuesto.

- 25 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias que lo flanquean en estado natural, p.ej., un fragmento de ADN que se ha extraído de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, p.ej., las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se da de manera natural. La expresión también se aplica a los ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente de otros componentes que acompañan de manera natural al ácido nucleico, p.ej., ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de manera natural en la célula. La expresión, por lo tanto, incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido de replicación autónoma o virus, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote, o que existe como una molécula diferente (p.ej., como un cADN o un fragmento genómico o de cADN producido mediante PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

- 30 Un "ligando" es un compuesto que se une de manera específica a un receptor objetivo o molécula objetivo.

Un "receptor" o molécula objetivo es un compuesto que se une de manera específica a un ligando.

- 35 Un ligando o un receptor "se une de manera específica a" un compuesto cuando el ligando o receptor funciona en una reacción de unión que es determinante de la presencia del compuesto en una muestra de compuestos heterogéneos. Así, en condiciones de ensayo concretas (p.ej., inmunoensayo), el ligando o receptor se une preferentemente a un compuesto particular y no se une en una cantidad significativa a otros compuestos presentes en la muestra. Por ejemplo, un polinucleótido se une de manera específica en condiciones de hibridación a un compuesto de polinucleótido que comprende una secuencia complementaria; un anticuerpo se une de manera específica en condiciones de inmunoensayo a un antígeno que alberga un epítipo contra el que se generó el anticuerpo.

- 40 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "unión" se refiere a una conexión entre dos grupos. La conexión puede ser covalente o no covalente, lo que incluye, pero sin limitación, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, e interacciones hidrófobas/hidrófilas.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, el término "ligador" se refiere a una molécula que une otras dos moléculas de manera covalente o no covalente, p.ej., por medio de enlaces iónicos o de hidrógeno o interacciones de van der Waals, p.ej., una molécula de ácido nucleico que hibrida a una secuencia complementaria en el extremo 5' y otra

secuencia complementaria en el extremo 3', por lo que una de las secuencias no es complementaria.

"Expresión errónea" de un gen significa la expresión de un gen en una célula de un paciente afectado por una enfermedad o trastorno, en el que el nivel de expresión (que incluye la ausencia de expresión), la porción del gen expresado, o el momento de la expresión del gen con respecto al ciclo celular, difiere de la expresión del mismo gen en una célula de un paciente no afectado por la enfermedad o el trastorno. Se entiende que la expresión errónea puede provocar o contribuir a la enfermedad o el trastorno, ser un síntoma de la enfermedad o el trastorno, o ambos.

La expresión "marcador de masa", tal como se usa en la presente memoria, significa una modificación química de una molécula, o más en general dos modificaciones de moléculas tales como péptidos, que se pueden distinguir de otra modificación basándose en la masa molecular, a pesar de la identidad química.

La expresión "medir el nivel de expresión" o "determinar el nivel de expresión", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier medida o ensayo que se puede usar para correlacionar los resultados del ensayo con el nivel de expresión de un gen o una proteína de interés. Tales ensayos incluyen medir el nivel de mRNA, los niveles de proteínas, etc. y se pueden llevar a cabo mediante ensayos tales como análisis de transferencia de Northern y Western, ensayos de unión, inmunotransferencias, etc. El nivel de expresión puede incluir las tasas de expresión, y se puede medir desde el punto de vista de la cantidad real de un mRNA o proteína presente.

Los micro-ARNs tienen en general una longitud de alrededor de 16-25 nucleótidos. En un aspecto, los miARNs son moléculas de ARN de una longitud de 22 nucleótidos o menos. Se ha descubierto que estas moléculas están muy implicadas en la patología de varios tipos de cáncer. Aunque en general se descubre que las moléculas de miARN son estables cuando están asociadas al suero sanguíneo y sus componentes después de un tratamiento con EDTA, la introducción de ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) en los miARNs por medio de PCR incrementa adicionalmente la estabilidad de los miARNs. Los LNAs son una clase de análogos de ácido nucleico en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" mediante un puente metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C del anillo de ribosa, lo que incrementa la afinidad de la molécula por otras moléculas. Los miARNs son especies de ARNs reguladores monocatenarios no codificantes pequeños que interactúan con la región sin traducir de 3' (3'-UTR) de las moléculas de mRNA objetivo por medio de una homología parcial de secuencias. Participan en las redes reguladoras como elementos de control que dirigen la expresión génica global. El análisis bioinformático ha predicho que un único miARN puede regular cientos de genes objetivo, lo que contribuye a la regulación combinatoria y sutil de numerosas rutas genéticas.

La expresión "ácido nucleico" se refiere en general a grandes polinucleótidos. "Ácido nucleico" significa cualquier ácido nucleico, compuesto de desoxirribonucleósidos o ribonucleósidos, y compuesto de uniones fosfodiéster o uniones modificadas tales como uniones fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato con puente, metileno fosfonato con puente, fosforamidato con puente, fosforamidato con puente, metileno fosfonato con puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato o sulfona, y combinaciones de tales uniones. La expresión ácido nucleico también incluye de manera específica los ácidos nucleicos compuestos de bases distintas de las cinco bases que se dan biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo).

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido nucleico" abarca el ARN así como el ADN y cADN mono y bicatenario. Además, las expresiones "ácido nucleico", "ADN", "ARN" y las expresiones similares también incluyen los análogos de ácidos nucleicos, es decir, los análogos que tienen un esqueleto distinto del fosfodiéster. Por ejemplo, los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en vez de enlaces fosfodiéster en el esqueleto, se consideran descritos en la presente memoria. "Ácido nucleico" significa cualquier ácido nucleico, compuesto de desoxirribonucleósidos o ribonucleósidos, y compuesto de uniones fosfodiéster o uniones modificadas tales como uniones fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato con puente, metileno fosfonato con puente, fosforamidato con puente, fosforamidato con puente, metileno fosfonato con puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato o sulfona, y combinaciones de tales uniones. La expresión ácido nucleico también incluye de manera específica los ácidos nucleicos compuestos de bases distintas de las cinco bases que se dan biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina, y uracilo). En la presente memoria se usa la notación convencional para describir las secuencias polinucleotídicas: el extremo izquierdo de una secuencia polinucleotídica monocatenaria es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de una secuencia polinucleotídica bicatenaria se denomina la dirección 5'. La dirección de la adición de nucleótidos de 5' a 3' a los transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un mRNA se denomina "cadena codificante"; las secuencias de la cadena de ADN que se localizan en 5' respecto de un punto de referencia del ADN se denominan "secuencias anteriores"; las secuencias de la cadena de ADN que están en 3' respecto de un punto de referencia del ADN se denominan "secuencias posteriores";

La expresión "construcción de ácido nucleico", tal como se usa en la presente memoria, abarca las secuencias de ADN y ARN que codifican el gen particular o el fragmento de gen deseado, obtenidas mediante métodos genómicos o sintéticos.

A menos que se especifique de otra manera, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí, y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

- 5 El término "oligonucleótido" se refiere en general a polinucleótidos cortos, en general, de como máximo alrededor de 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se representa mediante una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esta también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" sustituye a "T".

- 10 La expresión "muestra por lo demás idéntica", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una muestra similar a una primera muestra, es decir, se obtiene de la misma manera del mismo sujeto del mismo tejido o fluido, o se refiere a una muestra similar obtenida de un sujeto diferente. La expresión "muestra por lo demás idéntica de un sujeto no afectado" se refiere a una muestra obtenida de un sujeto en el que no se conoce que exista la enfermedad o trastorno que se está examinando. La muestra puede ser, por supuesto, una muestra patrón. Análogamente, la expresión "por lo demás idéntica" también se puede usar con respecto a regiones o tejidos en un sujeto o en un sujeto no afectado.

- 15 La descripción de dos polinucleótidos como "unidos de manera operable" significa que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos en el resto de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el que se caracteriza sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido de manera operable a la región codificante de un gen es capaz de estimular la transcripción de la región codificante.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido. La administración parenteral incluye por tanto, pero sin limitación, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se considera que la administración parenteral incluye, pero sin limitación, la inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, y técnicas de infusión mediante diálisis renal.

El término "péptido" se refiere en general a polipéptidos cortos.

- 30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "ligando peptídico" (o la palabra "ligando" en referencia a un péptido) se refiere a un péptido o fragmento de una proteína que se une de manera específica a una molécula, tal como una proteína, carbohidrato, y similares. Un receptor o molécula de unión del ligando peptídico puede ser básicamente cualquier tipo de molécula, tal como un polipéptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, o cualquier compuesto derivado orgánico. Los ejemplos específicos de ligandos son los ligandos peptídicos de la presente descripción.

La expresión "por aplicación", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la administración de un fármaco o compuesto a un sujeto.

- 40 La expresión "composición farmacéutica" significará una composición que comprende al menos un ingrediente activo, por lo cual la composición es susceptible a la investigación con respecto a un resultado eficaz específico en un mamífero (por ejemplo, sin limitación, un ser humano). Las personas de experiencia habitual en la técnica entenderán y apreciarán las técnicas adecuadas para determinar si un ingrediente activo tiene un resultado eficaz deseado basado en las necesidades del técnico.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que se puede combinar un compuesto o derivado adecuado y que, tras la combinación, se puede usar para administrar el compuesto adecuado a un sujeto.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión éster o sal "fisiológicamente aceptable" significa una forma de éster o sal del ingrediente activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, que es no perjudicial para el sujeto al que se va a administrar la composición.

"Farmacéuticamente aceptable" significa fisiológicamente tolerable para la aplicación humana o veterinaria.

- 50 Tal como se usa en la presente memoria, las "composiciones farmacéuticas" incluyen las formulaciones para uso humano y veterinario.

"Diversidad" significa al menos dos.

Un "polinucleotídico" significa una única cadena o cadenas paralelas y antiparalelas de un ácido nucleico. Así, un

polinucleótido puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario.

"Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, las variantes estructurales naturales relacionadas, y los análogos no naturales sintéticos de los mismos unidos por medio de enlaces peptídicos, las variantes estructurales naturales relacionadas, y los análogos no naturales sintéticos de los mismos.

- 5 "Péptidos o polipéptidos sintéticos" significa un péptido o polipéptido no natural. Los péptidos o polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de polipéptidos automatizado. Los expertos en la técnica conocen diversos métodos de síntesis de péptidos en fase sólida.

10 El término "prevenir", tal como se usa en la presente memoria, significa impedir que algo ocurra, o tomar medidas anticipadas contra algo que es posible o probable que ocurra. En el contexto de la medicina, la "prevención" se refiere en general a la acción tomada para disminuir la probabilidad de contraer una enfermedad o afección.

Un tratamiento "preventivo" o "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos, o que muestra solamente signos tempranos, de una enfermedad o trastorno. Se administra un tratamiento profiláctico o preventivo con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada al desarrollo de la enfermedad o trastorno.

- 15 "Cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar de manera específica a un molde polinucleotídico designado, y que proporciona un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis se da cuando el cebador polinucleotídico se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, un molde polinucleotídico complementario, y un agente para la polimerización, tal como una ADN polimerasa. Un cebador en general es monocatenario, pero puede ser bicatenario. Los cebadores son en general ácidos desoxirribonucleicos, pero es útil una amplia diversidad de cebadores sintéticos y naturales para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario al molde con el que debe hibridar según su diseño para servir como sitio para el inicio de la síntesis, pero no es necesario que refleje la secuencia exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica del cebador al molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores se pueden marcar, p.ej., con restos cromogénicos, radiactivos, o fluorescentes, y se pueden usar como restos detectables.

20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto génico unido de manera operable a la secuencia promotora/reguladora. En ciertos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora principal, y en otros casos esta secuencia puede incluir también una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que expresa el producto génico de una manera específica del tejido.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que controla la expresión de un gen al que está unido de manera operable, de manera constante en una célula. A modo de ejemplo, los promotores que controlan la expresión de genes constitutivos celulares se consideran promotores constitutivos.

- 35 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de manera operable a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solamente cuando está presente en la célula un inductor que corresponde al promotor.

40 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une de manera operable a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente solamente si la célula es una célula del tipo de tejido que corresponde al promotor.

Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad, o que exhibe solamente signos tempranos de la enfermedad, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada a la enfermedad.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, "grupo protector", con respecto a un grupo amino terminal, se refiere a un grupo amino terminal de un péptido, cuyo grupo amino terminal se acopla a cualquiera de diversos grupos protectores terminales de amino empleados tradicionalmente en la síntesis de péptidos. Tales grupos protectores incluyen, por ejemplo, grupos protectores de acilo tales como formilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, succinilo, y metoxisuccinilo; grupos protectores de uretano aromático tales como benciloxicarbonilo; y grupos protectores de uretano alifático, por ejemplo, terc-butoxicarbonilo o adamantiloxicarbonilo. Véase Gross y Mienhofer, eds., *The Peptides*, vol. 3, págs. 3-88 (Academic Press, Nueva York, 1981) para grupos protectores adecuados.

50 Tal como se usa en la presente memoria, "grupo protector", con respecto a un grupo carboxi terminal, se refiere a un grupo carboxilo terminal de un péptido, cuyo grupo carboxilo terminal se acopla a cualquiera de diversos grupos protectores terminales de carboxilo. Tales grupos protectores incluyen, por ejemplo, terc-butilo, bencilo u otros grupos aceptables unidos al grupo carboxilo terminal por medio de un enlace éster o éter.

El término "proteína" se refiere en general a polipéptidos largos. En la presente memoria se usa la notación convencional para describir las secuencias polipeptídicas: el extremo izquierdo de una secuencia polipeptídica es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia polipeptídica es el extremo carboxilo;

5 La expresión "ruta reguladora de una proteína", tal como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a la ruta reguladora anterior que regula una proteína, como a los eventos posteriores que esa proteína regula. Tal regulación incluye, pero sin limitación, la transcripción, la traducción, los niveles, la actividad, la modificación postraduccional, y la función de la proteína de interés, así como los eventos posteriores que la proteína regula.

Las expresiones "ruta de una proteína" y "ruta reguladora de una proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.

10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "proporcionar un pronóstico" se refiere a proporcionar información con respecto al impacto de la presencia del cáncer (p.ej., tal como se determina mediante los métodos de diagnóstico de la presente descripción) sobre la salud futura de un sujeto (p.ej., la morbilidad o mortalidad esperada, la probabilidad de tener un cáncer, y el riesgo de metástasis).

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "purificado" y las expresiones similares se refieren a un enriquecimiento de una molécula o compuesto respecto de los otros componentes asociados normalmente a la molécula o el compuesto en un medio nativo. El término "purificado" no indica necesariamente que se haya alcanzado una pureza completa de la molécula particular durante el proceso. Un compuesto "sumamente purificado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que tiene una pureza mayor del 90%. En particular, el ADN purificado de espermatozoides se refiere al ADN que no produce niveles detectables significativos de ADN de células distintas de espermatozoides tras la amplificación mediante PCR de ADN purificado de espermatozoides, y el análisis posterior de ese ADN amplificado. Un "nivel detectable significativo" es una cantidad de contaminante que sería visible en los datos presentados, y sería necesario abordarlo/explicarlo durante el análisis de la prueba forense.

20 Un "polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas entre sí de manera natural. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado se puede incluir en un vector adecuado, y el vector se puede usar para transformar una célula hospedadora adecuada.

Un polinucleótido recombinante también puede cumplir una función no codificante (p.ej., como promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.).

30 Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". Un gen que se expresa en una célula hospedadora recombinante en la que el gen comprende un polinucleótido recombinante produce un "polipéptido recombinante".

Un "polipéptido recombinante" es uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

35 Un "vector de virus adeno-asociado (AAV) recombinante que comprende un elemento regulador activo en células musculares" se refiere a un AAV que se ha construido para que comprenda un elemento regulador nuevo para controlar la expresión o la expresión específica de tejido en el músculo de un gen de elección o interés. Como se describe en la presente memoria, tal vector construido puede contener además al menos un promotor y opcionalmente al menos un potenciador como parte del elemento regulador, y el vector recombinante puede comprender además secuencias de ácido nucleico adicionales, que incluyen las de otros genes, que incluyen genes terapéuticos de interés.

40 El término "regular" se refiere a estimular o inhibir una función o actividad de interés.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "elementos reguladores" se usa de manera intercambiable con "secuencias reguladoras" y se refiere a promotores, potenciadores, y otros elementos de control de la expresión, o cualquier combinación de tales elementos.

45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "gen indicador" significa un gen cuya expresión se puede detectar mediante el uso de un método conocido. A modo de ejemplo, el gen lacZ de Escherichia coli se puede usar como gen indicador en un medio, debido a que la expresión del gen lacZ se puede detectar mediante el uso de métodos conocidos añadiendo el sustrato cromogénico o-nitrofenil-β-galactósido al medio (Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC, pág. 574).

50 Una "muestra", tal como se usa en la presente memoria, se refiere preferiblemente a una muestra biológica de un sujeto, que incluye, pero sin limitación, muestras de tejido normal, muestras de tejido enfermo, biopsias, sangre, saliva, heces, semen, lágrimas, y orina. Una muestra puede ser también cualquier otra fuente de material obtenido de un sujeto que contiene células, tejidos, o fluidos de interés. También se puede obtener una muestra a partir de un cultivo celular o tisular.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo secundario" se refiere a un anticuerpo que se une a la región constante de otro anticuerpo (el anticuerpo primario).

La expresión "secuencia señal" significa una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido que dirige la trayectoria adquirida por un polipéptido en una célula, es decir, dirige el procesamiento celular de un polipéptido en una célula, lo que incluye, pero sin limitación, la secreción final de un polipéptido desde una célula. Una secuencia señal es una secuencia de aminoácidos que se halla en general, pero no exclusivamente, en el extremo amino de un polipéptido que dirige la síntesis del polipéptido hacia el retículo endoplásmico. En ciertos casos, el péptido señal se elimina de manera proteolítica del polipéptido, y así no está presente en la proteína madura.

"ARNs de interferencia pequeños (siARNs)" significa, entre otros, una molécula de dsARN aislada compuesta de una cadena directa y una inversa. En un aspecto, tiene una longitud de más de 10 nucleótidos. siARN se refiere además a un único transcrito que tiene las secuencias directa e inversa complementaria del gen objetivo, p.ej., una horquilla. El siARN incluye además cualquier forma de dsARN (productos escindidos proteolíticamente de un dsARN mayor, ARN parcialmente purificado, ARN básicamente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante), así como ARN alterado que difiere del ARN natural mediante la adición, delección, sustitución, y/o alteración de uno o más nucleótidos.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "soporte sólido" se refiere a un sustrato insoluble en un disolvente que es capaz de formar uniones (preferiblemente enlaces covalentes) con diversos compuestos. El soporte puede ser de naturaleza biológica, tal como, sin limitación, una célula o partícula de bacteriófago, o sintético, tal como, sin limitación, un derivado de acrilamida, agarosa, celulosa, nailon, sílice, o partículas magnetizadas.

La expresión "se une de manera específica a", tal como se usa en la presente memoria, significa que un compuesto o ligando funciona en una reacción de unión o en condiciones de ensayo que son determinantes de la presencia del compuesto en una muestra de compuestos heterogéneos, o significa que una molécula, tal como un resto de unión, p.ej., un oligonucleótido o anticuerpo, se une preferentemente a otra molécula, tal como una molécula objetivo, p.ej., un ácido nucleico o una proteína, en presencia de otras moléculas en una muestra.

Las expresiones "unión específica" o "unir de manera específica", cuando se usan con respecto a la interacción de un péptido (ligando) y un receptor (molécula), también se refieren a una interacción que depende de la presencia de una estructura particular (es decir, una secuencia amino de un ligando o un dominio de unión al ligando de una proteína); en otras palabras, el péptido comprende una estructura que permite el reconocimiento y la unión a una estructura proteica específica de una molécula de unión en vez de a moléculas en general. Por ejemplo, si un ligando es específico hacia un bolsillo de unión "A", en una reacción que contiene el ligando peptídico marcado "A" (tal como un péptido expresado en un fago aislado o un péptido sintético aislado) y "A" sin marcar en presencia de una proteína que comprende un bolsillo de unión A, el ligando peptídico sin marcar reducirá la cantidad de ligando peptídico marcado unido a la molécula de unión, en otras palabras, un ensayo de unión competitiva.

El término "patrón", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a algo usado como comparación. Por ejemplo, puede ser un agente o compuesto patrón conocido que se administra y se usa para comparar los resultados cuando se administra un compuesto de ensayo, o puede ser un parámetro o función patrón que se mide para obtener un valor de control cuando se mide el efecto de un agente o compuesto sobre un parámetro o función. El patrón puede referirse además a un "patrón interno", tal como un agente o compuesto que se añade en cantidades conocidas a una muestra y que es útil en la determinación de cosas tales como las tasas de purificación o de recuperación al procesar una muestra o someterla a procedimientos de purificación o extracción antes de medir un marcador de interés. Los patrones internos a menudo son un marcador purificado de interés que se ha marcado, tal como con un isótopo radiactivo, que permite distinguirlo de un marcador endógeno.

Un "sujeto" de análisis, diagnóstico, o tratamiento es un animal. Tales animales incluyen mamíferos, preferiblemente un ser humano.

Tal como se usa en la presente memoria, un "sujeto que lo necesita" es un paciente, animal, mamífero, o ser humano, que se beneficiará del método de la presente descripción.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sujeto en riesgo de EAP" se refiere a un sujeto con uno o más factores de riesgo de desarrollar EAP. Los factores de riesgo incluyen, pero sin limitación, el sexo, la edad, la predisposición genética, la exposición ambiental, e incidentes previos de EAP, y el estilo de vida.

Tal como se usa en la presente memoria, las "secuencias de aminoácidos sustancialmente homólogas" incluyen las secuencias de aminoácidos que tienen al menos alrededor de un 95% de homología, preferiblemente al menos alrededor de un 96% de homología, más preferiblemente al menos alrededor de un 97% de homología, incluso más preferiblemente al menos alrededor de un 98% de homología, y lo más preferiblemente al menos alrededor de un 99% o más de homología respecto de una secuencia de aminoácidos de una cadena de un anticuerpo de referencia.

La similitud o identidad de secuencias de aminoácidos se puede calcular mediante el uso de los programas BLASTP y TBLASTN, que emplean el algoritmo BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica) 2.0.14. Los

ajustes por defecto usados para estos programas son adecuados para identificar secuencias de aminoácidos sustancialmente similares para los fines de la presente descripción.

5 "Secuencia de ácido nucleico sustancialmente homóloga" significa una secuencia de ácido nucleico que corresponde a una secuencia de ácido nucleico de referencia, en la que la secuencia correspondiente codifica un péptido que
 10 tiene sustancialmente la misma estructura y función que el péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia; p.ej., cuando se dan solamente cambios en aminoácidos que no afectan significativamente a la función del péptido. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico sustancialmente idéntica codifica el péptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia. El porcentaje de identidad entre la secuencia de ácido nucleico sustancialmente similar y la secuencia de ácido nucleico de referencia es de al menos alrededor del 50%, 65%, 75%,
 15 85%, 95%, 99% o más. La identidad sustancial de las secuencias de ácido nucleico se puede determinar comparando la identidad de secuencia de dos secuencias, por ejemplo mediante métodos físicos/químicos (es decir, hibridación) o mediante alineación de secuencias por medio de un algoritmo informático. Las condiciones adecuadas de hibridación de ácidos nucleicos para determinar si una secuencia de nucleótidos es sustancialmente similar a una secuencia de nucleótidos de referencia son: 7% de dodecil sulfato sódico SDS, Na₃PO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en solución salina citrato estándar (SSC) 2X, 0,1% de SDS a 50 °C; preferiblemente en un 7% (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en SSC 1X, 0,1% de SDS a 50 °C; preferiblemente en un 7% (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en SSC 0,5X, 0,1% de SDS a 50 °C; y más preferiblemente en un 7% (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C con lavado en SSC 0,1X, 0,1% de SDS a 65 °C. Los algoritmos informáticos adecuados para determinar la similitud sustancial entre dos secuencias de ácido nucleico incluyen el
 20 paquete informático GCS (Devereux et al., 1984 Nucl. Acids Res. 12:387), y los programas BLASTN o FASTA (Altschul et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990 87:14:5509-13; Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990 215:3:403-10; Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Los ajustes por defecto proporcionados con estos programas son adecuados para determinar la similitud sustancial de secuencias de ácido nucleico para los fines de la presente invención.

25 La expresión "sustancialmente puro" describe un compuesto, p.ej., una proteína o polipéptido, que se ha separado de los componentes que lo acompañan de manera natural. En general, un compuesto está sustancialmente puro cuando al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 99% del material total (en volumen, en peso húmedo o en peso seco, o en
 30 porcentaje molar o fracción molar) de una muestra es el compuesto de interés. La pureza se puede medir mediante cualquier método adecuado, p.ej., en el caso de los polipéptidos, mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel, o análisis de HPLC. Un compuesto, p.ej. una proteína, también está sustancialmente purificada cuando está básicamente libre de los componentes asociados de manera natural, o cuando se separa de los contaminantes nativos que lo acompañan en su estado natural.

35 El término "síntoma", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier fenómeno patológico o desviación de lo normal en estructura, función, o sensación, experimentada por el paciente e indicativa de enfermedad. En contraste, un "signo" es una prueba objetiva de enfermedad. Por ejemplo, una hemorragia nasal es un signo. Es evidente para el paciente, el doctor, la enfermera y otros observadores.

40 Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que exhibe signos de patología, con el fin de disminuir o eliminar esos signos.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto.

45 El término "transfección" se usa de manera intercambiable con las expresiones "transferencia génica", "transformación", y "transducción", y significa la introducción intracelular de un polinucleótido. "Eficacia de transfección" se refiere a la cantidad relativa del transgén absorbida por las células sometidas a transfección. En la práctica, la eficacia de transfección se estima mediante la cantidad del producto del gen indicador expresado tras el procedimiento de transfección.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "transgén" significa una secuencia de ácido nucleico exógena que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia promotora/reguladora unida de manera operable a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos, cuyo ácido nucleico exógeno está codificado por un mamífero transgénico.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "mamífero transgénico" significa un mamífero, cuyas células germinales comprenden un ácido nucleico exógeno.

55 Tal como se usa en la presente memoria, una "célula transgénica" es cualquier célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que se ha introducido en la célula de una manera que permite la expresión de un gen codificado por la secuencia de ácido nucleico introducida.

El término "tratar", tal como se usa en la presente memoria, significa reducir la frecuencia con la que un paciente o sujeto experimenta los síntomas, o administrar un agente o compuesto para reducir la frecuencia con la que experimenta los síntomas.

5 Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad, o que exhibe solamente signos tempranos de la enfermedad, trastorno o afección, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la patología asociada a la enfermedad, trastorno o afección.

10 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede usar para transportar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos, y virus. Así, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. También se debería considerar que el término incluye compuestos distintos de plásmidos y de virus que facilitan la transferencia o administración del ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores virales recombinantes, y similares. Los ejemplos de vectores no virales incluyen, pero sin limitación, liposomas, derivados de poliamina de ADN y similares.

15 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas de forma operable a una secuencia de nucleótidos a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión los puede suministrar la célula hospedadora o un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (p.ej., desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

Realizaciones

25 La presente descripción abarca el uso de miR-93 y la regulación de miR-93 para tratar y prevenir la hipoxia, isquemia, y otras lesiones, enfermedades, trastornos y afecciones asociadas a isquemia, tales como la enfermedad arterial periférica y la isquemia miocárdica. Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son útiles para tratar la lesión por isquemia-reperusión.

En un ejemplo, la isquemia es isquemia cerebral. En un ejemplo, la isquemia cerebral está asociada a traumatismo.

En un ejemplo, la isquemia es isquemia vascular. En un ejemplo, la isquemia vascular es isquemia de las arterias coronarias.

30 La presente descripción proporciona la administración de al menos un miARN, lo que incluye el pre-miARN y miARN maduro, o una molécula mimética del mismo. Las "moléculas miméticas de miARN" son moléculas basadas en ácidos nucleicos sintetizadas químicamente, preferiblemente ARNs bicatenarios que imitan los miARNs endógenos maduros tras la transfección en las células.

35 Los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II (pol II) o la ARN polimerasa III, y surgen de transcritos iniciales, denominados transcritos de miARN primarios (pri-miARNs), que tienen en general una longitud de varios miles de bases. Los pri-miARNs se procesan en el núcleo mediante la RNasa Drosha hasta precursores con forma de horquilla de alrededor de 70 a alrededor de 100 nucleótidos (pre-miARNs). Tras el transporte al citoplasma, el pre-miARN en horquilla se procesa adicionalmente mediante Dicer para producir un miARN bicatenario. La cadena de miARN madura se incorpora después al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en el que se asocia a sus mARNs objetivo mediante la complementariedad de pares de bases. En los casos relativamente poco frecuentes en los que un miARN tiene un emparejamiento de bases perfecto con un objetivo de mARN, favorece la degradación del mARN. Más habitualmente, los miARNs forman moléculas heterodúplex imperfectas con los mARNs objetivo, lo que afecta a la estabilidad del mARN o inhibe la traducción del mARN.

45 En un aspecto, un agonista tal como se usa en la presente memoria es una molécula o compuesto que incrementa la expresión, los niveles, o la actividad de un miARN objetivo.

Un miARN administrado puede ser el miARN natural, o puede ser un análogo u homólogo del miARN. En un ejemplo, el miARN, o el análogo o los homólogos, se modifican para incrementar la estabilidad de los mismos en el medio celular. En un ejemplo alternativo, el miARN está codificado por un vector de expresión y se puede administrar a la célula objetivo en un liposoma o microvesícula.

50 En una realización, un estimulador de la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93 es un agonista. En un aspecto, el agonista es un polinucleótido que comprende una secuencia madura de miR-93. En un aspecto, el agonista se expresa a partir de una construcción de expresión.

En un ejemplo, el agonista se administra a un sujeto mediante inyección intravenosa. En un ejemplo, el agonista se administra directamente en la localización de la enfermedad, el trastorno o la afección y la isquemia asociada.

Un inhibidor específico de miR puede ser un oligonucleótido anti-miARN (anti-miR) (por ejemplo, véase el documento WO2005054494).

En un ejemplo, el agonista se administra a un sujeto mediante administración oral, intravenosa, intramuscular, transdérmica, liberación sostenida, liberación controlada, liberación retardada, supositorio, subcutánea, con catéter, tópica, o sublingual.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista o antagonista de miR-93, seleccionado del grupo de ácidos nucleicos aislados que consisten en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro. La composición farmacéutica se puede formular para inyección o administración tópica. La formulación para administración tópica puede ser un gel, crema, loción, o pomada.

En otro ejemplo, se usa un agonista de miR-93 en combinación con otras modalidades o agentes terapéuticos para tratar la isquemia.

En una realización, los agonistas de miR-93 pueden ser ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de miR-93 precursora o madura. En ciertos ejemplos, el ácido nucleico aislado comprende la secuencia de SEQ N°s:1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, y 10, y los fragmentos y homólogos biológicamente activos de los mismos. En otro ejemplo, el agonista de miR-93 puede ser un polinucleótido que comprende la secuencia de pri-miARN o pre-miARN para miR-93. El polinucleótido que comprende la secuencia de miR-93 madura, pre-miR-93, o pri-miR-93 puede ser monocatenario o bicatenario. Los polinucleótidos pueden contener una o más modificaciones químicas, tales como ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos peptídicos, modificaciones de carbohidratos, tales como 2'-O-alquilo (p.ej. 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo), modificaciones de 2'-fluoro, y 4'-tio, y modificaciones del esqueleto, tal como una o más uniones fosforotioato, morfolino, o fosfonocarboxilato. En un ejemplo, el polinucleótido que comprende una secuencia de miR-93 se conjuga a colesterol. En otro ejemplo, el agonista de miR-93 puede ser un agente diferente de miR-93 que actúa para incrementar, complementar, o sustituir la función de miR-93.

En otro ejemplo, el agonista de miR-93 se puede expresar in vivo a partir de un vector. Un "vector" es una composición de materia que se puede usar para administrar un ácido nucleico de interés al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen los polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos, y virus. Así, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. Los ejemplos de vectores virales incluyen los vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados y vectores retrovirales. Una construcción de expresión se puede replicar en una célula viva, o se puede hacer de manera sintética. Para los fines de esta solicitud, las expresiones "construcción de expresión", "vector de expresión", y "vector" se usan de manera intercambiable para demostrar la aplicación de la descripción en un sentido general, ilustrativo.

La invención proporciona un vector de expresión para el uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, y dicho vector de expresión comprende una secuencia que codifica un agonista de miR-93 seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro. Un vector de expresión para expresar miR-93 comprende un promotor "unido de manera operable" a un polinucleótido que codifica miR-93. La frase "unido de manera operable" o "bajo control transcripcional", tal como se usa en la presente memoria, significa que el promotor está en la posición y orientación correctas con respecto a un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido. El polinucleótido que codifica miR-93 puede codificar la secuencia de microARN primario, la secuencia de microARN precursor, o la secuencia de miR-93 maduro. En otro ejemplo, el vector de expresión comprende un polinucleótido unido de manera operable a un promotor, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia de SEQ N°s:1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (o codifica las secuencias) y los fragmentos y homólogos biológicamente activos de los mismos, donde sea adecuado.

La expresión "construcción de expresión" pretende incluir cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico, en la que parte o todo el ácido nucleico que codifica la secuencia es capaz de ser transcrito. En general, el ácido nucleico que codifica un producto génico está bajo control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen.

En un ejemplo, un vector de la descripción es un vector viral. En un ejemplo, el vector es un vector AAV (virus adeno-asociado). En un ejemplo, un vector AAV recombinante de la presente descripción es útil para seleccionar como objetivo el músculo preferentemente respecto de otros tejidos. En un ejemplo, un vector AAV recombinante de la presente descripción es útil para incrementar la expresión de un gen de interés preferentemente en el músculo. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria abarcan seleccionar como objetivo y transducir el músculo con un vector AAV. El método comprende administrar a un sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un vector de virus adeno-asociado (AAV) recombinante que comprende un elemento regulador. El elemento regulador comprende al menos un elemento promotor y opcionalmente al menos un

- elemento potenciador. El potenciador y el promotor se unen de manera operable. El vector AAV recombinante también puede comprender opcionalmente al menos un gen unido de manera operable a un elemento promotor. El AAV puede comprender el genoma del AAV completo, o un homólogo o fragmento del mismo, tal como la cápside del AAV particular. Sin embargo, se debería indicar que el genoma completo del AAV puede no ser útil en ciertas situaciones, debido a la necesidad de hacer que el vector sea deficiente de replicación y/o a la inserción de genes de interés, tales como genes terapéuticos.
- 5
- Los elementos reguladores y el gen de interés se pueden sustituir también con fragmentos activos, modificaciones, u homólogos de los mismos. En un aspecto, el vector AAV recombinante selecciona como objetivo preferentemente el músculo esquelético.
- 10 Se puede preparar un vector AAV recombinante para el uso en la inactivación de genes específicos en el músculo con siARN o miARN expresado a partir de un vector AAV de la presente descripción.
- Otros vectores útiles, ácidos nucleicos, y proteínas u homólogos y fragmentos de los mismos son útiles en la práctica de la presente descripción, que incluyen, pero sin limitación, el AAV-9 con número de acceso del NCBI AX753250 y el AAV-8 con número de acceso del NCBI NC_006261.
- 15 Debido a las limitaciones de carga del AAV, en una realización se puede preferir un cADN. En un aspecto, se pueden introducir intrones y secuencias adicionales. En un aspecto, se usa el gen cap del AAV y no se usa el ADN genómico completo de AAV.
- Se conocen en la técnica otros métodos y vectores que también se pueden usar para poner en práctica los métodos de la presente descripción, que incluyen los de Souza et al. (pub. de pat. de EE.UU. n° 2011/0212529, publicada el 1 de septiembre de 2011).
- 20 Aunque los AAVs tales como AAV9 y AAV8 pueden seleccionar como objetivo ciertos tejidos con una especificidad mayor que otros tejidos, el uso de potenciadores y promotores específicos de tejidos o células como parte del vector puede ayudar a asegurar que los genes de interés se expresen en la célula o tejido deseado.
- Se puede hallar una descripción y uso más detallado de AAVs en la pub. de pat. de EE.UU. n° US 2013/0136729 (French y Annex, sol. de pat. de EE.UU. n° 13/673.351).
- 25 Ordahl et al. (pat. de EE.UU. n° 5.266.488) caracterizó el promotor del gen de troponina-T de pollo y descubrió que el elemento promotor proximal esencial contiene secuencias inespecíficas necesarias para que el inicio de la transcripción de un gen estructural esté asociado de forma operable al promotor. Véase la Figura 2 de Ordahl y SEQ ID N°:18 de la presente memoria. Cuando +1 designa el primer nucleótido del sitio de inicio de la transcripción, este elemento está localizado entre el nucleótido -49 y el nucleótido +1. Además, Ordahl demostró que el elemento regulador específico de músculo esquelético está colocado antes del elemento promotor proximal esencial y está asociado de manera operable a él. Este elemento es necesario para que la expresión de un gen estructural esté asociada de forma operable al promotor en las células de músculo esquelético. El elemento regulador específico de músculo esquelético está localizado entre los nucleótidos -129 y -49. Ordahl también indicó que el elemento regulador específico de músculo cardiaco está colocado antes del elemento regulador específico de músculo esquelético y del elemento promotor proximal esencial, y está asociado de forma operable al elemento promotor proximal esencial, y propuso que este elemento es necesario para que la expresión de un gen estructural esté asociada de forma operable al promotor en las células de músculo cardiaco. Ordahl también afirmó que el elemento regulador específico de músculo cardiaco está localizado entre el nucleótido -268 y el nucleótido -201.
- 30 Ordahl también demostró que el elemento regulador de músculo estriado positivo no esencial está colocado antes, y asociado de forma operable a, el elemento regulador específico de músculo esquelético y el elemento regulador específico de músculo cardiaco. Este elemento facilita que la expresión de un gen estructural esté asociada de forma operable al promotor en las células de músculo estriado, tanto cardiaco como esquelético. Este elemento está localizado entre los nucleótidos -550 y -269.
- 35 Según Ordahl, el elemento regulador negativo no esencial se coloca antes del elemento regulador de músculo estriado positivo, y se asocia de forma operable a él. Este elemento inhibe que el elemento regulador de músculo estriado positivo facilite la expresión de un gen estructural que esté asociado de forma operable con el promotor. Este elemento está localizado entre el nucleótido -3000 y el nucleótido -1100. Definido en líneas más generales, este elemento está localizado entre el nucleótido -3000 y el nucleótido -550.
- 40 Un ejemplo de la presente descripción abarca el uso de las regiones promotoras descritas por Ordahl para seleccionar como objetivo el músculo en general o para seleccionar como objetivo de manera más específica el músculo cardiaco respecto del músculo esquelético o viceversa.
- 45 Un promotor completo (uno que contiene todos los elementos descritos anteriormente) expresa un gen estructural asociado de forma operable a él en células de músculo esquelético y de músculo estriado. Los elementos
- 50

individuales que constituyen un promotor completo se pueden usar en cualquier combinación operable deseada para producir promotores nuevos que tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, el elemento regulador inespecífico negativo se puede deleccionar de un promotor completo, de forma que se facilite la expresión de un gen asociado al promotor. El elemento regulador específico de músculo cardíaco se puede deleccionar de un promotor completo, de forma que un gen estructural asociado de forma operable al promotor se exprese preferentemente en las células esqueléticas, o el elemento regulador específico de músculo esquelético se puede deleccionar de un promotor completo, de forma que un gen estructural asociado de forma operable al promotor se exprese preferentemente en las células cardíacas. El término "delecionado", tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier modificación en un elemento promotor que hace que el elemento sea inoperable.

Los promotores operables se pueden construir a partir de los mínimos elementos reguladores necesarios. Tal promotor comprende un elemento promotor proximal esencial y un elemento regulador específico de músculo cardíaco colocado antes del elemento promotor proximal esencial, y asociado de forma operable con él. Otro promotor comprende un elemento promotor proximal esencial y un elemento regulador específico de músculo esquelético colocado antes de dicho elemento promotor proximal esencial, y asociado de forma operable con él. En estos promotores se puede colocar opcionalmente un elemento regulador de músculo estriado positivo antes de, y asociado de forma operable con, el elemento regulador específico (esquelético o cardíaco).

Por lo tanto, la presente descripción abarca el uso de un promotor de troponina T cardíaca, por ejemplo, en el que la secuencia comprende un promotor y es la región de 5' de alrededor de la posición del nucleótido -3000 a alrededor del sitio de inicio de la transcripción de troponina T cardíaca o alrededor del nucleótido +25 a alrededor de +50, o en el que la secuencia comprende la región de 5' de alrededor del nucleótido -1000 a alrededor del sitio de inicio de la transcripción o alrededor del nucleótido +25 a alrededor de +50, o en el que la secuencia comprende la región de 5' de alrededor del nucleótido -550 a alrededor del sitio de inicio de la transcripción o alrededor del nucleótido +25 a alrededor de +50, o en el que la secuencia comprende la región de 5' de alrededor del nucleótido -400 a alrededor del sitio de inicio de la transcripción o alrededor del nucleótido +25 a alrededor de +50, o en el que la secuencia comprende la región de 5' de alrededor del nucleótido -300 a alrededor del sitio de inicio de la transcripción o alrededor del nucleótido +25 a alrededor de +50. En un ejemplo, la secuencia está alrededor de 375 nucleótidos antes (-) a 43 nucleótidos después (+) (véase el Ejemplo 1). En otro ejemplo, la secuencia es la región de 5' de alrededor del nucleótido -268 a alrededor del nucleótido +38 respecto del sitio de inicio de la transcripción.

Alguien de experiencia habitual en la técnica entenderá que cuando se debe usar un promotor diferente, tal como un promotor de creatina quinasa muscular, de forma similar al promotor de troponina T cardíaco, también se pueden usar diversas longitudes de secuencia.

La presente descripción abarca además composiciones y métodos para transducir músculo esquelético e incrementar la expresión génica mediante el uso de un vector AAV modificado para que comprenda un promotor génico de músculo esquelético. En un aspecto, el AAV es AAV9 o AAV8.

La presente descripción se refiere a métodos de terapia génica que utilizan vectores de expresión específicos de tejido. La descripción se refiere además a vectores de expresión usados para la administración de un transgén al músculo. En un ejemplo, el músculo es músculo cardíaco. En otro ejemplo, el músculo es músculo esquelético. De manera más específica, la presente descripción se refiere a elementos reguladores transcripcionales que posibilitan la expresión incrementada y sostenida de un transgén en el músculo.

Los promotores y potenciadores de músculo esquelético están disponibles para el gen de creatina quinasa muscular (MCK), y se abarcan en la presente descripción para regular la expresión de un gen terapéutico en un vector AAV de la descripción.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona vectores de expresión optimizados para la expresión sostenida de un transgén en el tejido muscular. También se describen combinaciones de potenciador/promotor que pueden dirigir niveles de expresión sostenidos y adecuados en diversos sistemas de expresión.

La presente descripción abarca combinar secuencias mínimas de promotores específicos de músculo y potenciadores específicos de músculo para crear elementos reguladores quiméricos que controlan la transcripción de un transgén de una manera sostenida. Una secuencia mínima es una secuencia que mantiene la función de interés, aunque posiblemente algo menos que la secuencia completa de interés. Los elementos reguladores quiméricos resultantes son útiles para la terapia génica dirigida a la expresión de transgenes en el músculo, así como para otras aplicaciones que requieren la expresión a largo plazo de proteínas exógenas en las células musculares transfectadas, tales como miocitos. En un ejemplo, los miocitos son miocitos cardíacos. En otro ejemplo, los miocitos son miocitos de músculo esquelético.

Los elementos reguladores quiméricos útiles para seleccionar como objetivo la expresión de transgenes en el músculo se proporcionan en la presente descripción. Los elementos reguladores quiméricos de la presente descripción comprenden combinaciones de promotores específicos de músculo y potenciadores específicos de músculo que son capaces de dirigir la expresión de transgenes sostenida preferentemente en el músculo. En un

ejemplo, los potenciadores y promotores son específicos de músculo cardíaco, y en otro ejemplo, los potenciadores y promotores son específicos de músculo esquelético.

La presente descripción se dirige además a transgenes recombinantes que comprenden uno o más elementos reguladores específicos de tejido de la descripción unidos de manera operable. Los elementos reguladores específicos de tejido, que incluyen promotores y potenciadores específicos de músculo unidos de manera operable a un transgén, controlan su expresión en miocitos y, en particular, en cardiomiocitos y/o miocitos esqueléticos. Los transgenes se pueden insertar en vectores virales recombinantes para dirigir la expresión de las secuencias de ADN codificantes asociadas al músculo. Los promotores específicos de músculo útiles en la presente descripción incluyen, por ejemplo, el promotor de creatina quinasa muscular (MCK), el promotor de troponina T cardíaca, o el promotor de desmina (DES). En un ejemplo particular, el promotor es un promotor humano. En otro ejemplo, el promotor es un promotor murino. En otro ejemplo, el promotor es un promotor de pollo. En ciertos ejemplos, el promotor está truncado.

En un ejemplo, se usan potenciadores específicos de tejido. Los potenciadores específicos de tejido incluyen los potenciadores específicos de músculo. Se puede usar uno o más de estos elementos potenciadores específicos de músculo en combinación con un promotor específico de músculo de la presente descripción para proporcionar un elemento regulador específico de tejido. En un ejemplo, los potenciadores se obtienen de ser humano, pollo, o ratón. En ciertos ejemplos, las combinaciones de potenciador/potenciador o potenciador/promotor son heterólogas, es decir, derivadas de más de una especie. En otros ejemplos, los potenciadores y promotores se obtienen de la misma especie. En ciertos ejemplos, los elementos potenciadores están truncados.

En un ejemplo, un elemento regulador de la presente descripción comprende al menos un potenciador de MCK o troponina T cardíaca unido de manera operable a un promotor. En otro ejemplo, un elemento regulador de la presente descripción comprende al menos dos potenciadores de MCK unidos a un promotor de MCK o un promotor de DES o un promotor de troponina T cardíaca. En otro ejemplo, un elemento regulador comprende al menos dos potenciadores de DES unidos a un promotor. En un ejemplo adicional, un elemento regulador comprende al menos dos potenciadores de troponina T cardíaca unidos a un promotor.

La presente descripción proporciona vectores que comprenden un elemento regulador de la descripción. En ciertos ejemplos, se incorpora un elemento regulador de la descripción en un vector viral, tal como uno derivado de adenovirus, virus adeno-asociado (AAV), o retrovirus, que incluyen lentivirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En una realización, el AAV es AAV8 o AAV9. La presente descripción también abarca métodos de transfección del tejido muscular, en el que tales métodos utilizan los vectores de la descripción.

La presente descripción proporciona además células transfectadas con el ácido nucleico que contiene una combinación de potenciador/promotor de la descripción.

Los promotores se pueden acoplar con otras secuencias/elementos reguladores que, cuando se unen a factores reguladores intracelulares adecuados, incrementan ("potenciadores") o reducen ("represores") la transcripción dependiente del promotor. Se dice que un promotor, potenciador, o represor, está "unido de manera operable" a un transgén cuando tal(es) elemento(s) controla(n) o afecta(n) a la tasa o eficacia de la transcripción de un transgén. Por ejemplo, una secuencia promotora localizada de manera proximal al extremo 5' de una secuencia codificante de un transgén normalmente está unida de manera operable al transgén. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "elementos reguladores" se usa de manera intercambiable con "secuencias reguladoras" y se refiere a promotores, potenciadores, y otros elementos de control de la expresión, o cualquier combinación de tales elementos.

Los promotores están colocados en 5' (en posición anterior) respecto de los genes que controlan. Muchos promotores eucarióticos contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento: la caja TATA y los elementos promotores de 5'. Se cree que la caja TATA, localizada 25-30 pb antes del sitio de inicio de la transcripción, está implicada en dirigir a la ARN polimerasa II para comenzar la síntesis de ARN en el sitio correcto. En contraste, los elementos promotores de 5' determinan la velocidad a la que se inicia la transcripción. Estos elementos pueden actuar independientemente de su orientación, pero deben estar localizados de 100 a 200 pb antes de la caja TATA.

Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción hasta 1000 veces a partir de los promotores homólogos u heterólogos unidos. Los elementos potenciadores a menudo siguen siendo activos incluso si se invierte su orientación (Li et al., J. Bio. Chem. 1990, 266: 6562-6570). Además, a diferencia de los elementos promotores, los potenciadores pueden ser activos cuando están colocados después del sitio de inicio de la transcripción, p.ej., en un intrón, o incluso a una distancia considerable del promotor (Yutzey et al., Mol. and Cell. Bio. 1989, 9:1397-1405).

En la técnica se sabe que se puede adaptar cierta variación de esta distancia sin la pérdida de la función del promotor. De forma similar, la colocación de los elementos reguladores con respecto al transgén puede variar significativamente sin pérdida de función. Múltiples copias de los elementos reguladores pueden actuar coordinadamente. En general, un vector de expresión comprende una o más secuencias potenciadoras seguidas, en la dirección 5' a 3', de una secuencia promotora, todas unidas de manera operable a un transgén, seguido de una

secuencia de poliadenilación.

La presente descripción se basa además en el hecho de que muchos potenciadores de genes celulares funcionan exclusivamente en un tipo de tejido o célula particular. Además, ciertos potenciadores se activan solamente en condiciones específicas, que se generan por la presencia de un inductor tal como una hormona o ión metálico.

5 Debido a estas diferencias en las especificidades de los potenciadores celulares, la elección de los elementos promotores y potenciadores a incorporar en un vector de expresión eucariótico está determinada por el tipo de célula(s) en la(s) que se va a expresar el gen recombinante.

10 En un ejemplo, los elementos reguladores de la descripción pueden ser heterólogos entre sí o respecto de un transgén, es decir, pueden ser de especies diferentes. Además, pueden ser de especies distintas del hospedador, o también se pueden obtener de la misma especie pero de genes diferentes, o se pueden obtener de un único gen.

La presente descripción incluye además el uso de elementos reguladores de desmina. La desmina es una proteína citoesquelética específica de músculo que pertenece a la familia de filamentos intermedios que se dan en la periferia del disco Z, y puede actuar para mantener las miofibrillas adyacentes en una alineación lateral. La expresión de los diversos filamentos intermedios está regulada a lo largo del desarrollo, y muestra especificidad tisular.

15 El gen de creatina quinasa muscular (MCK) es muy activo en todos los músculos estriados. La creatina quinasa desempeña un papel importante en la regeneración del ATP en los sistemas contráctiles y de transporte de iones. Posibilita la contracción muscular cuando ni la glicolisis ni la respiración están presentes transfiriendo un grupo fosfato de fosfocreatina a ADP para formar ATP. Existen cuatro isoformas conocidas de creatina quinasa: creatina quinasa cerebral (CKB), creatina quinasa muscular (MCK), y dos formas mitocondriales (CKMi). MCK es el mRNA no mitocondrial más abundante que se expresa en todos los tipos de fibras de músculo esquelético, y es también muy activa en el músculo cardíaco. El gen MCK no se expresa en los mioblastos, pero se activa transcripcionalmente cuando los mioblastos adquieren una diferenciación terminal hasta miocitos. Las regiones reguladoras del gen MCK muestran una actividad específica del músculo estriado, y se han caracterizado exhaustivamente in vivo e in vitro. Los elementos reguladores de MCK de mamífero se describen, por ejemplo, en Hauser et al., Mol. Therapy 2000, 2:16-25 y en Souza et al., 2011. En la presente memoria se proporcionan secuencias potenciadoras y promotoras de MCK.

La presente descripción incluye además el uso de elementos reguladores de troponina, especialmente troponina cardíaca.

30 La presente descripción incluye además el uso de combinaciones de elementos para formar, por ejemplo, elementos reguladores quiméricos. La presente descripción se dirige a transgenes recombinantes que comprenden uno o más de los elementos reguladores específicos de tejido descritos en la presente memoria. Los elementos reguladores específicos de tejido quiméricos de la presente descripción controlan la expresión de transgenes en las células musculares. En un ejemplo, la célula muscular es una célula muscular esquelética. En un ejemplo, la célula muscular es un cardiomiocito. Los transgenes se pueden insertar en vectores virales o no virales recombinantes para dirigir la expresión de las secuencias de ADN codificantes asociadas al músculo. En un ejemplo, el vector viral es un AAV. En un ejemplo, el elemento promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor de creatina quinasa muscular (MCK), promotor de desmina, y promotor de troponina T cardíaca. En un ejemplo particular, el promotor es un promotor humano. En otro ejemplo, el promotor es un promotor murino. En otro ejemplo, el promotor es un promotor de pollo. En ciertos ejemplos, el promotor está truncado. Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que no es necesario usar el promotor completo en todos los casos, y que se puede mantener la actividad cuando se delecionan o añaden algunos nucleótidos.

45 En un ejemplo, un elemento regulador de la presente descripción comprende al menos un potenciador de MCK unido de manera operable a un promotor de DES o un promotor de MCK o un promotor de troponina T cardíaca. En otro ejemplo, el elemento regulador comprende al menos dos potenciadores de MCK unidos a un promotor de MCK o un promotor de DES o un promotor de troponina T cardíaca. En otro ejemplo, un elemento regulador comprende al menos dos potenciadores de DES unidos a un promotor de DES. En otro ejemplo, un elemento regulador comprende al menos dos potenciadores de troponina T cardíaca unidos a un promotor de troponina T cardíaca. En un ejemplo, el potenciador de MCK comprende la secuencia de SEQ ID N°:15 o un fragmento activo o modificación de la misma.

50 Se entenderá que los elementos reguladores de la presente descripción no se limitan a las secuencias específicas a las que se hace referencia en la memoria descriptiva, sino que también abarcan sus análogos/homólogos estructurales y funcionales y los fragmentos funcionales de los mismos. Tales análogos pueden contener truncamientos, delecciones, inserciones, así como sustituciones de uno o más nucleótidos introducidos mediante mutagénesis dirigida o aleatoria. Se pueden introducir truncamientos para deleccionar uno o más sitios de unión de represores transcripcionales conocidos. Además, tales secuencias se pueden obtener a partir de secuencias halladas en la naturaleza que exhiben un grado elevado de identidad respecto de las secuencias de la descripción. En un ejemplo, se considerará que un ácido nucleico de 20 nt o más tiene un grado elevado de identidad respecto de una secuencia promotora/potenciadora de la descripción si hibrida con tal secuencia promotora/potenciadora en

condiciones rigurosas. De manera alternativa, se considerará que un ácido nucleico tiene un grado elevado de identidad respecto de una secuencia promotora/potenciadora de la invención si comprende una secuencia contigua de al menos 20 nt, que tiene una identidad en porcentaje de al menos un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o más tal como se determina mediante los algoritmos de alineación habituales tales como, por ejemplo, la herramienta de alineación local básica (BLAST) descrita en Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410, el algoritmo de Needleman et al., J. Mol. Biol. 1970, 48: 444-453, o el algoritmo de Meyers et al., Comput. Appl. Biosci. 1988, 4: 11-17. Los ejemplos de análogos, p.ej., secuencias promotoras homólogas y secuencias potenciadoras homólogas derivadas de diversas especies, se describen en la presente descripción.

La presente descripción incluye además vectores que comprenden un elemento regulador de la invención. En general, no hay limitaciones conocidas sobre el uso de los elementos reguladores de la descripción en ningún vector. Un elemento regulador comprende un elemento promotor y opcionalmente un elemento potenciador.

Se puede usar un antagonista de mir-93. En un ejemplo, el antagonista es un oligonucleótido inverso o un antagonir. En un aspecto, el oligonucleótido inverso comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia madura de miR-93.

Los vectores de expresión de miARN se conocen en la técnica, por ejemplo, de: Cell Biolabs (RAPAd® miRNA Adenoviral Expression System, nº de cat. VPK-253; pMXs-miR-GFP/Puro Retroviral Expression Vector, nº de Cat. RTV-017; miRNASelect™ pEGP-miR Cloning & Expression Vector, nº de cat. MIR-EXP-GP-C; miRNASelect™ pEP-miR Cloning & Expression Vector, nº de cat. MIR-EXP-C); sistemas de lentivectores de SBI (System Biosciences); Clontech; plásmido MicroRNA eXpression de Origene para la sobreexpresión de miARNs de elección (nºs SC410001 y SC410002); Life Technologies/Ambion (múltiples vectores, lo que incluye el control de miARNs).

Los ácidos nucleicos útiles en la presente descripción incluyen oligonucleótidos y polinucleótidos tales como ADN y/o ARNs inversos; ribozimas; ADN para terapia génica; fragmentos virales que incluyen ADN y/o ARN viral; quimeras de ADN y/o ARN; mARN; plásmidos; cósmidos; ADN genómico; cADN; fragmentos de genes; diversas formas estructurales de ADN que incluyen ADN monocatenario, ADN bicatenario, ADN superenrollado y/o ADN de triple hélice; Z-ADN; miARN, y siARN. Los ácidos nucleicos se pueden preparar mediante cualquier medio convencional usado en general para preparar ácidos nucleicos en gran cantidad. Por ejemplo, los ADN y ARNs se pueden sintetizar químicamente mediante el uso de reactivos y sintetizadores comercialmente disponibles mediante métodos que son muy conocidos en la técnica (véase, p.ej., Gait, 1985, OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, Oxford, Inglaterra)). Los ARNs se pueden producir con un rendimiento elevado por medio de transcripción in vitro mediante el uso de plásmidos tales como SP65 (Promega Corporation, Madison, WI).

Los miARNs son moléculas de ARN de una longitud de alrededor de 22 nucleótidos o menos, pero tienen una longitud variable. Estas moléculas son reguladores postranscripcionales que se unen a las secuencias complementarias de los mARNs objetivo. Aunque en general se descubre que las moléculas de miARN son estables cuando están asociadas al suero sanguíneo y sus componentes después de un tratamiento con EDTA, la introducción de ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) en los miARNs por medio de PCR incrementa adicionalmente la estabilidad de los miARNs. Los LNAs son una clase de análogos de ácido nucleico en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" mediante un puente metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C del anillo de ribosa, lo que incrementa la afinidad de la molécula por otras moléculas. En una realización, se puede usar un oligómero anti-miARN dirigido hacia miR-93. Véase la sol. de pat. de EE.UU. nº 13/503189, el documento WO2007/112754, y el documento WO2007/112653 para las descripciones adicionales de oligómeros, oligómeros de ácidos nucleicos bloqueados, GapmeRs, mixmers, totalmers, etc. En un aspecto, se puede adquirir un anti-miR-93.

La presente descripción también se dirige a los métodos de administración de los compuestos, células, proteínas y péptidos (denominados colectivamente compuestos) de la descripción a un sujeto.

En un ejemplo, el ácido nucleico es una molécula inversa, un oligonucleótido, un ARN, un siARN, y un miARN.

Aunque en general se descubre que las moléculas de miARN son estables cuando están asociadas al suero sanguíneo y sus componentes después de un tratamiento con EDTA, la introducción de ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) en los miARNs por medio de PCR incrementa adicionalmente la estabilidad de los miARNs. Los LNAs son una clase de análogos de ácido nucleico en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" mediante un puente metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C del anillo de ribosa, lo que incrementa la afinidad de la molécula por otras moléculas.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los presentes compuestos se administran a un individuo que lo necesita mediante cualquier número de vías que transportan de manera eficaz el compuesto activo al sitio adecuado o deseado de acción, lo que incluye, pero sin limitación, los medios tópicos, orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, parenterales, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales, pulmonares, bucales, vaginales, o rectales.

La presente invención también se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden los polinucleótidos/ácidos nucleicos de la presente invención. Más en particular, tales compuestos se pueden formular como composiciones farmacéuticas mediante el uso de vehículos farmacéuticamente aceptables habituales, rellenos, agentes solubilizantes y estabilizantes conocidos para los expertos en la técnica.

- 5 La presente descripción también abarca el uso de composiciones farmacéuticas de un compuesto adecuado, homólogo, fragmento, análogo, o derivado del mismo para poner en práctica los métodos de la presente descripción, y la composición comprende al menos un compuesto adecuado, homólogo, fragmento, análogo, o derivado del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar para proporcionar una dosis de ácido nucleico o agente terapéutico adicional de entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día. Las composiciones farmacéuticas para el uso según la invención y útiles en los métodos de la descripción se pueden administrar de manera sistémica en formulaciones sólidas orales, formulaciones oftálmicas, supositorios, en aerosol, tópicas u otras similares. Además del compuesto adecuado, tales composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes conocidos para incrementar y facilitar la administración de fármacos. Otras posibles formulaciones, tales como nanopartículas, liposomas, eritrocitos liberados, y sistemas inmunológicos se pueden usar también para administrar un compuesto adecuado según los métodos descritos en la presente memoria.

- 20 Los compuestos que se identifican mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria se pueden formular y administrar a un sujeto para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente memoria.

- 25 La presente descripción describe la preparación y el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto útil para el tratamiento de las afecciones, trastornos, y enfermedades descritas en la presente memoria como ingrediente activo. Tal composición farmacéutica puede consistir en el ingrediente activo solo, en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el ingrediente activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, uno o más ingredientes adicionales, o cierta combinación de los mismos. El ingrediente activo puede estar presente en la composición farmacéutica en forma de un éster o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, como se conoce bien en la técnica.

- 30 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado a continuación en la técnica de la farmacología. En general, tales métodos preparativos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con un vehículo o uno o más ingredientes secundarios adicionales, y después, si es necesario o deseable, dar forma o envasar el producto en una unidad de dosis unitaria o multidosis deseada.

- 35 Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se dirigen principalmente a las composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a seres humanos, el técnico experto entenderá que tales composiciones son adecuadas en general para la administración a animales de todo tipo. La modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a seres humanos para hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a diversos animales se comprende bien, y el farmacólogo veterinario de experiencia habitual puede diseñar y llevar a cabo tal modificación con una experimentación simplemente habitual, si es necesario.

- 40 Los sujetos para los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, pero sin limitación, los seres humanos y otros primates, mamíferos que incluyen los mamíferos comercialmente relevantes tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos, y perros, aves que incluyen las aves comercialmente relevantes tales como pollos, patos, gansos, y pavos.

- 45 Las composiciones farmacéuticas para el uso según la invención y útiles en los métodos de la presente descripción se pueden preparar, envasar, o vender en formulaciones adecuadas para la vía oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal u otra vía de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen las nanopartículas proyectadas, preparaciones liposómicas, eritrocitos liberados que contienen el ingrediente activo, y formulaciones inmunológicas.

- 50 Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar, o vender a granel, en forma de una dosis unitaria única, o en forma de una diversidad de dosis unitarias únicas. Tal como se usa en la presente memoria, un "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosis del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción adecuada de tal dosis tal como, por ejemplo, un medio o un tercio de tal dosis.

- 55 Las cantidades relativas del ingrediente activo, del vehículo farmacéuticamente aceptable, y de cualquier ingrediente

adicional en una composición farmacéutica de la invención variará, dependiendo de la identidad, el tamaño, y la afección del sujeto tratado, y además dependiendo de la vía mediante la que se va a administrar la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre un 0,1% y un 100% (p/p) de ingrediente activo.

5 Además del ingrediente activo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más agentes farmacéuticamente activos adicionales. Los agentes adicionales especialmente contemplados incluyen anti-eméticos y depuradores, tales como depuradores de cianuro y cianato.

10 Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención se pueden producir mediante el uso de la tecnología convencional. Una formulación de una composición farmacéutica de la invención adecuada para administración oral se puede preparar, envasar, o vender en forma de una dosis unitaria sólida discreta que incluye un comprimido, una cápsula dura o blanda, un oblea, un trocisco, o una pastilla, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo. Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero sin limitación, una formulación pulverizada o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una solución acuosa u oleosa, o una emulsión.

15 Tal como se usa en la presente memoria, un líquido "oleoso" es uno que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que exhibe un carácter menos polar que el agua.

Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la invención que son adecuadas para administración oral se pueden preparar, envasar, y vender en forma de líquido o en forma de un producto seco destinado a la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso.

20 Se pueden preparar suspensiones líquidas mediante el uso de métodos convencionales para llevar a cabo la suspensión del ingrediente activo en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo, o coco, aceites vegetales fraccionados, y aceites minerales tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero sin limitación, agentes de suspensión, dispersantes o agentes humectantes, agentes emulsionantes, emolientes, conservantes, tampones, sales, aromas, agentes colorantes, y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender además un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero sin limitación, jarabe de sorbitol, grasas comestibles hidrogenadas, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma arábiga, y derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa.

30 Los agentes dispersantes o humectantes conocidos incluyen, pero sin limitación, fosfátidos naturales tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (p.ej. estearato de polioxietileno, heptadecaetilenoxicetanol, monooleato de polioxietileno sorbitol, y monooleato de polioxietileno sorbitán, respectivamente).

35 Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero sin limitación, lecitina y goma arábiga. Los conservantes conocidos incluyen, pero sin limitación, para-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, o n-propilo, ácido ascórbico, y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propileno glicol, sorbitol, sacarosa, y sacarina. Los agentes espesantes conocidos para las suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura, y alcohol cetílico.

40 Las disoluciones líquidas del ingrediente activo en disolventes acuosos u oleosos se pueden preparar sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, y la diferencia principal es que el ingrediente activo se disuelve, en vez de suspenderse en el disolvente. Las disoluciones líquidas de la composición farmacéutica de la invención pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, y se entiende que los agentes de suspensión no ayudarán necesariamente a la disolución del ingrediente activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo, o coco, aceites vegetales fraccionados, y aceites minerales tales como parafina líquida.

50 Una composición de la presente descripción puede comprender ingredientes adicionales. Tal como se usa en la presente memoria, los "ingredientes adicionales" incluyen, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; rellenos; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención se

conocen en la técnica y se describen, por ejemplo en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

5 La composición farmacéutica se puede administrar a un animal con una frecuencia de varias veces al día, o se puede administrar con menos frecuencia, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso con menos frecuencia, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para el técnico experto, y dependerá de cualquier número de factores, tales como, pero sin limitación, el tipo y la gravedad de la afección o enfermedad a tratar, el tipo y la edad del animal, etc.

10 En otras realizaciones, se pueden usar agentes terapéuticos, que incluyen, pero sin limitación, agentes citotóxicos, agentes anti-angiogénicos, agentes pro-apoptóticos, antibióticos, hormonas, antagonistas de hormonas, quimiocinas, fármacos, profármacos, toxinas, enzimas u otros agentes como terapias complementarias.

Agentes e Ingredientes Terapéuticos Adicionales

15 La composición de la presente descripción puede comprender además aditivos terapéuticos adicionales, solos o en combinación (p.ej., 2, 3, o 4 aditivos adicionales). Los ejemplos de aditivos adicionales incluyen, pero sin limitación: (a) antimicrobianos, (b) esteroides (p.ej., hidrocortisona, triamcinolona); (c) medicaciones para el dolor (p.ej., aspirina, un AINE, y un anestésico local); (d) agentes anti-inflamatorios; (e) factores de crecimiento; (f) citocinas; (g) hormonas; y (h) combinaciones de los mismos.

20 En un ejemplo, una formulación de la descripción contiene un agente antimicrobiano. El agente antimicrobiano se puede proporcionar, por ejemplo, en una cantidad terapéuticamente eficaz habitual. Una cantidad terapéuticamente eficaz habitual es una cantidad que usa en general alguien de experiencia habitual en la técnica o una cantidad aprobada por una agencia reguladora (p.ej., la FDA o su homóloga europea). Los agentes antimicrobianos útiles en la presente memoria incluyen los dirigidos contra el espectro de organismos gram-positivos, organismos gram-negativos, hongos, y virus.

25 Según el ejemplo de anestésico tópico de la presente descripción, los agentes anestésicos locales adecuados que tienen un punto de fusión de 30° a 70 °C son prilocaína, tetracaína, butanilcaína, trimecaína, benzocaína, lidocaína, bupivocaína, dibucaína, mepivocaína, y etidocaína.

La presente descripción también describe el uso de al menos dos anestésicos.

30 La composición de anestésico local puede comprender además aditivos adecuados, tales como un pigmento, un colorante, un anti-oxidante, un estabilizante o un perfume, con tal de que la adición de tal aditivo no destruya la fase simple de la composición de anestésico.

35 En un ejemplo, la mezcla de anestésico local hidratado se prepara fundiendo el anestésico local con el mayor punto de fusión de los dos, seguido de la adición del otro anestésico local, con mezcla mecánica vigorosa, tal como trituración o molienda. Se forma un líquido viscoso lechoso, en cuyo momento se añade el tensioactivo con más mezcla mecánica. La mezcla del tensioactivo produce un líquido lechoso de viscosidad algo inferior. Finalmente, el equilibrio de agua se añade con mezcla mecánica enérgica. El material se puede transferir después a un recipiente hermético, tras lo cual se obtiene una composición clara tras alrededor de 60 minutos a temperatura ambiente.

40 De manera alternativa, la mezcla de anestésico local hidratado se puede preparar fundiendo primero el anestésico local de bajo punto de fusión, seguido de la adición del otro anestésico local, con mezcla mecánica enérgica, y después la adición del tensioactivo y el agua como antes. Sin embargo, cuando el anestésico local de punto de fusión más bajo se funde primero, el tiempo de almacenamiento necesario para obtener la composición de fase simple se incrementa de alrededor de 1 hora a alrededor de 72 horas. Por lo tanto, se prefiere el primer método.

Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que existen múltiples tensioactivos adecuados útiles para preparar el anestésico tópico hidratado de la presente descripción. Por ejemplo, los anestésicos tópicos hidratados de fase simple se pueden preparar a partir de tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos.

45 Varios ejemplos preferidos incluyen el uso de cualquier molécula terapéutica, lo que incluye cualquier producto farmacéutico o fármaco. Los ejemplos de productos farmacéuticos incluyen fármacos anestésicos, hipnóticos, sedantes e inductores del sueño, antipsicóticos, antidepresivos, antialérgicos, antianginosos, antiartríticos, antiasmáticos, antidiabéticos, antidiarreicos, anticonvulsivos, antigotosos, antihistamínicos, antipruríticos, eméticos, antieméticos, antiespasmódicos, inhibidores del apetito, sustancias neuroactivas, agonistas de neurotransmisores, antagonistas, bloqueantes de receptores y moduladores de la reabsorción, bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes de canales de calcio, disulfiram y fármacos similares a disulfiram, relajantes musculares, analgésicos, antipiréticos, estimulantes, agentes anticolinesterasa, agentes parasimpatomiméticos, hormonas, anticoagulantes, antitrombóticos, trombolíticos, inmunoglobulinas, inmunosupresores, agonistas/antagonistas de hormonas, vitaminas, agentes antimicrobianos, antineoplásicos, antiácidos, digestivos, laxantes, purgantes, antisépticos,

50

diuréticos, desinfectantes, fungicidas, ectoparasiticidas, antiparasitarios, metales pesados, antagonistas de metales pesados, agentes quelantes, gases y vapores, alcaloides, sales, iones, autacoides, digitalis, glucósidos cardiacos, antiarrítmicos, antihipertensivos, vasodilatadores, vasoconstrictores, antimuscarínicos, agentes estimulantes gangliónicos, agentes bloqueantes gangliónicos, agentes bloqueantes neuromusculares, inhibidores de nervios adrenérgicos, antioxidantes, vitaminas, cosméticos, anti-inflamatorios, productos de cuidado de heridas, agentes antitrombogénicos, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, anestésicos, agentes antigénicos, agentes cicatrizantes de heridas, extractos vegetales, factores de crecimiento, emolientes, humectantes, fármacos contra el rechazo/anti-rechazo, espermicidas, acondicionadores, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivirales, antibióticos, tranquilizantes, fármacos reductores de colesterol, antitúxicos, fármacos bloqueantes de histamina, inhibidor de monoamina oxidasa. También se incluyen todas las sustancias enumeradas en la Farmacopea de EE.UU. en las sustancias de la presente descripción.

Más adelante se proporciona una lista de los tipos de fármacos y los fármacos específicos de las categorías que abarca la presente descripción.

Los agentes antimicrobianos incluyen: sulfadiazina de plata, Nistatina, Nistatina/triamcinolona, Bacitracina, nitrofurazona, nitrofurantoína, una polimixina (p.ej., Colistina, Surfactina, Polimixina E, y Polimixina B), doxiciclina, péptidos antimicrobianos (p.ej., de origen natural y sintético), Neosporina (es decir, Bacitracina, Polimixina B, y Neomicina), Polisporina (es decir, Bacitracina y Polimixina B). Los agentes antimicrobianos adicionales incluyen agentes antimicrobianos tópicos (es decir, antisépticos), cuyos ejemplos incluyen sales de plata, yodo, cloruro de benzalconio, alcohol, peróxido de hidrógeno, y clorhexidina.

Analgésico: Acetaminofeno; Hidrocloruro de Alfentanilo; Aminobenzoato Potásico; Aminobenzoato Sódico; Anidoxima; Anileridina; Hidrocloruro de Anileridina; Hidrocloruro de Anilopam; Anirolac; Antipirina; Aspirina; Benoxapofeno; Hidrocloruro de Benzidamina; Hidrocloruro de Bicifadina; Hidrocloruro de Brifentanilo; Maleato de Bromadolina; Bromfenac Sódico; Hidrocloruro de Buprenorfina; Butacetina; Butixirato; Butorfanol; Tartrato de Butorfanol; Carbamazepina; Carbaspirina Cálcica; Hidrocloruro de Carbifeno; Citrato de Carfentanilo; Succinato de Ciprefadol; Ciramadol; Hidrocloruro de Ciramadol; Clonixerilo; Clonixina; Codeína; Fosfato de Codeína; Sulfato de Codeína; Hidrocloruro de Conorfona; Ciclazocina; Hidrocloruro de Dexoadrol; Dexpemedolac; Dezocina; Diflunisal; Bitartrato de Dihidrocodeína; Dimefadano; Dipirona; Hidrocloruro de Doxpicomina; Drinideno; Hidrocloruro de Enadolina; Epirizol; Tartrato de Ergotamina; Hidrocloruro de Etoxazeno; Etofenamato; Eugenol; Fenoprofeno; Fenoprofeno Cálcico; Citrato de Fentanilo; Floctafenina; Flufenisal; Flunixina; Flunixina Meglumina; Maleato de Flupirtina; Fluprocuzona; Hidrocloruro de Fluradolina; Flurbiprofeno; Hidrocloruro de Hidromorfona; Ibufenac; Indoprofeno; Ketazocina; Ketorfanol; Cetorolac Trometamina; Hidrocloruro de Letimida; Acetato de Levometadilo; Hidrocloruro de Acetato de Levometadilo; Hidrocloruro de Levonantradol; Tartrato de Levorfanol; Hidrocloruro de Lofemizol; Oxalato de Lofentanilo; Lorcinadol; Lomoxicam; Salicilato Magnésico; Ácido Mefenámico; Hidrocloruro de Menabitan; Hidrocloruro de Meperidina; Hidrocloruro de Meptazinol; Hidrocloruro de Metadona; Acetato de Metadilo; Metofolina; Metotrimprazina; Acetato de Metcefamida; Hidrocloruro de Mimbano; Hidrocloruro de Mirfentanilo; Molinazona; Sulfato de Morfina; Moxazocina; Hidrocloruro de Nabitán; Hidrocloruro de Nalbufina; Hidrocloruro de Nalmexona; Namoxirato; Hidrocloruro de Nantradol; Naproxeno; Naproxeno Sódico; Naproxol; Hidrocloruro de Nefopam; Hidrocloruro de Nexeridina; Hidrocloruro de Noracimetadol; Hidrocloruro de Ocfentanilo; Octazamida; Olvanilo; Fumarato de Oxetorona; Oxycodona; Hidrocloruro de Oxycodona; Tereftalato de Oxycodona; Hidrocloruro de Oximorfona; Pemedolac; Pentamorfona; Pentazocina; Hidrocloruro de Pentazocina; Lactato de Pentazocina; Hidrocloruro de Fenazopiridina; Hidrocloruro de Feniramidol; Hidrocloruro de Picenadol; Pinadolina; Pifenidona; Olamina de Piroxicam; Maleato de Pravadolina; Hidrocloruro de Prodiilidina; Hidrocloruro de Profadol; Fumarato de Propirarn; Hidrocloruro de Propoxifeno; Napsilato de Propoxifeno; Proxazol; Citrato de Proxazol; Tartrato de Proxofano; Hidrocloruro de Pirrolifeno; Hidrocloruro de Remifentanilo; Salcolex; Maleato de Saletamida; Salicilamida; Salicilato de Meglumina; Salsalato; Salicilato Sódico; Mesilato de Espiradolina; Sufentanilo; Citrato de Sufentanilo; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Succinato de Tazadoleno; Tebufelona; Tetridamina; Tifurac Sódico; Hidrocloruro de Tilidina; Tiopinac; Mesilato de Tonazocina; Hidrocloruro de Tramadol; Hidrocloruro de Trefentanilo; Trolamina; Hidrocloruro de Veradolina; Hidrocloruro de Verilopam; Volazocina; Mesilato de Xorfanol; Hidrocloruro de Xilazina; Mesilato de Zenazocina; Zomepirac Sódico; Zucapsaicina.

Antihipertensivo: Hidrocloruro de Alfuzosina; Alipamida; Altiazida; Hidrocloruro de Amiquinsina; Besilato de Amlodipina; Maleato de Amlodipina; Acetato de Anaritida; Maleato de Atiprosina; Belfosdil; Bemitradina; Mesilato de Bendacalol; Bendroflumetiazida; Benztiiazida; Hidrocloruro de Betaxolol; Sulfato de Betanidina; Hidrocloruro de Bevantolol; Hidrocloruro de Biclodilo; Bisoprolol; Fumarato de Bisoprolol; Hidrocloruro de Bucindolol; Bupicomida; Butiazida; Candoxatril; Candoxatrilat; Captopril; Carvedilol; Ceronapril; Clorotiazida Sódica; Cicletanina; Cilazapril; Clonidina; Hidrocloruro de Clonidina; Clopamida; Ciclopentiazida; Ciclotiazida; Darodipina; Sulfato de Debrisoquina; Hidrocloruro de Delapril; Diapamida; Diazóxido; Hidrocloruro de Dilevalol; Malato de Diltiazem; Ditekiren; Mesilato de Doxazosina; Ecadotril; Maleato de Enalapril; Enalaprilat; Enalkiren; Mesilato de Endralazina; Epitiazida; Eprosartán; Mesilato de Eprosartán; Mesilato de Fenoldopam; Maleato de Flavodilol; Flordipina; Flosequinán; Fosinopril Sódico; Fosinoprilat; Guanabenz; Acetato de Guanabenz; Sulfato de Guanacina; Sulfato de Guanadrel; Guancidina; Monosulfato de Guanetidina; Sulfato de Guanetidina; Hidrocloruro de Guanfacina; Sulfato de Guanisoquina; Sulfato de Guanoclor; Hidrocloruro de Guanoctina; Guanoxabenz; Sulfato de Guanoxano; Sulfato de Guanoxifeno;

- Hidrocloruro de Hidralazina; Hidralazina Polistirex; Hidroflumetiazida; Indacrinona; Indapamida; Hidrocloruro de Indolaprif; Indoramina; Hidrocloruro de Indoramina; Hidrocloruro de Indorenato; Lacidipina; Leniquinsina; Levromakalim; Lisinopril; Hidrocloruro de Lofexidina; Losartán Potásico; Hidrocloruro de Losulazina; Mebutamato; Hidrocloruro de Mecamilamina; Medroxalol; Hidrocloruro de Medroxalol; Metaltiazida; Meticlotiazida; Metildopa; Hidrocloruro de Metildopato; Metipranolol; Metolazona; Fumarato de Metoprolol; Succinato de Metoprolol; Metirosina; Minoxidil; Maleato de Monatepil; Muzolimina; Nebivolol; Nitrendipina; Ofornina; Hidrocloruro de Pargilina; Pazóxido; Hidrocloruro de Pelanserina; Perindopril Erbumina; Hidrocloruro de Fenoxibenzamina; Pinacidil; Pivopril; Politiazida; Hidrocloruro de Prazosina; Primidolol; Hidrocloruro de Prizidilol; Hidrocloruro de Quinapril; Quinaprilat; Hidrocloruro de Quinazosina; Hidrocloruro de Quinelorano; Hidrocloruro de Quinpirol; Bromuro de Quinuclio; Ramipril; Rauwolfia Serpentina; Reserpina; Sapisartán Potásico; Acetato de Saralazina; Nitroprusiato Sódico; Hidrocloruro de Sulfinalol; Tasosartán; Hidrocloruro de Teludipina; Hidrocloruro de Temocapril; Hidrocloruro de Terazosina; Terlakiren; Tiamenidina; Hidrocloruro de Tiamenidina; Ticrinafeno; Tinabino; Tiodazosina; Hidrocloruro de Tipentosina; Triclorometiazida; Hidrocloruro de Trimazosina; Camsilato de Trimetafán; Hidrocloruro de Trimoxamina; Tripamida; Xipamida; Hidrocloruro de Zankiren; Zofenoprilat Arginina.
- 15 Anti-inflamatorio: Alclofenac; Dipropionato de Alclometasona; Acetonida de Algestona; Alfa Amilasa; Amcinafal; Amcinafida; Amfenac Sódico; Hidrocloruro de Amiprilosa; Anakinra; Anirolac; Anitrazafeno; Apazona; Balsalazida Disódica; Bendazac; Benoxaprofeno; Hidrocloruro de Benzidamina; Bromelaínas; Broperamol; Budesonida; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazona; Cliprofeno; Propionato de Clobetasol; Butirato de Clobetasona; Clopirac; Propionato de Cloticasona; Acetato de Cormetasona; Cortodoxona; Deflazacort; Desonida; Desoximetasona;
- 20 Dipropionato de Dexametasona; Diclofenac Potásico; Diclofenac Sódico; Diacetato de Diflorasona; Diflumidona Sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona; Sulfóxido de Dimetilo; Drocironida; Endrisona; Enlimomab; Enolicam Sódico; Epirizol; Etodolac; Etofenamato; Felbinac; Fenamol; Fenbufeno; Fenclofenac; Fenclorac; Fendosal; Fenpipalona; Fentiazac; Flazalona; Fluazacort; Ácido Flufenámico; Flumizol; Acetato de Flunisolida; Flunixina; Flunixina Meglumina; Fluocortina Butilo; Acetato de Fluorometolona; Flucuazona; Flurbiprofeno; Fluretofeno;
- 25 Propionato de Fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; Propionato de Halobetasol; Acetato de Halopredona; Ibufenac; Ibuprofeno; Ibuprofeno Aluminio; Ibuprofeno Piconol; Ilonidap; Indometacina; Indometacina Sódica; Indoprofeno; Indoxol; Intrazol; Acetato de Isoflupredona; Isoxepac; Isoxicam; Cetoprofeno; Hidrocloruro de Lofemizol; Lornoxicam; Etabonato de Loteprednol; Meclofenamato Sódico; Ácido Meclofenámico; Dibutirato de Meclorisona; Ácido Mefenámico; Mesalamina; Meseclazona; Suleptanato de Metilprednisolona; Momiflumato;
- 30 Nabumetona; Naproxeno; Naproxeno Sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina Sódica; Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprozina; Oxifenbutazona; Hidrocloruro de paranilina; Pentosano Polisulfato Sódico; Fenbutazona Glicerato Sódico; Pírfenidona; Piroxicam; Cinamato de piroxicam; Olamina de Piroxicam; Pirprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido Prodólico; Procuazona; Proxazol; Citrato de Proxazol; Rimexolona; Romazarit; Salcolex; Salmacedina; Salsalato; Cloruro de Sanguinarium; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindac; Suprofeno; Talmetacina;
- 35 Talniflumato; Talosalato; Tebufelona; Tenidap; Tenidap Sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinac; Pivalato de Tixocortol; Tolmetina; Tolmetina Sódica; Triclonida; Triflumidato; Zidometacina; Zomepirac Sódico.

Factores de Crecimiento

- En un ejemplo, se administra una cantidad eficaz de al menos un factor de crecimiento, citocina, hormona, o compuesto de la matriz extracelular o proteína útil para incrementar la cicatrización de heridas. En un ejemplo, se usa una combinación de estos agentes. En un ejemplo, los factores de crecimiento útiles en la práctica de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, EGF, PDGF, GCSF, IL6, IL8, IL10, MCP1, MCP2, Factor Tisular, FGFb, KGF, VEGF, PLGF, MMP1, MMP9, TIMP1, TIMP2, TGFβ, y HGF. Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que la elección del factor de crecimiento, citocina, hormona, o proteína de la matriz extracelular usada variará dependiendo de criterios tales como el tipo de lesión, la enfermedad, o el trastorno a tratar, la edad, la salud, el sexo, y el peso del sujeto, etc. En un ejemplo, los factores de crecimiento, citocinas, hormonas, y compuestos de la matriz extracelular y proteínas son humanos.

- Las proteínas y otros compuestos biológicamente activos que se pueden incorporar, o incluir como aditivo, en una composición que comprende los compuestos de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, colágeno (que incluye el colágeno reticulado), fibronectina, laminina, elastina (que incluye la elastina reticulada), osteopontina, osteonectina, sialoproteínas óseas (Bsp), alfa-2HS-glicoproteínas, Gla-proteína ósea (Bgp), Gla-proteína de la matriz, fosfoglicoproteína ósea, fosfoproteína ósea, proteoglicano óseo, protolípido, proteína morfogénica ósea, factor de inducción de cartilago, factor de crecimiento esquelético, enzimas, o combinaciones y fragmentos biológicamente activos de los mismos. También se pueden usar adyuvantes que disminuyen una respuesta inmunitaria junto con los compuestos de la presente descripción.

- Otras moléculas útiles como compuestos o sustancias de la presente descripción incluyen hormonas del crecimiento, leptina, factor inhibitorio de leucemia (LIF), factor de necrosis tumoral alfa y beta, endostatina, angiostatina, trombospondina, proteína osteogénica-1, proteínas morfogénicas óseas 2 y 7, osteonectina, péptido similar a somatomedina, osteocalcina, interferón alfa, interferón alfa A, interferón beta, interferón gamma, interferón 1 alfa, e interleucinas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17 y 18. Los ejemplos que implican aminoácidos, péptidos,

polipéptidos, y proteínas pueden incluir cualquier tipo de tales moléculas de cualquier tamaño y complejidad, así como combinaciones de tales moléculas.

Aunque se han llevado a cabo algunos experimentos representativos en animales experimentales, se esperan resultados similares en seres humanos. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente los parámetros exactos a usar para las inyecciones en seres humanos.

La invención se describe a continuación con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin una descripción adicional, se considera que alguien de experiencia habitual en la técnica puede producir y utilizar, mediante el uso de la descripción precedente y de los ejemplos ilustrativos siguientes, la presente invención, y poner en práctica los métodos descritos.

10 Ejemplos

Métodos

Modelo Murino de Isquemia de Extremidades Posteriores y Monitorización de la Recuperación de la Perfusión: Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidados Animales, y se ajustaron a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicado por el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. Después de inducir la anestesia (90 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilazina), se realizó una ligadura unilateral de la arteria femoral y una escisión en ratones C57B1/6J o BALB/cJ macho de 8-12 semanas de edad (número indicado para cada resultado experimental) como se describió previamente^{14, 15}. La recuperación de la perfusión se midió mediante el uso de formación de imágenes por láser Doppler (Perimed, Inc) en los días 0, 3, 7, 14, y 21 tras la cirugía. La perfusión en la extremidad isquémica se normalizó respecto de la extremidad no isquémica para cada ratón. Micro-matriz de Micro-ARN: Se recogieron los músculos gastrocnemios de ratones C57B1/6J y BALB/cJ (n=3/grupo) en el día 3 tras la cirugía. Se aisló el ARN mediante el uso de un protocolo de aislamiento del transcriptoma total con trizol y kits Pure Link RNA Mini siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA). El ARN se alicuotó en cantidades de 50 µg, y se hicieron matrices mediante el uso de chips de micro-ARN de Illumina que contenían 380 micro-ARNs de ratón (kit de perfil de expresión de micro-ARN V2; miRbase 9.1). Los micro-ARNs expresados de manera diferencial se clasificaron basándose en la regulación mediante una combinación de isquemia y cepa, o la regulación mediante la isquemia o la cepa solamente.

Micro-matriz de mRNA: Para las matrices de mRNA de ratón entre el tejido isquémico y no isquémico, se recogió el músculo gastrocnemio de ratones BALB/cJ (n=3/grupo) en el día 3 tras HLI. Se extrajo el ARN total mediante el uso de un protocolo de aislamiento de transcriptoma total con trizol. Después del control de calidad, los ARNs se alicuotaron en alícuotas de 50 µg, y se hicieron matrices mediante el uso del genoma de ratón Gene Chip 43-2.0. Para las matrices de mRNA de HUVEC, se aisló el ARN de HUVECs después de haber transfectado HUVECs con una secuencia inespecífica o anti-miR-93, y de haberlas incubado durante 24 horas en condiciones de hipoxia y privación de suero (total de 48 hrs tras la transfección). Se realizaron matrices mediante el uso de la plataforma Illumina Human 6 V 1. Se obtuvieron datos sin normalizar mediante el uso de Genome Studio de Illumina. Se realizó el control de calidad, el pre-procesamiento y la normalización de cuantiles mediante el uso de R¹⁶ y el paquete BeadArray¹⁷. El análisis de enriquecimiento en grupos de genes se realizó mediante el uso de GSEA¹⁸ V 2.0 de Broad Institute, con el uso de 100 permutaciones y un umbral de FDR <0,25.

Inactivación *in vivo* de miR-93: Se sintetizaron secuencias de antagomir-93 e inespecíficas siguiendo las modificaciones de nucleótidos descritas por Krutzfeldt et al.¹⁹. Las secuencias oligonucleotídicas fueron las siguientes: Antagomir-93: 5'-CUACCUGCACGAACAGCACUUUG-3' (SEQ ID N°:3). Secuencia inespecífica (Bonauer et al.⁸) 5'-AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU-3' (SEQ ID N°:4). Los oligonucleótidos se disolvieron en PBS y se inyectaron de manera retroorbital a una dosis de 8 mg/kg de peso corporal^{8,9}. Las inyecciones se administraron 30 minutos antes, y en los días 7 y 14 tras la HLI. Para la detección de la eficacia de la inactivación *in vivo*, se sacrificó un grupo diferente de ratones en los días 0 (n=3), 3 (n=6) y 7 (n=3), y se cuantificó la expresión de miR-93 mediante el uso de qPCR en tiempo real.

Sobreexpresión *in vivo* de miR-93: Se disolvió premiR-93 (n° de catálogo PM10951; secuencia madura CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG; SEQ ID N°:7) o controles negativos de molécula mimética de miR (secuencia inespecífica) (n° de cat. 4464058, Ambion, Austin, TX) en PBS, y se administró una dosis total de 300 µM de premiR-93 o control negativo a cada ratón de manera intramuscular inyectando en dos sitios del músculo gastrocnemio (100 µM en 25 µl en cada sitio), y un sitio en el músculo TA (100 µM en 25 µl). Este método se adaptó de Ge et al.²⁰. Las inyecciones se administraron en el día 0, 30 minutos antes de la cirugía. Para la detección de la eficacia y duración de la sobreexpresión de miR-93, se sacrificó un grupo diferente de ratones en los días 4 y 10 (n=3/punto de tiempo), y se cuantificó la expresión de miR-93 en el músculo gastrocnemio mediante el uso de PCR en tiempo real.

Estadísticas: Se realizó el análisis estadístico mediante el uso del programa informático GraphPad Prism. Se usó la prueba t para datos independientes para comparar entre dos grupos, y se realizó la comparación en experimentos que contuvieron tres o más grupos mediante el uso de ANOVA unidireccional y prueba post hoc de Tukey. La significación estadística se ajustó a un valor de p <0,05. Para el análisis de una micro-matriz de micro-ARN, los

datos normalizados se ajustaron a un modelo lineal por genotipo y tratamiento. La significación de estos efectos se calculó con una prueba F (con un estimador de contracción de James-Stein) entre grupos en un diseño ANOVA factorial. Los valores de P se calcularon llevando a cabo 1000 permutaciones de muestras para romper la asociación a los valores de expresión, y se corrigieron para múltiples comparaciones mediante transformación adaptativa con la tasa de falsos descubrimientos (FDR).

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Métodos Suplementarios:

Cultivo Celular: Se adquirieron HUVECs mezcladas (Cell Applications Inc, San Diego, CA), y se cultivaron en medio de cultivo de células endoteliales estándar con un 10% de FBS (Cell Applications Inc, San Diego, CA). Las células C2C12 se cultivaron en DMEM con un 10% de FBS. Para los estudios de transfección *in vitro*, se usó un protocolo de transfección inverso mediante el uso del agente de transfección NeoFX (Ambion, Austin, TX). Se adquirió anti-miR-93 (MH10951), control negativo inhibidor de miARN (nº de cat. 44640760), premiR-93 (PM10951) o control negativo mimético de miARN (nº de cat. 4464058) de Ambion, Austin, TX. Los experimentos de respuesta a dosis inicial se realizaron con HUVECs y células C2C12 para determinar la dosis y la evolución a lo largo del tiempo para la inactivación eficaz de miR-93. Basándose en estos experimentos, se usó una dosis de 15 nM de anti-miR-93 o premiR-93 y sus controles respectivos para inactivar o sobreexpresar miR-93 en HUVECs. Para C2C12, se usó una dosis de 120 nM para anti-miR-93 o premiR-93 y sus controles respectivos. Se realizaron ensayos de proliferación celular, formación de túbulos y apoptosis 48 horas tras la transfección.

Apoptosis Celular: Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo para HUVECs, y para las células C2C12 se colocaron en placas a una densidad de $0,5 \times 10^4$ (para premiR-93 frente a secuencia inespecífica) o 1×10^5 (secuencia inespecífica frente a AntimiR93). Después de 24 horas de transfección, las células moduladas por miR-93 se expusieron a hipoxia (2% de oxígeno, BioSpherix, Lacona, NY) y privación de suero (HSS) para simular la isquemia *in vitro*. Las HUVECs se expusieron a 48 horas de HSS, mientras las células C2C12 se expusieron a 3 horas de HSS. Se seleccionó un tiempo de exposición más corto a HSS para las células C2C12 basándose en experimentos preliminares, que mostraron que las células C2C12 muestran una muerte celular significativa al aumentar la duración de HSS. Al final de la incubación, se determinó la apoptosis en las células mediante el uso de un ensayo TUNEL (TiterTACS, Trevigen Gaithersburg, MD). Los pocillos tratados con TACS nucleasa se usaron como control positivo, mientras los pocillos sin adición de TdT se usaron como controles negativos. Cada experimento se repitió al menos tres veces.

Proliferación Celular: Las células se colocaron en una placa de 96 pocillos a una densidad celular de 5×10^3 células/pocillo para HUVECs y a una densidad de $0,5 \times 10^3$ (para premiR-93 frente a secuencia inespecífica) o 1×10^3 (secuencia inespecífica frente a AntimiR93) para las células C2C12. Se analizó la proliferación celular 48 y 72 horas tras la colocación en las placas mediante el uso de la incorporación del colorante tetrazolio (BioVision, Milpitas, CA), y realizando recuentos celulares manuales tras la tinción con azul tripán para excluir las células muertas. Los experimentos se repitieron tres veces.

Ensayo de Angiogénesis *In vitro*: Después de 48 horas de la transfección, las HUVECs moduladas con miR-93 se colocaron en placas de Matrigel para estudiar la formación de túbulos. Las células transfectadas con premiR-93 o con secuencia inespecífica se colocaron en placas de matrigel de contenido reducido de factor de crecimiento (nº de cat. 356231, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad celular de 30.000 células/pocillo en una placa de 48 pocillos, y las células se cultivaron en condiciones de medio de cultivo bajo en suero del 0% o 5% (Life Technologies, NY). De forma similar, se colocaron en placas células transfectadas con anti-miR-93 o secuencia inespecífica con matrigel enriquecido en factor de crecimiento (nº de cat. 356234, BD Biosciences, Bedford, MA), y se cultivaron en condiciones de mezcla del 0% o 5% de factores de crecimiento de células endoteliales (EGM CC-3124, Lonza, Allendale, NJ). Se estudió la formación de túbulos de células endoteliales 6 horas tras la colocación en las placas. Cada condición se realizó por triplicado. Se tomaron cuatro fotografías representativas de cada pocillo con un aumento 100X, y se contó el número total de túbulos completos y se expresó como el número de túbulos por mm cuadrado.

Densidad de Capilares: Para la determinación de la densidad de capilares, 21 días tras HLI, los músculos gastrocnemios isquémicos de los ratones BALB/cJ tratados con premiR-93 y secuencia inespecífica se congelaron rápidamente en compuesto OCT y se cortaron con un grosor de 7 μ m. Los cortes se bloquearon primero con un 5% de suero de cabra normal, y después se incubaron con anticuerpo anti-CD31 de rata (1:25, BD Biosciences, nº de cat. 550274) a 4 °C durante la noche. Los cortes se lavaron después con PBS y se les añadió una sonda de IgG anti-rata de cabra conjugado a Alexa-555 a una dilución 1:25 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con PBS y se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector Lab, Burlingame, CA). Se usó solamente un anticuerpo secundario sin anticuerpo primario como control negativo para estudiar la unión inespecífica. Se tomaron tres fotografías representativas de cada corte a un aumento de 400X, mediante el uso de un microscopio de gran aumento Olympus BX51. Se contó el número total de puntos positivos para CD31/campo y el número total de fibra muscular/campo, y los capilares se expresaron como puntos positivos para CD31/fibra muscular.

Resultados

El micro-ARN-93 está regulado de manera diferencial en el músculo de las extremidades posteriores isquémicas de los ratones C57BL/6J frente a los ratones BALB/cJ tras la isquemia de las extremidades posteriores. A partir de una micro-matriz de micro-ARN inicial, se usó un análisis comparativo del perfil de micro-ARN y se identificó que el miR-106b y el miR-93 fueron los dos micro-ARNs cuya expresión mostró la interacción más significativa estadísticamente con la cepa y la isquemia combinadas (valores de p nominales de 0,007 y 0,008 respectivamente). Después se midió la expresión de miR-93 y miR-106b mediante el uso de PCR en tiempo real. En comparación con los ratones BALB/cJ, los ratones C57BL/6J mostraron un nivel mayor de expresión de miR-93 en el músculo no isquémico (Figura 1a). Aunque las diferencias en los niveles de miR-106b fueron direccionalmente similares, no fueron estadísticamente diferentes (Figura 1b). En los puntos temporales tras HLI, la expresión de miR-93 en el músculo de las extremidades posteriores se incrementó ~5 veces en el día 3 (un punto temporal en el que la recuperación de la perfusión fue comparable entre las cepas), y siguió estando elevada ~3 veces en el día 7 tras la cirugía en el músculo de los ratones C57BL/6J, mientras los ratones BALB/cJ no mostraron este incremento de miR-93 en el músculo isquémico/no isquémico (Figura 1c). Así, la cepa con mejor recuperación de la perfusión tuvo un mayor nivel de miR-93 antes de la isquemia, y una mayor estimulación de miR-93 tras HLI.

De manera interesante, tanto miR-106b como miR-93 se transcriben en forma de un único pre-micro-ARN a partir del intrón 13 del gen MCM-7. Por lo tanto, se midió la expresión de MCM-7 mediante el uso de PCR en tiempo real. En el músculo no isquémico, los niveles de mRNA de MCM-7 fueron mayores en los ratones C57BL/6J en comparación con BALB/cJ (expresión relativa de C57BL/6J frente a BALB/cJ: $1,02 \pm 0,11$ frente a $0,69 \pm 0,08$; $p=0,04$; media \pm EEM $n=5$ /grupo). En el día 3 tras HLI, hubo un incremento significativo en los niveles de MCM-7 en los músculos isquémicos de los ratones C57BL/6J (expresión relativa, no isquémica frente a isquémica: $1,11 \pm 0,32$ frente a $3,87 \pm 0,95$; media \pm EEM $p=0,04$; $n=4$ /grupo). Aunque la expresión de MCM-7 en el tejido de ratones BALB/cJ no isquémico frente a isquémico fue direccionalmente similar, no fue significativamente diferente (expresión relativa, no isquémico frente a isquémico: $1,04 \pm 0,2$ frente a $2,31 \pm 0,78$; media \pm EEM $p=ns$; $n=4$ /grupo). El patrón de expresión de MCM-7 en los ratones C57BL/6J y BALB/cJ fue paralelo a la expresión de miR-93, lo que indica la co-regulación del agrupamiento miR-106b-25 con su gen hospedador. También se comprobó la expresión de miR-26b, otro micro-ARN que no estaba regulado de manera diferencial por cepa o isquemia, en base a los resultados de la micro-matriz. La PCR cuantitativa no mostró ninguna diferencia en los niveles de miR-26b entre los ratones C57BL/6J y BALB/cJ (Figura Suplementaria 1). La lista de los micro-ARNs basándose en la significación estadística de la expresión diferencial (valores de p) entre las cepas en ausencia de isquemia y aquellas que mostraron el mayor cambio diferencial con la isquemia se muestran en la Tabla Suplementaria 1.

Un papel para el micro-ARN-93 en células *in vitro*: en ausencia de lesión y en respuesta a la hipoxia y la privación de suero (HSS). Se estudiaron HUVECs como células endoteliales representativas, y C2C12 (una línea inmortalizada de células musculares de ratón) como células musculares esqueléticas representativas. Se descubrió que miR-93 se expresó en ambos tipos de células, y tras HSS, miR-93 se estimula en ambos tipos de células (Figura 2a). Para identificar un papel directo de miR-93 en respuesta a la lesión hipóxica, se sobreexpresó o inactivó miR-93 en HUVECs y células C2C12. Se usaron secuencias antimir inespecíficas o miméticas de miR inespecíficas como controles para los experimentos de inactivación o sobreexpresión, respectivamente. La transfección de antimir-93 redujo la expresión de miR-93 en un ~80% en HUVECs y en un ~60% en las células C2C12 (Figura Suplementaria 2, a-b). La transfección de premiR-93 dio como resultado una sobreexpresión >100 veces de miR-93 en ambos tipos de células (Figura Suplementaria 2, c-d). Incluso en ausencia de lesión externa, la inactivación de miR-93 dio como resultado la estimulación de caspasa-9, un marcador de apoptosis tanto en HUVECs como en células C2C12 (Figura 2b). Tras HSS, la sobreexpresión de miR-93 atenuó la apoptosis, mientras la inactivación de miR-93 incrementó la apoptosis en las células endoteliales (Figura 2c) y C2C12 (Figura 2d). En conjunto, estos resultados indican que miR-93 media en la supervivencia celular en respuesta a HSS en las células endoteliales y en las células de músculo esquelético.

La sobreexpresión de miR-93 incrementa la proliferación celular y la formación de túbulos de células endoteliales. La respuesta angiogénica a la isquemia incluye la supervivencia, proliferación, y migración de las células endoteliales. Primero se investigaron los efectos de la sobreexpresión de miR-93 en la proliferación celular. La sobreexpresión de miR-93 mejoró la proliferación en las células endoteliales y C2C12 (Figura 2e). A continuación, se determinó el efecto de la sobreexpresión o inactivación de miR-93 sobre la formación de túbulos de células endoteliales en modelos de Matrigel. La sobreexpresión de miR-93 mejoró la formación de túbulos de células endoteliales (Figura 2f), mientras la inactivación de miR-93 atenuó la formación de túbulos de células endoteliales (Figura 2g). De manera interesante, e inesperada, este efecto fue independiente de los cambios en los niveles de VEGF en HUVECs con modulación con miR-93 (Figura Suplementaria 3). En conjunto, estos datos indican un papel pro-angiogénico de miR-93 *in vitro*.

El micro-ARN-93 regula múltiples genes en las células endoteliales y las células C2C12: Se ha demostrado previamente que el micro-ARN-93 selecciona como objetivo e inhibe los niveles de mRNA de varios genes que podrían desempeñar papeles importantes en la proliferación celular y en la recuperación de la isquemia de las extremidades posteriores, lo que incluye integrina-beta-8²¹, VEGF-A²², E2F-1, p21^{23,24}, y PTEN²⁵. Mediante el uso

de PCR cuantitativa en tiempo real, primero se investigaron los efectos de la modulación de miR-93 sobre la expresión de estos objetivos de mRNA conocidos de miR-93 en HUVECs y células C2C12 tratadas con HSS. Debido a que las HUVECs expresan niveles relativamente elevados de miR-93 y estos niveles se incrementan varias veces en respuesta a HSS (Figura 2a), se eligió inactivar miR-93 en HUVECs y sobreexpresar miR-93 en las células C2C12. La Tabla 1 resume estos resultados. En HUVECs con inactivación de miR-93, se incrementó la expresión de p21 y E2F-1, mientras los niveles de VEGF-A e Integrina-beta-8 no cambiaron. El resultado de VEGF-A fue inesperado, ya que Long et al. (22) demostró que miR-93 inhibió VEGF en sus estudios en condiciones hiperglucémicas. Esto sugiere además que el uso de un agonista de miR-93 no sería útil para tratar la EAP o la isquemia. A la inversa, en las células C2C12 con sobreexpresión de miR-93, los niveles de p21 y E2F-1 disminuyeron, mientras, de manera inesperada, los niveles de VEGF-A, PTEN, e integrina-beta-8 no cambiaron. Debido a que p21 y E2F-1 son componentes conocidos de la ruta del ciclo celular, se examinaron otros genes de esta ruta, que incluyeron MCM-7, TGFβ-1, y p53. Mientras p53 se estimuló en HUVECs con inactivación de miR-93, no cambió con la sobreexpresión en las células C2C12. MCM-7 y TGFβ-1, otros dos genes de la ruta del ciclo celular que también son objetivos predichos de miR-93 basándose en los modelos informáticos, no se vieron afectados por la modulación de miR-93 en ambos tipos de células. Acumulativamente, los datos indican que en dos tipos de células diferentes *in vitro*, miR-93 regula múltiples genes de la ruta del ciclo celular, lo que da como resultado cambios en la expresión génica que se espera que reduzcan la apoptosis e incrementen la proliferación celular.

La inhibición de miR-93 *in vivo* mediante el uso de un tratamiento con antagomir sistémico atenúa la recuperación de la perfusión de la isquemia de extremidades posteriores en los ratones C57Bl/6J: Los ratones C57Bl/6J se recuperan notablemente bien de HLI, mientras la respuesta en los ratones BALB/cJ es mucho peor. Los ratones C57Bl/6J también tienen niveles mayores de expresión de miR-93 en el músculo no isquémico, y muestran una expresión incrementada de miR-93 tras la isquemia. Para estudiar si miR-93 modula la respuesta a HLI, se trató a ratones C57Bl/6J con antagomir-93 sistémico. Se usaron ratones tratados con molécula inespecífica como controles. Una única inyección intravenosa de antagomir-93 administrada 30 minutos antes de la cirugía inhibió de manera eficaz la expresión de miR-93 comenzando en el día -1, y este efecto fue evidente incluso a los 7 días tras la inyección (Figura 3a). Este efecto fue selectivo hacia miR-93, ya que los niveles de otros dos micro-ARNs con una similitud de secuencia original hacia miR-93, miR-17 y miR-106b, no se vieron afectados significativamente (Figura Suplementaria 4, a-b). Se inyectó antagomir-93 o secuencias inespecíficas en los días 0, 7, y 14 de HLI, y se monitorizó la recuperación de la perfusión mediante el uso de formación de imágenes por Doppler. De manera coherente con el papel pro-angiogénico de miR-93 *in vitro*, los ratones tratados con antagomir-93 mostraron una recuperación de la perfusión dificultada comenzando en el día 14 tras HLI, en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica (Figura 3b). Estos resultados demuestran que la inhibición de miR-93 es eficaz para inhibir la recuperación de la perfusión.

La sobreexpresión de miR-93 en ratones BALB/cJ mejora la recuperación de la perfusión: Al compararlos con los ratones C57Bl/6J, los ratones BALB/cJ tienen una expresión inferior de miR-93 inicialmente, y no muestran un incremento de miR-93 tras HLI. Para investigar si la sobreexpresión de miR-93 tras HLI es suficiente para mejorar la perfusión, se sobreexpresó miR-93 en ratones BALB/cJ mediante el uso de inyecciones intramusculares locales de premiR-93 (molécula mimética de miR) y controles de secuencia inespecífica. La inyección intramuscular local de premiR-93 dio como resultado una sobreexpresión significativa de miR-93 que duró al menos hasta 10 días tras la inyección (Figura 3c). Como tal, se inyectó premiR-93 30 minutos antes de la inducción de HLI. Tras la isquemia de las extremidades posteriores, los ratones BALB/cJ con sobreexpresión de miR-93 mostraron una recuperación mejorada de la perfusión en comparación con los controles tratados con secuencia inespecífica (Figura 3d). De manera coherente con la recuperación mejorada de la perfusión, en el día 21 tras HLI, el músculo isquémico de los ratones tratados con premiR-93 mostró una densidad capilar mayor en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica (Figura 3e).

El efecto *in vivo* de miR-93 sobre la recuperación de la perfusión está mediado a través de la inhibición de múltiples genes de la ruta del ciclo celular. Primero se observó la expresión de p21, E2F-1, y p53 en el tejido muscular isquémico de ratones C57Bl/6J y BALB/cJ con modulación de miR-93. De forma coherente con los resultados *in vitro*, la inactivación de miR-93 en los ratones C57Bl/6J estimuló la expresión de p21 y p53 a nivel tanto del mRNA como de la proteína, mientras E2F-1 se estimuló solamente a nivel de la proteína (Figura 4, a-b). De forma coherente con estos hallazgos, la sobreexpresión de miR-93 en el músculo de extremidades posteriores isquémicas de los ratones BALB/cJ estuvo asociado a niveles disminuidos de p21, E2F-1 y p53 a nivel tanto del mRNA (Figura 4c) como de la proteína (Figura 4d) en comparación con el tratamiento con la secuencia inespecífica.

Para investigar otros genes/rutas potenciales que podrían desempeñar un papel en la mejora de la recuperación de la perfusión *in vivo* y podrían estar asociados a miR-93, primero se hizo una micro-matriz de mRNA de músculo isquémico frente a no isquémico de ratones BALB/cJ sin tratar. El análisis de enriquecimiento en grupos de genes (GSEA)¹⁸ de los resultados de la micro-matriz demostró que 847 rutas estuvieron estimuladas en el tejido isquémico de ratones BALB/cJ en comparación con el tejido no isquémico (la Tabla 2 muestra las veinte rutas más estimuladas en el tejido isquémico frente al no isquémico, BALB/cJ; FDR <0,25; lista completa en la Tabla Suplementaria 2). A continuación se analizó una micro-matriz de mRNA de HUVECs sometidas a HSS con una secuencia inespecífica frente a anti-miR-93, y se buscaron las rutas que se estimulan con la inactivación de miR-93. El análisis GSEA reveló

que 17 rutas estuvieron estimuladas (con FDR <0,25) en respuesta a la inactivación de miR-93 en HUVECs (Tabla 2). De manera interesante, la ruta del ciclo celular fue la única ruta común que se identificó que estuvo estimulada tanto en las HUVECs tratadas con antimir-93 como en el músculo isquémico de ratones BALB/cJ. La Figura 4e muestra el mapa térmico de los genes de la ruta del ciclo celular en el músculo isquémico frente al no isquémico de los ratones BALB/cJ sin tratar, con p21, p53, y E2F-1 estimulados en el músculo isquémico frente al no isquémico. Cuando miR-93 se sobreexpresó en los ratones BALB/cJ, los tres genes se inhibieron en comparación con los ratones tratados con secuencia inespecífica (Figura 4, c-d). A la inversa, cuando se inactivó miR-93 en los ratones C57Bl/6J, se estimuló p21, E2F-1 y p53 (Figura 4, a-b). Además, también se descubrió que MCM-7 y TGFβ-1, otros dos genes de la ruta del ciclo celular, fueron objetivos potenciales de miR-93 basándose en predicciones informáticas mediante el uso de TargetScan y MiRanda. Sin embargo, cuando se procedió a cuantificar los cambios en la expresión génica, estos genes no se vieron afectados por la sobreexpresión de miR-93 o la inactivación *in vivo*. Además, también se examinó la expresión de otros trece objetivos conocidos y/o predichos de miR-93 de otras tres rutas que están estimuladas en el tejido isquémico de ratones BALB/cJ sin tratar. Estos genes no se vieron afectados por la sobreexpresión de miR-93 o la inactivación *in vivo*. La Tabla 3 resume todos los genes examinados, las rutas implicadas, y los cambios en respuesta a la modulación de miR-93 *in vivo*. Estas observaciones indican que la sobreexpresión de miR-93 en HLI modula múltiples genes de la ruta del ciclo celular que funcionan conjuntamente para reducir la apoptosis inducida por la isquemia, e incrementan la proliferación de células endoteliales, y de ese modo mejoran la recuperación de la perfusión tras la isquemia de las extremidades posteriores.

Discusión

Aunque se ha establecido que los micro-ARNs desempeñan papeles clave en los estados de patología/lesión, existe una información limitada sobre el papel de los micro-ARNs en EAP. Aunque el presente estudio no es el primero que identifica el papel de los micro-ARNs en la recuperación de la isquemia de las extremidades posteriores, en el presente estudio hay varios aspectos nuevos. En primer lugar, se utilizaron dos cepas de ratones endogámicas fenotípicamente diferentes para identificar los micro-ARNs con papeles potenciales en la adaptación a la isquemia, mientras los estudios anteriores han identificado los micro-ARNs objetivo basándose en una micro-matriz de micro-ARN de HUVECs⁸ o entre tejidos no isquémicos frente a los tejidos isquémicos de una única cepa de ratón⁹. El uso de cepas de ratón diferentes con adaptaciones diferentes a la HLI examinadas en un momento en el que la recuperación es comparable es una estrategia alternativa sin distorsión. En segundo lugar, los presentes experimentos *in vitro* demuestran que miR-93 ejerce efectos proliferativos y anti-apoptóticos en dos tipos de células diferentes, relevantes para la recuperación de la perfusión de HLI, e *in vivo*, se confirmó que el papel de miR-93 sobre la recuperación de la perfusión con técnicas tanto de ganancia como de pérdida de la función. En tercer lugar, los presentes experimentos indican que miR-93 media sus efectos a través de la regulación de múltiples genes de la ruta del ciclo celular, y no por medio de la regulación de un único gen.

Mediante el uso de ratones C57Bl/6J como modelo con una respuesta adaptativa favorable hacia HLI, y ratones BALB/cJ como modelo con una respuesta adaptativa escasa, se identificó el micro-ARN-93 como uno de los micro-ARNs con la diferencia más coherente basándose en la cepa y la isquemia. Los estudios de seguimiento *in vitro* indican que miR-93 se expresa tanto en las células endoteliales como en las células de músculo esquelético, y ambos tipos de células estimulan miR-93 en respuesta a HSS, lo que indica un papel de miR-93 en la adaptación celular a la hipoxia/privación de suero. La sobreexpresión de micro-ARN-93 mejoró la supervivencia celular hacia HSS, y mejoró la formación de túbulos de células endoteliales. Se usaron secuencias de antagomir modificadas como describió Krutzfeldt et al.¹⁹ para inactivar miR-93 *in vivo*. La administración sistémica de antagomir fue capaz de inactivar miR-93 en el músculo esquelético de manera muy eficaz (Figura 3a) y específica (Figura Suplementaria 4a-b), como demostraron previamente otros autores^{8, 9, 19}. El grado de inactivación de miR-93 fue comparable al mostrado por Bonauer et al. a las 24 h tras la inyección⁸, y por Grundmann et al.⁹ a los 3 y 7 días tras la inyección. Grundmann et al. inyectó antagomiR-100 a 8 mg/kg de p.c. a través de la vena de la cola en los días 0, 1, y 2, y mostró una inhibición significativa de miR-100 que duró hasta 7 días. Esto es comparable a la duración de la inhibición de miR-93 observada en los presentes experimentos tras una única inyección, aunque una comparación directa es difícil, ya que los autores de los estudios anteriores no observaron de manera específica la duración de la inhibición con miR después de una única inyección. En los presentes experimentos, las inyecciones retroorbitales pueden haber dado como resultado una mejor administración sistémica en comparación con las inyecciones en la vena de la cola usadas por otros autores^{8, 9}. De forma similar, los presentes estudios de sobreexpresión fueron comparables a lo observado por Ge et al.²⁰ mediante el uso de una técnica similar, en la que demostraron la estimulación de miR-125b en el día 1 que persistió hasta el día 7 tras la inyección intramuscular de la molécula mimética de miR. Por lo tanto, se escogió el día 3 como el punto temporal temprano y el día 10 como un punto temporal tardío para comprobar la expresión de miR-93 tras la inyección intramuscular de la molécula mimética de miR-93. Los presentes experimentos (Figura 3C) mostraron una estimulación de miR-93 en el día 3 de ~9 veces, y una estimulación persistente de miR-93 hasta el día 10 de ~3 veces, lo cual es comparable a lo demostrado por Ge et al. La sobreexpresión ligeramente mejor en los presentes estudios se puede explicar por las inyecciones en múltiples sitios en vez de una inyección en un único sitio. De forma coherente con sus efectos *in vitro*, el tratamiento *in vivo* de ratones C57Bl/6J con antagomir-93 sistémico atenuó la recuperación de la perfusión, mientras la sobreexpresión de miR-93 en BALB/cJ mejoró la densidad de capilares en el músculo isquémico, y mejoró la recuperación de la perfusión. En conjunto, los datos indican que miR-93 incrementa la supervivencia y proliferación

de las células endoteliales y los miocitos, e incrementa la angiogénesis para mejorar la recuperación de la isquemia de las extremidades posteriores.

MiR-93 es un miembro del agrupamiento 106b-25 de miRs, que se transcribe a partir del intrón 13 del gen MCM-7 del cromosoma 5 en ratones y 7 en seres humanos²⁴. MCM-7 es una proteína de mantenimiento del minicromosoma muy conservada esencial para la replicación del ADN eucariótico. La expresión elevada de MCM-7 se ha asociado a diversos tumores²⁶. De forma similar, la sobreexpresión de miR-93 también se ha descrito en muchos tumores diferentes, lo que indica su papel en la supervivencia/angiogénesis tumoral. Sin embargo, el presente estudio descrito es el primero que investiga su papel en la angiogénesis inducida por la isquemia en un modelo de EAP. Como muchos otros micro-ARNs intrónicos, se ha demostrado que miR-93 regula muchos genes que están implicados en rutas relacionadas con su gen hospedador. Varios de los objetivos predichos y validados experimentalmente de miR-93 en las células tumorales incluyen proteínas reguladoras del ciclo celular y pro-apoptóticas. Se ha demostrado que miR-93 selecciona como objetivo directamente E2F-1 en las células de adenoma gástrico y previene la apoptosis mediada por TGF- β ²⁴. Se ha demostrado que los niveles en exceso de E2F-1 median en la apoptosis celular^{27, 28}, y los ratones con inactivación de E2F-1 exhiben una recuperación de la perfusión mejorada²⁹. También se ha demostrado que miR-93 selecciona como objetivo directamente p21 y mejora la progresión del ciclo celular²³, y estimula el crecimiento tumoral en las células de glioblastoma inhibiendo la integrina-beta-8²¹. Sin embargo, gran parte de Fang et al. se debió a efectos indirectos y a la interacción de un tipo celular con otro²¹. Es decir, parece que Fang estaba estudiando interacciones paracrinias o célula-célula. Además, otra proteína clave implicada en la ruta de ciclo celular, p53, también estuvo regulada por la modulación de miR-93 en los presentes experimentos. Aunque es posible que la regulación de p53 sea mediante represión transcripcional o traduccional directa, también se puede inhibir como efecto secundario a partir de otros cambios en genes. Los estudios recientes han demostrado que p53 media en la muerte de células endoteliales inducida por hipoxia³⁰, y la inactivación de p53 atenuó la muerte celular inducida por anoxia en cardiomiocitos³¹. Por lo tanto, mediante la inhibición de p21 y p53, miR-93 posibilita la progresión del ciclo celular y una proliferación celular incrementada, mientras limita la apoptosis inducida por isquemia mediante la inhibición de E2F-1 y p53. La capacidad de miR-93 de regular múltiples genes que convergen en rutas funcionales complementarias hace de él un regulador potente de la recuperación de la perfusión de la isquemia de extremidades posteriores. Los ratones con inactivación del agrupamiento 106-25 que carecen de miR-93 (además de otros miembros de este agrupamiento, miR-106b y miR-25) no exhiben ningún fenotipo en circunstancias normales³², mientras la inactivación de su agrupamiento parálogo, miR-17-92, da como resultado la muerte neonatal³². Sin embargo, la inactivación del agrupamiento 106b-25 además del agrupamiento miR-17-92 (doble inactivación) empeora el fenotipo de inactivación de miR-17-92 induciendo la muerte fetal a la mitad de la gestación. Esto indica que el papel de miR-93 es probablemente más pronunciado principalmente en el ámbito de otra lesión/isquemia.

Long et al. demostró que miR-93 selecciona como objetivo directamente y reduce la expresión de VEGF-A en podocitos cultivados y glomérulos²². Sorprendentemente, a pesar de las predicciones basadas en el trabajo de Long de que miR-93 regularía VEGF-A, en la presente memoria se describe, tanto en HUVECs cultivadas como *in vivo*, que la expresión de VEGF-A no se vio afectada por la modulación de miR-93. La presente solicitud describe, por lo tanto, el resultado inesperado de que miR-93 puede regular funciones biológicas, tales como incrementar la recuperación de la perfusión de la isquemia, independientemente de la regulación de VEGF, mientras otros autores, tales como Long et al. (22), han demostrado que miR-93 regula VEGF. Por lo tanto, basándose en las publicaciones anteriores, se habría predicho que un agonista de miR-93 no sería útil para tratar EAP o isquemia, lo cual es contrario al resultado descrito en la presente memoria. Sin desear limitarse por cualquier teoría particular, en la presente memoria se plantea la hipótesis de que la regulación del micro-ARN de genes objetivo puede depender probablemente del contexto y del tipo celular, y por tanto no es predecible. Además, como se observa en los presentes estudios, se ha demostrado que la expresión de miR-93 es paralela a la expresión de MCM-7, lo que indica la co-regulación de miR-93 con su gen hospedador²⁴. Se ha demostrado que HIF-1 α regula negativamente la expresión de MCM-7³⁴, y MCM-7 a su vez desestabiliza HIF-1 α e inhibe su acción³⁴. Además, Manalo et al. comparó los perfiles de expresión génica en células endoteliales arteriales cultivadas en condiciones normóxicas e hipóxicas, y en células no hipóxicas infectadas con HIF-1 α activo de manera constitutiva, y mostraron los genes inducidos y reprimidos por HIF-1 α . Se descubrió que las proteínas MCM se reprimieron mediante HIF-1 α ³⁵. Ante esto, es muy probable que la estimulación de MCM-7 y miR-93 en la hipoxia en ratones C57Bl/6 sea independiente de HIF-1 α , y, por lo tanto, la modulación de miR-93 de la angiogénesis inducida por isquemia es un nuevo mecanismo potencial independiente de los genes angiogénicos regulados por HIF-1 α tradicionales. Basándose en la técnica descrita en la presente memoria, la presente solicitud describe resultados inesperados con respecto a la regulación de miR-93 y la recuperación de la reperfusión, y otras cuestiones asociadas a la isquemia.

Aunque la tasa de mortalidad de la cardiopatía isquémica está disminuyendo en los Estados Unidos, la enfermedad arterial periférica de las extremidades inferiores no ha disminuido. Se puede esperar que la EAP se convierta en un problema sanitario aún mayor en los próximos años. El principal problema en EAP es el flujo sanguíneo reducido en las piernas, y debido a que las oclusiones totales en una o más de las arterias de entrada principales a la(s) pierna(s) es habitual en los pacientes con EAP, el flujo sanguíneo en la pierna pasa a depender del número y grado de vasos sanguíneos colaterales y su capacidad de conectar la microvasculatura distal en el músculo isquémico.

Las terapias médicas actuales usadas para tratar a los pacientes con EAP son para la aterosclerosis sistémica, pero estos agentes no tratan el problema primario en EAP, que es el flujo sanguíneo disminuido. En un modelo simple, un único miR puede unirse a la región sin traducir de 3' de un único mRNA y seleccionar ese mRNA para la degradación. Sin embargo, un único miR se puede unir a varios mRNAs funcionalmente relacionados, y de ese modo regular rutas biológicas completas. En la presente memoria se describen modelos *in vivo*, una aproximación informática, estudios *in vitro* y de expresión génica que demostraron que miR-93 reguló varios genes de manera simultánea para organizar múltiples procesos en la adaptación del músculo esquelético a la isquemia. Esto proporciona el marco para el desarrollo de nuevas aproximaciones para el tratamiento de EAP.

Tabla 1. Resumen de los genes examinados *in vitro* con inactivación de miR-93 en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) y sobreexpresión de miR-93 en células de músculo esquelético de ratón (C2C12). 24 HSS=hipoxia y privación de suero; 3 HSS=3 hrs de hipoxia y privación de suero.

| Objetivos conocidos de miR-93 (respaldado por la bibliografía) | HUVEC con 24 HSS AntimiR-93 frente a molécula inespecífica | C2C12 con 3 HSS PremiR-93 frente a molécula inespecífica |
|--|--|--|
| P21 | Estimulado | Inhibido |
| E2F-1 | Estimulado | Inhibido |
| PTEN | Inalterado | Inalterado |
| Integrina beta-8 | Inalterado | Inalterado |
| VEGF-A | Inalterado | Inalterado |
| Otros reguladores clave del ciclo celular y/o objetivos predichos informáticamente de miR-93 | | |
| P53 | Estimulado | Inalterado |
| MCM-7 | Inalterado | Inalterado |
| TGFβ-1 | Inalterado | Inalterado |

Tabla 2. Lista de las veinte rutas más estimuladas (análisis del enriquecimiento de grupos de genes de matrices de mRNA, FDR <0,25) en tejido isquémico frente a no isquémico de ratones BALB/cJ sin tratar, y lista de las rutas estimuladas en HUVECs tratadas con anti-miR-93 frente a secuencia inespecífica expuestas a 24 horas de hipoxia y privación de suero (24 HSS). La ruta del ciclo celular fue la única ruta común estimulada en HUVECs tratadas con anti-miR-93 y en músculo isquémico de ratones BALB/cJ.

| Grupos de genes/rutas estimuladas en músculo isquémico frente a no isquémico de ratones BALB/cJ sin tratar en el día 3 tras la isquemia de las extremidades posteriores | FDR q-val | Grupos de genes/rutas estimuladas en HUVECs tratadas con AntimiR-93 frente a secuencia inespecífica expuestas a 24 HSS | FDR q-val |
|---|-----------|--|-----------|
| HUMAN_TISSUE_TESTIS | 0,050 | GOLGI_VESICLE_TRANSPORT | 0,000 |
| TAVOR_CEBP_UP | 0,050 | ELECTRON_TRANSPORT_GO_0006118 | 0,126 |
| BCNU_GLIOMA_MGMT_24HRS_DN | 0,064 | OUTER_MEMBRANE | 0,140 |
| BYSTRYKH_HSC_CIS_GLOCUS | 0,065 | CELL_CYCLE_ARREST_GO_0007050 | 0,202 |
| HSA04664_FC_EPSILON_RI_SIGNALING_PATHWAY | 0,066 | APICOLATERAL_PLASMA_MEMBRANE | 0,206 |
| CELL_CYCLE | 0,066 | NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_CYCLE | 0,209 |
| HEMATOPOESIS_RELATED_TRANSCRIPTION_FACTORS | 0,067 | ORGANELLE_LOCALIZATION | 0,210 |
| XU_CBP_UP | 0,067 | SYNAPSE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS | 0,211 |
| BASSO_REGULATOR_HUBS | 0,067 | BIOGENIC_AMINE_METABOLIC_PROCESS | 0,214 |
| DNA_DAMAGE_SIGNALING | 0,067 | ORGANELLE_OUTER_MEMBRANE | 0,214 |

| | | | |
|--------------------------|-------|----------------------------|-------|
| MANALO_HYPOXIA_DN | 0,067 | IMMUNE_EFFECTOR_PROCESS | 0,217 |
| RACCYCDPATHWAY | 0,067 | CELL_CORTEX_PART | 0,220 |
| HSA04110_CELL_CYCLE | 0,068 | COLLAGEN | 0,220 |
| CMV_ALL_UP | 0,068 | APICAL_JUNCTION_COMPLEX | 0,220 |
| IFN_BETA_UP | 0,069 | N_ACYLTRANSFERASE_ACTIVITY | 0,229 |
| PYRIMIDINE_METABOLISM | 0,070 | TIGHT_JUNCTION | 0,234 |
| WILLERT_WNT_NCCIT_ALL_UP | 0,070 | SERINE_HYDROLASE_ACTIVITY | 0,240 |
| CHANG_SERUM_RESPONSE_UP | 0,070 | | |
| HSC_MATURE_SHARED | 0,070 | | |
| GREENBAUM_E2A_UP | 0,070 | | |

Tabla 3. Resumen de los cambios en genes en la extremidad posterior isquémica en el día 3 tras isquemia de extremidades posteriores en respuesta a la modulación de miR-93 in vivo.

| Genes | BALB/cJ PremiR-93 frente a secuencia inespecífica (mediante qPCR y/o transferencia de Western) | C57BL/6J Antagomir-93 frente a secuencia inespecífica (mediante qPCR y/o transferencia de Western) | Ruta(s) implicada(s) |
|------------------|--|--|----------------------------|
| P21 | Inhibido | Estimulado | Ciclo Celular |
| E2F-1 | Inhibido | Estimulado | Ciclo Celular/Apoptosis |
| P53 | Inhibido | Estimulado | Ciclo Celular/Apoptosis |
| PTEN | Sin Cambio | Sin Cambio | Fosfoproteína fosfatasa |
| Integrina beta-8 | Sin Cambio | Sin Cambio | Señalización de integrina |
| VEGF-A | Sin Cambio | Sin Cambio | Angiogénesis/proliferación |
| MCM-7 | Sin Cambio | Sin Cambio | Ciclo celular |
| TGFβ1 | Sin Cambio | Sin Cambio | Ciclo celular |
| Epirregulina | Sin Cambio | Sin Cambio | Metabólico |
| BMP-2 | Sin Cambio | Sin Cambio | Metabólico |
| ATP8b | Sin Cambio | Sin Cambio | Metabólico |
| Dusp-4 | Sin Cambio | Sin Cambio | Fosfoproteína fosfatasa |

5 Tabla Suplementaria 1. Lista de los diez primeros micro-ARNs más expresados de manera diferencial mediante micro-Matriz clasificados basándose en diferentes comparaciones. Se sometió a ratones C57Bl/6J y BALB/CJ (n=3/grupo) a isquemia de las extremidades posteriores. En el día 3 tras la isquemia, se aisló el ARN total de los músculos gastrocnemios y se realizó una matriz de micro-ARN Illumina, observando 380 micro-ARNs de ratón.

| Identificador | Valor de p |
|--|------------|
| Diez Primeros Micro-ARNs Regulados de Manera Diferencial por Cepa e Isquemia | |
| mmu-miR-106b | 0,0061 |
| mmu-miR-106b93 | 0,0089 |
| mmu-miR-let-7i | 0,0174 |
| mmu-miR-17 | 0,0187 |
| mmu-miR-214* | 0,0191 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|---------|
| mmu-miR-124 | 0,0192 |
| mmu-miR-540-3p | 0,0205 |
| mmu-miR-351 | 0,0214 |
| mmu-miR-204 | 0,0221 |
| mmu-miR-541 | 0,0233 |
| Diez Primeros Micro-ARNs Regulados de Manera Diferencial por Cepa Solamente | |
| mmu-miR-339-3p | 0,0009 |
| mmu-miR-324-5p | 0,00196 |
| solexa-622-718 | 0,00236 |
| mmu-miR-106a:9.1 | 0,00348 |
| solexa-200-2167 | 0,00377 |
| mmu-miR-338-3p | 0,00548 |
| mmu-miR-466 | 0,00568 |
| mmu-miR-127 | 0,00582 |
| mmu-miR-410 | 0,0059 |
| mmu-miR-669h-3p | 0,00919 |
| Diez Primeros Micro-ARNs Regulados de Manera Diferencial por Isquemia Solamente | |
| mmu-miR-101b:9.1 | 0,00273 |
| mmu-miR-101a:9.1 | 0,00376 |
| mmu-miR-143 | 0,00559 |
| mmu-miR-140 | 0,00622 |
| mmu-miR-879 | 0,00642 |
| mmu-miR-27a | 0,00822 |
| solexa-130-3526 | 0,009 |
| mmu-miR-30e | 0,0092 |
| mmu-miR-479 | 0,0097 |
| Mmu-miR-127 | 0,01125 |

Tabla Suplementaria 2. Lista completa de rutas estimuladas (FDR <0,25) en tejido isquémico frente a no isquémico de ratones BALB/C sin tratar (basado en el análisis GSEA de matrices de mARN).

| NOMBRE | FDR q-val |
|--|-------------|
| HUMAN_TISSUE_TESTIS | 0,05 |
| TAVOR_CEBP_UP | 0,05 |
| BCNU_GLIOMA_MGMT_24HRS_DN | 0,064809084 |
| BYSTRYKH_HSC_CIS_GLOCUS | 0,06584324 |
| HSA04664_FC_EPSILON_RI_SIGNALING_PATHWAY | 0,06622046 |
| CELL_CYCLE | 0,06629 |
| HEMATOPOESIS_RELATED_TRANSCRIPTION_FACTORS | 0,06661608 |
| XU_CBP_UP | 0,06700018 |
| BASSO_REGULATORY_HUBS | 0,06703148 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| DNA_DAMAGE_SIGNALING | 0,06736976 |
| MANALO_HYPOXIA_DN | 0,067468196 |
| RACCYCDPATHWAY | 0,06775575 |
| HSA04110_CELL_CYCLE | 0,067927875 |
| CMV_ALL_UP | 0,0681 |
| IFN_BETA_UP | 0,06815929 |
| PYRIMIDINE_METABOLISM | 0,068412416 |
| WILLERT_WNT_NCCIT_ALL_UP | 0,06892387 |
| CHANG_SERUM_RESPONSE_UP | 0,06946456 |
| HSC_MATURE_SHARED | 0,07003704 |
| GREENBAUM_E2A_UP | 0,07036249 |
| HSC_MATURE_ADULT | 0,07048955 |
| ALCALAY_AML_NPMC_DN | 0,07064423 |
| CCR5PATHWAY | 0,07068086 |
| UVB_NHEK3_C6 | 0,07080033 |
| GILDEA_BLADDER_UP | 0,07120818 |
| BREAST_DUCTAL_CARCINOMA_GENES | 0,07128935 |
| ELONGINA_KO_DN | 0,07134255 |
| UVC_HIGH_D2_DN | 0,071420886 |
| TFF2_KO_UP | 0,07163233 |
| DAC_PANC_UP | 0,07168678 |
| BRUNO_IL3_DN | 0,07197612 |
| HSC_LATEPROGENITORS_SHARED | 0,0720423 |
| BRG1_ALAB_UP | 0,07207382 |
| HSC_LATEPROGENITORS_FETAL | 0,07209282 |
| CALRES_MOUSE_NEOCORTEX_DN | 0,072404265 |
| ZHAN_TONSIL_PCBC | 0,072409675 |
| FSH_OVARY_MCV152_UP | 0,072438024 |
| CELL_CYCLE_KEGG | 0,07244094 |
| CELL_CYCLE_CHECKPOINT | 0,07253369 |
| UVB_SCC_UP | 0,07270865 |
| HSA04620_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY | 0,0727895 |
| CELLCYCLEPATHWAY | 0,073041104 |
| ET743_SARCOMA_72HRS_UP | 0,07318242 |
| NAB_LUNG_DN | 0,07327142 |
| CMV_24HRS_UP | 0,073491715 |
| UVB_NHEK3_C8 | 0,07352338 |
| HEARTFAILURE_VENTRICLE_DN | 0,07356298 |
| G1PATHWAY | 0,073589124 |
| ADIP_DIFF_CLUSTER3 | 0,07372476 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|-------------|
| HSC_LATEPROGENITORS_ADULT | 0,073958986 |
| BRENTANI_PROTEIN_MODIFICATION | 0,074010365 |
| GENOTOXINS_ALL_4HRS_REG | 0,0743307 |
| HSC_MATURE_FETAL | 0,07469621 |
| BECKER_TAMOXIFEN_RESISTANT_UP | 0,07480314 |
| AGED_MOUSE_HYPOTH_UP | 0,075054124 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER4 | 0,07523184 |
| BCNU_GLIOMA_NOMGMT_48HRS_DN | 0,07542257 |
| G1_TO_S_CELL_CYCLE_REACTOME | 0,07563645 |
| UVB_SCC_DN | 0,07579693 |
| HSA04115_P53_SIGNALING_PATHWAY | 0,075802006 |
| OLDAGE_DN | 0,07618109 |
| ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_SUBCLASSES_DIFF | 0,076202296 |
| GLYCOSPHINGOLIPID_METABOLISM | 0,076264076 |
| HYPOXIA_FIBRO_UP | 0,07659237 |
| HSA04650_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY | 0,07682923 |
| HSA00240_PYRIMIDINE_METABOLISM | 0,07692899 |
| PEART_HISTONE_UP | 0,077149995 |
| SANSOM_APC_4_DN | 0,077250384 |
| PEART_HISTONE_DN | 0,07727423 |
| SCHUMACHER_MYC_UP | 0,07762844 |
| BRENTANI_REPAIR | 0,07772115 |
| ROSS_CBF_MYH | 0,077735685 |
| HSA00052_GALACTOSE_METABOLISM | 0,07799198 |
| BLEO_HUMAN_LYMPH_HIGH_24HRS_UP | 0,07806986 |
| FSH_OVARY_MCV152_DN | 0,07836521 |
| XU_CBP_DN | 0,07838582 |
| MYC_TARGETS | 0,07874852 |
| MPRPATHWAY | 0,07914234 |
| CANTHARIDIN_DN | 0,07945373 |
| SANSOM_APC_5_DN | 0,07966169 |
| UVB_NHEK3_C5 | 0,079998754 |
| HDACI_COLON_BUT16HRS_DN | 0,08013886 |
| PENG_LEUCINE_DN | 0,08034357 |
| HDACI_COLON_BUT48HRS_DN | 0,080696404 |
| HDACI_COLON_BUT_DN | 0,08105753 |
| BRCA1_OVEREXP_PROSTATE_UP | 0,0814173 |
| BRCA_PROGNOSIS_NEG | 0,08258 |
| HALMOS_CEBP_UP | 0,0828362 |
| UVC_HIGH_ALL_DN | 0,08319704 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| DER_IFNB_UP | 0,083263844 |
| UV-4NQO_FIBRO_DN | 0,08366139 |
| ET743_HELA_UP | 0,08442017 |
| TOLLPATHWAY | 0,08461013 |
| P21_P53_MIDDLE_DN | 0,08477871 |
| VHL_RCC_UP | 0,08497831 |
| UVC_TTD_ALL_DN | 0,08614139 |
| PENG_RAPAMYCIN_UP | 0,08632516 |
| ABRAHAM_AL_VS_MM_UP | 0,086510174 |
| GAMMA-UV_FIBRO_UP | 0,087118134 |
| KRETZSCHMAR_IL6_DIFF | 0,087196164 |
| BROCKE_IL6 | 0,08805103 |
| LEE_TCELLS5_UP | 0,088323444 |
| NKTPATHWAY | 0,08869194 |
| TPA_RESIST_LATE_UP | 0,08869298 |
| BASSO_GERMINAL_CENTER_CD40_DN | 0,08905461 |
| TGFBETA_C2_UP | 0,08911723 |
| BRENTANI_CELL_CYCLE | 0,08912608 |
| WANG_HOXA9_VS_MEIS1_DN | 0,08945446 |
| ZHAN_MMPC_EARLYVS | 0,08978339 |
| NICK_RHAPC_UP | 0,089797534 |
| TNFALPHA_4HRS_UP | 0,08988574 |
| RUIZ_TENASCIN_TARGETS | 0,09014662 |
| LVAD_HEARTFAILURE_DN | 0,09027048 |
| AGED_MOUSE_CEREBELLUM_UP | 0,09027932 |
| UNDERHILL_PROLIFERATION | 0,09050191 |
| KANNAN_P53_UP | 0,090578474 |
| P21_P53_ANY_DN | 0,09060948 |
| VANTVEER_BREAST_OUTCOME_GOOD_VS_POOR_DN | 0,09063328 |
| LINDSTEDT_DEND_DN | 0,09063949 |
| ROSS_MLL_FUSION | 0,0907165 |
| UVC_HIGH_D3_DN | 0,090725005 |
| JNK_UP | 0,09091946 |
| AGED_MOUSE_NEOCORTEX_UP | 0,090945095 |
| HYPOXIA_RCC_UP | 0,09100389 |
| TPA_SENS_EARLY_UP | 0,09125636 |
| BRENTANI_SIGNALING | 0,09132675 |
| PENG_GLUCOSE_DN | 0,09165474 |
| JISON_SICKLE_CELL | 0,091849454 |
| NEMETH_TNF_UP | 0,09209056 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| H2O2_CSBDIFF_C1 | 0,09210463 |
| BAF57_BT549_DN | 0,09230463 |
| LEI_MYB_REGULATED_GENES | 0,092337385 |
| REOVIRUS_HEK293_DN | 0,09233815 |
| AS3_FIBRO_DN | 0,09236295 |
| UEDA_MOUSE_LIVER | 0,09240781 |
| ABRAHAM_MM_VS_AL_DN | 0,092446804 |
| ET743_SARCOMA_48HRS_DN | 0,09247453 |
| MYOD_NIH3T3_DN | 0,092498705 |
| HSA00760_NICOTINATE_AND_NICOTINAMIDE_METABOLISM | 0,092528045 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_REJECTION_PBL_UP | 0,09258354 |
| HOFFMANN_BIVSBII_BI_TABLE2 | 0,09258866 |
| ZHAN_MMPC_SIM | 0,09262444 |
| NI2_MOUSE_UP | 0,09263615 |
| HINATA_NFKB_UP | 0,092658125 |
| LEE_TCELLS9_UP | 0,09266641 |
| HG_PROGERIA_DN | 0,09268967 |
| SHEPARD_CRASH_AND_BURN_MUT_VS_WT_DN | 0,09269242 |
| SERUM_FIBROBLAST_CORE_UP | 0,09269454 |
| LIZUKA_L1_GR_G1 | 0,09270097 |
| CMV_UV_CMV_COMMON_HCMV_6HRS_UP | 0,09271182 |
| LI_FETAL_VS_WT_KIDNEY_UP | 0,0927844 |
| HSA04670_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION | 0,09279239 |
| SHEPARD_GENES_COMMON_BW_CB_MO | 0,092807256 |
| TNFALPHA_ALL_UP | 0,092820235 |
| JISON_SICKLECELL_DIFF | 0,09286636 |
| OXSTRESS_RPE_H2O2HNE_DN | 0,092877164 |
| BECKER_TAMOXIFEN_RESISTANT_DN | 0,09288919 |
| HOHENKIRK_MONOCYTE_DEND_DN | 0,09289221 |
| CPR_NULL_LIVER_UP | 0,09289665 |
| BYSTROM_IL5_UP | 0,09290746 |
| SHEPARD_NEG_REG_OF_CELL_PROLIFERATION | 0,09291989 |
| UVB_NHEK3_ALL | 0,092927724 |
| KENNY_WNT_UP | 0,09293406 |
| HOFMANN_MANTEL_LYMPHOMA_VS_LYMPH_NODES_UP | 0,09295821 |
| UVB_NHEK2_DN | 0,09298089 |
| ALCALAY_AML_NPMC_UP | 0,092983745 |
| NING_COPD_DN | 0,09298717 |
| GENOTOXINS_4HRS_DISCR | 0,09300757 |
| WANG_HOXA9_VS_MEIS1_UP | 0,09302454 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|-------------------------------|-------------|
| IFN_GAMMA_UP | 0,09303833 |
| TPA_RESIST_MIDDLE_DN | 0,093089424 |
| HSA00230_PURINE_METABOLISM | 0,0930917 |
| AS3_FIBRO_C4 | 0,09309298 |
| SHEPARD_CELL_PROLIFERATION | 0,09309684 |
| ADIP_DIFF_CLUSTER5 | 0,093124814 |
| GSK3PATHWAY | 0,09313526 |
| HDACI_COLON_BUT12HRS_DN | 0,09315126 |
| P53PATHWAY | 0,093157254 |
| SANSOMAPC_LOSS4_UP | 0,09318556 |
| LEI_HOXC8_DN | 0,09319186 |
| GAMMA_UNIQUE_FIBRO_DN | 0,09320535 |
| IFN_ALL_UP | 0,09322175 |
| DIAB_NEPH_DN | 0,093226776 |
| OXSTRESS_RPETHREE_DN | 0,0932322 |
| SCHRAETS_MLL_UP | 0,09324405 |
| VHL_NORMAL_UP | 0,0932444 |
| BCRABL_HL60_CDNA_DN | 0,09326578 |
| WNT_TARGETS | 0,093274444 |
| KNUDSEN_PMNS_UP | 0,09328712 |
| SANA_TNFA_ENDOTHELIAL_DN | 0,09329307 |
| LI_FETAL_VS_WT_KIDNEY_DN | 0,09329964 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER1 | 0,093303815 |
| TARTE_PLASMA_BLASTIC | 0,09331439 |
| YU_CMYC_UP | 0,09335085 |
| CHIARETTI_T_ALL_DIFF | 0,09335565 |
| TNFA_NFKB_DEP_UP | 0,09335753 |
| ADIPOGENESIS_HMSC_CLASS8_DN | 0,09336921 |
| CORDERO_KRAS_KD_VS_CONTROL_DN | 0,09339853 |
| ZHAN_MM_CD138_PR_VS_REST | 0,0934531 |
| GOLDRATH_CELLCYCLE | 0,09347236 |
| BRCA1_SW480_UP | 0,09348996 |
| HOFFMANN_BIVSBII_BI | 0,093538776 |
| TPA_SENS_LATE_UP | 0,09356527 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_12HRS_UP | 0,09356714 |
| CELL_PROLIFERATION | 0,093600065 |
| IL6_SCAR_FIBRO_UP | 0,09360304 |
| WALKER_MM_SNP_DIFF | 0,09360719 |
| TNFR1PATHWAY | 0,093649015 |
| SASAKI_ATL_UP | 0,093665026 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| HSA04662_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY | 0,093780704 |
| DER_IFNG_UP | 0,09380333 |
| ET743_SARCOMA_72HRS_DN | 0,09381784 |
| HSA04520_ADHERENS_JUNCTION | 0,0938862 |
| GUO_HEX_UP | 0,09393246 |
| VERHAAK_AML_NPM1_MUT_VS_WT_UP | 0,094044015 |
| TPA_SENS_MIDDLE_DN | 0,09405091 |
| ZHAN_MMPC_SIM_BC_AND_MM | 0,09408061 |
| UVC_TTD_4HR_DN | 0,09421959 |
| IRITANI_ADPROX_VASC | 0,09429331 |
| SASAKI_TCELL_LYMPHOMA_VS_CD4_UP | 0,09433405 |
| BRG1_SW13_UP | 0,094377175 |
| IFN_ANY_UP | 0,09451051 |
| PRMT5_KD_UP | 0,094614275 |
| FALT_BCLL_IG_MUTATED_VS_WT_UP | 0,0947059 |
| GERY_CEBP_TARGETS | 0,094724044 |
| ST_DICTYOSTELIUM_DISCOIDEUM_CAMP_CHEMOTAXIS_PATHWAY | 0,094805285 |
| POD1_KO_UP | 0,094920196 |
| PASSERINI_APOPTOSIS | 0,09493991 |
| ADIP_DIFF_CLUSTER4 | 0,095222645 |
| NAKAJIMA_MCS_UP | 0,09541266 |
| LE_MYELIN_UP | 0,095552936 |
| HYPOXIA_RCC_NOVHL_UP | 0,09560426 |
| IRS1_KO_ADIP_UP | 0,095720574 |
| REOVIRUS_HEK293_UP | 0,09572745 |
| FRASOR_ER_UP | 0,09574929 |
| 4NQO_ESR_WS_UNREG | 0,09579752 |
| CELL_SURFACE_RECEPTOR_LINKED_SIGNAL_TRANSDUCTION | 0,09585844 |
| E2F3_ONCOGENIC_SIGNATURE | 0,09591108 |
| STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM | 0,095926255 |
| UVC_XPCS_4HR_DN | 0,09605442 |
| CAMPTOTHECIN_PROBCELL_DN | 0,09689154 |
| DORSAM_HOXA9_UP | 0,09856794 |
| HTERT_UP | 0,098945975 |
| BRCA1_OVEREXPUP | 0,099289335 |
| UVC_HIGH_D6_DN | 0,09987931 |
| UVC_XPCS_8HR_DN | 0,10015042 |
| ICHIBA_GVHD | 0,10016795 |
| LINDSTEDT_DEND_8H_VS_48H_UP | 0,10035346 |
| PARK_MSCS_LIN2 | 0,10054283 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| HOFMANN_MDS_CD34_LOW_AND_HIGH_RISK | 0,10060569 |
| IDX_TSA_UP_CLUSTER2 | 0,10064254 |
| CMV_HCMV_6HRS_DN | 0,1006583 |
| HDACI_COLON_BUT24HRS_DN | 0,10071625 |
| CMV_8HRS_UP | 0,10073929 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_6H_DN | 0,10074499 |
| UVC_TTD-XPCS_COMMON_DN | 0,100753926 |
| CHESLER_BRAIN_HIGHEST_VARIANCE_GENES | 0,100857735 |
| IRITANI_ADPROX_DN | 0,10091207 |
| HSA03030_DNA_POLYMERASE | 0,10105875 |
| HSA00600_SPHINGOLIPID_METABOLISM | 0,10111378 |
| CHIARETTI_T_ALL | 0,10233358 |
| ST_B_CELL_ANTIGEN_RECEPTOR | 0,10370769 |
| SHEPARD_BMYB_MORPHOLINO_DN | 0,1038577 |
| CALRES_RHESUS_UP | 0,103903 |
| FALT_BCLL_DN | 0,103979364 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER3 | 0,10406017 |
| LINDSTEDT_DEND_UP | 0,10409972 |
| ET743_RESIST_DN | 0,10418003 |
| IL1_CORNEA_UP | 0,1041947 |
| FERNANDEZ_MYC_TARGETS | 0,10426418 |
| HSIAO_LIVER_SPECIFIC_GENES | 0,10429789 |
| MAGRANGEAS_MULTIPLE_MYELOMA_IGL_VS_IGK_DN | 0,10430001 |
| CORDERO_KRAS_KD_VS_CONTROL_UP | 0,104382195 |
| BRENTANI_DEATH | 0,10440076 |
| CANCER_UNDIFFERENTIATED_META_UP | 0,10445315 |
| HESS_HOXAANMEIS1_UP | 0,1044975 |
| HESS_HOXAANMEIS1_DN | 0,104883105 |
| RAS_ONCOGENIC_SIGNATURE | 0,10513935 |
| GALINDO_ACT_UP | 0,10551507 |
| ET743_SARCOMA_6HRS_UP | 0,10557761 |
| BRCA1_OVEREXP_PROSTATE_DN | 0,10576794 |
| UVC_XPCS_ALL_DN | 0,10595959 |
| HYPOXIA_REVIEW | 0,10605718 |
| TGFBETA_EARLY_UP | 0,10609327 |
| GAY_YY1_DN | 0,10615256 |
| PENG_GLUCOSE_UP | 0,106204465 |
| FCER1PATHWAY | 0,10621549 |
| ZHAN_MM_CD138_MF_VS_REST | 0,106245935 |
| ET743_SARCOMA_DN | 0,10628241 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|-------------|
| VERHAAK_AML_NPM1_MUT_VS_WT_DN | 0,1062915 |
| FSH_GRANULOSA_UP | 0,10634685 |
| PENG_LEUCINE_UP | 0,1063795 |
| G2PATHWAY | 0,10643596 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_10D_UP | 0,106542505 |
| NF90_DN | 0,10654499 |
| SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION | 0,10654831 |
| IL6_FIBRO_UP | 0,10658014 |
| MATSUDA_VALPHAINKT_DIFF | 0,106731914 |
| DSRNA_UP | 0,10673951 |
| PTDINSPATHWAY | 0,10679032 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_WELL_PBL_DN | 0,10681937 |
| SANSOM_APC_LOSS5_UP | 0,1069167 |
| ALZHEIMERS_INCIPIENT_UP | 0,10693791 |
| HBX_HCC_DN | 0,10699859 |
| ZUCCHI_EPITHELIAL_DN | 0,107008144 |
| TPA_SENS_MIDDLE_UP | 0,10710271 |
| HOFFMANN_BIVSBII_IMVM | 0,10713769 |
| TSADAC_HYPOMETH_OVCA_UP | 0,107181855 |
| GUO_HEX_DN | 0,10719817 |
| RUTELLA_HEMATOGFSNDCS_DIFF | 0,10723969 |
| HADDAD_CD45CD7_PLUS_VS_MINUS_UP | 0,10728993 |
| HADDAD_HSC_CD7_UP | 0,10764286 |
| PROLIFERATION_GENES | 0,10782312 |
| CMV_UV-CMV_COMMON_HCMV_6HRS_DN | 0,107929885 |
| AD12_ANY_DN | 0,108007856 |
| DNA_REPLICATION_REACTOME | 0,108226836 |
| UVB_NHEK3_C7 | 0,10841111 |
| ATRIA_UP | 0,109495826 |
| HYPOXIA_NORMAL_UP | 0,109529614 |
| LEE_MYC_E2F1_UP | 0,10971624 |
| RCC_NL_UP | 0,111033596 |
| AGUIRRE_PANCREAS_CHR8 | 0,111155055 |
| PARK_RARALPHA_MOD | 0,111185774 |
| LEE_MYC_TGFA_UP | 0,111220814 |
| INSULIN_ADIP_INSENS_UP | 0,11137461 |
| IFNA_HCMV_6HRS_UP | 0,111499 |
| NGUYEN_KERATO_UP | 0,111564636 |
| CELL_CYCLE_REGULATOR | 0,111755826 |
| ACTINYPATHWAY | 0,11183212 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|-------------|
| LH_GRANULOSA_UP | 0,1120178 |
| ZHAN_MM_MOLECULAR_CLASSI_UP | 0,1122046 |
| IFN_ALPHA_UP | 0,112217344 |
| RADIATION_SENSITIVITY | 0,11224026 |
| BRCA1KO_MEF_DN | 0,11230446 |
| BREASTCA_TWO_CLASSES | 0,11239252 |
| CREB_BRAIN_8WKS_UP | 0,11242606 |
| ESR_FIBROBLAST_UP | 0,11249384 |
| RADMACHER_AMLNORMALKARYTYPE_SIG | 0,11275865 |
| CMV-UV_HCMV_6HRS_UP | 0,11286231 |
| GH_GHRHR_KO_24HRS_DN | 0,11287937 |
| ROSS_AML1_ETO | 0,11306378 |
| ABBUD LIF UP | 0,11324926 |
| PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTEM | 0,11392149 |
| HSA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION | 0,114121 |
| TUMOR_SUPPRESSOR | 0,11430686 |
| ZHAN_PCS_MULTIPLE_MYELOMA_SPKD | 0,11449379 |
| HOFFMANN_BIVSBII_LGBII | 0,11516408 |
| GN_CAMP_GRANULOSA_DN | 0,11519823 |
| UVB_NHEK1_DN | 0,11523961 |
| HDACI_COLON_BUT30MIN_DN | 0,11574291 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_ALL_UP | 0,11588081 |
| DRUG_RESISTANCE_AND_METABOLISM | 0,11592808 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER5 | 0,11606796 |
| ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_VS_NORMAL_DN | 0,116114326 |
| WANG_MLL_CBP_VS_GMP_UP | 0,11623408 |
| P21_ANY_DN | 0,1162562 |
| HPV31_DN | 0,11641858 |
| LU_IL4BCELL | 0,11644549 |
| UVB_NHEK1_C1 | 0,116604105 |
| IRITANI_ADPROX_LYMPH | 0,116790675 |
| BOQUEST_CD31PLUS_VS_CD31MINUS_UP | 0,116846606 |
| MMS_HUMAN_LYMPH_LOW_4HRS_DN | 0,11757067 |
| CIS_XPC_DN | 0,11775731 |
| KNUDSEN_PMNS_DN | 0,1180087 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_16D_DN | 0,11859642 |
| UVB_NHEK1_C6 | 0,11864519 |
| NGUYEN_KERATO_DN | 0,11957301 |
| BLEO_MOUSE_LYMPH_LOW_24HRS_DN | 0,11961402 |
| CELL_MOTILITY | 0,12029685 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|----------------------------------|-------------|
| IL2RBPATWAY | 0,12088914 |
| IDX_TSAUP_CLUSTER3 | 0,120919846 |
| YAGI_AML_PROG ASSOC | 0,12138579 |
| HSA00790_FOLATE_BIOSYNTHESIS | 0,12152317 |
| OLD_FIBRO_UP | 0,12157718 |
| LAL_KO_6MO_UP | 0,12162986 |
| TARTE_BCELL | 0,12164226 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER6 | 0,121713884 |
| HOGERKORP_CD44_UP | 0,12176959 |
| ST_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_PATHWAY | 0,12236386 |
| TGFBETA_ALL_UP | 0,12255479 |
| RADAEVA_IFNA_UP | 0,12449681 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_3D_UP | 0,12451883 |
| UVC_LOW_C2_DN | 0,12462516 |
| UVC_HIGH_D8_DN | 0,124690294 |
| EMT_UP | 0,12471138 |
| OXSTRESS_RPETWO_DN | 0,12482102 |
| KUMAR_HOXA_DIFF | 0,12486712 |
| LEE_TCELLS3_UP | 0,124884784 |
| PARK_MSCS_BOTH | 0,12508032 |
| APOPTOSIS_KEGG | 0,12517367 |
| DAC_PANC50_UP | 0,12563193 |
| TPA_SENS_LATE_DN | 0,12654063 |
| LEE_E2F1_UP | 0,1265787 |
| MATRIX_METALLOPROTEINASES | 0,1267711 |
| UV-CMV_UNIQUE_HCMV_6HRS_UP | 0,12691027 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_48HRS_DN | 0,1269645 |
| IFN_BETA_GLIOMA_UP | 0,127105 |
| HTERT_DN | 0,12722939 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_ALL_DN | 0,12730068 |
| FSH GRANULOSA_DN | 0,12736738 |
| O6BG_RESIST_MEDULLOBLASTOMA_DN | 0,12749323 |
| LH GRANULOSA_DN | 0,12768342 |
| ST_ADRENERGIC | 0,12768647 |
| BRENTANI_CELL_ADHESION | 0,12788069 |
| BREAST_CANCER_ESTROGEN_SIGNALING | 0,1284447 |
| DNMT1_KO_UP | 0,12844634 |
| ELONGINA_KO_UP | 0,1286384 |
| SHIPP_FL_VS_DLBCL_DN | 0,12863909 |
| IL7PATHWAY | 0,12981917 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|-------------------------------------|------------|
| ZHAN_TONSIL_BONEMARROW | 0,13076092 |
| DAVIES_MGUS_MM | 0,1309579 |
| STT_CELL_SIGNAL_TRANSDUCTION | 0,13119389 |
| FERRANDO_MLL_T_ALL_UP | 0,13161941 |
| IFNALPHA_RESIST_DN | 0,13215357 |
| MMS_MOUSE_LYMPH_HIGH_4HRS_UP | 0,13322589 |
| UVB_NHEK4_6HRS_UP | 0,13327979 |
| STEFFEN_AML_PML_PLZF_TRGT | 0,133425 |
| SIG_BCR_SIGNALING_PATHWAY | 0,13362506 |
| MITOCHONDRIAPATHWAY | 0,13363753 |
| EGF_HDMEC_UP | 0,13382609 |
| LAL_KO_3MO_UP | 0,13402808 |
| ROTH_HTERT_DIFF | 0,1350049 |
| VEGF_MMMEC_ALL_UP | 0,13608687 |
| YAGI_AML_PROGNOSIS | 0,13608956 |
| TPA_SENS_EARLY_DN | 0,13641003 |
| AGEING_KIDNEY_SPECIFIC_UP | 0,13749892 |
| CMV_ALL_DN | 0,1379116 |
| HDACI_COLON_BUT24HRS_UP | 0,13800333 |
| BREASTCA_THREE_CLASSES | 0,13816813 |
| ETSPATHWAY | 0,138208 |
| UVC_HIGH_D9_DN | 0,13837415 |
| IRS1_KO_ADIP_DN | 0,13880534 |
| HSA05210_COLORECTAL_CANCER | 0,13900763 |
| CIS_XPC_UP | 0,13904755 |
| ZHANG_EFT_EWSFLI1_UP | 0,1392057 |
| CMV_24HRS_DN | 0,13921085 |
| SANA_IFNG_ENDOTHELIAL_DN | 0,13925274 |
| SANA_TNFA_ENDOTHELIAL_UP | 0,13937165 |
| SIG_PIP3_SIGNALING_IN_B_LYMPHOCYTES | 0,1394103 |
| FERRANDO_MLL_T_ALL_DN | 0,13945885 |
| HSA05223_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER | 0,13982873 |
| PARK_RARALPHAUP | 0,14052689 |
| GREENBAUM_E2A_DN | 0,14097859 |
| HOHENKIRK_MONOCYTE_DEND_UP | 0,1411 |
| CHAUHAN_2ME2 | 0,14122844 |
| MMS_HUMAN_LYMPH_HIGH_24HRS_UP | 0,14235373 |
| VEGF_MMMEC_12HRS_UP | 0,14276302 |
| HSA04370_VEGF_SIGNALING_PATHWAY | 0,14289977 |
| ET743PT650_COLONCA_DN | 0,142916 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|------------|
| NAKAJIMA_MCSMBP_EOS | 0,14296825 |
| HDACI_COLON_SUL48HRS_DN | 0,14306012 |
| ATMPATHWAY | 0,1431044 |
| HSA04810_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON | 0,14311977 |
| IFN_BETA_GLIOMA_DN | 0,14314601 |
| WALLACE_JAK2_DIFF | 0,1431744 |
| STRESS_TPA_SPECIFIC_UP | 0,14322004 |
| YAGI_AML_PROG_FAB | 0,14323133 |
| FALT_BCLL_UP | 0,14327726 |
| ZHAN_MM_MOLECULAR_CLASSI_DN | 0,14328639 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_8D_UP | 0,14334565 |
| GPCRS_CLASS_A_RHODOPSIN_LIKE | 0,14335345 |
| STEMCELL_COMMON_DN | 0,14336893 |
| ERKPATHWAY | 0,14348094 |
| LEE_TCELLS1_UP | 0,14348719 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_16D_UP | 0,14352603 |
| AD12_24HRS_DN | 0,14361675 |
| LEE_TCELLS8_UP | 0,1437899 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_6HRS_DN | 0,14381593 |
| GALACTOSE_METABOLISM | 0,14390767 |
| OLDONLY_FIBRO_UP | 0,14402978 |
| SIG_CHEMOTAXIS | 0,14404705 |
| LEE_TCELLS10_UP | 0,1440939 |
| H2O2_CSBDIFF_C2 | 0,14410831 |
| POD1_KO_MOST_UP | 0,14412153 |
| HDACI_COLON_CUR2HRS_UP | 0,14414567 |
| HDACI_COLON_SUL24HRS_DN | 0,14416648 |
| CHAUVIN_ANDROGEN_REGULATED_GENES | 0,14424974 |
| H2O2_CSBRESCUED_UP | 0,14471224 |
| SPPAPATHWAY | 0,14545694 |
| SA_CASPASE_CASCADE | 0,14558618 |
| CARIES_PULP_UP | 0,14569725 |
| HSA00220_UREA_CYCLE_AND_METABOLISM_OF_AMINO_GROUPS | 0,14571595 |
| CHESLER_BRAIN_CIS_GENES | 0,14574213 |
| BLEO_HUMAN_LYMPH_HIGH_4HRS_UP | 0,14579727 |
| BRENTANI_TRANSCRIPTION_FACTORS | 0,14582695 |
| HDACI_COLON_BUT48HRS_UP | 0,14589293 |
| YAO_P4_KO_VS_WT_DN | 0,14591011 |
| HSA04120_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS | 0,14602496 |
| AGED_RHESUS_UP | 0,14604557 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|------------|
| TPA_RESIST_MIDDLE_UP | 0,14619894 |
| SERUM_FIBROBLAST_CELLCYCLE | 0,14620738 |
| FASPATHWAY | 0,14624318 |
| HSA00512_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS | 0,1462919 |
| ST_INTERLEUKIN_4_PATHWAY | 0,1463951 |
| ET743_SARCOMA_UP | 0,14640698 |
| CXCR4PATHWAY | 0,14641401 |
| GOLDRATH_HP | 0,14660743 |
| PROSTAGLANDIN_SYNTHESIS_REGULATION | 0,1466934 |
| EMT_DN | 0,14688298 |
| TPA_RESIST_LATE_DN | 0,14702436 |
| IRITANI ADPROX UP | 0,14705583 |
| BASSO_GERMINAL_CENTER_CD40_UP | 0,14707331 |
| ZHAN_MM_CD1_VS_CD2_DN | 0,14721611 |
| IGLESIAS_E2FMINUS_UP | 0,1472165 |
| WIELAND_HEPATITIS_B_INDUCED | 0,14724728 |
| LEE_MYC_UP | 0,14740938 |
| ZHAN_MMPC_LATEVS | 0,14752746 |
| CROONQUIST_IL6_STARVE_UP | 0,14758644 |
| DNMT1_KO_DN | 0,14760305 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_20HRS_DN | 0,14772251 |
| IFNA_UV-CMV_COMMON_HCMV_6HRS_UP | 0,14788888 |
| UVC_TTD_8HR_DN | 0,14791833 |
| CMV_HCMV_6HRS_UP | 0,14940266 |
| ADIP_VS_PREADIP_DN | 0,14973073 |
| LINDSTEDT_DEND_8H_VS_48H_DN | 0,14978209 |
| ZHAN_MM_CD1_VS_CD2_UP | 0,14984885 |
| G13_SIGNALING_PATHWAY | 0,14997144 |
| CALCIUM_REGULATION_IN_CARDIAC_CELLS | 0,15004124 |
| RENE2F1_TARGETS | 0,15005425 |
| KANG_TERT_DN | 0,15014863 |
| VANASSE_BCL2_TARGETS | 0,15016152 |
| DER_IFNA_UP | 0,15016164 |
| HSA04660_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY | 0,15023437 |
| IFNALPHA_NL_UP | 0,15025584 |
| NEMETH_TNF_DN | 0,15031175 |
| CHIARETTI_ZAP70_DIFF | 0,15034086 |
| OKUMURA_MC_LPS | 0,15042824 |
| UVB_NHEK2_UP | 0,15049413 |
| UVB_NHEK3_C0 | 0,15050691 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|------------|
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_48HRS_UP | 0,15063983 |
| AGED_MOUSE_RETINA_ANY_UP | 0,15112324 |
| ET743_SARCOMA_24HRS_DN | 0,15157622 |
| TARTE_PC | 0,15170725 |
| JECHLINGER EMT UP | 0,15175733 |
| WERNER_FIBRO_DN | 0,15185222 |
| CMV_8HRS_DN | 0,1518977 |
| CROONQUIST_IL6_STROMA_UP | 0,15208888 |
| IL1RPATHWAY | 0,15214935 |
| AGED_MOUSE_CORTEX_UP | 0,15217562 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_8D_DN | 0,1522808 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_REJECTION_UP | 0,1527369 |
| LEE_DENA_UP | 0,15282856 |
| BYSTROM_IL5_DN | 0,15415153 |
| PENG_RAPAMYCIN_DN | 0,15426636 |
| AS3_FIBRO_C3 | 0,15441811 |
| WERNERONLY_FIBRO_DN | 0,15456103 |
| LEE_TCELLS4_UP | 0,15458624 |
| AS3_FIBRO_UP | 0,15470093 |
| HEMATOP_STEM_ALL_UP | 0,15475011 |
| MUNSHI_MM_VS_PCS_UP | 0,15480834 |
| ZHAN_MMPC_SIMAL | 0,15499856 |
| RAY_P210_DIFF | 0,1550941 |
| FERRARI_4HPR_UP | 0,15518945 |
| VEGF_MMMEC_3HRS_UP | 0,15523078 |
| IFNALPHA_HCC_UP | 0,15528588 |
| HASLINGER_B_CLL_11Q23 | 0,15528953 |
| UVC_LOW_ALL_DN | 0,15533017 |
| STFAS_SIGNALING_PATHWAY | 0,15554893 |
| TARTE_MATURE_PC | 0,15573774 |
| PENG_Glutamine_UP | 0,15592724 |
| YANG_OSTECLASTS_SIG | 0,15657431 |
| PENG_Glutamine_DN | 0,15691812 |
| SANA_IFNG_ENDOTHELIAL_UP | 0,15695943 |
| ERM_KO_SERTOLI_DN | 0,15707411 |
| SHEPARD_POS_REG_OF_CELL_PROLIFERATION | 0,15714772 |
| 4NQO_UNIQUE_FIBRO_UP | 0,15733673 |
| DOX_RESIST_GASTRIC_UP | 0,15737425 |
| KUROKAWA_5FU_IFN_SENSITIVE_VS_RESISTANT_DN | 0,15743662 |
| YU_CMYC_DN | 0,15749827 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|------------|
| CTNNB1_ONCOGENIC_SIGNATURE | 0,1587554 |
| SA_B_CELL_RECEPTOR_COMPLEXES | 0,15891938 |
| ROSS_PML_RAR | 0,15902102 |
| HSA01030_GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_1 | 0,15919058 |
| GAMMA_ESR_OLD_UNREG | 0,15921193 |
| IDX_TSA_UP_CLUSTER4 | 0,15991868 |
| NO1PATHWAY | 0,16062583 |
| HDACI_COLON_SUL_DN | 0,16112022 |
| HSA00565_ETHER_LIPID_METABOLISM | 0,16131279 |
| PASSERINI_IMMUNE | 0,16215943 |
| CHANG_SERUM_RESPONSE_DN | 0,16351765 |
| ADDYA_K562_HEMIN_TREATMENT | 0,16384988 |
| HSA04512_ECM_RECEPTOR_INTERACTION | 0,16390312 |
| RUTELLA_HEPATGFSNDCS_UP | 0,1651148 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_24HRS_DN | 0,16583315 |
| ST_G_ALPHA_I_PATHWAY | 0,16597734 |
| INOS_ALL_DN | 0,16606128 |
| MAMMARY_DEV_UP | 0,16707349 |
| AS3_FIBRO_C1 | 0,16727026 |
| HASLINGER_B_CLL_12 | 0,1673312 |
| AGEING_KIDNEY_UP | 0,16749705 |
| AS3_FIBRO_C2 | 0,16755186 |
| PASSERINI_SIGNAL | 0,1677289 |
| ATRBRCAPATHWAY | 0,16775142 |
| TPA_RESIST_EARLY_DN | 0,16782525 |
| OXSTRESS_RPE_H202TBH_DN | 0,1678344 |
| P53_BRCA1_UP | 0,1678418 |
| CELL_ADHESION | 0,16795067 |
| HSA00310_LYSINE_DEGRADATION | 0,16802531 |
| TGFBETA_LATE_UP | 0,16803889 |
| HSA05222_SMALL_CELL_LUNG_CANCER | 0,1701583 |
| RAC1PATHWAY | 0,17040874 |
| HDACI_COLON_SUL30MIN_DN | 0,17152873 |
| MOREAUX_TACI_HI_IN_PPC_UP | 0,17201042 |
| GLYCEROLIPID_METABOLISM | 0,17364457 |
| STOSSI_ER_UP | 0,17372909 |
| HDACI_COLON_CLUSTER9 | 0,17434259 |
| NF90_UP | 0,17454778 |
| KLEIN_PEL_DN | 0,17564699 |
| PARK_MSCS_DIFF | 0,1757411 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|------------|
| ADIP_HUMAN_DN | 0,1757531 |
| RIBAVIRIN_RSV_UP | 0,17576809 |
| TENEDINI_MEGAKARYOCYTIC_GENES | 0,17580557 |
| CMV_IE86_UP | 0,17582427 |
| CROONQUIST_IL6_RAS_DN | 0,1759441 |
| TSA_HEPATOMA_UP | 0,17594522 |
| NFKBPATHWAY | 0,17603053 |
| ROSS_CBF_LEUKEMIA | 0,1761407 |
| GALE_FLT3ANDAPL_UP | 0,17615002 |
| ADIP_DIFF_CLUSTER2 | 0,17622577 |
| POMEROY_MD_TREATMENT_GOOD_VS_POOR_DN | 0,17623748 |
| HSA04080_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION | 0,1763555 |
| HADDAD_CD45CD7_PLUS_VS_MINUS_DN | 0,1767668 |
| HSA04612_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION | 0,17696081 |
| HADDAD_HSC_CD7_DN | 0,17705052 |
| ADIP_DIFF_CLUSTER1 | 0,17716199 |
| HDACI_COLON_BUT_UP | 0,17736544 |
| HSA00100_BIOSYNTHESIS_OF_STEROIDS | 0,17781189 |
| SERUM_FIBROBLAST_CORE_DN | 0,17786564 |
| TSA_HEPATOMA_CANCER_UP | 0,17787606 |
| SMITH_HCV_INDUCED_HCC_UP | 0,17789568 |
| HSC_INTERMEDIATEPROGENITORS_ADULT | 0,18001235 |
| GO_ROS | 0,18005292 |
| S1P_SIGNALING | 0,18021575 |
| NADLER_OBESITY_UP | 0,18025519 |
| BAF57_BT549_UP | 0,18033901 |
| LIAN_MYELOID_DIFF_GRANULE | 0,18042083 |
| GNATENKO_PLATELET_UP | 0,18045807 |
| PASSERINI_INFLAMMATION | 0,18059188 |
| CALRES_MOUSE_NEOCORTEX_UP | 0,18062651 |
| GNATENKO_PLATELET | 0,1807396 |
| XPB_TTD-CS_UP | 0,18079405 |
| HSA04514_CELL_ADHESION_MOLECULES | 0,18083291 |
| DAC_BLADDER_UP | 0,18086575 |
| UVB_NHEK1_UP | 0,18093763 |
| TSA_CD4_UP | 0,1810399 |
| GPCRDB_CLASS_A_RHODOPSIN_LIKE | 0,18107054 |
| HALMOS_CEBP_DN | 0,181276 |
| HSA05220_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA | 0,18175948 |
| BRCA1_MES_UP | 0,18191634 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|--|------------|
| MUNSHI_MM_UP | 0,1823359 |
| BHATTACHARYA_ESC_UP | 0,18247174 |
| WNTPATHWAY | 0,18253918 |
| HSA00530_AMINOSUGARS_METABOLISM | 0,18265657 |
| CERAMIDEPATHWAY | 0,1828597 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_WELL_UP | 0,18293731 |
| KANG_TERT_UP | 0,18365723 |
| OVARIAN_INFERTILITY_GENES | 0,18385155 |
| GH_GHRHR_KO_6HRS_DN | 0,18395166 |
| LIAN_MYELOID_DIFF_RECEPTORS | 0,18399741 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_10D_DN | 0,18440002 |
| CHOLESTEROL_BIOSYNTHESIS | 0,1847759 |
| HSA04540_GAP_JUNCTION | 0,1848347 |
| TAVOR_CEBP_DN | 0,18556434 |
| HSA00500_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM | 0,1856034 |
| PLATELET_EXPRESSED | 0,18569198 |
| AGEING_BRAIN_UP | 0,186651 |
| DIAB_NEPH_UP | 0,1866737 |
| BCNU_GLIOMA_MGMT_48HRS_DN | 0,18687859 |
| AGED_MOUSE_CEREBELLUM_DN | 0,1874551 |
| HSA00030_PENTOSE_PHOSPHATE_PATHWAY | 0,18766026 |
| WONG_IFNA_HCC_RESISTANT_VS_SENSITIVE_DN | 0,18778451 |
| DFOSB_BRAIN_8WKS_UP | 0,18808551 |
| HADDAD_HPCLYMPHO_ENRICHED | 0,18845524 |
| HBX_HEP_UP | 0,18865947 |
| BOQUEST_CD31PLUS_VS_CD31MINUS_DN | 0,18866067 |
| TCELL_ANERGIC_UP | 0,19079365 |
| HSA00260_GLYCINE_SERINE_AND_THREONINE_METABOLISM | 0,19159348 |
| CCR3PATHWAY | 0,1915958 |
| HCC_SURVIVAL_GOOD_VS_POOR_DN | 0,1916092 |
| CASPASEPATHWAY | 0,19174318 |
| ROS_MOUSE_AORTA_DN | 0,1917559 |
| H2O2_CSBRESCUED_C1_UP | 0,19181655 |
| HDACI_COLON_CUR_UP | 0,19189991 |
| CANCER NEOPLASTIC_META_UP | 0,19196437 |
| UV_UNIQUE_FIBRO_UP | 0,19258218 |
| GAMMA-UV_FIBRO_DN | 0,19291615 |
| NING_COPD_UP | 0,19328448 |
| BENNETT_SLE_UP | 0,1938234 |
| IGF1_NIH3T3_UP | 0,19403242 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|------------|
| CROONQUIST_RAS_STROMA_UP | 0,19477823 |
| HIVNEFPATHWAY | 0,19495702 |
| CARIES_PULP_HIGH_UP | 0,19508535 |
| CROMER_HYPOPHARYNGEAL_MET_VS_NON_UP | 0,1951668 |
| TAKEDA_NUP8_HOXA9_3D_DN | 0,19658327 |
| STANELLE_E2F1_UP | 0,1978441 |
| VEGF_MMMEC_6HRS_UP | 0,1991934 |
| APOPTOSIS | 0,19987626 |
| APOPTOSIS_GENMAPP | 0,19989651 |
| CROMER_HYPOPHARYNGEAL_MET_VS_NON_DN | 0,20057206 |
| PASSERINI_PROLIFERATION | 0,20094965 |
| LEE_ACOX1_UP | 0,20226721 |
| BRENTANI_CYTOSKELETON | 0,20314501 |
| ADIPOGENESIS_HMSC_CLASS3_UP | 0,20336221 |
| FRASOR_ER_DN | 0,20343539 |
| PASSERINI_ADHESION | 0,20356679 |
| PASSERINI_EM | 0,20358007 |
| DAC_FIBRO_UP | 0,20428288 |
| FLOTHO_CASP8AP2_MRD_DIFF | 0,20437786 |
| UVC_HIGH_D7_DN | 0,20440628 |
| HSC_INTERMEDIATEPROGENITORS_SHARED | 0,20462373 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_14HRS_DN | 0,20476495 |
| BASSO_HCL_DIFF | 0,20574453 |
| GAMMA_ESR_WS_UNREG | 0,2057917 |
| IGF_VS_PDGF_DN | 0,20666905 |
| CROONQUIST_IL6_RAS_UP | 0,20723964 |
| IRS_KO_ADIP_DN | 0,20752625 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_WELL_PBL_UP | 0,2093802 |
| APPEL_IMATINIB_UP | 0,2107771 |
| HSA05214_GLIOMA | 0,21128817 |
| BRCA2_BRCA1_UP | 0,21251862 |
| HSA04360_AXON_GUIDANCE | 0,21335466 |
| PARK_HSC_VS_MPP_UP | 0,21349284 |
| LIZUKA_L0_SM_L1 | 0,21357848 |
| KERATINOCYTEPATHWAY | 0,21368635 |
| N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS | 0,21369067 |
| METPATHWAY | 0,21382597 |
| HIPPOCAMPUS_DEVELOPMENT_PRENATAL | 0,21384783 |
| TGFBETA_C1_UP | 0,21391122 |
| HSA01031_GLYCAN_STRUCTURES_BIOSYNTHESIS_2 | 0,2139361 |

ES 2 708 624 T3

| | |
|---|------------|
| HSA04010_MAPK_SIGNALING_PATHWAY | 0,21404946 |
| FLECHNER_KIDNEY_TRANSPLANT_REJECTION_PBL_DN | 0,21407354 |
| LIAN_MYELOID_DIFF_TF | 0,21415913 |
| ECMPATHWAY | 0,21429983 |
| CMV_HCMV_TIMECOURSE_1HR_DN | 0,21430913 |
| INSULIN_SIGNALING | 0,21436907 |
| RORIE_ES_PNET_UP | 0,21459675 |
| IDX_TSA_DN_CLUSTER2 | 0,21487209 |
| UEDA_MOUSE_SCN | 0,2150408 |
| TNF_AND_FAS_NETWORK | 0,21509545 |
| STRESS_GENOTOXIC_SPECIFIC_DN | 0,21512306 |
| NTHIPATHWAY | 0,21542308 |
| AGED_RHESUS_DN | 0,21564633 |
| HANSON_NFKAPPB_IND | 0,21593153 |
| HDACI_COLON_CLUSTER6 | 0,21621247 |
| HSA05219_BLADDER_CANCER | 0,21648672 |
| HSA01430_CELL_COMMUNICATION | 0,21658385 |
| HSA04510_FOCAL_ADHESION | 0,21669702 |
| AGUIRRE_PANCREAS_CHR12 | 0,2168742 |
| SMITH_HTERT_DN | 0,21999177 |
| ST_PHOSPHOINOSITIDE_3_KINASE_PATHWAY | 0,2200618 |
| JECHLINGER_EMT_DN | 0,22019191 |
| CELL_ADHESION_RECEPTOR_ACTIVITY | 0,22155796 |
| GOLDRATH_CYTOLYTIC | 0,22161815 |
| TNFR2PATHWAY | 0,2216969 |
| CMV-UV_HCMV_6HRS_DN | 0,2218287 |
| JAIN_NEMO_DIFF | 0,22184545 |
| HSC_HSC_FETAL | 0,2220867 |
| VERNELL_PRB_CLSTR1 | 0,2223137 |
| BUT_TSA_UP | 0,22237343 |
| CHEN_HOXA5_TARGETS_DN | 0,22312076 |
| HDACI_COLON_CUR_DN | 0,22334173 |
| STRESS_ARSENIC_SPECIFIC_DN | 0,22519669 |
| PENTOSE_PHOSPHATE_PATHWAY | 0,22524716 |
| MMS_MOUSE_LYMPH_HIGH_24HRS_UP | 0,22597119 |
| MENSSEN_MYC_UP | 0,22597916 |
| HADDAD_HSC_CD10_UP | 0,2260113 |
| CROONQUIST_RAS_STROMA_DN | 0,2262417 |
| NAB_LUNG_UP | 0,2264721 |
| ST_GA12_PATHWAY | 0,22669226 |

| | |
|---|------------|
| BRG1_ALAB_DN | 0,22756894 |
| HDACI_COLON_SUL16HRS_DN | 0,22758031 |
| HSA00510_N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS | 0,22761597 |
| TNFALPHA_30MIN_UP | 0,22775866 |
| FETAL_LIVER_ENRICHED_TRANSCRIPTION_FACTORS | 0,22872427 |
| INOSITOL_PHOSPHATE_METABOLISM | 0,22881456 |
| MANALO_HYPOXIA_UP | 0,2289087 |
| HSA01032_GLYCAN_STRUCTURES_DEGRADATION | 0,2289546 |
| KLEIN_PEL_UP | 0,22988707 |
| HSA04210_APOPTOSIS | 0,22989124 |
| UV_4NQO_FIBRO_UP | 0,23033006 |
| SIG_REGULATION_OF_THE_ACTIN_CYTOSKELETON_BY_RHO_GTPASES | 0,23105277 |
| ZHAN_MM_CD138_HP_VS_REST | 0,23247305 |
| INSULIN_NIH3T3_UP | 0,23272075 |
| TGFBETA_C5_UP | 0,23543428 |
| PURINE_METABOLISM | 0,23597485 |
| GH_AUTOCRINE_UP | 0,23621017 |
| BRENTANI_IMMUNE_FUNCTION | 0,23727974 |
| AGUIRRE_PANCREAS_CHR1 | 0,2383487 |
| WNT_SIGNALING | 0,23855525 |
| CHEN_HOXA5_TARGETS_UP | 0,23858711 |
| HSA04610_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES | 0,23873012 |
| GH_AUTOCRINE_DN | 0,2394122 |
| RIBAVIRIN_RSV_DN | 0,24160875 |
| SMITH_HTERT_UP | 0,24165125 |
| HSA04630_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY | 0,24340692 |
| STRESS_ARSENIC_SPECIFIC_UP | 0,24574614 |
| TSADAC_PANC50_UP | 0,24603078 |
| HSA00561_GLYCEROLIPID_METABOLISM | 0,2464587 |
| ZHAN_MM_CD138_CD1_VS_REST | 0,24645932 |
| CELL_ADHESION_MOLECULE_ACTIVITY | 0,2464768 |
| INOS_ALL_UP | 0,24656406 |
| LEE_CIP_UP | 0,24662143 |
| CALCINEURIN_NF_AT_SIGNALING | 0,2466587 |
| RHOPATHWAY | 0,24722067 |

Bibliografia

1. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5:522-531.
2. Sun W, Julie Li YS, Huang HD, Shyy JY, Chien S. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;12:1-27.
3. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during

- mouse development. *J Biol Chem.* 2005;280:9330-9335.
4. Lee KH, Chen YL, Yeh SD, Hsiao M, Lin JT, Goan YG, Lu PJ. MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. *Oncogene.* 2009;28:3360-3370.
- 5 5. Niu J, Shi Y, Tan G, Yang CH, Fan M, Pfeiffer LM, Wu ZH. DNA damage induces NF-kappaB-dependent microRNA-21 upregulation and promotes breast cancer cell invasion. *J Biol Chem.* 2012;287:21783-21795.
6. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene.* 2008;27:1788-1793.
- 10 7. Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11:136-146.
8. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;324:1710-1713.
- 15 9. Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JP, Hofer I, Pasterkamp G, Bode C, Moser M. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2011; 123:999-1009.
10. Yin KJ, Olsen K, Hamblin M, Zhang J, Schwendeman SP, Chen YE. Vascular endothelial cell-specific microRNA-15a inhibits angiogenesis in hindlimb ischemia. *J Biol Chem.* 2012;287:27055-27064.
- 20 11. Dokun AO, Keum S, Hazarika S, Li Y, Lamonte GM, Wheeler F, Marchuk DA, Annex BH. A quantitative trait locus (LSq-1) on mouse chromosome 7 is linked to the absence of tissue loss after surgical hindlimb ischemia. *Circulation.* 2008;117:1207-1215.
12. Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiol Genomics.* 2007;30:179-191.
- 25 13. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:520-526.
14. Li Y, Hazarika S, Xie D, Pippen AM, Kontos CD, Annex BH. In mice with type 2 diabetes, a vascular endothelial growth factor (VEGF)-activating transcription factor modulates VEGF signaling and induces therapeutic angiogenesis after hindlimb ischemia. *Diabetes.* 2007;56:656-665.
- 30 15. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res.* 2007;101:948-956.
16. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing.: R Foundation for Statistical Computing; 2009:1-409.
- 35 17. Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, Tavare S. Beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics.* 2007;23:2183-2184.
18. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:15545-15550.
- 40 19. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005;438:685-689.
20. Ge Y, Sun Y, Chen J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. *J Cell Biol.* 2011;192:69-81.
- 45 21. Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, Yee AJ, Ang LC, He C, Shan SW, Yang BB. MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8. *Oncogene.* 2011;30:806-821.
22. Long J, Wang Y, Wang W, Chang BH, Danesh FR. Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions. *J Biol Chem.* 2010;285:23457-23465.
23. Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, Magnus JF, Kibukawa M, Schelter JM, Kobayashi SV, Lim L, Burchard J, Jackson

- AL, Linsley PS, Cleary MA. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2008;28:2167-2174.
24. Petrocca F, Vecchione A, Croce CM. Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res*. 2008;68:8191-8194.
- 5 25. Fu X, Tian J, Zhang L, Chen Y, Hao Q. Involvement of microRNA-93, a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells. *FEBS Lett*. 2012;586:1279-1286.
- 10 26. Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, Cho HS, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S, Maejima K, Chino M, Field HI, Neal DE, Tsuchiya E, Ponder BA, Maehara Y, Nakamura Y, Hamamoto R. Minichromosome Maintenance Protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2011;10:65-66.
27. Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, Liu TJ, Stilwell A, Atienza C, Jr., McMasters KM. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer*. 1999;86:2021-2033.
- 15 28. Shan B, Lee WH. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1994;14:8166-8173.
29. Qin G, Kishore R, Dolan CM, Silver M, Wecker A, Luedemann CN, Thorne T, Hanley A, Curry C, Heyd L, Dinesh D, Kearney M, Martelli F, Murayama T, Goukassian DA, Zhu Y, Losordo DW. Cell cycle regulator E2F1 modulates angiogenesis via p53-dependent transcriptional control of VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:11015-11020.
- 20 30. Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, Kay M, Winn R, Harlan J. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem*. 1999;274:8039-8045.
31. Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 2011;17:71-78.
- 25 32. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008;132:875-886.
33. Li Y, Tan W, Neo TW, Aung MO, Wasser S, Lim SG, Tan TM. Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2009;100:1234-1242.
34. Hubbi ME, Luo W, Baek JH, Semenza GL. MCM proteins are negative regulators of hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell*. 2011;42:700-712.
- 30 35. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105:659-669.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, y dicha composición farmacéutica comprende:
5 un agonista de la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93, en el que dicho agonista de miR-93 se selecciona del grupo de ácidos nucleicos aislados que consiste en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho agonista incrementa la expresión, los niveles, o la actividad de miR-93.
3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho ácido nucleico aislado está
10 unido de manera operable a un promotor específico de una célula.
4. Un vector de expresión para el uso en el tratamiento de la enfermedad arterial periférica, y dicho vector de expresión comprende una secuencia que codifica un agonista de miR-93 seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que comprende un miR-93 precursor, y un ácido nucleico que comprende un miR-93 maduro.
5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica
15 disminuye la expresión de al menos un gen de la ruta del ciclo celular seleccionado del grupo que consiste en p21, E2F-1, y p53.

Figura 1a - c

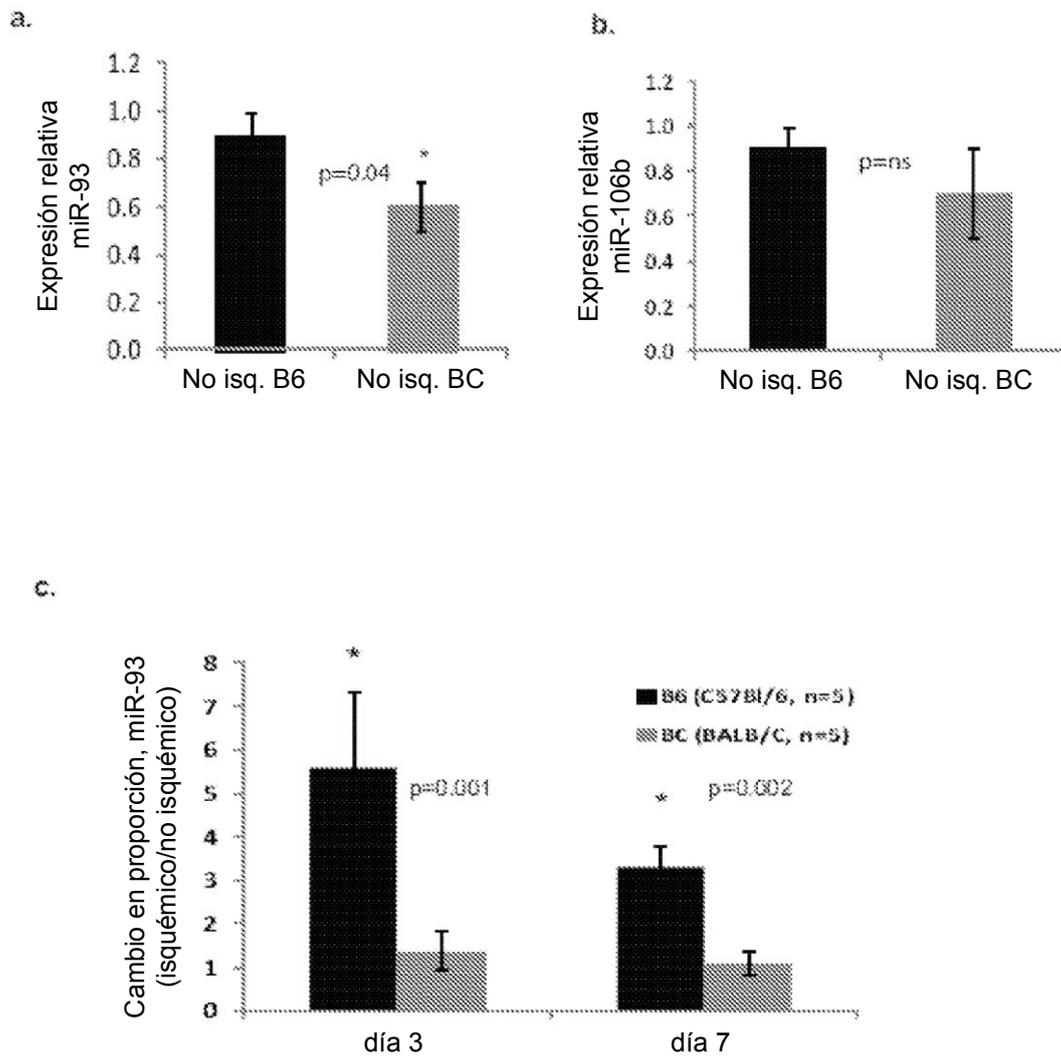


Figura 2a y 2b

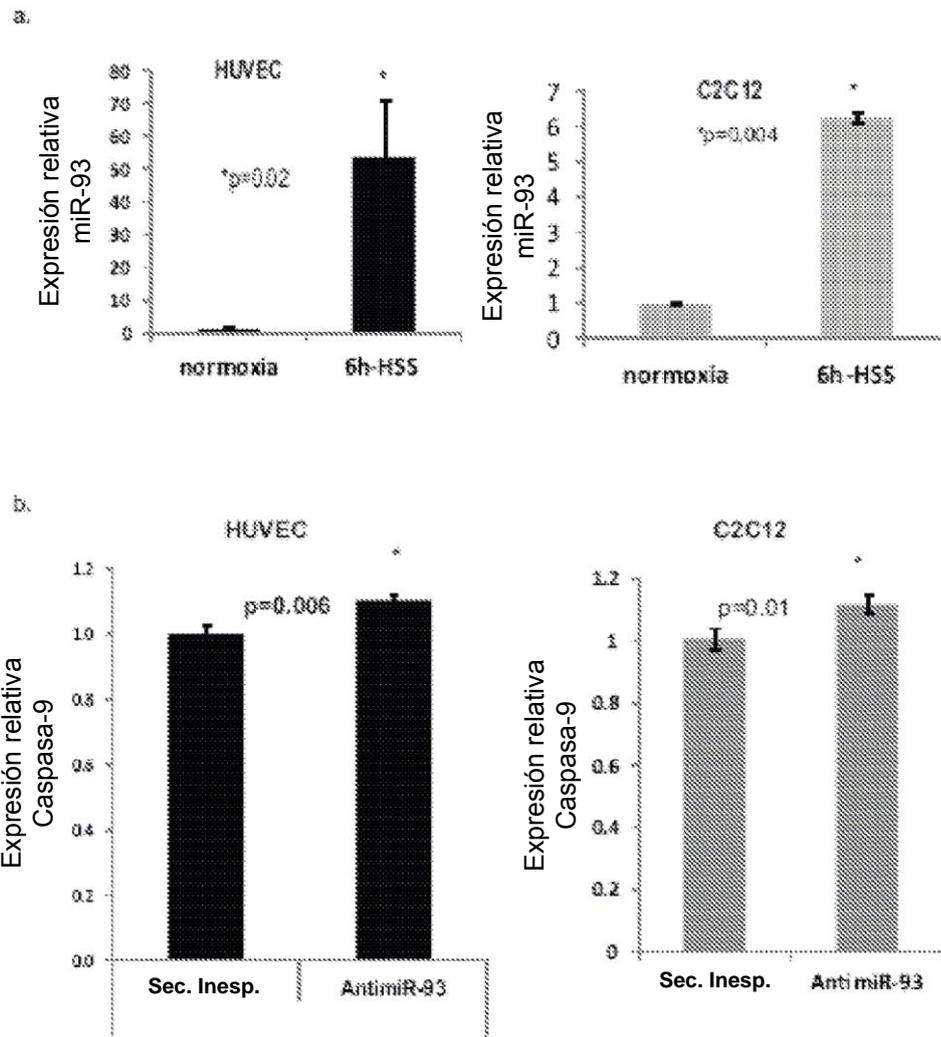


Figura 2c y 2d

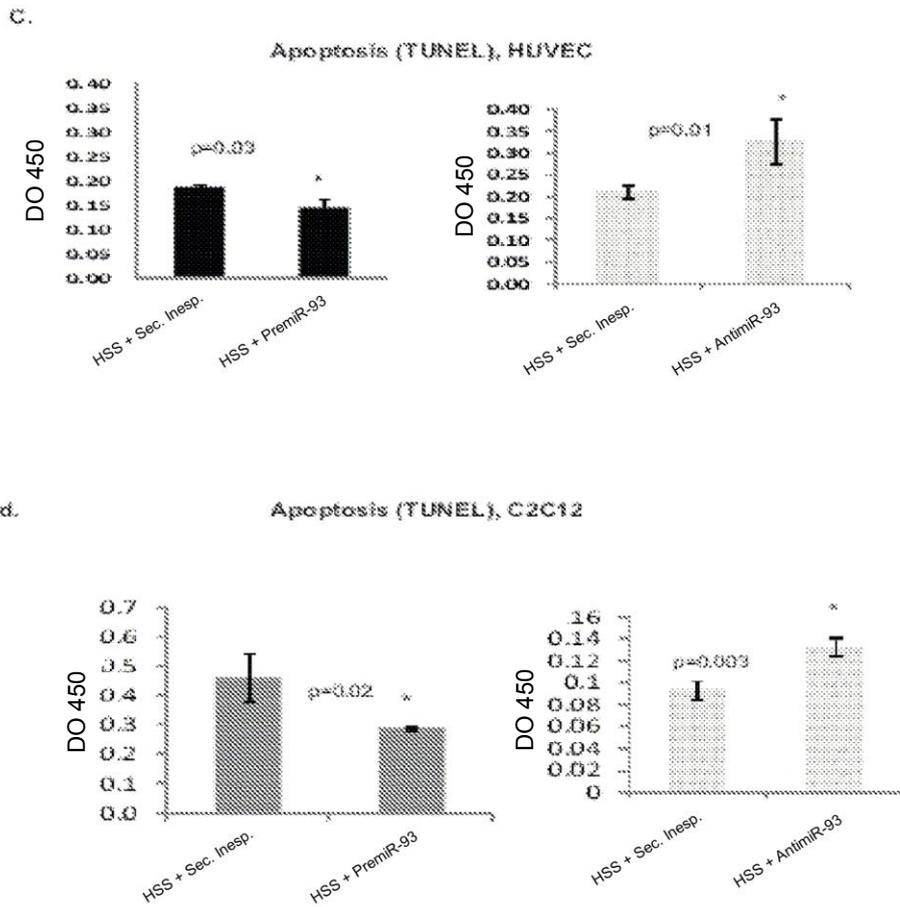


Figura 2e y 2g

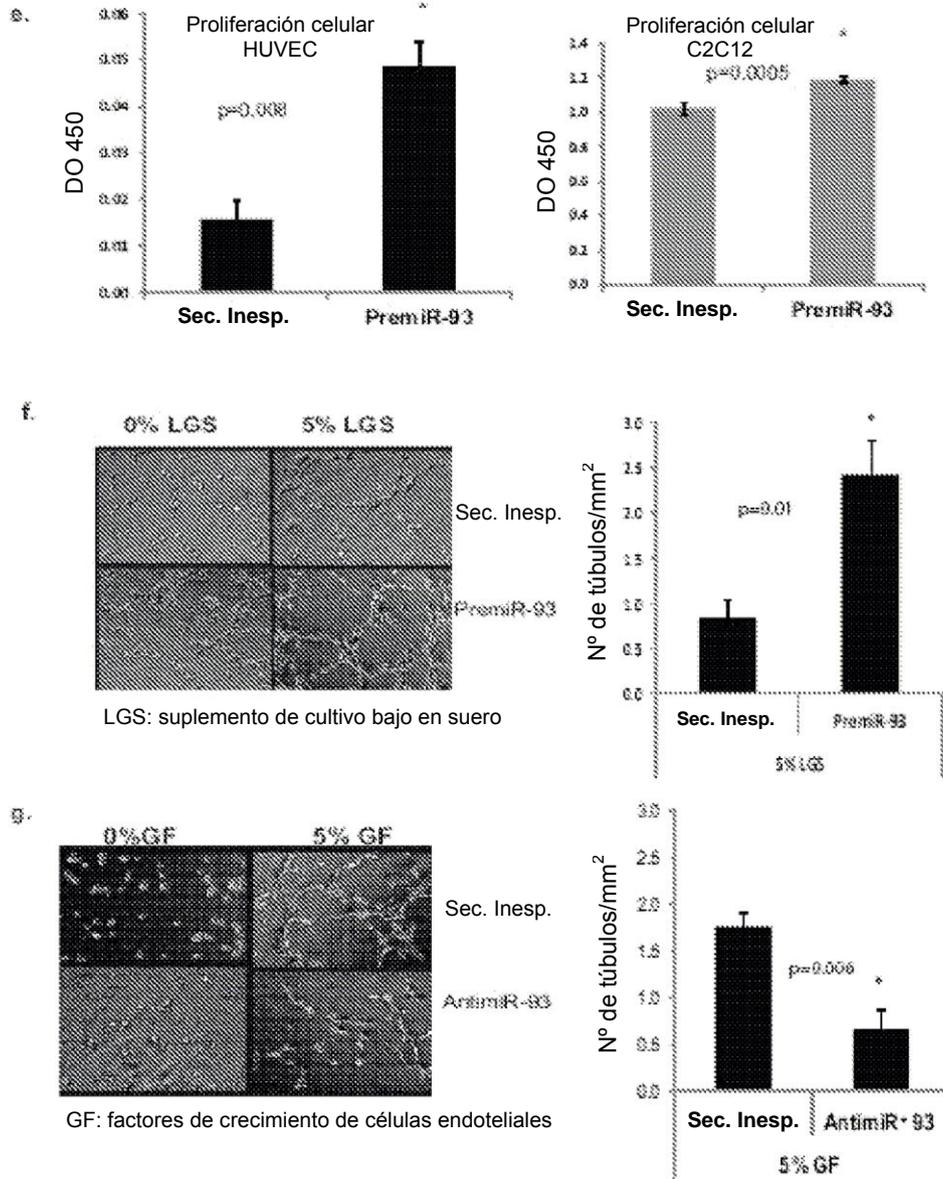


Figura 3a y 3b

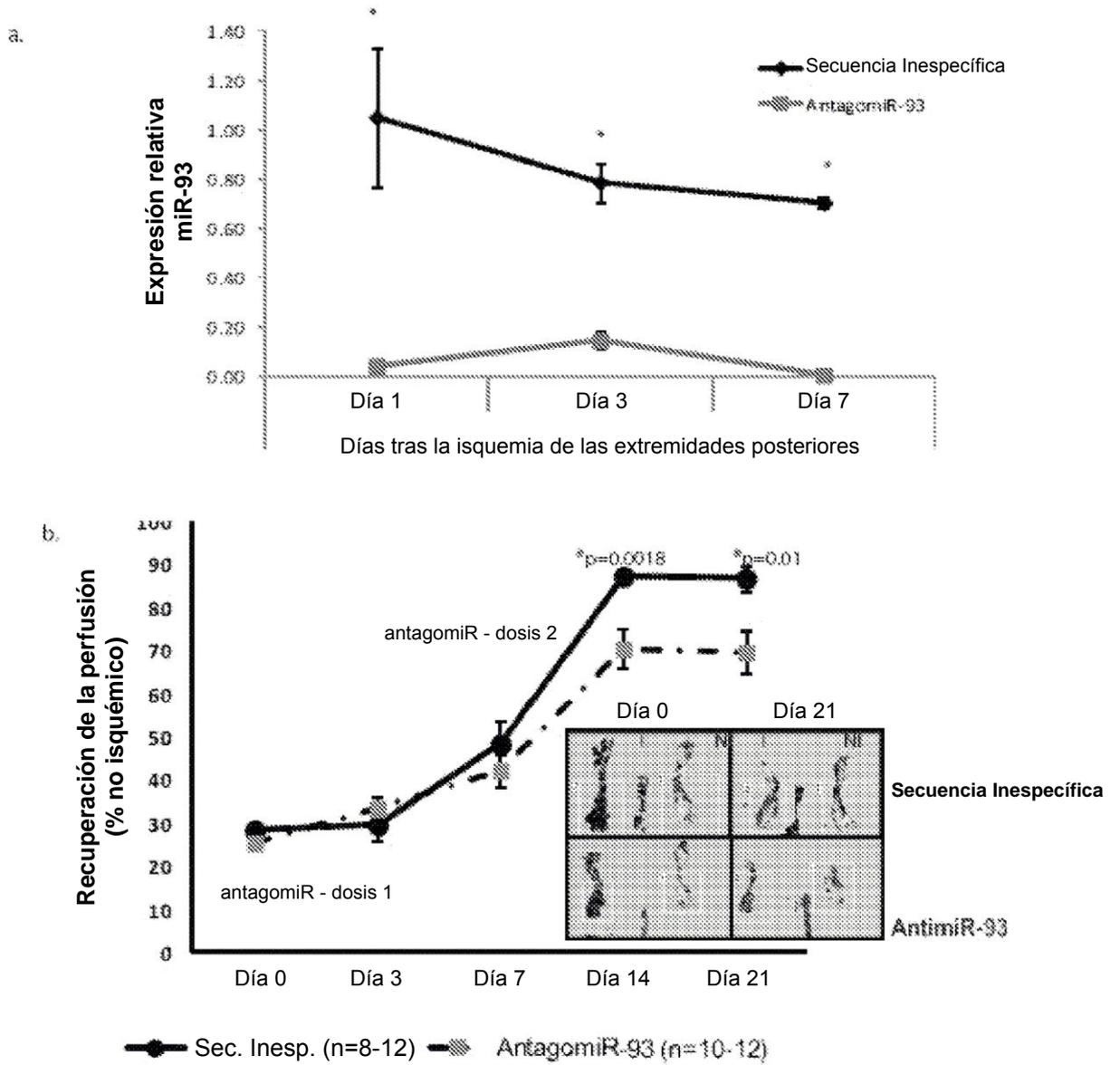


Figura 3c y 3d

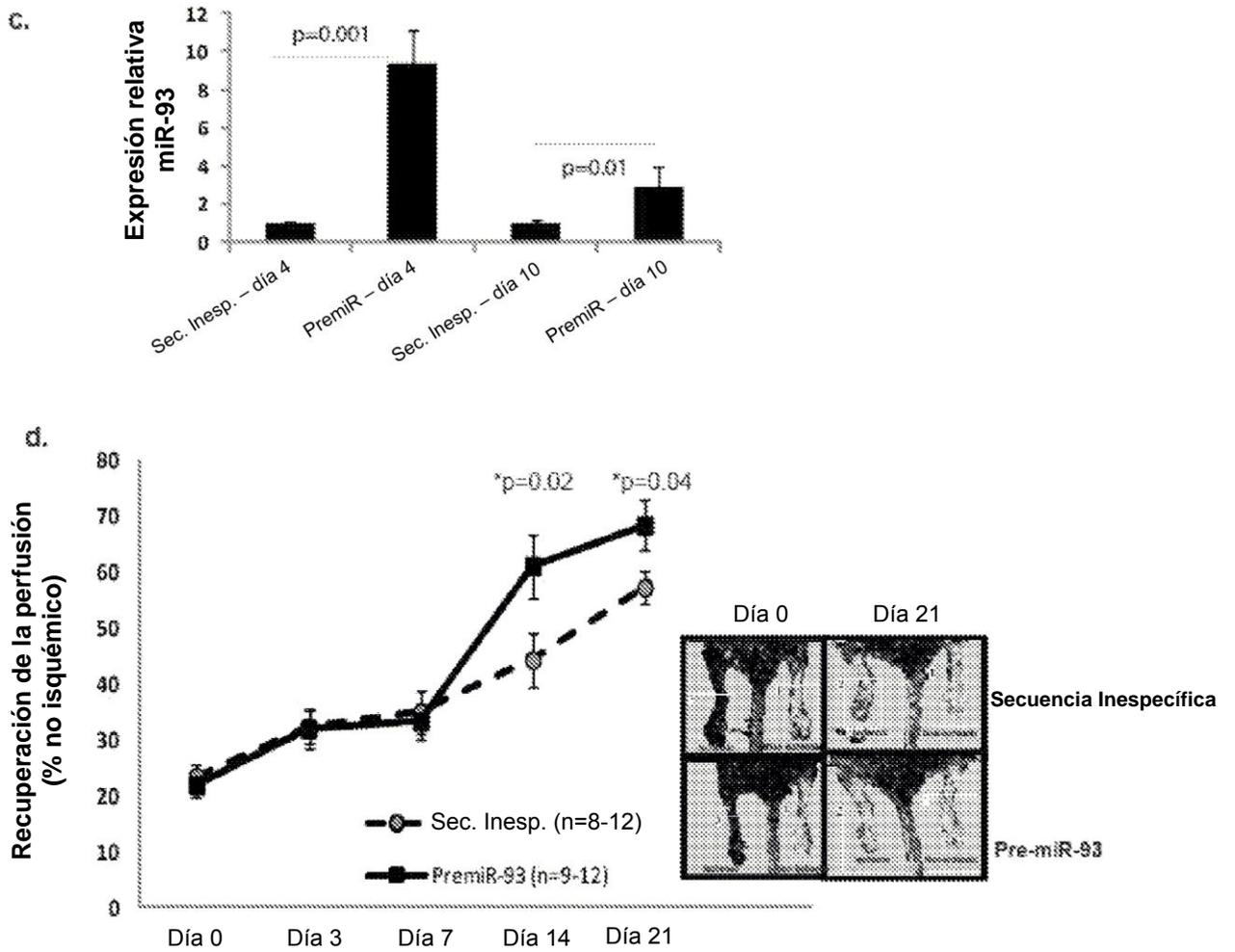


Figura 3e

e.

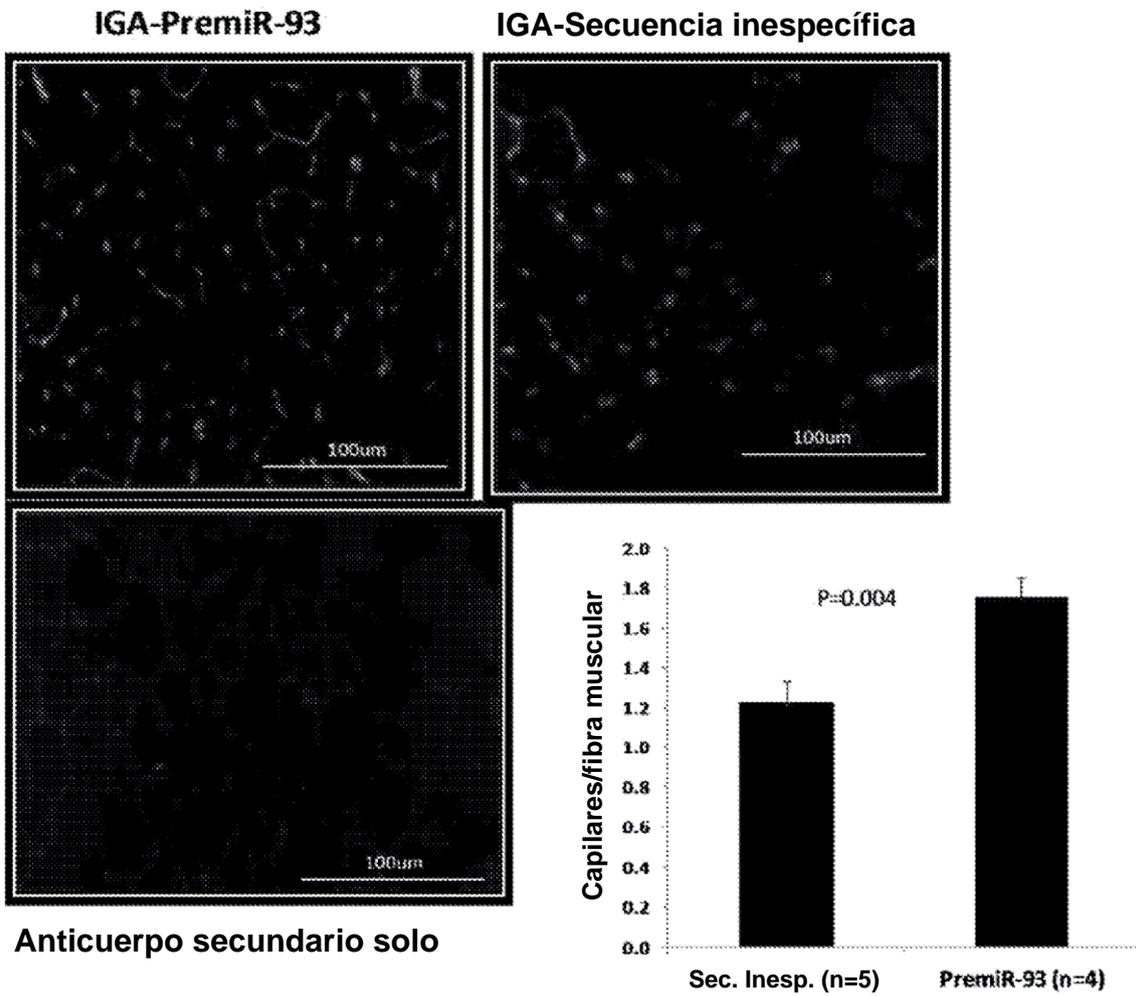
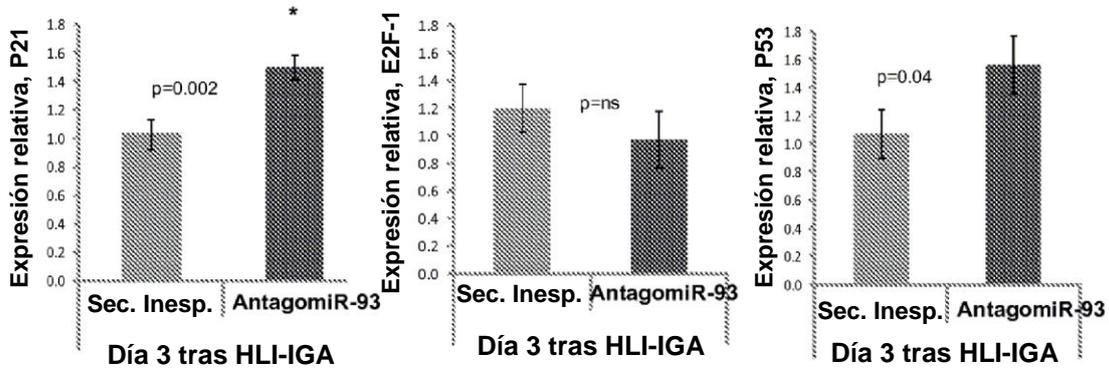


Figura 4a y 4b

a. Cambios en la expresión génica a nivel del mRNA, C57Bl/6J tratados con sec. inespecífica frente a AntagomiR-93



b. Cambios en la expresión génica a nivel de proteína, C57BL/6J tratados con sec. inespecífica frente a AntagomiR-93

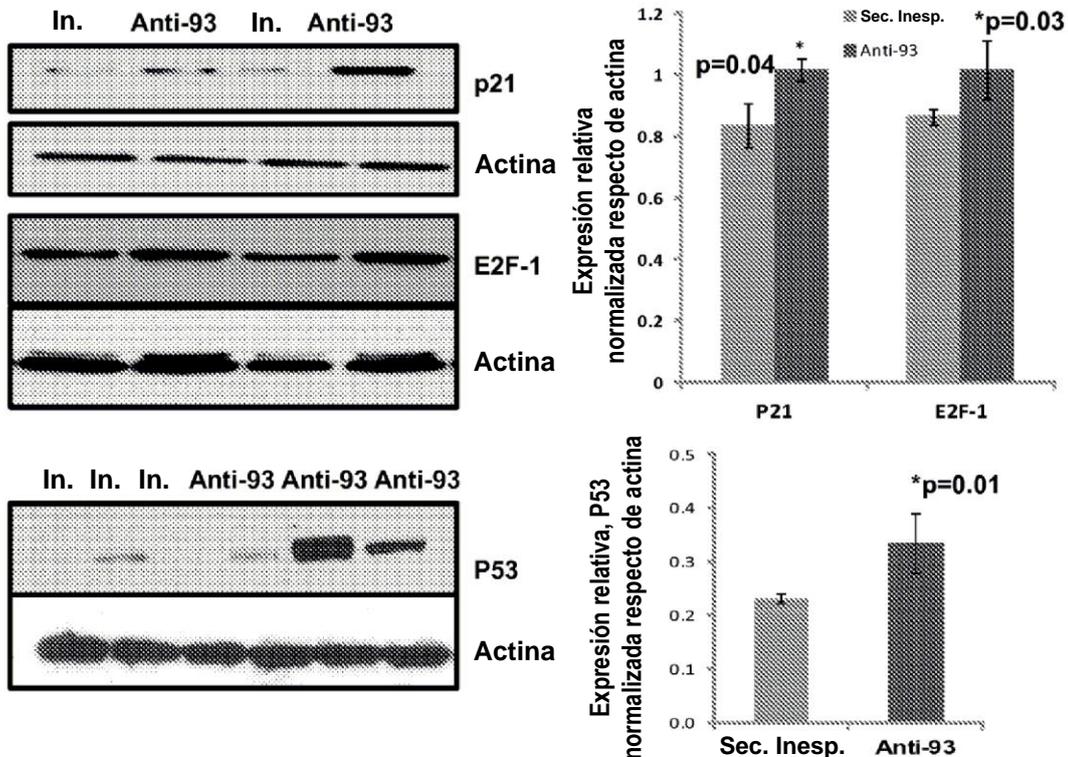
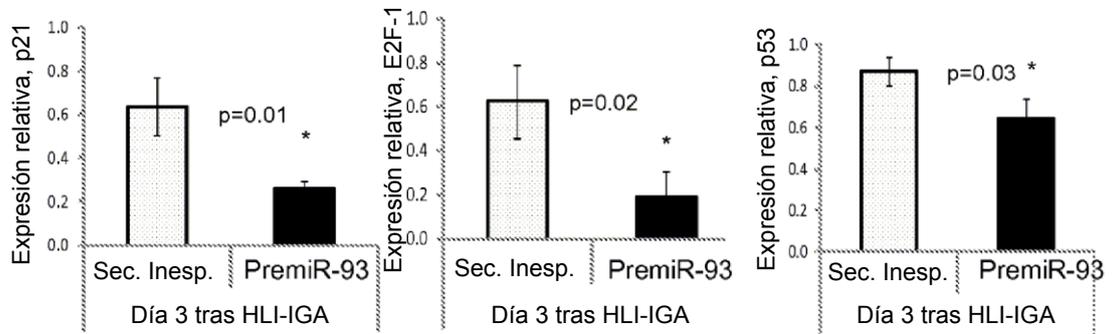


Figura 4c y 4d

c. Cambios en genes a nivel del mRNA con sobreexpresión de miR-93, BALB/cJ



d. Cambios a nivel de proteína con sobreexpresión de miR-93, BALB/cJ

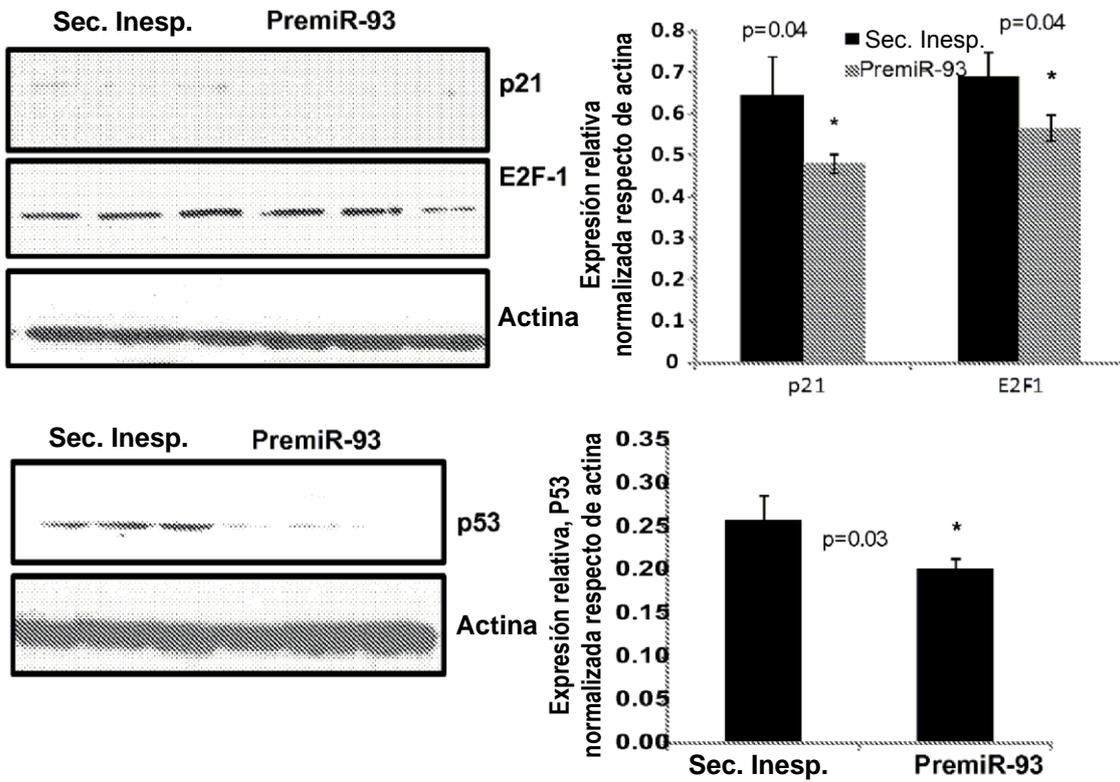
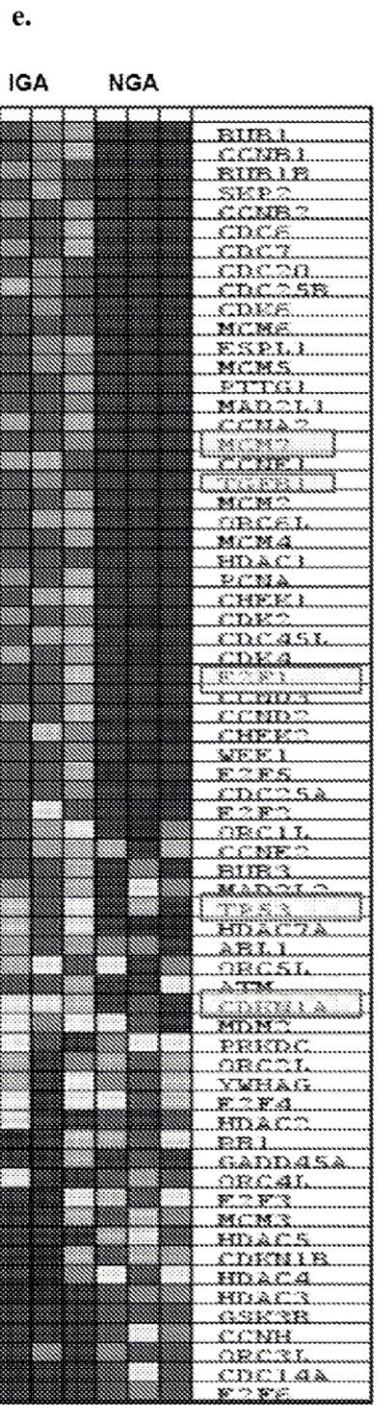


Figura 4e



El intervalo de colores (rojo a azul) indica el intervalo de enriquecimiento (alto a bajo)

Figura Suplementaria 1

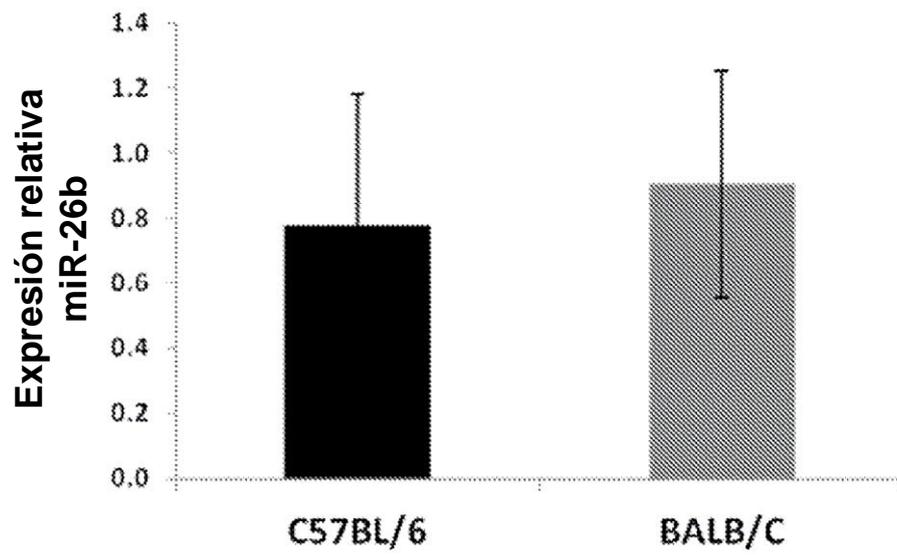


Figura Suplementaria 2 a-d

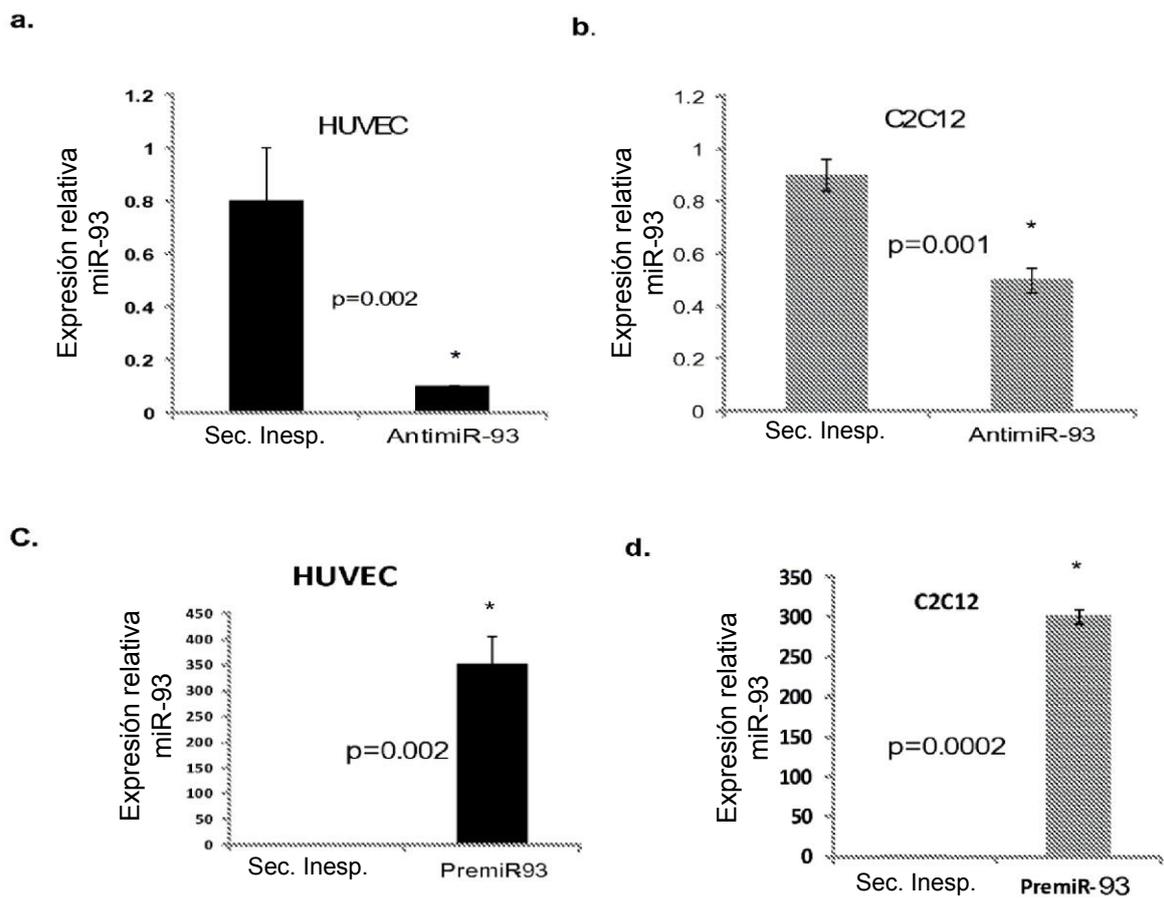


Figura Suplementaria 3

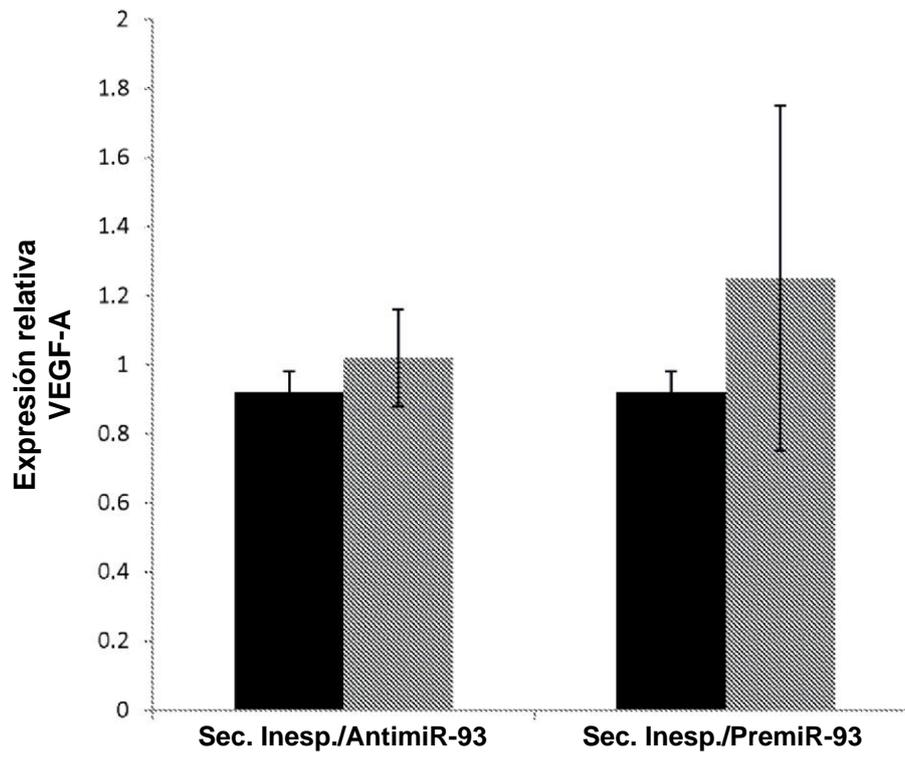


Figura Suplementaria 4a y b

