

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 250**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06845222 .6**
96 Fecha de presentación: **12.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1969125**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **MicroARN que regulan la proliferación y diferenciación de células musculares**

30 Prioridad:
12.12.2005 US 749544 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2012

73 Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL
308 BYNUM HALL CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:
**WANG, Da-zhi y
CHEN, Jianfu**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 387 250 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

MicroARN que regulan la proliferación y diferenciación de células musculares.

5 CAMPO TÉCNICO

10 [0001] La materia presentemente desvelada se refiere, en general, a procedimientos y composiciones para modular la expresión génica en un miocito. Más particularmente, la materia presentemente desvelada se refiere a procedimientos de uso de microARN (miARN) para modular el nivel de expresión de un gen en un miocito, y a composiciones que comprenden miARN.

ANTECEDENTES

15 [0002] El entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la proliferación y diferenciación celular es un tema central de la biología del desarrollo. Los microARN (miARN) son una clase recientemente descubierta de ARN reguladores de ~ 22 nucleótidos que regulan postranscripcionalmente la expresión génica^{1,2}. Un aumento de pruebas ha indicado la posible función de miARN en una variedad de procesos biológicos³⁻⁸.

20 [0003] ZHAO Y Y COL.: "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB LNKD-DOI: 10.1038/NATURE03817, vol. 436, nº 7048, 1 de julio de 2005, páginas 214 – 220, describe la función de miR-1 en células musculares y corazones. Se muestra que miR-1-1 se expresa específicamente en células precursoras de músculo cardíaco y esquelético y que los genes de miR-1 son dianas transcripcionales directas de reguladores de diferenciación de músculo que incluyen efector de la respuesta a suero, MyoD y Mif2. Se sugiere que los genes de miR-1 valoran los efectos de proteínas reguladoras cardíacas críticas para controlar el equilibrio entre la diferenciación y la proliferación durante la cardiogénesis. Sin embargo, no se ha descrito una combinación con miR-133.

30 [0004] Sin embargo, queda una necesidad que se sentía desde hace tiempo y continua en la materia para la caracterización de la función o funciones de miARN en procesos biológicos. La materia presentemente desvelada trata esta y otras necesidades en la materia.

RESUMEN

35 [0005] Este resumen enumera varias realizaciones de la materia presentemente desvelada, y en muchos casos enumera variaciones y permutaciones de estas realizaciones. Este resumen es simplemente a modo de ejemplo de las numerosas y variadas realizaciones. La mención de una o más características representativas de una realización dada es asimismo a modo de ejemplo. Una realización dada puede normalmente existir con o sin la(s) característica(s) mencionada(s); asimismo, aquellas características pueden aplicarse a otras realizaciones de la materia presentemente desvelada, si se enumeran en este resumen o no. Para evitar repetición excesiva, este resumen no enumera o sugiere todas las posibles combinaciones de tales características.

45 [0006] En una realización de la materia presentemente desvelada se proporcionan agentes para su uso en un procedimiento para tratar una lesión muscular en un sujeto. Específicamente, miARN-133 y un inhibidor de miARN-1 se administran en combinación al sitio de lesión muscular en un primer momento de tiempo y un miARN-1 y un inhibidor de miARN-133 se administran en combinación al sitio de lesión muscular en un segundo momento de tiempo para así tratar la lesión muscular. En algunas realizaciones, la lesión muscular resulta de un traumatismo muscular mecánico, un trastorno degenerativo muscular, una lesión cardíaca o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero.

50 [0007] En otra realización de la materia presentemente desvelada se proporciona un procedimiento *in vitro* para modular la diferenciación, proliferación de miocitos, o ambas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende poner en contacto un miocito con miARN (y un inhibidor de miR-133 o con miR133 y un inhibidor de miR-1 o un vector que codifica dichos miARN elegidos como diana para un gen en el miocito que pueden modular la diferenciación, proliferación de miocitos, o ambas. En algunas realizaciones, la modulación es inhibitoria y en algunas realizaciones el miARN inhibe la traducción del gen.

60 [0008] En todavía otra realización se proporciona una cantidad eficaz de un inhibidor de miR-1 y miR-133 o de miR1 y un inhibidor de miR-133 para tratar una lesión muscular.

65 [0009] En algunas realizaciones de los procedimientos desvelados en este documento, el miARN empleado comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID Nº: 1 y 2 y secuencias al menos el 70 % idénticas a cualquiera de SEQ ID Nº: 1 y 2. El miARN se selecciona de miR-1 y miR-133. Además, en algunas realizaciones, el miARN es elegido como diana para una región sin traducir de 3' del gen.

[0010] Además, en algunas realizaciones de los procedimientos, el gen elegido como diana por miARN se

selecciona del grupo que consiste en un gen de diferenciación de miocitos (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido de histona desacetilasa 4 (HDAC4) o una proteína de receptor de la hormona tiroidea 240 (TRAP240)), un gen de proliferación de miocitos (por ejemplo, un gen que codifica un polipéptido de factor de respuesta a suero (SRF)) y una proteína relacionada con la hormona (por ejemplo, un gen que codifica hormona tiroidea asociada a la proteína 1 (Thrap1)).

[0011] También se proporcionan vectores que codifican dichos miARN. En algunas realizaciones, el vector comprende un promotor operativamente ligado a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de miARN; y una secuencia de terminación de la transcripción. Además, en algunas realizaciones, el vector se incorpora en un kit que comprende además al menos un reactivo para introducir el vector en un miocito. El kit, en algunas realizaciones, comprende además instrucciones para introducir el vector en un miocito.

[0012] Por consiguiente, es un objeto de la materia presentemente desvelada proporcionar agentes para su uso en un procedimiento para manipular la expresión génica en un miocito usando un enfoque mediado por miARN. Este objeto se logra por completo o en parte por la materia presentemente desvelada.

[0013] Un objeto de la materia presentemente desvelada que se ha establecido anteriormente, otros objetos y ventajas serán evidentes para aquellos expertos en la materia después de un estudio de la siguiente descripción de la materia presentemente desvelada y ejemplos no limitantes. Los datos con referencia a otros miARN sólo se proporcionan para motivos comparativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

Las Figuras 1a-1e representan datos para la expresión de miR-1 y miR-133 en músculo cardíaco y esquelético durante el desarrollo.

La Figura 1a muestra datos de la expresión de matrices de miARN de mioblastos C2C12 cultivados en medio de crecimiento (MC) o en medio de diferenciación (MD) durante 0, 1, 3 y 5 días, respectivamente. Los datos logarítmicos normalizados (base 2) se agruparon jerárquicamente por gen y se representan como un mapa de calor. El intervalo de señal fue de -4 veces a + 4 veces. Amarillo denota alta expresión y azul denota baja expresión, con respecto a la mediana, y sólo se muestran los nodos de miARN que están regulados por incremento en el medio de diferenciación.

La Figura 1b representa un análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 y miR-133 usando ARN total aislado de mioblastos C2C12 cultivados en MC o en MD durante 0, 1, 3 y 5 días, respectivamente. Los ARNt se usaron como control de carga.

La Figura 1c representa un análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 y miR-133 en tejidos de ratón adulto.

La Figura 1d representa un análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 y miR-133 en tejidos de ratón del día embrionario 13,5 (E13,5) y 16,5 (E16,5).

La Figura 1e representa un análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 y miR-133 en tejidos de ratón neonato. La misma cantidad de ARN totales de músculo cardíaco y esquelético adulto se cargaron en transferencias para servir de una comparación con ARN embrionario y neonato (Figuras 1d y 1e).

Las Figuras 2a-2j representan datos que muestran la regulación de la proliferación y diferenciación de mioblastos por miR-1 y miR-133. Los mioblastos C2C12 cultivados en medio de crecimiento (MC) se electroporaron con dúplex de miARN bicatenario para miR-1, miR-133 y GFP como control.

Las Figuras 2a-2e muestran resultados de experimentos en los que células se cultivaron continuamente en MC durante 24 h después de la transfección, luego se transfirieron a medio de diferenciación (MD) durante 12 h antes de la inmunotinción para miogenina (Figura 2a) o 36 h antes de la inmunotinción para MHC (Figura 2b). Los mioblastos C2C12 cultivados en MC se electroporaron con dúplex de miARN bicatenario para miR-1, miR-133 (o sus mutantes como se indica), o miR-208 y GFP como controles y se cultivaron durante 24 h antes: transferencia usando anticuerpos indicados (Figura 2c); las células se transfirieron a MD durante 24 h y se realizaron RT-PCR para los genes indicados (Figura 2d); o las células se transfirieron a MD durante 24 h y transferencia Western usando los anticuerpos indicados (Figura 2e).

Las Figuras 2f-2h muestran resultados de experimentos en los que mioblastos C2C12 cultivados en MC se electroporaron con inhibidores de 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido para miR-1, miR-133 o miR-208 y GFP como controles. Las células se cultivaron en MC durante 24 h después de la transfección, luego se transfirieron a MD durante: 12 h antes de la inmunotinción para fosfo-histona H3 (Figura 2f); 24 h antes de la realización de la RT-

PCR para los genes indicados (Figura 2g); o 24 h antes de la transferencia Western usando anticuerpos indicados (Figura 2h).

5 Las Figuras 2i y 2j muestran resultados de experimentos en los que mioblastos C2C12 cultivados en MC se electroporaron con tanto dúplex de miARN como con inhibidores de 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido como se indica. Las células se cultivaron en MC durante 24 h después de la transfección, luego se transfirieron a MD durante 12 h antes de la inmunotinción para miogenina (Figura 2i) o fosfo-histona H3 (Figura 2j). Se contaron las células teñidas positivas y los datos se presentan como el nivel de expresión con respecto a un control de GFP (100 %).

10 Las Figuras 3a-3k representan datos que muestran el control del desarrollo de músculo cardíaco y esquelético por miR-1 y miR-133 *in vivo*.

15 Las Figuras 3a-3h muestran datos de experimentos en embriones de *Xenopus*. Embriones de *Xenopus* derivados de embriones sin inyectar (Figuras 3a y 3b), inyectados con control de ARN de GFP (Figuras 3c y 3d), inyectados con miR-1 (Figuras 3e y 3f) o inyectados con miR-133 (Figuras 3g y 3h) se tiñeron con anti-tropomiosina y se mostraron en la etapa 32 bajo campo brillante (Figuras 3a, 3c, 3e y 3g) o fluorescencia (Figuras 3b, 3d, 3f y 3h). Obsérvese la falta de tinción para tejido de corazón (Figura 3b y 3d, flechas H) y la alteración de somitas segmentadas (Figuras 3f y 3h, flechas S).

20 Las Figuras 3i-3k muestran datos de secciones transversales de embriones de *Xenopus*. Secciones transversales de embriones de *Xenopus* correspondientes a la posición del corazón en la etapa 32 de embriones sin inyectar (Figura 3i), inyectados con miR-1 (Figura 3j) o inyectados con miR-133 (Figura 3k) se tiñeron con anti-tropomiosina para visualizar somitas (flechas S) y tejido cardíaco (flechas H) y anti-fosfo-histona H3 (rojo) para visualizar células en fase S. Cada conjunto de inyecciones se realizó al menos dos veces independientemente, y el fenotipo se observó en al menos el 90 % de un mínimo de 50 embriones puntuados por inmunotinción de montaje completo.

Las Figuras 4a-4i representan datos que muestran la identificación de genes diana de miR-1 y miR-133 en músculo esquelético.

30 La Figura 4a representa datos que muestran la represión de 3' UTR de SRF y HDAC4 por miR-133 y miR-1. Los informadores de luciferasa que contienen tanto sitios complementarios de miR-133 de 3' UTR de SRF de ratón (SRF-3'-UTR), sitios complementarios de miR-1 de 3' UTR de HDAC4 de ratón (HDAC4-3'-UTR) o las secuencias antisentido perfectas de miR-133 (miR-133-luc) o miR-1 (miR-1-luc) se co-transfectaron con los vectores de expresión de miARN indicados o sus mutantes. La actividad de luciferasa se determinó 48 h después de la transfección. Los datos representan la media \pm d.e. de al menos tres experimentos independientes por duplicado (* P < 0,05).

40 La Figura 4b representa datos que muestran resultados de indicadores de luciferasa SRF-3'-UTR, HDAC4-3'-UTR y MCK-luc transfectados en mioblastos C2C12. Las células se mantuvieron en MC durante 24 h (MC) o se transfirieron a MD durante 1 día (MD1) o 3 días (MD3) antes de determinarse la actividad de luciferasa.

45 Las Figuras 4c-4e representan datos que muestran los resultados de mioblastos C2C12 cultivados en MC y electroporados con dúplex de miARN bicatenario indicados (o sus mutantes), o miR-208 y GFP como controles. Las células se cultivaron en MC durante 24 h después de la transfección antes: transferencia Western usando anticuerpos anti-SRF y anti-HDAC4 (Figura 4c); las células se transfirieron en MD durante 24 h y se realizó RT-PCR para los genes indicados (Figura 4d); las células se transfirieron en MD durante 24 h y transferencia Western usando los anticuerpos indicados. Los mioblastos C2C12 cultivados en MC se electroporaron con los inhibidores de 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido indicados (Figura 4e).

50 Las Figuras 4f y 4g representan datos que muestran resultados de células cultivadas en MC durante 24 h después de la transfección, luego se transfirieron a MD durante 24 h antes: se realizó RT-PCR para los genes indicados (Figura 4f); y transferencia Western usando los anticuerpos indicados (Figura 4g).

55 La Figura 4h representa datos que muestran los resultados de mioblastos C2C12 cultivados en MC y electroporados con los dúplex de miARN bicatenario indicados o/y plásmidos de expresión para SRF o HDAC4, como se indica. Las células se cultivaron en MC durante 24 h después de la transfección. La transferencia Western se realizó 24 h después de la transferencia en MD usando anticuerpos indicados.

60 La Figura 4i representa datos que muestran los resultados de mioblastos C2C12 cultivados en MC o MD durante 0, 1, 3 ó 5 días. La transferencia Western se realizó usando los anticuerpos indicados.

La Figura 5 muestra un modelo para la regulación mediada por miR-1 y miR-133 de proliferación y diferenciación de músculo esquelético.

65 La Figura 6 muestra datos de análisis de datos de expresión de matrices de miARN de mioblastos C2C12 cultivados en medio de crecimiento (MC) o en medio de diferenciación (MD) durante 0, 1, 3 y 5 días, respectivamente. Los

datos logarítmicos normalizados (base 2) se agruparon jerárquicamente por gen y se representan como un mapa de calor. El intervalo de señal fue de -4 veces a + 4 veces. La sombra clara denota alta expresión y la sombra oscura denota baja expresión, con respecto a la mediana.

5 Las Figuras 7a-7d muestran datos de expresión de miR-1, miR-133 y genes de marcadores de diferenciación de músculo esquelético en células C2C12.

10 Las Figuras 7a y 7b muestran análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 (Figura 7a) y miR-133 (Figura 7b) usando ARN total aislado de mioblastos C2C12 cultivados en MC o en medio de diferenciación (MD) durante 0, 1, 3 y 5 días, respectivamente. Se indican tanto los miARN maduros como sus precursores (Pre). Los ARNt se usaron como control de carga.

15 La Figura 7c muestra análisis por RT-PCR semi-cuantitativa de genes de marcadores de diferenciación de músculo esquelético. GAPDH se usó como control para carga igual.

20 La Figura 7d muestra la expresión de marcadores de diferenciación de músculo esquelético. Los mioblastos C2C12 se cultivaron en medio de crecimiento (MC) o en medio de diferenciación (MD) durante 0, 1, 3 y 5 días, y las transferencias Western se realizaron con extractos de células usando los anticuerpos indicados. La β -tubulina sirve de control de carga.

25 Las Figuras 8a-8f muestran datos de expresión de miR-1 y miR-133 en músculo cardíaco y esquelético en ratones adultos y durante todo el desarrollo. Se muestra el análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 (Figura 8a) y miR-133 (Figura 8d) en tejidos de ratón adulto. Se muestra el análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 (Figura 8b) y miR-133 (Figura 8e) en tejidos de ratón del día embrionario 13,5 (E13,5) y 16,5 (E16,5). La misma cantidad de ARN total de músculo cardíaco y esquelético adulto también se cargó en la transferencia para servir de comparación. Se muestra el análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-1 (Figura 8c) y miR-133 (Figura 8f) en tejidos de ratón neonato. La misma cantidad de ARN total de músculo cardíaco y esquelético adulto también se cargó en la transferencia para servir de comparación. Se indican tanto los miARN maduros como sus precursores (Pre). Los ARNt se usaron como controles de carga.

30 Las Figuras 9a-9e muestran datos para la expresión de transcritos primarios de miR-1 y miR-133 en músculo cardíaco y esquelético.

35 La Figura 9a es un diagrama que muestra genes de miR-1 y miR-133 agrupados en los cromosomas 2 y 18 de ratón. Las sondas usadas para transferencias Northern se denotan en las Figuras 9b-9e.

40 Las Figuras 9b-9e muestran datos de análisis de transferencia Northern de la expresión de transcritos primarios para miR-1 (Figuras 9c y 9e) y miR-133 (Figuras 9b y 9d) del cromosoma 2 (Figuras 9d y 9e) y el cromosoma 18 (Figuras 9b y 9c). Se usaron 20 μ g de ARN total de los tejidos de ratón adulto indicados.

45 Las Figuras 10a-10g proporcionan datos que muestran que el potenciador de miR-1 y miR-133 puede dirigir la expresión del gen indicador en músculo cardíaco y esquelético.

La Figura 10a muestra datos de *Xenopus laevis* transgénico para la secuencia genómica de miR-1 y miR-133 de ratón ligada a dsRed que ilustra la expresión de somitas (flechas S) en la etapa 28.

La Figura 10b muestra *Xenopus laevis* transgénico (Tg) que lleva un transgén que contiene miR-1 y miR-133 en la etapa 46 (embrión inferior) y control negativo (no transgénico, Ct, embrión superior) bajo campo brillante.

50 La Figura 10c es una fotografía de los mismos embriones que se muestran en la Figura 10b bajo fluorescencia.

La Figura 10d es una fotomicrografía de aumento de alta potencia del embrión transgénico en la Figura 10b bajo campo brillante que muestra la expresión del transgén en el corazón (flechas H) y arcos branquiales (flechas BA).

55 La Figura 10e es una fotomicrografía de aumento de alta potencia del embrión transgénico en la Figura 10b bajo fluorescencia que muestra la expresión del transgén en el corazón (flechas H) y arcos branquiales (flechas BA).

La Figura 10f es una fotomicrografía de aumento de alta potencia de un embrión transgénico en la etapa 46 que muestra la expresión del transgén en las somitas (flechas S).

60 La Figura 10g muestra secuencias genómicas de ADN (SEQ ID N°: 82) del potenciador de miR-1/133 del cromosoma 2 de ratón. Están marcados un sitio MEF2 putativo y la caja CArG, y se indican las mutaciones introducidas en estos sitios.

65 Las Figuras 11a – 11h muestran datos que demuestran la represión de un sensor de miR-133 por miR-133 en células C2C12. Las células C2C12 que expresan establemente el sensor de miR-133 se transfectaron con vectores de expresión para GFP (control), miR-133 natural (miR-133), miR-133 mutante (miR-133mut) en los que se había

mutado la secuencia “semilla”, o una combinación del vector de expresión de miR-133 y 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido (miR-133 + 2'-O-metilo). Las células se transfirieron a medio de diferenciación durante 12 h y se obtuvieron imágenes usando contraste de fases (P/C) (Figuras 11a – 11d) o fluorescencia para mostrar la expresión del gen indicador dsRed (Figuras 11e – 11h). Las células de cada condición se recogieron y la expresión del gen indicador dsRed se cuantificó usando análisis de FACS (paneles inferiores). El área blanca bajo la línea denota la autofluorescencia de la célula y el área rayada bajo la línea indica la expresión de ds-Red.

La Figura 12 muestra secuencias de los sitios diana de miR-1 y miR-133 en 3' UTR de genes *HDAC4* y *SRF*. Panel superior: secuencias de 3' UTR de *HDAC4* de especies vertebradas conservadas: ser humano (SEQ ID N°: 24), chimpancé (SEQ ID N°: 25), ratón (SEQ ID N°: 26), rata (SEQ ID N°: 27), perro (SEQ ID N°: 28) y pollo (SEQ ID N°: 29), y su alineamiento con miR-1 (SEQ ID N°: 1) y miR-206 (SEQ ID N°: 3). Panel inferior: secuencias de 3' UTR de *SRF* de ser humano (SEQ ID N°: 30 y 31) y rata (SEQ ID N°: 32 y 33) y su alineamiento con miR-133. Las secuencias de nucleótidos conservadas se enumeran en mayúsculas.

La Figura 13 representa un modelo de biogénesis de miARN. (A) pri-miARN se transcriben en el núcleo por ARN polimerasa II y (B) se procesan por Drosha a pre-miARN que contienen un tallo-bucle. (C) La exportina-5 reconoce el oligonucleótido protuberante en 3' dejado por Drosha y exporta pre-miARN al citoplasma, en el que (D) Dicer escinde pre-miARN por debajo del tallo-bucle para producir un dúplex de ~ 22 nucleótidos. (E) Una única cadena se incorpora en RISC, que (F) reconoce secuencias complementarias dentro de las regiones sin traducir de 3' de ARNm y regula la expresión génica por supresión traduccional o escisión de ARNm.

Las Figuras 14a-14c representan la genómica de miR-208. La Figura 14a muestra que una secuencia de miR-208 precursora de ratón (SEQ ID N°: 34) se pliega usando mFold y con la secuencia de miR-208 (SEQ ID N°: 4) madura a la derecha. La Figura 14b muestra un alineamiento de secuencias de secuencias del precursor de miR-208 de ratón (SEQ ID N°: 35), rata (SEQ ID N°: 36) y ser humano (SEQ ID N°: 37). La secuencia de miR-208 madura se muestra en la parte derecha superior de la Figura 14A. Los asteriscos denotan conservación de secuencia perfecta. La Figura 14c muestra que miR-208 se origina de un intrón de *alfa-MHC*. miR-208 de ratón se localiza dentro del intrón 29 de *α-MHC*. Similarmente, miR-208 humano se encuentra dentro del intrón 28 de *α-MHC*.

Las Figuras 15a – 15c muestran datos que demuestran que miR-208 está regulado por el desarrollo. El ARN total de diferentes tejidos de ratón se transfirió y se sondó con un oligodesoxinucleótido radiomarcado en 5' complementario a miR-208. La carga igual de ARN total sobre el gel se verificó por tinción con bromuro de etidio antes de la transferencia.

La Figura 15a muestra datos que demuestran que miR-208 es específico para cardíaco. La señal superior es el transcrito de pre-miR-208, mientras que la señal inferior es la forma madura de 22 nt.

La Figura 15b muestra datos de la expresión de miR-208 en tejidos de ratón neonato con respecto a músculo cardíaco y esquelético adulto.

La Figura 15c muestra datos de la expresión de miR-208 en diversos tejidos de ratones E13,5 y E16,5 con respecto a músculo cardíaco y esquelético adulto.

Las Figuras 16a y 16b muestran datos de la expresión de miR-208 ectópica en cardiomiocitos. La Figura 16a muestra una transferencia de Northern preparada a partir de cardiomiocitos infectados con Ad-GFP o Ad-208 sondados usando oligonucleótido antisentido de miR-208 radiomarcado. La Figura 16b muestra micrografías epifluorescentes de cardiomiocitos infectados a MOI 1 y 10.

La Figura 17 muestra un diagrama de un sistema transgénico condicional desvelado en este documento. Se utilizan dos líneas independientes de líneas transgénicas de ratones: una que expresa proteína de fusión tTA-VP16 bajo el control del promotor de *α-MHC* y una segunda línea que aloja el transgén *miR-208* bajo el control de un promotor mínimo del CMV. El promotor mínimo del CMV tiene varias repeticiones del operón de tetraciclina (tetO) localizado directamente en la dirección 5'. Las dos líneas se crían juntas y dan, asumiendo un patrón de herencia mendeliana, 1 de 4 ratones que son transgénicos dobles. Si la doxiciclina (DOX) se administra a un ratón transgénico doble, la proteína tTA-VP16 se une por DOX y se inhibe la transcripción de *miR-208*. Si la DOX está ausente, la proteína tTA se une al concatémoro tetO, que permite que el dominio de VP16 induzca la transcripción de *miR-208* del promotor mínimo del CMV. La expresión génica diana específica para cardíaco puede activarse o desactivarse mediante la adición o extracción de DOX. Adaptado de James y col. Am J Physiol 273: H2105-H2118, incorporado en este documento por referencia.

Las Figuras 18A-18C son gráficas y un alineamiento de secuencias que muestran datos que demuestran que miR-208 elige *Thrap1* como diana. Los indicadores de luciferasa con una secuencia de *miR-208* antisentido (sensor de miR-208), o 3' UTR de *hemoglobina-β* (*Hbb*) y hormona tiroidea asociada a la proteína 1 (*Thrap1*) (Figura 18A) o cuatro copias de sitios de unión de miR-208 putativos de 3' UTR de *Thrap 1* (Figura 18B) se unieron directamente en la dirección 3' del gen de luciferasa y se co-transfectaron con cantidades crecientes de miR-208 de pCDNAN3.1 en células 293T. El sensor de miR-208, los indicadores de *Thrap1* y 4x *Thrap1* se reprimieron ambos de un modo

dependiente de la dosificación, mientras que el control negativo CSNK no cambió significativamente. La Figura 18C muestra la secuencia de miR-208 madura (SEQ ID N°: 4) unida al sitio diana de miR-208 predicho dentro de la 3' UTR del gen *Thrap1* humano (SEQ ID N°: 38) y de ratón (SEQ ID N°: 39). Obsérvese la región semilla diana perfectamente conservada dentro de ambas dianas predichas (los nucleótidos 2° a 8° en el extremo 5' de miR-208).

5 La Figura 19 muestra un modelo de regulación de miR-208 del cambio de isoforma de la cadena pesada de miosina cardíaca. Los receptores de la hormona tiroidea nuclear (TR) se unen a secuencias de elementos de receptores tiroideos (TRE) dentro de los promotores de los genes α -MHC y β -MHC. El promotor de α -MHC contiene un TRE completo unido por dos TR, mientras que β -MHC se ha unido por un único TR a medio TRE. Los monómeros y dímeros de TR pueden ambos heterodimerizarse con el complejo de TRAP, un cofactor de TR. La hormona tiroidea (T₃) se une a TR e inhibe la transcripción de β -MHC, a la vez que induce la expresión de α -MHC. miR-208 se expresa simultáneamente con proteína de α -MHC y se predice que regula la traducción de *Thrap1*, la mayor subunidad del complejo de TRAP. Se cree que miR-208 es un componente de un bucle de retroalimentación negativo que regula la expresión de la isoforma de la cadena pesada de la miosina cardíaca inhibiendo la señalización de T₃.

Las Figuras 20A y 20B muestran datos del análisis de matrices de miARN de músculo esquelético lesionado/regenerado. La Figura 20A muestra datos de miARN que se regulan por disminución en músculo lesionado. La Figura 20B muestra datos de miARN que están regulados por incremento en músculo lesionado.

La Figura 21 enumera secuencias a modo de ejemplo para SEQ ID N°: 6-9.

La Figura 22 muestra datos que demuestran la expresión de miR-1 en la diferenciación de células satélite de músculo esquelético usando un sensor de miARN. Se indujeron células satélite que expresan establemente el sensor de miR-1 (dsRed: : miR-1) o el sensor mutante (dsRed: : miR-1-Mut) para diferenciarse por transferencia en el medio de diferenciación, en el que bFGF se eliminó, y se obtuvieron imágenes usando fluorescencia para mostrar la expresión del gen indicador dsRed (dsRed: : miR-1) o la cadena pesada de miosina del gen del marcador de diferenciación muscular (MF20). La baja expresión de dsRed en las células diferenciadoras expresadas en sensor indica la expresión de miR-1 en aquellas células. DAPI tiñe los núcleos de las células.

Las Figuras 23A y 23B muestran datos que demuestran el establecimiento del sistema de expresión de miR-1/206 (Figura 23A) y sensor de miR-1/206 (Figura 23B). La Figura 23A muestra un diagrama de la construcción de expresión para la expresión de miR-1/206 y una proteína de GFP (Figura 23A, panel izquierdo). El análisis de transferencia Northern muestra la expresión de miR-1 (Figura 23a, panel derecho). La Figura 23B demuestra la represión de un sensor de miR-1/206 por miR-1 en células 293. La células 293 que expresan establemente el sensor de miR-1/206 se transfectaron con vector de expresión para miR-1/206 (SDSA: : miR-1), y se obtuvieron imágenes usando contraste de fases (célula 293) o fluorescencia para mostrar la expresión del gen indicador dsRed (dsRed: : miR-1) o miARN: : GFP (SDSA: : miR-1) o solapar ambas (recubrimiento). Obsérvese que la expresión del sensor de dsRed y miR-1 es exclusiva, que indica que miR-1 reprime específicamente la expresión del indicador del sensor.

Las Figuras 24A y 24B representan datos que muestran la represión de 3'UTR de *Pax7* y *BDNF* por miR-1/206. La Figura 24A es un alineamiento de secuencias de UTR de *Pax7* de ratón (SEQ ID N°: 40-41) con MiR-1 (SEQ ID N°: 1) y miR-206 (SEQ ID N°: 3). La Figura 24B desvela gráficas que muestran indicadores de luciferasa que contienen tanto 3' UTR de *Pax7* de ratón (Luc-*Pax7*: : UTR) como su mutante (Luc-*Pax7*: : UTR-M) o 3' UTR de *BDNF* (Luc-*BDNF*: : UTR) o su mutante (Luc-*BDNF*: : UTR-M) se co-transfectaron con los vectores de expresión de miARN indicados. La actividad de luciferasa se determinó 48 h después de la transfección. Los datos representan la media \pm d.e. de al menos tres experimentos independientes por duplicado. Obsérvese que miR-1/206 reprime fuertemente la expresión de indicadores de 3' UTR de *Pax7* y *BDNF*.

Las Figuras 25A-25C muestran que miR-1/206 inhibe la expresión de *Pax7*, pero no de *Pax3*, en células satélite. La Figura 25A es un análisis de transferencia Northern de la expresión de *Pax7* que demuestra que los niveles de transcritos de ARNm de *Pax7* no son inhibidos por 3' UTR. La Figura 25B es un análisis de transferencia Western que demuestra que el nivel de proteína de *Pax7*, pero no de *Pax3*, es menor en células satélite expresadas en exceso por miR-1/206. La Figura 25C muestra imágenes obtenidas usando contraste de fases (paneles de fases/contraste) o fluorescencia para mostrar la expresión de las proteínas *Pax7* o *Pax3* (paneles de *Pax7* y *Pax3*) o miARN: : GFP (paneles de SDSA: : miR-1/206) o el recubrimiento (paneles de recubrimiento) en células satélite de músculo esquelético. Obsérvese que la expresión de *Pax7*, pero no la de *Pax3*, se inhibe por miR-1/206.

La Figura 26 muestra que miR-1/206 inhibe la expresión de *BDNF*, pero no de *GDNF*, en células satélite. Se obtuvieron imágenes usando contraste de fases (paneles de fases/contraste) o fluorescencia para mostrar la expresión de las proteínas de *BDNF* o *GDNF* (paneles de *BDNF* y *GDNF*) o miARN: : GFP (paneles SDSA: : miR-1/206) o recubrimiento (paneles de recubrimiento) en células satélite de músculo esquelético. Obsérvese que la expresión de *BDNF*, pero no de *GDNF*, se inhibe por miR-1/206.

Las Figuras 27A y 27B muestran que miR-1/206 inhibe la proliferación de células satélite. La Figura 27A muestra imágenes de células satélite obtenidas usando contraste de fases o fluorescencia para mostrar el índice de

proliferación celular como se marca por BrdU (paneles de BrdU) o miARN: : GFP (panel de SDSA: : miR-1 + 206). Se observaron menos células positivas para BrdU en células satélite expresadas en exceso por miR-1/206. La Figura 27B es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los que células teñidas positivas para BrdU se contaron en células de control y expresadas en exceso por miR-1/206 y los datos se presentan como la relación de células positivas para BrdU frente a células totales.

Las Figuras 28A y 28B muestran que miR-1/206 potencia la diferenciación de células satélite. Las Figuras 28A y 28B muestran los resultados de experimentos en los que células satélite expresan establemente en exceso tanto miR-1/206 (SDSA-miR-1 + 206) como GFP (control), luego se transfirieron a medio de diferenciación, en el que bFGF se eliminó, durante 24 h (Figura 28A) o 48 h (Figura 28B) antes de la inmunotinción para la cadena pesada de la miosina (MyHC). Obsérvese la tinción potenciada de MyHC en células expresadas en exceso por miR-1/206. DAPI marca núcleo de células.

La Figura 29 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los que la expresión en exceso de miR-1/206 potencia la diferenciación cinética de células satélite. Las células satélite que expresan en exceso tanto miR-1/206 (■) como GFP (control; ◆) se cultivaron en medio de crecimiento o se transfirieron a medio de diferenciación, en el que bFGF se eliminó, a diferentes momentos de tiempo (0, 12, 24, 36 y 48 h) y se puntuaron las células positivas para la cadena pesada de la miosina (MyHC). Los resultados estuvieron presentes como relaciones de células positivas para MyHC frente a células totales.

La Figura 30 muestra un modelo para miR-1/206 en la regulación de la proliferación y diferenciación de células satélite de músculo esquelético.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS

[0015] La Tabla 1 es una lista de las abreviaturas de nucleótidos de una letra usadas en este documento.

[0016] La Tabla 2 muestra el efecto sobre la proliferación y diferenciación miogénica por miR-1 y miR-133. Los mioblastos C2C12 cultivados en medio de crecimiento (MC) se electroporaron con dúplex de miARN bicatenario o 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido para miR-1, miR-133 o GFP como control negativo. 36 h después, el MC se substituyó con medio de diferenciación (MD) durante 8, 12 y 24 h y las células se fijaron para análisis de inmunohistoquímica usando anticuerpos contra miogenina, fosfo-histona H3 y cadena pesada de miosina (MHC). Las células positivas se contaron de 5000 células teñidas con DAPI del campo elegido al azar. Los ensayos se realizaron independientemente tres veces con resultados comparables.

[0017] La Tabla 3 enumera los nombres y secuencias de oligonucleótidos desvelados en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS

[0018] La lista de secuencias desvela, entre otros, las secuencias de diversos miARN, específicamente miR-1, miR-133, miR-206, miR-208, miR-22, miR-26, miR-29, miR-30, miR-128, miR-143 y miR-145 (SEQ ID N°: 1-11, respectivamente), además de secuencias de polinucleótidos adicionales desveladas en este documento. En algunos casos, las secuencias de ARN se presentan en forma de ADN (es decir, presente con timidina en lugar de uracilo), se entiende que estas secuencias también pretenden corresponderse con los transcritos de ARN de estas secuencias de ADN (es decir, con cada T substituida con un U).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0019] En este documento se desvela la determinación de que miARN particulares pueden modular la expresión de genes específicos en miocitos que afectan la diferenciación y/o proliferación de los miocitos. Este descubrimiento tiene aplicaciones terapéuticas, como se desvela en este documento, que incluye tratar lesiones musculares que tienen una amplia variedad de causas tales como, por ejemplo, traumatismo muscular mecánico, trastornos degenerativos musculares y lesión cardíaca. La aplicación de los descubrimientos desvelados en este documento incluye adicionalmente modular la expresión de uno o más genes específicos en miocitos utilizando miARN que tienen especificidad por los genes y, a su vez, modular la funcionalidad de los miocitos tal como, por ejemplo, diferenciación y/o proliferación de los miocitos. Los miARN cubiertos por la materia presentemente desvelada incluyen miARN-1 y miARN-133. miARN-1 (miR-1) y miARN-133 (miR-133), que están agrupados en los mismos loci cromosómicos, se transcriben juntos de un modo específico para tejido durante el desarrollo. miR-1 y miR-133, cada uno de los cuales desempeña distintas funciones en la modulación de la proliferación y diferenciación de músculo esquelético, se cultivaron en mioblastos *in vitro* y en embriones de *Xenopus in vivo*. miR-1 promueve la miogénesis eligiendo como diana histona desacetilasa 4 (HDAC4), un represor transcripcional de la expresión génica de músculo. A diferencia, miR-133 potencia la proliferación de mioblastos reprimiendo el factor de respuesta al suero (SRF). Los resultados revelan por primera vez que dos miARN maduros, derivados del mismo policistrón de miARN y transcritos juntos, pueden realizar distintas funciones biológicas. Por tanto, la presente divulgación proporciona mecanismos moleculares en los que los miARN participan en circuitos transcripcionales que controlan la expresión génica del músculo y el desarrollo embrionario.

[0020] La expresión de *Thrap1* es probablemente regulada por miR-208 que no se encuentra bajo las presentes reivindicaciones. La 3' UTR de *Thrap1* contiene dos sitios de unión a miR-208 predichos (Figura 18). Las dos dianas se localizan -80 pb en la dirección 3' del codón de terminación de *Thrap1* y están separadas entre sí sólo ~50 pb. Ambas dianas son perfectamente complementarias a la región semilla de miR-208. El gen *Thrap1* codifica TRAP240, una subunidad de 240 kd del complejo de TRAP (proteína de receptor de la hormona tiroidea) que se expresa ubicuamente. TRAP es un complejo de proteína de multisubunidad que es un coactivador de receptores nucleares y los miembros de la familia TRAP son importantes para el desarrollo apropiado. Por tanto, miR-208 puede regular la producción de TRAP240 y promover la diferenciación de cardiomiocitos dependiente de hormona.

10 I. Consideraciones generales

[0021] Se descubrió inesperadamente que el primer miARN descrito, el gen *lin-4*, que controla el momento adecuado del desarrollo larval de *C. elegans*, producía un ARN no codificante de 21 nucleótidos de longitud que suprimía la expresión de *lin-14* de proteínas sin afectar notablemente los niveles de ARNm de *lin-14*. E encontró que este ARN pequeño elegía como diana sitios complementarios en la región sin traducir de 3' (UTR) de *lin-14*^{49,50}. Aunque este fenómeno se trató inicialmente como una rareza genética y prácticamente se ignoró, ahora se aprecia que existen cientos de ARN pequeños, ahora llamados miARN, similares a *lin-4* en los genomas de especies divergentes y regulan la traducción de ARNm complementario. Aunque informes recientes sugieren funciones para algunos miARN en procesos biológicos sorprendentemente diversos, la mayoría sigue estando en buena parte sin caracterizar.

20 I.A. Biogénesis y mecanismo de miARN

[0022] En la Figura 13 se representa un modelo general para la biogénesis de miARN. Los miARN maduros tienen ~ 22 nucleótidos (nt) de longitud que se procesaron a partir de transcritos más largos^{51,52}. Los miARN primarios (pri-miARN) pueden transcribirse por ARN Pol II como unidades transcripcionales independientes o pueden originarse a partir de intrones cortados y empalmados de genes huésped⁵³. La ruta de procesamiento de miARN puede empezar con la escisión nuclear de pri-miARN por la ARNasa III endonucleasa Drosha, que produce un precursor de miARN (pre-miARN) intermedio de ~ 70 nt de longitud que tiene una estructura de tallo-bucle⁵⁴. La exportina-5 reconoce el corte en bisel dejado por la escisión de Drosha y exporta el pre-miARN al citoplasma de un modo dependiente de Ran-GTP⁵⁴⁻⁶⁰. Una vez en el citoplasma, ambas cadenas del pre-miARN pueden escindir por Dicer, otra enzima ARNasa III, aproximadamente dos giros helicoidales desde la base del tallo-bucle⁶¹⁻⁶³. El dúplex de ARN ~ 22mero resultante es liberado por Dicer y un brazo de un único tallo puede incorporarse en RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). RISC es un complejo de ribonucleoproteína que contiene miembros de la familia de las proteínas Argonauta y factores accesorios, junto con una diana de miARN y ARNm. Se cree que las estabildades térmicas relativas del dúplex de tallo-brazo determinan qué cadena se incorpora en RISC: la cadena que entra en RISC es frecuentemente aquella cuyo extremo 5' es menos estable^{64,65}. La inhibición de la traducción está mediada por la complementariedad de miARN con secuencia(s) diana dentro de la 3' UTR del ARNm diana por un mecanismo todavía desconocido^{66,67}. Generalmente, la complementariedad imperfecta produce la supresión de la traducción, mientras que la complementariedad perfecta o casi perfecta produce la escisión de ARNm⁶⁸. Muchos aspectos de la biogénesis de miARN, tráfico, ensamblaje de RISC y el mecanismo de la función de RISC esperan aclaración; sin embargo, estudios funcionales de miARN específicos y análisis genéticos y bioquímicos de los componentes de la ruta de miARN han mostrado que los miARN son importantes en diversos procesos biológicos.

45 I.B. miARN en desarrollo

[0023] El desarrollo de un organismo pluricelular requiere control espacial y temporal de las rutas genéticas. Se propone que los miARN controlan o ajustan aquellas rutas complejas por regulación postranscripcional de genes diana. Un enfoque para determinar la necesidad de miARN en el desarrollo animal ha sido crear mutaciones en Dicer, una enzima en la dirección 5' requerida para el procesamiento de miARN a su forma activa madura. Se cree que los vertebrados sólo tienen una única copia de Dicer, que probablemente se requiere para procesar completamente todo los miARN de vertebrado^{62,63,69}. En ratones, la ablación de la función de Dicer produjo letalidad en el día embrionario (E) 7,5⁶⁹. Los ratones nulos para Dicer no expresaron el marcador T de la línea primitiva (*brachyury*), que indica que el desarrollo fue probablemente detenido antes de que el cuerpo se configurara durante la gastrulación. La disminución del tamaño de las extremidades y el aumento de la muerte celular programada resultaron de la pérdida condicional de la función de Dicer específicamente en el mesodermo de las extremidades de ratón⁷⁰. El bloqueo completo de la formación de miARN en pez cebra produciendo mutantes de *Dicer* cigóticos maternos reveló que la pérdida de miARN no afectó la formación del eje o el modelado de muchos tipos de células en los embriones. Sin embargo, la morfogénesis durante la gastrulación, formación del cerebro, somitogénesis y desarrollo del corazón demostraron todos ser anormales y produjeron letalidad⁷¹. En conjunto, los análisis genéticos de la función de Dicer sugieren que se requieren miARN maduros para el desarrollo apropiado. Los estudios que eliminan toda la función de miARN son informativos; sin embargo, también son herramientas directas y no proporcionan la oportunidad de ver las funciones precisas de miARN específicos.

I.C. Funciones biológicas de miARN específicos

[0024] Hay una cantidad creciente de pruebas que sugieren que los miARN participan en diversos procesos biológicos. En células de islote pancreáticas, la expresión en exceso de miR-375 suprimió la secreción de insulina inducida por glucosa, mientras que la inhibición de miR-375 endógeno potenció la secreción de insulina⁷². Una estrategia de expresión en exceso e inhibición similar identificó una función para miR-143 en la diferenciación de adipocitos mediante la regulación de la expresión de proteínas ERK5⁷³. En otro ejemplo, un gen de miARN policistrónico que codifica 5 miARN se ligó a tumorigénesis⁷⁴. Se han propuesto otras funciones para miARN en hematopoyesis⁷⁵, diferenciación neuronal^{76,77} y regulación de la expresión génica de *Hox*^{78,79}.

[0025] Ahora hay más de 300 miARN humanos conocidos; sin embargo, sólo un puñado tiene alguna función biológica asignada. Se requieren estudios de miARN específicos para el entendimiento de la prevalencia y la importancia de la regulación mediada por miARN en el desarrollo y la patología. La materia presentemente desvelada proporciona por primera vez una función para miARN en la regulación de la diferenciación y proliferación muscular.

I.D. miARN en el desarrollo del corazón

[0026] La cardiogénesis requiere el control preciso de diferentes programas genéticos, por tanto, es interesante especular que miARN enriquecidos en cardíaco diferencialmente expresados podrían ayudar a regular aquellas rutas complejas. Tales patrones de expresión específicos para tejido se desvelan en este documento por la materia presentemente desvelada para varios miARN. miR-1 y miR-133 se expresan en tejido de músculo tanto esquelético como cardíaco, mientras que miR-208 se detecta únicamente en tejido de músculo cardíaco. Antes de la presente divulgación, las funciones de estos miARN específicos para músculo no estaban claras.

I.E. Identificación de dianas de miARN

[0027] La identificación de dianas de miARN específicos facilita el entendimiento de su función precisa en las rutas reguladoras. La mayoría de los miARN de animal son imperfectamente complementarios a su sitio diana, que se frustra usando simples búsquedas de homología para identificar sitios diana de miARN de animal. Para superar este obstáculo se han desarrollado varios procedimientos computacionales que incorporan conservación de secuencias y características de dianas de miARN conocidas como criterios para predecir nuevas dianas de miARN de animal⁸⁰⁻⁸⁵. Por ejemplo, algunos algoritmos tienen en cuenta que la mayoría de los miARN han presentado alta complementariedad entre el segundo y el octavo nucleótido dentro de sitios diana validados, que se llama la región 'semilla'. Otros algoritmos no, ya que, en algunos casos, la complementariedad en el extremo 3' de un miARN puede compensar la débil unión del extremo 5'. Estos algoritmos también alinean predicciones por conservación de secuencias diana a través de dos o más especies con respecto a regiones flanqueantes. Estos tipos de enfoques computacionales han predicho satisfactoriamente algunos sitios diana de miARN de mamífero. Las predicciones producidas por cualquier miARN particular casi contienen ciertamente positivos falsos. Sin embargo, las predicciones son extremadamente útiles como generadores de hipótesis. Cualquier predicción puede verificarse experimentalmente y disponerse en un contexto biológico relevante.

I.F. Significancia

[0028] Actualmente hay varias áreas activas en la investigación de miARN que buscan entender los mecanismos moleculares precisos detrás de la represión dirigida por miARN, desarrollar mejores herramientas para analizar la expresión de miARN e identificar sitios diana, y determinar funciones biológicamente relevantes para miARN específicos dentro de rutas reguladoras.

[0029] El desarrollo y la patología del corazón están íntimamente ligados a la regulación de rutas genéticas complejas, y se han realizado grandes esfuerzos por intentar entender estas rutas. La mayoría de los estudios se han basado en la función de factores de transcripción y secuencias potenciadoras reguladoras según se requiera para la transcripción del gen cardíaco. La regulación de la expresión del gen cardíaco ha demostrado ser bastante compleja, estando controlados los genes cardíacos individuales por múltiples potenciadores independientes que dirigen patrones de expresión muy restringidos en el corazón. Posiblemente, los miARN han aumentado espectacularmente su complejidad añadiendo incluso adicionalmente otra capa de regulación al nivel postranscripcional. La materia presentemente desvelada proporciona, en parte, un nuevo entendimiento de cómo está regulada la expresión génica del músculo cardíaco y esquelético y desvela aplicaciones terapéuticas y de investigación para los descubrimientos. Además, los descubrimientos relacionados con el control de miARN de la diferenciación y proliferación de músculo desvelada en este documento también sirve de modelo para el entendimiento de la función de miARN en otras rutas.

II. Definiciones

[0030] Por comodidad, aquí se recogen ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Aunque se cree que los siguientes términos son bien entendidos por un experto en la materia, las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia presentemente desvelada.

[0031] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la materia presentemente desvelada. Aunque en la práctica o prueba de la materia presentemente desvelada pueda usarse cualquier procedimiento, dispositivo y material similar o equivalente a aquellos descritos en este documento, ahora se describen procedimientos, dispositivos y materiales representativos.

[0032] Siguiendo el antiguo convenio de leyes de patente, los términos “un”, “una”, “el” y “la” se refieren a “uno o más” cuando se usan en la presente solicitud, que incluye las reivindicaciones. Por tanto, los artículos “un”, “una”, “el” y “la” se usan en este documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” se refiere a un elemento o a más de un elemento.

[0033] Como se usa en este documento, el término “aproximadamente”, cuando se refiere a un valor o a una cantidad de masa, peso, tiempo, volumen, concentración o porcentaje, pretende englobar variaciones en algunas realizaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, en algunas realizaciones de $\pm 5\%$, en algunas realizaciones de $\pm 1\%$, en algunas realizaciones de $\pm 0,5\%$ y en algunas realizaciones de $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para poner en práctica la materia presentemente desvelada. A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, etc. usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la materia presentemente desvelada.

[0034] Como se usa en este documento, los términos “aminoácido” y “residuo de aminoácido” se usan indistintamente y se refieren a cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen naturalmente, además de a análogos, derivados y congéneres de los mismos; análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes; y todos los estereoisómeros de cualquiera de los anteriores. Por tanto, el término “aminoácido” pretende englobar todas las moléculas, tanto si son naturales como sintéticas, que incluyen tanto una funcionalidad amino como una funcionalidad ácido y que pueden incluirse en un polímero de aminoácidos que se producen naturalmente.

[0035] Un aminoácido puede formarse tras digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácidos en este documento se describen en algunas realizaciones en la forma isomérica “L”. Sin embargo, los residuos en la forma isomérica “D” pueden estar sustituidos por cualquier residuo de L-aminoácido, en tanto que la propiedad funcional sea retenida por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional, las abreviaturas para residuos de aminoácidos se muestran en la forma tabulada presentada anteriormente en este documento.

[0036] Se observa que todas las secuencias de residuos de aminoácidos representadas en este documento por las fórmulas tienen una orientación de izquierda a derecha en la dirección convencional de extremo amino a extremo carboxi. Además, los términos “aminoácido” y “residuo de aminoácido” se definen ampliamente para incluir aminoácidos modificados e inusuales.

[0037] Además, se observa que un guión al principio o final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico con otra secuencia de uno o más residuos de aminoácidos o un enlace covalente con un grupo del extremo amino tal como NH_2 o acetilo o con un grupo del extremo carboxi tal como COOH .

[0038] Como se usa en este documento, el término “célula” se usa en su sentido biológico usual. En algunas realizaciones, la célula está presente en un organismo, por ejemplo, un sujeto vertebrado. La célula puede ser eucariota (por ejemplo, un miocito tal como un miocito esquelético o un miocito cardíaco) o procariota (por ejemplo, una bacteria). La célula puede ser de origen somático o de la línea germinal, totipotente, pluripotente o diferenciada a cualquier grado, divisora o no divisora. La célula también puede derivarse de o puede comprender un gameto o embrión, un citoblasto o una célula completamente diferenciada.

[0039] Como se usa en este documento, los términos “células huésped” y “células huésped recombinantes” se usan indistintamente y se refieren a células (por ejemplo, miocitos) en las que pueden introducirse las composiciones de la materia presentemente desvelada (por ejemplo, un vector de expresión que codifica un miARN). Además, los términos no sólo se refieren a la célula particular en la que inicialmente se introduce una construcción de expresión, sino también a la progenie o posible progenie de una célula tal. Debido a que ciertas modificaciones pueden producirse en generaciones sucesivas debido a cualquier mutación o influencias medioambientales, tal progenie podría, en realidad, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término como se usa en este documento.

[0040] Como se usa en este documento, el término “gen” se refiere a un ácido nucleico que codifica un ARN, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a: genes estructurales que codifican un polipéptido. El término “gen” también se refiere ampliamente a cualquier segmento de ADN asociado a una función biológica. Como tal, el término “gen” engloba secuencias que incluyen, pero no se limitan a: una secuencia codificante; una región promotora; una secuencia reguladora de la transcripción; un segmento de ADN no expresado

que es una secuencia de reconocimiento específica para proteínas reguladoras; un segmento de ADN no expresado que contribuye a la expresión génica tal como, por ejemplo, un segmento de ADN que puede transcribirse en una región sin transcribir de 3' de un ARNm que a su vez es elegido como diana y se une por miARN a modo de ejemplo de la materia presentemente desvelada; un segmento de ADN diseñado para tener parámetros deseados; o combinaciones de los mismos. Un gen puede obtenerse mediante una variedad de procedimientos que incluyen clonación de una muestra biológica, síntesis basada en información de secuencia conocida o predicha y derivación recombinante de una o más secuencias existentes.

[0041] Como se entiende en la materia, un gen normalmente comprende una cadena codificante y una cadena no codificante. Como se usa en este documento, los términos “cadena codificante” y “cadena sentido” se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos que tiene la misma secuencia de nucleótidos que un ARNm del que se traduce el producto génico. Como también se entiende en la materia, cuando la cadena codificante y/o cadena sentido se usan para referirse a una molécula de ADN, la cadena codificante/sentido incluye residuos de timidina en lugar de residuos de uridina encontrados en el ARNm correspondiente. Adicionalmente, cuando se usa para referirse a una molécula de ADN, la cadena codificante/sentido también puede incluir elementos adicionales no encontrados en el ARNm que incluyen, pero no se limitan a: promotores, potenciadores e intrones. Similarmente, los términos “cadena molde” y “cadena antisentido” se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de ácidos nucleicos que es complementaria a la cadena codificante/sentido. Sin embargo, debe observarse que para aquellos genes que no codifican productos de polipéptido, por ejemplo, un gen de miARN, el término “cadena codificante” se usa para referirse a la cadena que comprende el miARN. En este uso, la cadena que comprende el miARN es una cadena sentido con respecto al precursor de miARN, pero sería antisentido con respecto a su ARN diana (es decir, el miARN se hibrida con el ARN diana debido a que comprende una secuencia que es antisentido para el ARN diana).

[0042] Como se usa en este documento, los términos “complementariedad” y “complementario” se refieren a un ácido nucleico que puede formar uno o más enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácidos nucleicos por tanto tipos de interacciones tradicionales de Watson-Crick como otros no tradicionales. En referencia a las moléculas nucleicas de la materia presentemente desvelada, la energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que continúe la función relevante del ácido nucleico, en algunas realizaciones, actividad de ribonucleasa. Por ejemplo, el grado de complementariedad entre la cadena sentido y antisentido de un precursor de miARN puede ser igual o diferente del grado de complementariedad entre la cadena que contiene miARN de un precursor de miARN y la secuencia de ácidos nucleicos diana. La determinación de las energías libres de unión para moléculas de ácidos nucleicos es muy conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Freier y col., 1986³¹; Turner y col., 1987³².

[0043] Como se usa en este documento, el término “complementariedad en porcentaje”, “identidad en porcentaje” e “idéntico en porcentaje” se usan indistintamente en este documento y se refieren al porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de las 10 siendo complementarias el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y el 100 %). Los términos “complementarios el 100 %”, “completamente complementarios” y “perfectamente complementarios” indican que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos pueden unirse a hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácidos nucleicos. Como los miARN tienen aproximadamente 17-24 nt, y normalmente son tolerados hasta 5 desapareamientos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 desapareamientos) durante la modulación dirigida por miARN de la expresión génica, una complementariedad en porcentaje de al menos aproximadamente el 70 % entre un miARN y el ARN que se elige como diana debería ser suficiente para que el miARN modulara la expresión del gen del que se derivó el ARN diana.

[0044] El término “expresión génica” se refiere generalmente a los procedimientos celulares por los que un polipéptido biológicamente activo se produce a partir de una secuencia de ADN y presenta una actividad biológica en una célula. Como tal, la expresión génica implica procedimientos de transcripción y traducción, pero también implica procedimientos postranscripcionales y postraduccionales que pueden influir en una actividad biológica de un gen o producto génico. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a: síntesis, procesamiento y transporte de ARN, además de síntesis de polipéptidos, transporte y modificación postraduccionales de polipéptidos. Adicionalmente, los procedimientos que afectan las interacciones proteína-proteína dentro de la célula también pueden afectar la expresión génica como se define en este documento.

[0045] Sin embargo, en el caso de genes que no codifican productos de proteína, por ejemplo, genes de miARN, el término “expresión génica” se refiere a procedimientos por los que un miARN de precursor se produce a partir del gen. Normalmente, este procedimiento se denomina en lo sucesivo transcripción, aunque a diferencia de la transcripción dirigida por ARN polimerasa II para genes que codifican proteína, los productos de transcripción de un gen de miARN no se traducen para producir una proteína. Sin embargo, la producción de un miARN maduro a partir de un gen de miARN está englobada por el término “expresión génica” ya que ese término se usa en este documento.

[0046] Como se usa en este documento, el término “aislado” se refiere a una molécula sustancialmente libre

de otros ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono y/u otros materiales con los que está normalmente asociado, siendo tal asociación tanto en material celular como en un medio de síntesis. Por tanto, el término “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido ribonucleico o una molécula de ácido desoxirribonucleico (por ejemplo, un ADN genómico, ADNc, ARNm, miARN, etc.) de origen natural o sintético o a alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociada a la célula en la que el “ácido nucleico aislado” se encuentra en la naturaleza, o (2) está operativamente ligada a un polinucleótido con el que no está ligado en la naturaleza. Similarmente, el término “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido, en algunas realizaciones preparado a partir de ADN o ARN recombinante, o de origen sintético, o algunas combinación de los mismos, que (1) no está asociado a proteínas con las que normalmente se encuentra en la naturaleza, (2) se aísla de la célula en la que normalmente se produce, (3) se aísla libre de otras proteínas de la misma fuente celular, (4) se expresa por una célula de una especie diferente o (5) no se produce en la naturaleza.

[0047] El término “aislado”, cuando se usa en el contexto de una “célula aislada”, se refiere a una célula que ha sido eliminada de su entorno natural, por ejemplo, como una parte de un órgano, tejido u organismo.

[0048] Como se usa en este documento, los términos “marca” y “marcado” se refieren a la unión de un resto, que puede detectarse por procedimientos espectroscópicos, radiológicos y otros, con una molécula de sonda. Por tanto, los términos “marca” o “marcado” se refieren a la incorporación o unión, opcionalmente covalentemente o no covalentemente, de un marcador detectable en una molécula, tal como un polipéptido. En la técnica se conocen diversos procedimientos de marcado de polipéptidos y pueden usarse. Ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a: las siguientes: radioisótopos, marcas fluorescentes, átomos pesados, marcas enzimáticas o indicadores de genes, grupos quimioluminiscentes, grupos de biotínulo, epítopes de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias del par de la cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos, dominios de unión a metal, marcas de epítopes). En algunas realizaciones, las marcas están unidas por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

[0049] Como se usa en este documento, el término “modular” se refiere a un aumento, disminución u otra alteración de cualquiera, o todas, las actividades químicas y biológicas o propiedades de una entidad bioquímica. Por ejemplo, el término “modular” puede referirse a un cambio en el nivel de expresión de un gen o un nivel de una molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteína; o a una actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas que están reguladas por incremento o reguladas por disminución, de forma que la expresión, nivel o actividad sea mayor que o inferior a la observada en ausencia del modulador. Por ejemplo, el término “modular” puede significar “inhibir” o “suprimir”, pero el uso de la palabra “modular” no se limita a esta definición.

[0050] El término “modulación” como se usa en este documento se refiere a tanto la regulación por incremento (es decir, activación o estimulación) como a la regulación por disminución (es decir, inhibición o supresión) de una respuesta. Por tanto, el término “modulación”, cuando se usa en referencia a una propiedad funcional o actividad biológica o procedimiento (por ejemplo, actividad enzimática o unión a receptor), se refiere a la capacidad de regular por incremento (por ejemplo, activar o estimular), regular por disminución (por ejemplo, inhibir o suprimir) o cambiar de otro modo una calidad de tal propiedad, actividad o proceso. En ciertos casos, tal regulación puede depender de la aparición de un acontecimiento específico, tal como activación de una ruta de transducción de señales, y/o puede manifestarse sólo en tipos de células particulares.

[0051] El término “modulador” se refiere a un polipéptido, ácido nucleico, macromolécula, complejo, molécula, molécula pequeña, compuesto, especies o similares (que se producen naturalmente o que se producen no naturalmente) o a un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales que pueden causar modulación. Los moduladores pueden evaluarse para la posible actividad como inhibidores o activadores (directamente o indirectamente) de una propiedad funcional, actividad o proceso biológico, o una combinación de los mismos (por ejemplo, agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inhibidores de infección o proliferación microbiana y similares), por inclusión en ensayos. En tales ensayos, muchos moduladores pueden cribarse de una vez. La actividad de un modulador puede ser conocida, desconocida o parcialmente conocida.

[0052] Los moduladores pueden ser tanto selectivos como no selectivos. Como se usa en este documento, el término “selectivo” cuando se usa en el contexto de un modulador (por ejemplo, un inhibidor) se refiere a una diferencia medible o de otro modo biológicamente relevante de forma que el modulador interactúe con una molécula (por ejemplo, un ARN diana de interés) frente a otra molécula similar, pero no idéntica (por ejemplo, un ARN derivado de un miembro de la misma familia de genes que el ARN diana de interés).

[0053] Debe entenderse que para que un modulador se considere un modulador selectivo, la naturaleza de su interacción con una diana no necesita excluir enteramente su interacción con otras moléculas relacionadas con la diana (por ejemplo, transcritos de miembros de familias distintos de la propia diana). Establecido de otra forma, el término modulador selectivo no pretende limitarse a aquellas moléculas que sólo se unen a transcritos de ARNm de un gen de interés y no con aquellos de miembros de la familia relacionados. También está previsto que el término

incluya moduladores que pueden interactuar con transcritos de genes de interés y de miembros de la familia relacionados, pero para los que es posible diseñar condiciones bajo las cuales las interacciones diferenciales con las dianas frente a los miembros de la familia tengan una consecuencia biológicamente relevante. Tales condiciones pueden incluir, pero no se limitan a: diferencias en el grado de identidad de secuencias entre el modulador y los miembros de la familia, y el uso del modulador en un tejido específico o tipo de célula que expresa alguno, pero no todos los miembros de la familia. Bajo el último conjunto de condiciones, un modulador podría considerarse selectivo para una diana dada en un tejido dado si interactúa con esa diana para producir un efecto biológicamente relevante a pesar del hecho de que en otro tejido que expresa miembros de la familia adicionales el modulador y la diana no interactuarían para producir en absoluto un efecto biológico debido a que el modulador sería “absorbido fuera” del tejido por la presencia de otros miembros de la familia.

[0054] Cuando se identifica un modulador selectivo, el modulador se une a una molécula (por ejemplo, un transcrito de ARNm de un gen de interés) de un modo que es diferente (por ejemplo, más fuerte) a la forma con la que se une a otra molécula (por ejemplo, un transcrito de ARNm de un gen relacionado con el gen de interés). Como se usa en este documento, se dice que el modulador muestra “unión selectiva” o “unión preferencial” a la molécula con la que se une más fuertemente con respecto a algunas otras moléculas posibles con las que el modulador podría unirse.

[0055] Como se usa en este documento, los términos “inhibir”, “suprimir”, “regular por disminución” y variantes gramaticales de los mismos se usan indistintamente y se refieren a una actividad por la que el producto génico (por ejemplo, un polipéptido), expresión de un gen, actividad de un polinucleótido tal como, por ejemplo, un miARN, o un nivel de un ARN que codifica uno o más productos génicos se reduce por debajo de la observada en ausencia de una implementación de un enfoque de la materia presentemente desvelada.

[0056] En algunas realizaciones, la inhibición con una molécula de miARN produce una disminución en el nivel de expresión en estado estacionario de un ARN diana. En algunas realizaciones, la inhibición con una molécula de miARN produce un nivel de expresión de un gen diana que está por debajo del nivel observado en presencia de una molécula inactiva o atenuada que no puede regular por disminución el nivel de expresión de la diana. En algunas realizaciones, la inhibición de la expresión génica con una molécula de miARN de la materia presentemente desvelada es mayor en presencia de la molécula de miARN que en su ausencia. En algunas realizaciones, la inhibición de la expresión génica está asociada a una tasa potenciada de degradación del ARNm codificado por el gen (por ejemplo, por la inhibición de la expresión génica mediada por miARN). En algunas realizaciones, la inhibición con una molécula de miARN de la materia presentemente desvelada produce un nivel de expresión de un producto génico de un gen diana que está por debajo del nivel observado en ausencia del miARN.

[0057] En algunas realizaciones, un miARN, tal como, por ejemplo, un miARN endógeno, puede inhibirse por un inhibidor de miARN, produciendo un aumento en la expresión de un gen elegido como diana por el miARN, con respecto al nivel de expresión génica (por ejemplo, producción de un producto génico) cuando el miARN no es inhibido. Como se usa en este documento, el término “inhibidor de miARN” se refiere a una molécula que inhibe la actividad de un miARN.

[0058] En algunas realizaciones, un inhibidor de miARN es un polinucleótido que se hibrida con un miARN diana particular bajo condiciones especificadas, inhibiéndose así la actividad del miARN diana. Condiciones bajo las que el inhibidor de miARN puede hibridarse con el miARN diana incluyen, por ejemplo, condiciones fisiológicas. El inhibidor de miARN puede hibridarse con el miARN diana a un mayor o menor grado basándose en la complementariedad de la secuencia de polinucleótidos del inhibidor de miARN con el polinucleótido de miARN diana. En algunas realizaciones, el miARN puede ser completamente complementario a todo o una parte del miARN diana, o menos de completamente complementario, que incluye, por ejemplo, complementario el 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 80 % o 70 % al miARN diana, dependiendo de la aplicación particular y necesidad de especificidad, como sería generalmente entendido por un experto en la materia. El inhibidor de miARN sólo necesita compartir complementariedad con el miARN diana ya que es necesario para inhibir una cantidad deseada de actividad de miARN diana bajo un conjunto particular de condiciones. Ejemplos de inhibidores de miARN útiles con la materia presentemente desvelada incluyen, pero no se limitan a: polinucleótidos modificados tales como 2'-O-metilpolinucleótidos. Ejemplos no limitantes representativos se exponen en la Tablas 2 y 3, e incluyen 2'-O-metil-miR-1, 2'-O-metil-miR-133 y 2'-O-metil-miR-208, que pueden inhibir específicamente la actividad de miR-1, miR-133 o miR-208, respectivamente.

[0059] Como se usa en este documento, el término “mutación” lleva su connotación tradicional y se refiere a un cambio, heredado, que se produce naturalmente o introducido en una secuencia de ácidos nucleicos o de polipéptidos, y se usa en su sentido que generalmente es conocido para aquellos expertos en la materia.

[0060] Como se usa en este documento, el término “miocito” se refiere ampliamente a todas las clasificaciones de células musculares en todos los estadios de desarrollo. Por tanto, “miocito” engloba tanto células musculares sin diferenciar tales como, por ejemplo, mioblastos, además de células musculares diferenciadas tales como, por ejemplo, miotubos terminalmente diferenciados. “Miocito” también engloba células musculares de tipos histológicos variables que incluyen, pero no se limitan a: células de músculo estriado (por ejemplo, células de

músculo esquelético), células de músculo liso (por ejemplo, células musculares intestinales) y células de músculo cardíaco. Además, "miocito" como se usa en este documento no es específico para especie.

[0061] El término "que se producen naturalmente", como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto pueda encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo bacterias) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio se produce naturalmente. Sin embargo, debe entenderse que cualquier manipulación por la mano del hombre puede convertir un objeto "que se produce naturalmente" en un objeto "aislado" como se usa ese término en este documento.

[0062] Como se usa en este documento, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se refieren a cualquiera de ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligación, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Los ácidos nucleicos puede comprender monómeros que son nucleótidos que se producen naturalmente (tal como desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos), o análogos de nucleótidos que se producen naturalmente (por ejemplo, formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen naturalmente), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones en restos de azúcar y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar entero puede reemplazarse con estructuras estéricamente y electrónicamente similares tales como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos muy conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden ligarse por enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término "ácido nucleico" también incluye los llamados "ácidos nucleicos peptídicos" que comprenden bases de ácidos nucleicos que se producen naturalmente o modificadas unidas a un esqueleto de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser tanto monocatenarios como bicatenarios.

[0063] El término "operativamente ligado", cuando describe la relación entre dos regiones de ácidos nucleicos, se refiere a una yuxtaposición en la que las regiones están en una relación que les permite funcionar en su modo previsto. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente ligada" con una secuencia codificante puede ligarse de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logre en condiciones compatibles con las secuencias de control, tal como cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, inductores y polimerasas) están unidas a la(s) secuencia(s) de control o reguladora(s). Por tanto, en algunas realizaciones, el término "operativamente ligado" se refiere a un promotor conectado con una secuencia codificante de tal forma que la transcripción de esa secuencia codificante esté controlada y regulada por ese promotor. Técnicas para ligar operativamente un promotor a una secuencia codificante se conocen en la técnica; la orientación y localización precisa con respecto a una secuencia codificante de interés es dependiente, entre otros, de la naturaleza específica del promotor.

[0064] Por tanto, el término "operativamente ligado" puede referirse a una región promotora que está conectada a una secuencia de nucleótidos de tal forma que la transcripción de esa secuencia de nucleótidos esté controlada y regulada por esa región promotora. Similarmente, una secuencia de nucleótidos se dice que está bajo el "control transcripcional" de un promotor con el que está operativamente ligado. Técnicas para ligar operativamente una región promotora a una secuencia de nucleótidos se conocen en la técnica.

[0065] El término "operativamente ligado" también puede referirse a una secuencia de terminación de la transcripción que está conectada a una secuencia de nucleótidos de tal forma que la terminación de la transcripción de esa secuencia de nucleótidos esté controlada por esa secuencia de terminación de la transcripción. En algunas realizaciones, una secuencia de terminación de la transcripción comprende una secuencia que produce la transcripción por una ARN polimerasa III para terminar en la tercera o cuarta T en la secuencia terminadora, TTTTTT. Por tanto, el transcrito pequeño naciente normalmente tiene 3 ó 4 U en el extremo 3'.

[0066] Los términos "identidad en porcentaje" e "idéntico en porcentaje," en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen en algunas realizaciones al menos el 60 %, en algunas realizaciones al menos el 70 %, en algunas realizaciones al menos el 80 %, en algunas realizaciones al menos el 85 %, en algunas realizaciones al menos el 90 %, en algunas realizaciones al menos el 95 %, en algunas realizaciones al menos el 96 %, en algunas realizaciones al menos el 97 %, en algunas realizaciones al menos el 98 % y en algunas realizaciones al menos el 99 % de identidad de residuos de nucleótidos o de aminoácidos cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. La identidad en porcentaje existe en algunas realizaciones a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10 residuos de longitud, en algunas realizaciones a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 20 residuos de longitud, en algunas realizaciones a lo largo de una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, en algunas realizaciones a lo largo de una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y en algunas realizaciones la identidad en porcentaje existe a lo largo de al

menos aproximadamente 150 residuos. En algunas realizaciones, la identidad en porcentaje existe a lo largo de toda la longitud de una región dada, tal como una región codificante o un miARN entero.

[0067] Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se diseñan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Entonces, la comparación del algoritmo de secuencias calcula la identidad de secuencias en porcentaje para la(s) secuencia(s) de prueba con respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros de programa diseñados.

[0068] El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local descrito en Smith & Waterman, 1981³³, por el algoritmo de alineamiento por homología descrito en Needle & Wunsch, 1970³⁴, por la búsqueda del procedimiento de similitud descrito en Pearson & Lipman, 1988³⁵, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en GCG[®] WISCONSIN PACKAGE[®], disponible de Accelrys, Inc., San Diego, California, Estados Unidos de América), o por inspección visual. Véase generalmente Ausubel y col., 1989³⁶.

[0069] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar identidad de secuencias en porcentaje y similitud de secuencias es el algoritmo BLAST que se describe en Altschul y col., 1990³⁷. El software para realizar los análisis de BLAST está públicamente disponible del Centro nacional de información biotecnológica por la red informática mundial. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabra cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que tanto se corresponde con como satisface alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina en lo sucesivo el umbral de puntuación de palabra vecina³⁷. Estas palabras vecinas iniciales actúan de semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contienen. Entonces, las palabras comunes se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos de apareamiento; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos de desapareamiento; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las palabras comunes en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulada disminuye la cantidad X de su máximo valor alcanzado, la puntuación acumulada tiende a cero o por debajo debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa residuo, o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una esperanza (E) de 10, un valor de corte de 100, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una esperanza (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62³⁸.

[0070] Además de calcular la identidad de secuencias en porcentaje, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Véase, por ejemplo, Karlin & Altschul 1993³⁹. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad a la que se produciría al azar un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de suma en una comparación de la secuencia de ácidos nucleicos de prueba con la secuencia de ácidos nucleicos de referencia es en algunas realizaciones inferior a aproximadamente 0,1, en algunas realizaciones inferior a aproximadamente 0,01 y en algunas realizaciones inferior a aproximadamente 0,001.

[0071] El término “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos secuencias de nucleótidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 70 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 75 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 80 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 85 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 90 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 95 % de identidad de nucleótidos, en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 97 % de identidad de nucleótidos y en algunas realizaciones al menos aproximadamente el 99 % de identidad de nucleótidos, cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia, como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. En un ejemplo, la identidad sustancial existe en secuencias de nucleótidos de al menos 17 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 18 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 19 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 20 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 21 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 22 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 23 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 24 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos

aproximadamente 25 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
aproximadamente 26 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
aproximadamente 27 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
aproximadamente 30 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
5 aproximadamente 50 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
aproximadamente 75 residuos, en algunas realizaciones en la secuencia de nucleótidos de al menos
aproximadamente 100 residuos, en algunas realizaciones en secuencias de nucleótidos de al menos
aproximadamente 150 residuos y en otro ejemplo más en secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias
codificantes completas. En algunas realizaciones, secuencias polimórficas pueden ser secuencias sustancialmente
10 idénticas. El término “polimórficas” se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas genéticamente
determinadas o alelos en una población. Una diferencia alélica puede ser tan pequeña como una par de bases. Sin
embargo, un experto en la materia reconocería que las secuencias polimórficas se corresponden con el mismo gen.

[0072] Otra indicación de que dos secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es que las dos
moléculas se hibridan específicamente o sustancialmente entre sí bajo condiciones rigurosas. En el contexto de la
15 hibridación de ácidos nucleicos, dos secuencias de ácidos nucleicos que se comparan pueden designarse una
“secuencia de sonda” y una “secuencia de prueba”. Una “secuencia de sonda” es una molécula de ácido nucleico de
referencia y una “secuencia de prueba” es una molécula de ácido nucleico de prueba frecuentemente encontrada
dentro de una población heterogénea de moléculas de ácidos nucleicos.

[0073] Una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo empleada para estudios o ensayos de hibridación
incluye secuencias de sonda que son complementarias a o imitan en algunas realizaciones al menos una secuencia
de aproximadamente 14 a 40 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la materia presentemente
20 desvelada. En un ejemplo, las ondas comprenden 14 a 20 nucleótidos, o incluso más si se desea, tal como 30, 40,
50, 60, 100, 200, 300 ó 500 nucleótidos, o hasta la longitud completa de un gen dado. Tales fragmentos pueden
prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por síntesis química, por aplicación de
tecnología de amplificación de ácidos nucleicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores
recombinantes para la producción recombinante.

[0074] La frase “elegido como diana para” incluye “hibridar específicamente con”, que se refiere a la unión,
formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo con una secuencia de nucleótidos particular bajo
30 condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla de ácido nucleico complejo (por ejemplo,
ADN o ARN celular total).

[0075] A modo de ejemplo no limitante, la hibridación puede llevarse a cabo en 5x SSC, 4x SSC, 3x SSC, 2x
35 SSC, 1x SSC o 0,2x SSC durante al menos aproximadamente 1 hora, 2 horas, 5 horas, 12 horas o 24 horas (véase
Sambrook & Russell, 2001, para una descripción del tampón SSC y otras condiciones de hibridación). La
temperatura de la hibridación puede aumentarse para ajustar la rigurosidad de la reacción, por ejemplo, de
aproximadamente 25 °C (temperatura ambiente) a aproximadamente 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C. La reacción
de hibridación también puede incluir otro agente que afecta la rigurosidad; por ejemplo, la hibridación realizada en
40 presencia de 50 % de formamida aumenta la rigurosidad de hibridación a una temperatura definida.

[0076] La reacción de hibridación puede ir seguida de una única etapa de lavado, o dos o más etapas de
lavado, que pueden ser a la misma salinidad y temperatura o a diferente. Por ejemplo, la temperatura de lavado
45 puede aumentarse para ajustar la rigurosidad de aproximadamente 25 °C (temperatura ambiente) a
aproximadamente 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, o superior. La etapa de lavado puede realizarse en presencia
de un detergente, por ejemplo, SDS. Por ejemplo, la hibridación puede ir seguida de dos etapas de lavado a 65 °C,
cada una durante aproximadamente 20 minutos en 2x SSC, 0,1 % de SDS, y opcionalmente dos etapas de lavado
adicionales a 65 °C, cada una durante aproximadamente 20 minutos en 0,2x SSC, 0,1 % de SDS.

[0077] Lo siguiente son ejemplos de condiciones de hibridación y de lavado que pueden usarse para clonar
secuencias de nucleótidos homólogas que son sustancialmente idénticas a secuencias de nucleótidos de referencia
de la materia presentemente desvelada: una secuencia de nucleótidos de sonda se hibrida en un ejemplo con una
50 secuencia de nucleótidos diana en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, ácido
etilendiaminotetraacético 1 mM (EDTA) a 50 °C seguido de lavado en 2X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C; en algunas
realizaciones, una secuencia de sonda y de prueba se hibridan en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5
55 M, EDTA 1 mM a 50 °C seguido de lavado en 1X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C; en algunas realizaciones, una
secuencia de sonda y de prueba se hibridan en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a
50 °C seguido de lavado en 0,5X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C; en algunas realizaciones, una secuencia de sonda y
de prueba se hibridan en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C seguido de
60 lavado en 0,1X SSC, 0,1 % de SDS a 50 °C; en otro ejemplo más, una secuencia de sonda y de prueba se hibridan
en 7 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO₄ 0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C seguido de lavado en 0,1X SSC, 0,1 %
de SDS a 65 °C.

[0078] Condiciones de hibridación rigurosas adicionales a modo de ejemplo incluyen hibridación durante la
65 noche a 42 °C en una disolución que comprende o que consiste en 50 % de formamida, 10x Denhardt (0,2 % de
Ficoll, 0,2 % de polivinilpirrolidona, 0,2 % de albúmina de suero bovino) y 200 mg/ml de ADN portador

desnaturalizado, por ejemplo, ADN de esperma de salmón cortado, seguido de dos etapas de lavado a 65 °C, cada una durante aproximadamente 20 minutos en 2x SSC, 0,1 % de SDS, y dos etapas de lavado a 65 °C, cada una durante aproximadamente 20 minutos en 0,2x SSC, 0,1 % de SDS.

5 **[0079]** La hibridación puede incluir hibridar dos ácidos nucleicos en disolución, o un ácido nucleico en disolución, con un ácido nucleico unido a un soporte sólido, por ejemplo, un filtro. Si un ácido nucleico está sobre un soporte sólido, antes de la hibridación puede realizarse una etapa de prehibridación. La prehibridación puede llevarse a cabo durante al menos aproximadamente 1 hora, 3 horas o 10 horas en la misma disolución y a la misma temperatura que la hibridación (pero sin la cadena de polinucleótido complementaria).

10 **[0080]** Por tanto, tras una revisión de la presente divulgación, las condiciones de rigurosidad son conocidas para aquellos expertos en la materia o pueden determinarse por el experto sin experimentación adicional.^{36,40-44}

15 **[0081]** La frase “hibridar sustancialmente con” se refiere a la hibridación complementaria entre una molécula de ácido nucleico de sonda y una molécula de ácido nucleico diana y engloba desapareamientos menores que pueden acomodarse reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la hibridación deseada.

20 **[0082]** El término “fenotipo” se refiere al carácter físico, bioquímico y fisiológico entero de una célula o un organismo, por ejemplo, que tiene un rasgo cualquiera o cualquier grupo de rasgos. Como tales, los fenotipos resultan de la expresión de genes dentro de una célula o un organismo, y se refieren a rasgos que son posiblemente observables o ensayables.

25 **[0083]** Como se usa en este documento, los términos “polipéptido”, “proteína” y “péptido”, que se usan indistintamente en este documento, se refieren a un polímero de los aminoácidos de 20 proteínas, o análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. Aunque “proteína” se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos relativamente grandes y “péptido” se usa frecuentemente en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la materia se solapa y varía. El término “polipéptido” como se usa en este documento se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en este documento, los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se usan indistintamente en este documento cuando se refieren a un producto génico. El término “polipéptido” engloba proteínas de todas las funciones, incluyendo enzimas. Por tanto, polipéptidos a modo de ejemplo incluyen productos génicos, proteínas que se producen naturalmente, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

35 **[0084]** Los términos “fragmento de polipéptido” o “fragmento”, cuando se usan en referencia a un polipéptido de referencia, se refieren a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos están delecionados con respecto al propio polipéptido de referencia, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es normalmente idéntica en las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Tales deleciones pueden producirse en el extremo amino o extremo carboxi del polipéptido de referencia, o alternativamente en ambos. Los fragmentos tienen normalmente al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de longitud, al menos 14 aminoácidos de longitud, al menos 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos de longitud, al menos 75 aminoácidos de longitud, o al menos 100, 150, 200, 300, 500 o más aminoácidos de longitud. Un fragmento puede retener una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. Además, los fragmentos pueden incluir un sub-fragmento de una región específica, sub-fragmento que retiene una función de la región de la que se deriva.

45 **[0085]** Como se usa en este documento, el término “cebador” se refiere a una secuencia que comprende en algunas realizaciones dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en algunas realizaciones más de tres, en algunas realizaciones más de ocho y en algunas realizaciones al menos aproximadamente 20 nucleótidos de una región exónica o intrónica. Tales oligonucleótidos tienen en algunas realizaciones entre diez y treinta bases de longitud.

50 **[0086]** El término “purificado” se refiere a una especie objeto que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). Una “fracción purificada” es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies presentes. Al hacer la determinación de la pureza de una especie en disolución o dispersión, el disolvente o matriz en la que la especie se disuelve o dispersa no está normalmente incluido en tal determinación; en su lugar, sólo se tienen en cuenta las especies (incluyendo la de interés) disueltas o dispersas. Generalmente, una composición purificada tendrá una especie que comprende más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies presentes en la composición, más de aproximadamente el 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de todas las especies presentes. Las especies objeto pueden purificarse a homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por procedimientos de detección convencionales) en las que la composición consiste esencialmente de una única especie. La pureza de un polipéptido puede determinarse por varios procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen, por ejemplo, análisis de secuencias de aminoácidos del extremo amino, electroforesis en gel y análisis de espectrometría de masas.

65 **[0087]** Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida usada como base para una comparación de

secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de longitud completa, o puede comprender una secuencia completa. Debido a que dos proteínas pueden cada una (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de proteínas completa) que es similar entre las dos proteínas, y (2) pueden comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos proteínas, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) proteínas se realizan normalmente comparando secuencias de las dos proteínas sobre una “ventana de comparación” (definida anteriormente en este documento) para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias.

[0088] El término “secuencia reguladora” es un término genérico usado durante toda la memoria descriptiva para referirse a secuencias de polinucleótidos tales como señales de iniciación, potenciadores, reguladores, promotores y secuencias de terminación, que son necesarios o deseables para afectar la expresión de secuencias codificantes y no codificantes con las que están operativamente ligadas. Secuencias reguladoras a modo de ejemplo se describen en Goeddel, 1990⁴⁵, e incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío del virus simio 40 (SV40), promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, el promotor mínimo del CMV, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, promotor T7 cuya expresión está dirigida por T7 ARN polimerasa, el operador mayor y regiones promotoras de fago lambda, las regiones de control para la proteína de la envuelta fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento α de levadura, el promotor de poliedro del sistema de baculovirus y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariontas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos. La naturaleza y el uso de tales secuencias de control pueden diferenciarse dependiendo del organismo huésped. En procariontas, tales secuencias reguladoras incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómico y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencia reguladora” está previsto que incluya, como mínimo, componentes cuya presencia puede influir la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras y secuencias de componentes de fusión.

[0089] En ciertas realizaciones, la transcripción de una secuencia de polinucleótidos está bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora) que controla la expresión del polinucleótido en un tipo de célula en el que está prevista la expresión. También se entenderá que el polinucleótido puede estar bajo el control de secuencias reguladoras que son iguales o diferentes de aquellas secuencias que controlan la expresión de la forma que se produce naturalmente del polinucleótido. En algunas realizaciones, una secuencia promotora se selecciona del grupo que consiste en un promotor mínimo del CMV, creatina cinasa de músculo (MCK) y un promotor de la cadena pesada de α -miosina (MHC). Por ejemplo, el promotor de creatina cinasa de músculo (MCK), que dirige la expresión génica en músculo esquelético, puede usarse para expresar miARN tales como, por ejemplo, miR-1, miR-133 o miR-206 en tejido, que incluye músculo esquelético usando técnicas transgénicas actualmente disponibles. Se entiende que no necesita emplearse el promotor entero identificado por cualquier promotor (por ejemplo, los promotores enumerados en este documento) y que puede usarse un derivado funcional del mismo. Como se usa en este documento, el término “derivado funcional” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende secuencia suficiente para dirigir la transcripción de otra molécula de ácido nucleico operativamente ligada. Como tal, un “derivado funcional” puede funcionar de promotor mínimo, como ese término se define en este documento.

[0090] La terminación de la transcripción de una secuencia de polinucleótidos está normalmente regulada por una secuencia de terminación de la transcripción operativamente ligada (por ejemplo, una secuencia de terminación de ARN polimerasa III). En ciertos casos, los terminadores de la transcripción también son responsables de la correcta poliadenilación de ARNm. La secuencia de ADN reguladora no transcrita de 3' incluye en algunas realizaciones aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000, y en algunas realizaciones aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000, pares de bases de nucleótidos y contiene secuencias de terminación de la transcripción y de la traducción. En algunas realizaciones, una secuencia de terminación de ARN polimerasa III comprende la secuencia de nucleótidos TTTTTT.

[0091] El término “gen indicador” se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que es fácilmente detectable tanto por su presencia como actividad que incluye, pero no se limita a, luciferasa, proteína fluorescente (por ejemplo, proteína verde fluorescente), cloranfenicol acetil transferasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina placentaria secretada, β -lactamasa, hormona de crecimiento humana y otros indicadores de enzimas secretadas. Generalmente, un gen indicador codifica un polipéptido no producido de otro modo por la célula huésped que es detectable por análisis de la(s) célula(s), por ejemplo, por el análisis fluorométrico directo, radioisotópico o espectrofotométrico de la(s) célula(s) y normalmente sin la necesidad de destruir las células para el análisis de señales. En ciertos casos, un gen indicador codifica una enzima, que produce un cambio en propiedades fluorométricas de la célula huésped, que es detectable por la función cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa o la activación transcripcional. Enzimas a modo de ejemplo incluyen esterases, β -lactamasa, fosfatasas, peroxidasas, proteasas (activador tisular del plasminógeno o urocinasa) y otras enzimas cuya función puede detectarse por sustratos cromogénicos o fluorogénicos apropiados conocidos para aquellos expertos en la materia o desarrollados en el futuro.

[0092] Como se usa en este documento, el término “secuenciación” se refiere a determinar la secuencia lineal ordenada de ácidos nucleicos o aminoácidos de un ADN, ARN o muestra diana de proteína usando técnicas de laboratorio manuales o automatizadas convencionales.

5 **[0093]** Como se usa en este documento, el término “sustancialmente puro” se refiere a que el polinucleótido o polipéptido está sustancialmente libre de las secuencias y moléculas con las que está asociado en su estado natural, y aquellas moléculas usadas en el procedimiento de aislamiento. El término “sustancialmente libre” se refiere a que la muestra está en algunas realizaciones al menos el 50 %, en algunas realizaciones al menos el 70 %, en algunas realizaciones el 80 % y en algunas realizaciones el 90 % libre de los materiales y compuestos con los que está asociado en la naturaleza.

10 **[0094]** Como se usa en este documento, el término “célula diana” se refiere a una célula en la que se desea insertar una secuencia de ácidos nucleicos o polipéptido, o efectuar de otro modo una modificación de condiciones conocidas por ser convencionales en la célula sin modificar. Una secuencia de ácidos nucleicos introducida en una célula diana puede ser de longitud variable. Adicionalmente, una secuencia de ácidos nucleicos puede entrar en una célula diana como componente de un plásmido u otro vector o como una secuencia desnuda.

15 **[0095]** Como se usa en este documento, el término “gen diana” se refiere a un gen que es elegido como diana para la modulación usando los procedimientos y composiciones de la materia presentemente desvelada. Por tanto, un gen diana comprende una secuencia de ácidos nucleicos cuyo nivel de expresión, tanto al nivel de ARNm como de polipéptidos, se regula por disminución por un miARN. Similarmente, los términos “ARN diana” o “ARNm diana” se refieren al transcrito de un gen diana con el que pretende unirse el miARN, conduciendo a la modulación de la expresión del gen diana. El gen diana puede ser un gen derivado de una célula, un gen endógeno, un transgén o genes exógenos tales como genes de un patógeno, por ejemplo, un virus que está presente en la célula después de la infección de la misma. La célula que contiene el gen diana puede derivarse de o estar contenida en cualquier organismo, por ejemplo, una planta, animal, protozoo, virus, bacteria u hongo.

20 **[0096]** Como se usa en este documento, el término “transcripción” se refiere a un procedimiento celular que implica la interacción de una ARN polimerasa con un gen que dirige la expresión como ARN de la información estructural presente en las secuencias codificantes del gen. El procedimiento incluye, pero no se limita a, las siguientes etapas: (a) la iniciación de la transcripción; (b) extensión del transcrito; (c) corte y empalme del transcrito; (d) polarización del transcrito; (e) terminación del transcrito; (f) poliadenilación del transcrito; (g) exportación nuclear del transcrito; (h) corrección del transcrito; y (i) estabilización del transcrito.

25 **[0097]** Como se usa en este documento, el término “factor de transcripción” se refiere a una proteína citoplásmica o nuclear que se une a un gen, o se une a un transcrito de ARN de un gen, o se une a otra proteína que se une a un gen o un transcrito de ARN u otra proteína que a su vez se une a un gen o un transcrito de ARN, de manera que así modula la expresión del gen. Tal modulación puede lograrse adicionalmente por otros mecanismos; la esencia de un “factor de transcripción para un gen” se refiere a un factor que altera de alguna forma el nivel de transcripción del gen.

30 **[0098]** El término “transfección” se refiere a la introducción de un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, en una célula receptora, que en ciertos casos implica transferencia génica mediada por ácido nucleico. El término “transformación” se refiere a un procedimiento en el que un genotipo de célula es cambiado como resultado de la captación celular de ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, una célula transformada puede expresar un miARN de la materia presentemente desvelada.

35 **[0099]** Como se usa en este documento, “significancia” o “significativo” se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que haya una asociación no al azar entre dos o más entidades. Para determinar si una relación es o no “significativa” o tiene “significancia” pueden realizarse manipulaciones estadísticas de los datos para calcular una probabilidad expresada como un “valor de p”. Aquellos valores de p que se encuentran por debajo de un punto de corte definido por el usuario se consideran significativos. En un ejemplo, un valor de p inferior a 0,05, en algunas realizaciones inferior a 0,01, en algunas realizaciones inferior a 0,005, y en algunas realizaciones inferior a 0,001, se considera significativo.

40 **[0100]** Como se usa en este documento, el término “ARN diana” se refiere a una molécula de ARN (por ejemplo, una molécula de ARNm que codifica un producto génico) que es una diana para la modulación. En algunas realizaciones, el ARN diana es codificado por un gen diana. Similarmente, el término “sitio diana” se refiere a una secuencia dentro de un ARN diana que es “elegido como diana” para la escisión mediada por una construcción de miARN que contiene secuencias dentro de su cadena antisentido que son complementarias al sitio diana. Por tanto, similarmente, el término “célula diana” se refiere a una célula que expresa un ARN diana y en el que pretende introducirse un miARN. Una célula diana es en algunas realizaciones un miocito.

45 **[0101]** Un miARN es “elegido como diana para” una molécula de ARN si tiene suficiente similitud de nucleótidos con la molécula de ARN que se esperaría que modulara la expresión de la molécula de ARN en condiciones suficientes para que interaccionara el miARN y la molécula de ARN. En algunas realizaciones, la

interacción se produce dentro de un miocito. En algunas realizaciones, la interacción se produce bajo condiciones fisiológicas. Como se usa en este documento, el término “condiciones fisiológicas” se refiere a condiciones *in vivo* dentro de un miocito, si ese miocito es parte de un sujeto o tejido de un sujeto, o ese miocito está siendo cultivado *in vitro*. Por tanto, como se usa en este documento, el término “condiciones fisiológicas” se refiere a las condiciones dentro de un miocito bajo cualquier condición a la que pueda exponerse el miocito, tanto como parte de un sujeto como cuando se cultiva *in vitro*.

[0102] Como se usa en este documento, el término “nivel de escisión detectable” se refiere a un grado de escisión de ARN diana (y formación de ARN producto escindido) que es suficiente para permitir la detección de productos de escisión por encima de la referencia de ARN producidos por degradación al azar del ARN diana. La producción de productos de escisión mediados por miARN de al menos el 1 % – 5 % del ARN diana es suficiente para permitir la detección por encima de la referencia para la mayoría de los procedimientos de detección.

[0103] Los términos “microARN” y “miARN” se usan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico de aproximadamente 17 – 24 nucleótidos que se produce a partir de un pri-miARN, un pre-miARN o un equivalente funcional. Los miARN deben contrastarse con ARN interferentes pequeños (ARNip), aunque en el contexto de miARN y ARNip exógenamente suministrados, esta distinción podría ser algo artificial. La distinción a tener en cuenta es que un miARN es necesariamente el producto de la actividad de nucleasa en una molécula de horquilla tal como se ha descrito en este documento, y un ARNip puede generarse a partir de una molécula de ARN completamente bicatenaria o una molécula de horquilla. Información adicional relacionada con miARN generalmente, además de una base de datos de miARN publicados conocidos y herramientas de búsqueda para explotar la base de datos, pueden encontrarse en la página web de Wellcome Trust Sanger Institute miRBase: : Sequences, incorporada en este documento por referencia. Véase también The microRNA Registry, Griffiths-Jones S., NAR, 2004, 32, Database Issue, D109 – D111, incorporada en este documento por referencia.

[0104] Como se usa en este documento, el término “ARN” se refiere a una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. Por “ribonucleótido” se indica un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un resto de β-D-ribofuranosa. Los términos engloban ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN con regiones tanto bicatenarias como monocatenarias, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético y ARN recombinantemente producido. Por tanto, los ARN incluyen, pero no se limitan a: transcritos de ARNm, miARN y precursores de miARN y ARNip. Como se usa en este documento, el término “ARN” también pretende englobar ARN alterado, o ARN análogo, que son ARN que se diferencian del ARN que se produce naturalmente mediante la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir adición de material de no nucleótido tal como al (a los) extremo(s) del ARN o internamente, por ejemplo, en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN de la materia presentemente desvelada también pueden comprender nucleótidos no convencionales tales como nucleótidos que se producen no naturalmente o nucleótidos o desoxinucleótidos químicamente sintetizados. Estos ARN alterados pueden denominarse en lo sucesivo análogos o análogos de un ARN que se produce naturalmente.

[0105] Como se usa en este documento, el término “ARN bicatenario” se refiere a una molécula de ARN al menos una parte de la cual está en apareamiento de bases de Watson-Crick formando un dúplex. Como tal, el término debe entenderse que engloba una molécula de ARN que es tanto completamente como sólo parcialmente bicatenaria. ARN bicatenarios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: moléculas que comprenden al menos dos cadenas de ARN distintas que están tanto parcialmente como completamente duplexadas por hibridación intermolecular. Adicionalmente, el término está previsto que incluya una única molécula de ARN que por hibridación intramolecular pueda formar una región bicatenaria (por ejemplo, una horquilla). Por tanto, como se usa en este documento, los términos “hibridación intermolecular” e “hibridación intramolecular” se refieren a moléculas bicatenarias para las que los nucleótidos implicados en la formación del dúplex están presentes en diferentes moléculas o la misma molécula, respectivamente.

[0106] Como se usa en este documento, el término “región bicatenaria” se refiere a cualquier región de una molécula de ácido nucleico que está en una conformación bicatenaria mediante enlaces de hidrógeno entre los nucleótidos que incluyen, pero no se limitan a: enlaces de hidrógeno entre citosina y guanosina, adenosina y timidina, adenosina y uracilo, y cualquier otro dúplex de ácido nucleico como entendería un experto en la materia. La longitud de la región bicatenaria puede variar de aproximadamente 15 pares de bases consecutivos a varios miles de pares de bases. En algunas realizaciones, la región bicatenaria tiene al menos 15 pares de bases, en algunas realizaciones entre 15 y 300 pares de bases, y en algunas realizaciones entre 15 y aproximadamente 60 pares de bases. Como se describe anteriormente en este documento, la formación de la región bicatenaria resulta de la hibridación de cadenas de ARN complementarias (por ejemplo, una cadena sentido y una cadena antisentido), tanto por una hibridación intermolecular (es decir, que implica 2 o más moléculas de ARN distintas) como mediante una hibridación intramolecular, pudiendo producirse la última cuando una única molécula de ARN contiene regiones auto-complementarias que pueden hibridarse entre sí en la misma molécula de ARN. Estas regiones auto-complementarias están normalmente separadas por una corta extensión de nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 5 – 10 nucleótidos), de forma que el acontecimiento de hibridación intramolecular forma lo que se denomina en la materia una “horquilla” o una “estructura de tallo-bucle”.

III. Ácidos nucleicos

[0107] Las moléculas de ácidos nucleicos empleadas según la materia presentemente desvelada incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican un producto génico de miocito, además de las moléculas de ácidos nucleicos que se usan según la materia presentemente desvelada para modular la expresión de un gen de miocito (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico de miARN). Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos empleadas según la materia presentemente desvelada incluyen, pero no se limitan a: las moléculas de ácidos nucleicos descritas en este documento. Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos empleadas en este documento incluyen, pero no se limitan a: miR-1 (UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUA; SEQ ID N°: 1), miR-133 (UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU; SEQ ID N°: 2), miR-206 (UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG; SEQ ID N°: 3), miR-208 (AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU; SEQ ID N°: 4), miR-22 (AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU; SEQ ID N°: 5), miR-26 (UUCAAGUAAUyCAGGAUAGGy(U); SEQ ID N°: 6), **miR-29** (UAGCACCAUyUGAAAUCrGU(kUU); SEQ ID N°: 7), miR-30 (ykUwmAswysshswyUvnnv(bC); SEQ ID N°: 8), miR-128 (UCACAGUGAACCGGUCUCUUUy; SEQ ID N°: 9), miR-143 (UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA; SEQ ID N°: 10) y miR-145 (GUCCAGUUUUCCAGGAAUCCUU; SEQ ID N°: 11); secuencias sustancialmente idénticas a aquellas descritas en este documento (por ejemplo, en algunas realizaciones, secuencias de al menos el 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idénticas a cualquiera de SEQ ID N°: 1-11); y subsecuencias y secuencias alargadas de las mismas. La materia presentemente desvelada también engloba genes, ADNc, genes quiméricos y vectores que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos desveladas. Sólo miR-1 y miR-133 están cubiertos por las presentes reivindicaciones.

[0108] Los códigos de nucleótidos de una letra usados anteriormente y en cualquier parte en este documento son según WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tabla 1, (M.P.E.P. 2422, Tabla 1), incorporado en este documento por referencia. En particular, los siguientes códigos de una letra representan el (los) nucleótido(s) asociado(s) que se expone(n) en la Tabla 1. El (Los) nucleótido(s) en paréntesis (por ejemplo, (n)) pretende(n) significar que el (los) nucleótido(s) puede(n) estar presente(s) o ausente(s). Además, la Figura 21 enumera secuencias individuales posibles para SEQ ID N°: 5-11 basándose en las permutaciones de nucleótidos expuestas en SEQ ID N°: 5-11.

Tabla 1

Abreviaturas de nucleótidos de una letra	
A	adenina
G	guanina
C	citocina
T	timina
U	uracilo
k	G o U/T
w	U/T o A
m	C o A
s	G o C
h	A, C, o U/T
v	G, A, o C
b	C, G, o U/T
n	A, G, C, o U/T
y	C o T/U

[0109] Una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo empleada en los procedimientos desvelados en este documento comprende secuencias que son complementarias entre sí, pudiendo formar las regiones complementarias un dúplex de, en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 15 a 300 pares de bases, y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente 15 – 24 pares de bases. Una cadena del dúplex comprende una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 15 bases contiguas que tienen una secuencia de ácidos nucleicos de una molécula de ácido nucleico de la materia presentemente desvelada. En un ejemplo, una cadena del dúplex comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende 15, 16, 17 ó 18 nucleótidos, o incluso más si se desea, tal como 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 nucleótidos, o hasta la longitud completa de cualquiera de aquellas secuencias de ácidos nucleicos descritas en este documento. Tales fragmentos pueden prepararse fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento por síntesis química, por aplicación de tecnología de amplificación de ácidos nucleicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante. El término “hibridar específicamente con” se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sola con una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla de ácido nucleico complejo (por ejemplo, ADN o ARN celular total).

[0110] El término “subsecuencia” se refiere a una secuencia de una molécula de ácido nucleico o molécula de aminoácido que comprende una parte de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos más larga. Una subsecuencia a modo de ejemplo es una secuencia que comprende parte de una región de dúplex de un pri-miARN

o un pre-miARN (“precursores de miARN”) que incluye, pero no se limita a, los nucleótidos que se convierten en el miARN maduro después de la acción de nucleasas o una región monocatenaria en un precursor de miARN.

[0111] El término “secuencia extendida” se refiere a una adición de nucleótidos (u otras moléculas análogas) incorporadas en el ácido nucleico. Por ejemplo, una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) puede añadir secuencias al extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Además, la secuencia de nucleótidos puede combinarse con otras secuencias de ADN tal como promotores, regiones promotoras, potenciadores, señales de poliadenilación, secuencias intrónicas, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple y otros segmentos codificantes.

[0112] Los ácidos nucleicos de la materia presentemente desvelada pueden clonarse, sintetizarse, alterarse recombinantemente, mutagenizarse o someterse a combinaciones de estas técnicas. En la técnica se conocen técnicas de clonación de ADN recombinante y molecular convencionales usadas para aislar ácidos nucleicos. Procedimientos no limitantes a modo de ejemplo se describen por Silhavy y col., 1984⁴⁶; Ausubel y col., 1989³⁶; Glover & Hames, 1995⁴⁷; y Sambrook & Russell, 2001⁴⁰. La mutagénesis específica para sitio para crear cambios de pares de bases, deleciones o pequeñas inserciones también se conocen en la técnica como se ejemplifica por las publicaciones (véase, por ejemplo, Adelman y col., 1983⁴⁸ Sambrook & Russell, 2001⁴⁰).

IV. Vectores de expresión de miARN

[0113] En algunas realizaciones de la materia presentemente desvelada, moléculas de miARN o moléculas de precursores de miARN se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ácido nucleico (alternativamente denominados generalmente “vectores recombinantes” o “vectores de expresión”). Un vector puede usarse para administrar una molécula de ácido nucleico que codifica un miARN en un miocito para elegir como diana un gen específico. Los vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, plásmidos de ADN o vectores víricos. En la técnica se conoce una variedad de vectores de expresión. La selección del vector de expresión apropiado puede hacerse basándose en varios factores que incluyen, pero no se limitan a: el tipo de célula en el que se desea la expresión.

[0114] El término “vector” se refiere a un ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha ligado. Vectores incluyen aquellos que pueden replicarse autónomamente y expresar ácidos nucleicos con los que se ligan. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes con lo que están operativamente ligados se denominan en este documento “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas recombinantes están frecuentemente en forma de plásmidos. Sin embargo, la materia presentemente desvelada pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales que sirven a funciones equivalentes y que se conocen en la técnica posteriormente a esto.

[0115] El término “vector de expresión” como se usa en este documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que puede dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped apropiada que comprende un promotor operativamente ligado a la secuencia de nucleótidos de interés que está operativamente ligado a secuencias de terminación de la transcripción. Normalmente también comprende secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La construcción que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérica. La construcción también puede ser una que se produce naturalmente, pero que ha sido obtenida de una forma recombinante útil para expresión heteróloga. La secuencia de nucleótidos de interés, que incluye cualquier secuencia adicional diseñada para efectuar la expresión apropiada de las secuencias de nucleótidos, también puede denominarse en lo sucesivo un “casete de expresión”.

[0116] Los términos “gen heterólogo”, “secuencia de ADN heterólogo”, “secuencia de nucleótidos heteróloga”, “molécula de ácido nucleico exógena” o “segmento de ADN exógeno”, como se usan en este documento, se refieren cada uno a una secuencia que se origina a partir de una fuente extraña a una célula huésped prevista o, si es a partir de la misma fuente, se modifica a partir de su forma original. Por tanto, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno a la célula huésped particular, pero que se ha modificado, por ejemplo, por mutagénesis o por aislamiento a partir de secuencias reguladoras transcripcionales nativas. Los términos también incluyen copias múltiples que se producen no naturalmente de una secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente. Por tanto, los términos pueden referirse a un segmento de ADN que es extraño o heterólogo para la célula, u homólogo con la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que el elemento no se encuentra generalmente.

[0117] El término “promotor” o “región promotora” se refiere cada uno a una secuencia de nucleótidos dentro de un gen que está posicionado 5' con respecto a una secuencia codificante y funciona para dirigir la transcripción de la secuencia codificante. La región promotora comprende un sitio de inicio de la transcripción y puede incluir adicionalmente uno o más elementos reguladores de la transcripción. En algunas realizaciones, un procedimiento de la materia presentemente desvelada emplea un promotor de ARN polimerasa III.

[0118] Un “promotor mínimo” es una secuencia de nucleótidos que tiene los elementos mínimos requeridos para permitir que se produzca la transcripción de nivel basal. Como tales, los promotores mínimos no son

promotores completos, sino que son subsecuencias de promotores que pueden dirigir un nivel basal de transcripción de una construcción indicadora en un sistema experimental. Los promotores mínimos incluyen, pero no se limitan a: el promotor mínimo del citomegalovirus (CMV), el promotor mínimo de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk), el promotor mínimo del virus simio 40 (SV40), el promotor mínimo de β -actina humana, el promotor mínimo de EF2 humano, el promotor mínimo del adenovirus E1B y el promotor mínimo de la proteína de choque térmico (hsp) 70. Los promotores mínimos se incrementan frecuentemente con uno o más elementos reguladores de la transcripción para influir la transcripción de un gen operativamente ligado. Por ejemplo, pueden añadirse elementos reguladores de la transcripción específicos para tipo de célula o específicos para tejido a los promotores mínimos para crear promotores recombinantes que dirigen la transcripción de una secuencia de nucleótidos operativamente ligada de un modo específico para tipo de célula o específico para tejido. Como se usa en este documento, el término “promotor mínimo” también engloba un derivado funcional de un promotor desvelado en este documento que incluye, pero no se limita a, un promotor de ARN polimerasa III (por ejemplo, un promotor de H1, 7SL, 5S o U6), un promotor del adenovirus VA1, un promotor de Vault, un promotor de ARN de telomerasa y un promotor del gen de ARNt.

[0119] Diferentes promotores tienen diferentes combinaciones de elementos reguladores de la transcripción. Tanto si un gen se expresa en una célula como si no depende de una combinación de los elementos reguladores de la transcripción particulares que constituyen el promotor del gen y los diferentes factores de transcripción que están presentes dentro del núcleo de la célula. Como tales, los promotores se clasifican frecuentemente como “constitutivos”, “específicos para tejido”, “específicos para tipo de célula” o “inducibles” dependiendo de sus actividades funcionales *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, un promotor constitutivo es uno que puede dirigir la transcripción de un gen en una variedad de tipos de células (en algunas realizaciones, en todos los tipos de células) de un organismo. Promotores constitutivos a modo de ejemplo incluyen los promotores para los siguientes genes que codifican ciertas funciones constitutivas o “de mantenimiento”: hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR; (Scharfmann y col., 1991), adenosina desaminasa, fosfoglicerato cinasa (PGK), piruvato cinasa, fosfoglicerato mutasa, el promotor de β -actina (véase, por ejemplo, Williams y col., 1993) y otros promotores constitutivos conocidos para aquellos expertos en la materia. Por otra parte, los promotores “específicos para tejido” o “específicos para tipo de célula” dirigen la transcripción en algunos tejidos o tipos de células de un organismo, pero son inactivos en algunos o todos los otros tejidos o tipos de células. Promotores específicos para tejido a modo de ejemplo incluyen aquellos promotores descritos en más detalle más adelante en este documento, además de otros promotores específicos para tejido y específicos para tipo de célula conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0120] Cuando se usa en el contexto de un promotor, el término “ligado” como se usa en este documento se refiere a una proximidad física de elementos promotores de forma que funcionen juntos para dirigir la transcripción de una secuencia de nucleótidos operativamente ligada.

[0121] El término “secuencia reguladora de la transcripción” o “elemento regulador de la transcripción”, como se usa en este documento, se refiere cada uno a una secuencia de nucleótidos dentro de la región promotora que permite sensibilidad a un factor de transcripción regulador. La sensibilidad puede englobar una disminución o un aumento en la salida de la transcripción y está mediada por la unión del factor de transcripción a la secuencia de nucleótidos que comprende el elemento regulador de la transcripción. En algunas realizaciones, una secuencia reguladora de la transcripción es una secuencia de terminación de la transcripción, alternativamente denominada en este documento señal de terminación de la transcripción.

[0122] El término “factor de transcripción” se refiere generalmente a una proteína que modula la expresión génica por interacción con el elemento regulador de la transcripción y componentes celulares para la transcripción, que incluyen ARN polimerasa, factores asociados a la transcripción (TAF), proteínas de remodelación de cromatina y cualquier otra proteína relevante que tenga un impacto sobre la transcripción génica.

V. Procedimientos para modular la expresión génica en miocitos

[0123] La materia presentemente desvelada proporciona agentes para su uso en procedimientos para modular la expresión de genes en miocitos con especificidad. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden poner en contacto un miocito con un miARN o un vector que codifica el miARN elegido como diana para un gen en el miocito. La elección como diana de uno o más genes particulares en miocito permite la manipulación de la función o desarrollo de miocitos (por ejemplo, diferenciación) con un alto nivel de especificidad. Por tanto, en algunas realizaciones, la materia presentemente desvelada proporciona además procedimientos para modular la función o desarrollo de miocitos poniendo en contacto un miocito con un miARN elegido como diana para un gen en el miocito que puede modular la función o desarrollo de miocitos.

[0124] En algunas realizaciones, el miARN elegido como diana para un gen particular se selecciona de miR-1 y miR-133 (SEQ ID N°: 1-2) que incluye miARN que tienen secuencias al menos aproximadamente el 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idénticas a las secuencias expuestas en una cualquiera de SEC ID N° 1-2.

[0125] Un miARN es “elegido como diana para” un molécula de ARN si tiene suficiente similitud de nucleótidos con la molécula de ARN que se esperaría que modulara la expresión de la molécula de ARN en condiciones suficientes para que interaccionen el miARN y la molécula de ARN. En algunas realizaciones, la interacción se produce dentro de un miocito. En algunas realizaciones, la interacción se produce bajo condiciones fisiológicas. Como se usa en este documento, el término “condiciones fisiológicas” se refiere a condiciones *in vivo* dentro de un miocito, si ese miocito es parte de un sujeto o tejido de un sujeto, o ese miocito está siendo cultivado *in vitro*. Por tanto, como se usa en este documento, el término “condiciones fisiológicas” se refiere a las condiciones dentro de un miocito bajo cualquier condición a la que pueda exponerse el miocito, tanto como parte de un organismo como cuando se cultiva *in vitro*.

[0126] En algunas realizaciones, el gen elegido como diana es un gen de diferenciación de miocitos o un gen de proliferación de miocitos y cuando se expresa puede modular la diferenciación y/o proliferación de miocitos, respectivamente. En algunas realizaciones, el gen elegido como diana puede expresar un producto génico que inhibe la diferenciación y/o proliferación de miocitos. Por tanto, la inhibición elegida como diana de la expresión de uno o más de estos genes diana de diferenciación y/o proliferación por el miARN puede producir un aumento en la diferenciación y/o proliferación del miocito tratado. En realizaciones a modo de ejemplo no limitantes de la materia presentemente desvelada, el gen de diferenciación de miocitos puede codificar un polipéptido de histona desacetilasa 4 (HDAC4) o una proteína 240 de receptor de hormona tiroidea (TRAP240) y el gen de proliferación de miocitos puede codificar un polipéptido de factor de respuesta a suero (SRF).

[0127] La expresión de uno o más de los genes de diferenciación o proliferación de miocitos puede elegirse como diana para la inhibición utilizando uno de los miARN desvelados en este documento. Los miARN miR-1 y miARN-133 eligen cada uno específicamente como diana la región sin traducir de 3' de HDAC4 y SRF, respectivamente, e inhiben la expresión de los productos génicos codificados por estos genes. Por tanto, en algunas realizaciones de la materia presentemente desvelada, la diferenciación de un miocito puede aumentarse poniendo en contacto el miocito con miR-1, que elige como diana el gen que codifica HDAC4, previniéndose así sustancialmente la expresión de HDAC4 y aumentando la diferenciación de miocitos. Asimismo, en algunas realizaciones de la materia presentemente desvelada, la proliferación de un miocito puede aumentarse poniendo en contacto el miocito con miR-133, que elige como diana el gen que codifica SRF, previniéndose así sustancialmente la expresión de SRF y aumentando la proliferación de miocitos.

VI. Procedimientos terapéuticos

[0128] La materia presentemente desvelada proporciona en algunas realizaciones agentes para su uso en procedimientos terapéuticos para tratar una lesión muscular en un sujeto. Como se desvela en este documento, los miARN pueden elegirse como diana para genes para modular la expresión de los genes. En particular, los genes que expresan productos que funcionan para inhibir la diferenciación y/o proliferación de miocitos pueden ser elegidos como diana por miARN para inhibir la expresión de estos genes, produciendo un aumento de la diferenciación y/o proliferación de miocitos. Además, los inhibidores de miARN pueden elegirse como diana para miARN endógenos para facilitar el aumento relativo en la expresión de productos génicos particulares de un modo beneficioso para el tratamiento de la lesión muscular. Adicionalmente, las combinaciones de miARN y/o inhibidores de miARN pueden co-administrarse a la lesión muscular en un enfoque para optimizar la curación de la lesión. El aumento de la diferenciación y/o proliferación de miocitos puede ser beneficioso en la curación de tejido muscular lesionado o la estimulación del recrecimiento de tejido muscular perdido.

[0129] Por tanto, en algunas realizaciones de la materia presentemente desvelada, los agentes proporcionados usados en procedimientos para tratar una lesión muscular en un sujeto comprenden administrar a un sitio de lesión muscular en un sujeto una cantidad eficaz de un miARN, un vector que codifica el miARN, un inhibidor de un miARN, o combinaciones de los mismos, en las que el miARN es elegido como diana para un gen en un miocito en el sitio de lesión muscular.

[0130] El desarrollo muscular, y comparablemente el crecimiento y/o curación de músculo, tal como después de lesión, pueden producirse en fases. Fases representativas incluyen proliferación de miocitos no diferenciada, seguida de diferenciación de los miocitos en células maduras del tejido muscular. Por tanto, la reparación de tejido muscular en un sitio de lesión muscular puede facilitarse por la administración coordinada al sitio de lesión de miARN y/o inhibidores de miARN que potencian la proliferación de miocitos no diferenciados, y la administración al sitio de lesión de miARN y/o inhibidores de miARN que potencian la diferenciación de los miocitos proliferados en tejido muscular de funcionamiento maduro.

[0131] Por ejemplo, como se desvela en este documento, se ha determinado que miR-1 y miR-133 desempeñan cada uno funciones distintas en la modulación de la proliferación y diferenciación de músculo esquelético. miR-133 potencia la proliferación de miocitos reprimiendo SRF. A diferencia, miR-1 promueve la diferenciación de miocitos eligiendo como diana HDAC4, un represor de la transcripción de la expresión génica de músculo. Por tanto, en una realización representativa no limitante de la materia presentemente desvelada, miR-133 y un inhibidor de miR-1 (por ejemplo, 2'-O-metil-miR-1) se co-administran primero al sitio de lesión muscular en un primer momento de tiempo para aumentar la proliferación de miocitos en el sitio de lesión. Entonces, miR-1 y un

inhibidor de miR-133 (por ejemplo, 2'-O-metil-miR-133) se co-administran al sitio de lesión muscular en un segundo momento de tiempo para aumentar la diferenciación de los miocitos proliferados. La coadministración temporalmente coordinada de múltiples miARN y/o inhibidores de miARN puede mejorar adicionalmente la recuperación de lesión muscular.

5
[0132] En algunas realizaciones, la lesión muscular resulta de un traumatismo muscular mecánico, un trastorno degenerativo muscular, una lesión cardíaca, o una combinación de los mismos. El traumatismo muscular mecánico puede ser el resultado de, por ejemplo, traumatismo por objeto contundente tal como se produce en
 10 accidentes de automóvil o lesiones penetrantes en las que el tejido muscular es cortado o rasgado. Trastornos degenerativos musculares no limitantes a modo de ejemplo incluyen distrofias musculares (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne (DMD)), enfermedades de las neuronas motoras (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ELA)), miopatías inflamatorias (por ejemplo, dermatomiositis (DM)), enfermedades de la unión neuromuscular (por ejemplo, miastenia grave (MG)), miopatías endocrinas (por ejemplo, miopatía hipertiroidica (HYPTM)) y enfermedades musculares metabólicas (por ejemplo, deficiencia de fosforilasa (MPD)). Lesiones de músculo por
 15 lesión cardíaca no limitantes a modo de ejemplo incluyen infarto de miocardio y lesión por reperfusión de músculo cardíaco.

[0133] El miARN elegido como diana para un gen particular se selecciona del grupo que consiste en miR-1 y miR-133 (SEQ ID N°: 1-2), que incluye miARN que tienen secuencias al menos el 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92
 20 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idénticas a las secuencias expuestas en una cualquiera de SEC ID N° 1-2. En algunas realizaciones, el gen es un gen de diferenciación de miocitos (por ejemplo, que codifica HDAC4 o TRAP240) o un gen de proliferación de miocitos (por ejemplo, que codifica SRF).

[0134] Con respecto a los procedimientos terapéuticos de la materia presentemente desvelada, un sujeto preferido es un sujeto vertebrado. Un vertebrado preferido es de sangre caliente; un vertebrado de sangre caliente preferido es un mamífero. Un mamífero preferido es lo más preferentemente un ser humano. Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humano como animales. Por tanto, se proporcionan usos terapéuticos veterinarios según la materia presentemente desvelada.

[0135] Como tal, la materia presentemente desvelada proporciona el tratamiento de mamíferos tales como seres humanos, además de aquellos mamíferos de importancia debido a que están en vías de extinción tales como tigres siberianos; de importancia económica tales como animales criados en granjas para el consumo por los seres humanos; y/o animales de importancia social para los seres humanos tales como animales mantenidos mascotas o en zoológicos. Ejemplos de tales animales incluyen, pero no se limitan a: carnívoros tales como gatos y perros; cerdos, que incluyen cerdos, cerdos salvajes y jabalíes; rumiantes y/o ungulados tales como ganado vacuno, buey, ovejas, jirafas, ciervo, cabras, bisonte y camellos; y caballos. También se proporciona el tratamiento de pájaros, que incluye el tratamiento de aquellos tipos de pájaros que están en vías de extinción y/o mantenidos en zoológicos, además de aves, y más particularmente aves domesticadas, es decir, aves de corral tales como pavos, pollos, patos, ganso, gallina de Guinea y similares, ya que también son de importancia económica para los seres humanos. Por tanto, también se proporciona el tratamiento de ganado que incluye, pero no se limita a, cerdos domesticados, rumiantes, ungulados, caballos (incluyendo caballos de carreras), aves de corral y similares.

[0136] Procedimientos adecuados para administrar a un sujeto un miARN o un vector que codifica el miARN incluyen, pero no se limitan a: administración sistémica, administración parenteral (incluyendo administración intravascular, intramuscular, intraarterial), administración oral, administración bucal, administración subcutánea, inhalación, instilación intratraqueal, implantación quirúrgica, administración transdérmica, inyección local e inyección/bombardeo a hiper-velocidad. Si procede, la infusión continua puede potenciar la acumulación de fármaco en un sitio diana.

[0137] El modo particular de administración usado según los procedimientos de la presente materia depende de diversos factores que incluyen, pero no se limitan a: el miARN y/o vector vehículo empleado, la gravedad de la afección que va a tratarse y mecanismos para el metabolismo o la eliminación del (de los) compuesto(s) activo(s) tras la administración.

[0138] El término "cantidad eficaz" se usa en este documento para referirse a una cantidad de la composición terapéutica (por ejemplo, una composición que comprende un miARN o un vector que codifica el miARN) suficiente para producir una respuesta biológica medible (por ejemplo, un aumento en la diferenciación y/o proliferación de miocitos). Niveles de dosificación reales de compuestos activos en una composición terapéutica de la materia presentemente desvelada pueden variarse de manera que se administre una cantidad del (de los) compuesto(s) activo(s) que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto y/o aplicación particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la composición terapéutica, formulación, la vía de administración, combinación con otros fármacos o tratamientos, gravedad de la afección que está tratándose y la afección física e historia médica previa del sujeto que está tratándose. Preferentemente se administra una dosis mínima, y la dosis se aumenta en ausencia de toxicidad limitante de dosis a una cantidad mínimamente eficaz. La determinación y el ajuste de una dosis eficaz, además de la evaluación de cuándo y cómo hacer tales ajustes, están dentro del experto en la materia.

EJEMPLOS

[0139] Los siguientes ejemplos se han incluido para ilustrar modos de la materia presentemente desvelada. En vista de la presente divulgación y el nivel general de habilidad en la materia, los expertos apreciarán que los siguientes ejemplos sólo pretenden ser a modo de ejemplo y que pueden emplearse numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la materia presentemente desvelada.

EJEMPLO 1

[0140] Con el fin de entender la posible implicación de microARN (miARN) en la proliferación y diferenciación de músculo esquelético, los presentes inventores analizaron la expresión de miARN durante la diferenciación de músculo esquelético usando el análisis de micromatrices establecidas⁹. Los presentes inventores eligieron usar mioblastos C₂C12 debido a que esta línea de células imita fielmente la diferenciación de músculo esquelético *in vitro* ya que los mioblastos pueden inducirse para convertirse en miotubos terminalmente diferenciados cuando el suero se extrae del medio de cultivo¹⁰⁻¹². Los presentes inventores encontraron que la expresión de una fracción del miARN examinado se reguló por incremento en mioblastos C₂C12/miotubos diferenciados (Figura 1a y Figura 6). El aumento en la expresión de miR-1 y miR-133 en mioblastos diferenciados se confirmó por análisis de transferencia Northern (Figura 1b y Figura 7).

EJEMPLO 2

[0141] miR-1 y miR-133 se expresan específicamente en tejidos de músculo cardíaco y esquelético adulto, pero no en otros tejidos probados (Figura 1c, Figura 8). Sin embargo, poco se sabe sobre la distribución temporoespacial de miARN específicos durante el desarrollo de mamíferos. Por tanto, los presentes inventores examinaron la expresión de miR-1 y miR-133 en embriones de ratón y neonatos. miR-1 y miR-133 se expresan a niveles muy bajos en los corazones en desarrollo y músculo esquelético de embriones de E13,5 y E16,5 (Figura 1d y Figura 8). Se encontró un nivel creciente de la expresión de miR-1 y miR-133 en corazones neonatales y músculo esquelético, aunque éste es todavía significativamente más bajo que el de adultos (Figura 1e y Figura 8). Estos datos están de acuerdo con los hallazgos de pez cebra en el que la mayoría de los miARN se expresan relativamente tarde durante la embriogénesis¹⁶.

EJEMPLO 3

[0142] Tanto miR-1 como miR-133 están agrupados juntos en los cromosomas 2 (separados por 9,3 kb) y 18 (separados por 2,5 kb) de ratón (Figura 9 y ref. 14). Los presentes inventores realizaron un análisis de transferencia Northern usando sondas genómicas de ~ 300 pb que incluían las secuencias de miR-1 o miR-133 (Figuras 9a-9e). Las sondas de miR-1 y miR-133 del cromosoma 18 detectaron un único transcrito primario de ~ 6 kb de ARN totales aislados de músculo cardíaco y esquelético (Figuras 9b y 9c), que indica que miR-1 y miR-133 son de hecho transcritos juntos. Mientras que tanto las sondas de miR-1 como de miR-133 del cromosoma 2 detectaron un transcrito de ~ 10 kb de músculo cardíaco y esquelético, la sonda de miR-133 también se hibridó con dos transcritos adicionales de ~ 4,5 kb y ~ 2,2 kb, mientras que la sonda de miR-1 también detectó un transcrito principal de ~ 6 kb (Figuras 9d y 9e), sugiriendo la posible implicación del procesamiento postranscripcional. Juntos, los datos de los presentes inventores indican que la expresión específica para músculo cardíaco y esquelético de miR-1 y miR-133 es dictada como la etapa de transcripción primaria.

EJEMPLO 4

[0143] Los presentes inventores razonaron que los elementos reguladores que controlan la transcripción de tanto el cromosoma 2 como 18 de agrupaciones de miR-1 y miR-133 están probablemente conservados. Por tanto, los presentes inventores realizaron análisis de secuencias e identificaron una región altamente conservada (~ 2 kb), que se encuentra aproximadamente 50 kb en la dirección 5' de las agrupaciones de miR-1/133 en tanto el cromosoma 2 como 18 (Figura 10). Cuando este fragmento genómico del cromosoma 2 se usó para accionar la expresión de un gen indicador dsRed en *Xenopus* transgénico, los presentes inventores encontraron expresión específica para músculo cardíaco y esquelético del transgén (Figura 10).

EJEMPLO 5

[0144] Para evaluar la función de miR-1 y miR-133 en músculo esquelético, los presentes inventores intentaron primero expresar en exceso miR-1 y miR-133 en células de mamífero. Los presentes inventores probaron y validaron la expresión y actividad de ambos miARN usando análisis de transferencia Northern, además de "sensores" de miR-1 y miR-133¹⁷, en los que las secuencias complementarias para miR-1 o miR-133 se clonaron en la dirección 3' de una secuencia codificante de dsRed (Figura 11 y datos no mostrados). Los presentes inventores transfirieron mioblastos C₂C12 con miR-1 o miR-133 y luego tanto mantuvieron las células en medio de crecimiento (MC) como las transfirieron a medio de diferenciación (MD) después de la transfección. miR-1 potenció fuertemente la miogénesis como se indica por el aumento de la expresión de los marcadores miogénicos tanto tempranos como

tardíos miogenina y cadena pesada de la miosina (MHC), respectivamente, además de otros marcadores miogénicos que incluyen MyoD, Mef2 y α -actina esquelética (Figuras 2a – 2e, 2i, 2j y Tabla 2). miR-1 indujo la expresión génica de marcadores miogénicos en células mantenidas en tanto la condición de crecimiento en fase logarítmica (Figura 2c) como la condición de diferenciación (Figuras 2, 2d, 2e). La diferenciación miogénica acelerada inducida por miR-1 también va acompañada de una disminución en la proliferación celular, como se marca por una disminución significativa en la expresión de fosfo-histona H3 (Figuras 2, 2c, 2e y Tabla 2). De particular importancia, la miogénesis inducida por miR-1 es específica, ya que la expresión en exceso de un control de GFP o miR-208, que no se expresa endógenamente en miocitos esqueléticos, no mostró efecto (Figuras 2a – 2e). Además, las mutaciones introducidas en las secuencias “semilla” de miR-1 abolieron su capacidad para activar la expresión génica miogénica (Figuras 2d – 2e). A diferencia, la expresión en exceso de miR-133 reprimió la expresión de miogenina y MHC (Figura 2, a – e y Tabla 2) y promovió la proliferación de mioblastos (Figuras 2c – 2e y Tabla 2). De nuevo, el efecto de miR-133 sobre la proliferación de mioblastos es específica, ya que los controles no mostraron efecto y la mutación introducida abolió la función de miR-133 (Figuras 2a – 2e, 2j).

Tabla 2
El efecto sobre la proliferación y diferenciación miogénica por la expresión en exceso e inactivación de miR-1 y miR-133

Tratamiento	MD (8 h)			MD (12 h)			MD (24 h)					
	Células positivas para miogenina	Con respecto al control	%	Células positivas para miogenina	Con respecto al control	%	Células positivas para fosfo-H3	Con respecto al control	%	Células positivas para MHC	Con respecto al control	%
GFP	172	100 %	100 %	93	100 %	100 %	118	100 %	100 %	22	100 %	100 %
miR-1	206	121 %	247,3 %	230	247,3 %	68,9 %	251	212,7 %	55,5 %	56	254,5 %	254,5 %
miR-133	89	51,7 %	73,1 %	68	73,1 %	124,4 %	93	78,8 %	146,7 %	12	54,5 %	54,5 %
2'-O-metil-GFP	146	100 %	100 %	145	100 %	100 %	348	100 %	100 %	22	100 %	100 %
2'-O-metil-miR-1	120	82,2 %	67,6 %	98	67,6 %	124,4 %	299	85,9 %	136,7 %	18	81,8 %	81,8 %
2'-O-metil-miR-133	205	140,4 %	145,5 %	211	145,5 %	62,2 %	498	143,1 %	92,3 %	44	200 %	200 %

[0145] Los presentes inventores realizaron el experimento recíproco en el que los presentes inventores transfectaron mioblastos C2C12 con los 2'-O-metiloligonucleótidos inhibidores antisentido de miR-1 o miR-133 (o GFP y miR-208 de control), que se ha mostrado que inhiben la función de miARN^{18,19}. Las células transfectadas con el inhibidor de miR-1 mostraron inhibición de la miogénesis y promoción de la proliferación de mioblastos, como se indica por una disminución en marcadores miogénicos y un aumento en fosfo-histona H3 (Figuras 2f – 2i y Tabla 2). De acuerdo con la función de miR-133 en la promoción de la proliferación de mioblastos y la represión de la diferenciación, la inhibición de miR-133 produjo un efecto opuesto, en el que la miogénesis fue potenciada y la proliferación celular se reprimió (Figuras 2f – 2j y Tabla 2). A diferencia, los inhibidores de 2'-O-metilo de control no mostraron efectos (Figuras 2f – 2j). Los presentes inventores llegan a la conclusión de que miR-1 y miR-133 tienen distintas funciones en la proliferación y diferenciación de músculo esquelético: miR-1 promueve la diferenciación de mioblastos, mientras que miR-133 estimula la proliferación de mioblastos.

EJEMPLO 6

[0146] Tanto miR-1 como miR-133 se han encontrado en la mayoría de las especies animales, de *Drosophila* a humano, sugiriendo que se conservan evolutivamente. Para probar los efectos de miR-1 y miR-133 sobre el desarrollo de músculo esquelético y del corazón *in vivo*, los presentes inventores identificaron copias de miR-1 y miR-133 en *Xenopus* y probaron su función mediante expresión inadecuada. La introducción de miR-1 en el estadio de una célula conduce a un eje espectacularmente acortado con reducción acompañante en estructuras anteriores y un aumento en el tamaño del cuerpo a lo largo del eje dorsal-ventral se compara con controles tanto sin inyectar como inyectados con miGFP (n > 45, dos experimentos independientes) (Figura 3). Aunque se formaron somitas en embriones inyectados con miR-1 (Figura 3), la tinción con anticuerpo de montaje completo y el seccionamiento seriado revelan que el tejido está altamente desorganizado y fracasa en desarrollarse en estructuras segmentadas (Figuras 3e, 3f, 3j). El tejido cardíaco está completamente ausente como se juzga por histología, tinción con tropomiosina (Figuras 3f, 3j) y tinción con actina cardíaca. Además de estos defectos, hay una espectacular disminución en la tinción con fosfo-histona H3 (Figuras 3i – 3k), de acuerdo con la función esencial de miR-1 en regular la proliferación y diferenciación de miocitos. Aunque la expresión inadecuada de miR-133 también conduce a una reducción en estructuras anteriores y se detecta en el desarrollo de somitas, a diferencia de miR-1, sólo hay una modesta reducción en la longitud anterior-posterior y los efectos somáticos son los más graves en los aspectos más anteriores o posteriores del embrión en los que las somitas fracasan en formarse (Figuras 3g, 3h). Además, el tejido cardíaco se forma frecuentemente en embriones de miR-133, aunque está altamente desorganizado y fracasa en experimentar ciclo cardíaco o formación de cavidades (Figuras 3g, 3h, 3k). En conjunto, estos datos sugieren que el momento correcto y los niveles de tanto miR-1 como miR-133 son necesarios para el apropiado desarrollo de músculo esquelético y del corazón.

EJEMPLO 7

[0147] HDAC4 contiene dos sitios de miR-1 putativos que se producen naturalmente en su 3' UTR, que están evolutivamente conservados entre especies de vertebrados (Figura 12). Similarmente, dos sitios de unión de miR-133 conservados se encuentran en 3' UTR del gen SRF de mamífero (Figura 12), que se ha mostrado que desempeña una función importante en la proliferación y diferenciación de músculo *in vitro* e *in vivo*^{11,24,25}.

[0148] Los presentes inventores fusionaron las 3' UTR de SRF y HDAC4 de ratón con un gen indicador de luciferasa y transfectaron estas construcciones juntas con controles de transfección en células de mamífero. La expresión en exceso ectópica de miR-1 reprimió fuertemente un gen indicador de luciferasa de 3' UTR HDAC4, mientras que miR-133 inhibió la expresión de un gen indicador de luciferasa de 3' UTR SRF (Figura 4a). A diferencia, las mutaciones introducidas en secuencias "semilla" de miR-1 o miR-133 abolieron tal represión, que indica la especificidad de la acción (Figura 4a).

[0149] Cuando los indicadores anteriores se transfectaron en mioblastos C2C12 y la actividad de luciferasa se midió antes y después de la inducción de la diferenciación de células, los presentes inventores encontraron que la actividad indicadora era espectacularmente reprimida en células diferenciadas (Figura 4b), que indica que niveles elevados de miR-1 y miR-133 endógeno inhibieron el gen indicador. Los efectos y especificidad de miR-1 y miR-133 endógeno se monitorizaron por el "sensor" de miARN (Figura 11). A diferencia, la actividad de luciferasa del indicador de MCK-luc, un indicador de diferenciación de músculo, aumentó en miocitos diferenciados (Figura 4b). Además, la expresión en exceso de miR-1 condujo a la regulación por disminución de la proteína HDAC4 endógena en células C2C12 en tanto la condición de crecimiento (Figura 4c) como la condición de diferenciación (Figura 4e), mientras que miR-133 reprimió la expresión de proteínas SRF endógenas (Figuras 4c, 4e). A diferencia, los niveles de ARNm de SRF y HDAC4 no fueron alterados por aquellos miARN (Figura 4d), soportando la noción de que los miARN reprimen la función de sus genes diana principalmente inhibiendo la traducción. Cuando se aplicaron los 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido contra miR-1 o miR-133, aliviaron la represión ejercida sobre los niveles de proteína de HDAC4 o SRF, respectivamente (Figura 4 g), sin efecto sobre sus niveles de ARNm (Figura 4f).

[0150] Para verificar adicionalmente que HDAC4 y SRF son dianas relacionadas para miR-1 o miR-133 en

regular la expresión génica de músculo esquelético, los presentes inventores probaron si la cotransfección de plásmidos de expresión para SRF o HDAC4 podría “suprimir” la miogénesis mediada por miARN. De hecho, como se muestra en la Figura 4h, la expresión en exceso de SRF invirtió parcialmente la represión del gen miogénico inducida por miR-133. A diferencia, HDAC4 contrarrestó los efectos de miR-1 sobre la expresión génica de músculo esquelético (Figura 4h).

[0151] De acuerdo con la posible implicación de HDAC4 y SRF en la proliferación y diferenciación de músculo esquelético dependiente miR-1 y miR-133, los niveles de proteína HDAC4 y SRF endógena se regularon por disminución en células C2C12 diferenciadas, con un aumento concomitante en la expresión de marcadores miogénicos de diferenciación y una disminución en la expresión del marcador del índice mitótico fosfo-histona H3 (Figura 4i y Figura 7d). La disminución de la expresión de la proteínas SRF y HDAC4 estuvo acompañada de un aumento de la expresión de miR-1 y miR-133 (compárense la Figura 4i con la Figura 1b). Juntos, estos datos demuestran que miR-1 y miR-133 reprimen específicamente niveles de proteína HDAC4 y SRF, respectivamente, que a su vez, contribuye a (al menos en parte) los efectos reguladores de aquellos miARN sobre la proliferación y diferenciación de mioblastos.

[0152] Los presentes inventores caracterizaron miR-1 y miR-133 específicos para músculo cardíaco y esquelético y han mostrado su función en controlar la proliferación y diferenciación de músculo esquelético. De significancia, los presentes inventores encontraron que miR-1 y miR-133, que están agrupados en los mismos loci cromosómicos y se transcriben juntos como un único transcrito, se convierten en dos miARN maduros independientes con distintas funciones biológicas alcanzadas inhibiendo diferentes genes diana. Esto implica la participación de miARN en mecanismos moleculares complejos. Interesantemente, mientras que la expresión específica para tejido de miR-1 y miR-133 está controlada por myoD y SRF⁸, la expresión de SRF es reprimida por miR-133. Por tanto, estos hallazgos revelan un bucle regulador negativo en el que los miARN participan en rutas reguladoras para controlar la proliferación y diferenciación celular (Figura 5).

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LOS EJEMPLOS 1-7

Análisis de la expresión de microARN por micromatriz

[0153] Se aisló ARN total de células C2C12 cultivadas en medio de crecimiento (MC) que consistía en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.) con 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Sigma) y 1 % de penicilina/estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) o medio de diferenciación (MD) que consistía en DMEM (Sigma) con 2 % de suero de caballo (Sigma) en diferentes momentos de tiempo (día 0, 1, 3 y 5 transfiriendo el primer día a MD contado como día 0). Se realizó la hibridación de micromatrices y los datos se analizaron como se describe⁹. Brevemente, 2,5 ug de ARN aislado se marcaron con 5'-fosfato-citidil-uridil-Cy3-3' (Dharmacon, Inc., Lafayette, Colorado, EE.UU.) usando ARN ligasa y se hibridaron con mezcla 0,5 mM de sondas de oligonucleótidos para 124 microARN marcados con ALEXA 647[®] (Cy5) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) en cámaras desechables (MJ Research, Reno, Nevada, EE.UU.; número de pieza SLF-0601). Los datos logarítmicos normalizados (base 2) se agruparon jerárquicamente por gen y se representan como un mapa de calor. El intervalo de señal fue de - 4 veces a + 4 veces. Amarillo denota alta expresión y azul denota baja expresión, con respecto a la mediana.

Análisis de transferencia Northern

[0154] Se extrajo ARN total de células C2C12, tejido embrionario o adulto de ratón usando el reactivo TRIZOL[®] (Invitrogen). Para el análisis de transferencia Northern de miARN, PEG se aplicó para eliminar ARN de gran tamaño. Brevemente, 30 µg de cada muestra de ARN total se mezclaron 1: 1 con 5X disolución de PEG y se situaron sobre hielo 10 min. Después de 10 min de centrifugación a máxima velocidad a 4 °C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Entonces, los ARN se precipitaron añadiendo 2,5 volúmenes de 100 % de EtOH y se centrifugaron 30 min a velocidad máxima. El análisis de transferencia Northern para miARN se realizó como se describe¹³. Las secuencias de oligonucleótidos de miR-1 y miR-133 usadas como sondas se enumeran en la Tabla 3. El análisis de transferencia Northern se usó para detectar transcritos primarios de miARN y se realizó como se describe²⁶ usando 20 µg de ARN total de cada muestra. Los fragmentos genómicos para miR-1 y miR-133 se clonaron por PCR y sirven de sondas.

Tabla 3

Secuencias de oligonucleótidos desveladas en este documento

Nombre	Secuencia
Sonda de miR-1	TACATACTTCTTTACATTCCA
Sonda de miR-133	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA
miR-133a-1-incremento	CATGTGACCCCTCACACACA
miR-133a-1-disminución	ACAAGGGGAGCCTGGATCCC
miR-133a-2-incremento	GGACATATGCCTAAACACGTGA
miR-133a-2-disminución	GAAACATCTTTATCCAGTTT
miR-1-2-incremento	AGACTGAGACACAGGCACACC
miR-1-2-disminución	TGCCGGTCCATCGGTCCATTGC
nuR-1-1-incremento	CACTGGATCCATTACTCTTC
miR-1-1-disminución	TTGGAATGGGGCTGTTAGTA
miR-1mut-incremento	TGAACATTCAGTGCTATAAAGAAGTATGTATTTTTGGGTAGGTA
miR-1mut-disminución	TACCTACCCAAAATACATACTTCTTTATAGCACTGAATGTTCA
miR-133mut-incremento	AATCGCCTCTTCAATGGATTTGTCAACCAGCTGTAGCTATGCATTGAT
miR-133mut-disminución	ATCAATGCATAGCTACAGCTGGTTGACAAATCCATTGAAGAGGCGATT
Dúplex de miR-1	UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUACAUUCCAUA
Dúplex de miR-1-mut	UUAACCAUAAAAGAAGUAUGUA CAUACUUCUUUAGGUUAAUA
Dúplex de miR-133	UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGGGGACCAAUA
Dúplex de miR-133-mut	UCAAGUAACUUAACCAGCUGU AGCUGGUUGAAGUUACUUGAAU
Dúplex de miR-208	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU AAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAC
Dúplex de GFP	AACUUCAGGGUCAGCUUGCCUU GGCAAGCUGACCCUGAAGUUGG
2'-O-metil-miR-1	AAUACAUACUUCUUUACAUUCCAUAGC
2'-O-metil-miR-133	AGCUACAGCUGGUUGAAGGGGACCAAUCCA
2'-O-metil-miR-208	GACCAACAAGCUUUUUGCUCGUUUUACGUG
2'-O-metil-GFP	AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
HDAC4-UTR-incremento	CAGCACTGGTGATAGACTTGG
HDAC4-UTR-disminución	CTTAAGAATAAGTTCAATAAGAC
SRF-UTR-incremento	AGATATGGGGGCTTGTGCC
SRF-UTR-disminución	CTGGGAGAAAGGGGGTAGAC
Miogenina F	TGGAGCTGTATGAGACATCCC
Miogenina R	TGGACAATGCTCAGGGGTCCC
MyoD F	GCAGGCTCTGCTGCGCGACC
MyoD R	TGCAGTCGATCTCTCAAAGCACC
α-Actina F esquelética	CAGAGCAAGCGAGGTATCC
α-Actina R esquelética	GTCCCCAGAATCCAACACG
MEF2D F	CAAGCTGTTCCAGTATGCCAG
MEF2D R	AAGGGATGATGTCACCAGGG
HDAC4 F	GAGAGAATTCTGCTAGCAATGAGCTCCCAA

Clonación y expresión de miR-1 y miR-133

5 [0155] Fragmentos genómicos para precursores de miR-1 y miR-133 de los cromosomas 2 y 18 de ratón (cr 2 y cr 18) se amplificaron por PCR usando ADN genómico de ratón como molde (para cebadores de PCR véase la Tabla 3 anterior). Los productos de PCR se clonaron en el vector pcDNATM(+)3.1 (Invitrogen) y la expresión de los miARN se determinó transfecando vectores de expresión en células de mamífero (COS7, 10T1/2 o C2C12) y se detectó por análisis de transferencia Northern.

Cultivo celular, diferenciación de miogénesis *in vitro* y ensayo de indicador de luciferasa

15 [0156] Se cultivaron células de mioblasto C2C12 y la miogénesis se indujo como se ha descrito¹². Se realizaron ensayos de indicador de luciferasa por transfección transitoria como se ha descrito^{12,26}. Los dúplex de miARN y los 2'-O-metiloligorribonucleótidos antisentido para miR-1, miR-133, miR-208 y GFP se compararon de Dharmacon (véase la Tabla 3 para secuencias). Se introdujeron en células de mamífero usando tanto transfección por LIPOFECTAMINETM (Invitrogen) (200 nM) como electroporación usando el sistema NUCLEOFECTOR[®] de Amaxa Biosystems (Gaithersburg, Mariland, EE.UU.) (5 µg).

[0157] Para la construcción del indicador de 3' UTR-luciferasa, el sitio de clonación múltiple del vector de control pGL3 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) se eliminó y se sustituyó en la dirección 3' del gen de luciferasa. Las 3' UTR para *HDAC4* y *SRF* de ratón se amplificaron por PCR y se clonaron en el vector de control pGL3 modificado para producir las construcciones SRF-3'UTR y HDAC4-3'UTR (véase la Tabla 3 para las secuencias de cebadores de PCR). Los ensayos de indicador de luciferasa se realizaron como se ha descrito²⁶.

Transferencia Western e inmunotinción

[0158] Las transferencias Western se realizaron como se ha descrito previamente²⁷. Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-miogenina; SRF; MEF2; HDAC4; y β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.); y fosfo-histona H3 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, Nueva York, EE.UU.). El anticuerpo MF20, que reconoce MHC específica para músculo estriado, se obtuvo de DSHB (Universidad de Iowa, Iowa City, Iowa, EE.UU.).

[0159] Para inmunotinción, células C2C12 tratadas en placas de 12 pocillos se fijaron con 4 % de formaldehído durante 5 min a 37 °C y se cambiaron a 0,1 % de disolución de NP40/PBS durante 15 min a TA. Los anticuerpos primarios se incubaron en 0,1 % de NP40-PBS con 3 % de BSA durante 2 h a la siguiente concentración: anti-miogenina (dilución 1: 20), anti-fosfo-histona H3 (dilución 1: 100), MF20 (dilución 1: 10). Los anticuerpos secundarios fluoresceína anti-ratón/conejo (dilución 1: 100; Vector Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) se añadieron en 0,1 % de NP40-PBS con 3 % de BSA durante 1 h a 37 °C. Se añadió DAPI durante 5 min a TA. Después de varios lavados con PBS, las células se sometieron a observación por microscopía de fluorescencia. Se escogieron diez campos que cubrían el pocillo completo y se contaron las células positivas para fluorescencia verde y las células totales con tinción DAPI para cada pocillo, respectivamente.

Análisis por RT-PCR

[0160] Se realizó RT-PCR esencialmente como se ha descrito²⁷. Se extrajo ARN total de células C2C12 usando el reactivo TRIZOL[®] (Invitrogen) y 2,0 μ g de alícuotas se transcribieron inversamente en ADNc usando hexámeros al azar y transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen). Para cada caso se usaron 2,5 % de conjunto de ADNc para la amplificación y la PCR se realizó durante 24 – 28 ciclos. Las secuencias para cebadores de PCR pueden encontrarse en la Tabla 3.

Inyecciones y transgénesis de embriones de *Xenopus*

[0161] Se utilizaron procedimientos convencionales en la obtención y cultivo de embriones de *Xenopus laevis*. Las construcciones de ADN se linealizaron con Kpn I y se generaron embriones transgénicos según los procedimientos descritos por Kroll y Amaya²⁸. La expresión del transgén se analizó bajo un microscopio Leica MZFLIII. La preparación e inyección de *Xenopus* con miARN se llevó a cabo esencialmente como se describe previamente²⁹. Sin embargo, el ARN no se polarizó antes de la inyección. El análisis de inmunohistología de montaje completo se llevó a cabo como se ha descrito³⁰.

[0162] Los Ejemplos 8 – 12 no se encuentran bajo el alcance de la invención y sólo están incluidos por motivos comparativos.

EJEMPLO 8

[0163] miR-208 es un miARN específico para cardíaco conservado entre ser humano, ratón y rata (Figura 14). El análisis de transferencia Northern reveló que la expresión de miR-208 está regulada durante el desarrollo (Figura 15). Se prepararon transferencias Northern a partir de tejidos de ratón en platina y se sondaron con sonda radiomarcada complementaria a miR-208. Los niveles de miR-208 fueron espectacularmente mayores en el corazón de ratón adulto con respecto a E13,5, E16,5 y corazones en fase neonatal. *miR-208* es presentado por un intrón del gen de la *cadena pesada de α -miosina (α -MHC)* de músculo cardíaco (Figura 14). Una de las dos isoformas pesadas de la miosina cardíaca α -MHC se expresa débilmente durante el desarrollo del ratón, pero más tarde se convierte en la isoforma predominante en el corazón de ratón adulto. miR-208 y α -MHC son ambos específicos para cardíaco y se transcriben a partir de la cadena inversa, que sugiere que miR-208 se procesa a partir del intrón de α -MHC y se expresa paralelamente a la transcripción de α -MHC.

EJEMPLO 9

[0164] Para investigar la función *in vitro* de miR-208 en cardiomiocitos, los presentes inventores han elegido usar cardiomiocitos de rata neonatal debido a que es un modelo bien caracterizado *in vitro* para estudiar las características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas de células cardíacas. Los cardiomiocitos neonatales no pierden su capacidad para replicar después del nacimiento; una gran fracción experimenta división mitótica y

prolifera *in vitro* e *in vivo* en la que también se activa la expresión del gen cardíaco. Es probable que miR-208 promueva la diferenciación de cardiomiocitos, ya que se expresa altamente en el corazón adulto con respecto al desarrollo más temprano. Con el fin de determinar la función de miR-208 en el corazón, este sistema de modelo se usa para estudiar los efectos de la expresión de miR-208 y la inhibición tras el programa de cardiogénesis.

5

Sistema de modelo *in vitro*

[0165] Los cardiomiocitos cultivados son uno de los modelos experimentales más ampliamente usados en investigación cardíaca. La preparación de cardiomiocitos de mamíferos pequeños es económica con respecto a estudios en animales completos, fidedigna y permite un amplio espectro de experimentos. Por motivos tanto económicos como técnicos, los cardiomiocitos son los más comúnmente aislados de ratas neonatales. Los presentes inventores aíslan cardiomiocitos de rata esencialmente como se ha descrito previamente, con modificaciones menores⁸⁶.

10

[0166] miARN maduros funcionales pueden expresarse ectópicamente usando una secuencia promotora de ARN Pol II para dirigir la transcripción de la secuencia precursora de miARN más ~ 150 nucleótidos flanqueantes. Los transcritos de ARN resultantes son reconocidos por la maquinaria de procesamiento de miARN y se convierten en miARN completamente funcionales que pueden dirigir la represión de la traducción. Los presentes inventores han amplificado por PCR la secuencia del precursor de miR-208 y regiones flanqueantes de ADN genómico de ratón e insertado este fragmento en un vector de adenovirus para generar adenovirus recombinante que expresa miR-208 (Ad-208). El análisis de transferencia Northern muestra un aumento dependiente de la dosificación de la expresión de *miR-208* en cardiomiocitos aislados infectados con concentraciones crecientes de Ad-208 (Figura 16). Esta herramienta puede utilizarse para estudiar los efectos de la expresión de miR-208 en exceso sobre el fenotipo de cardiomiocitos *in vitro*.

15

20

25

Análisis de la expresión ectópica de miR-208

[0167] Se usa un ensayo de recuento de células para determinar si cambios en la expresión de miR-208 afectan la proliferación. Se siembran cardiomiocitos en placa a baja densidad y se infectan con Ad-208. Aunque el adenovirus se ha usado extensivamente con gran éxito en estudios de cardiomiocitos, células con Ad-GFP también pueden infectarse a la misma multiplicidad de infección (MOI) que Ad-208 para controlar efectos indirectos producidos por la infección adenovírica. Como ambos virus expresan la proteína verde fluorescente (GFP), las eficiencias de infección también se controlan por microscopía de epifluorescencia.

30

[0168] Las células se cuentan bajo iluminación de campo brillante antes de la infección y 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección. Las células en 10 campos de visión se cuentan para ambas condiciones en cada momento de tiempo. Se aplican análisis estadísticos a datos de cifras de células. Puede usarse la prueba de la *t* de Student para datos independientes para determinar la probabilidad de que el número medio de células contadas por vista de campo se diferencie significativamente entre infección por Ad-208 y Ad-GFP en cada momento de tiempo particular; aunque la prueba de la *t* de Student para datos dependientes puede determinar la probabilidad de que el número medio de células contadas para cada infección se diferencie significativamente entre momentos de tiempo. Si la probabilidad de que dos medias sean significativamente diferentes es mayor que o igual al 95 %, aquellas diferencias se consideran significativas.

35

40

[0169] El ensayo de recuento de células se complementa con estudios para determinar el índice mitótico usando anticuerpos fosfo-histona H3 y para determinar el porcentaje de células que experimentan síntesis de ADN por incorporación de BrdU. Las células fijadas se tiñen con TUNEL para descartar la posibilidad de que la expresión en exceso de miR-208 produzca muerte celular. Las posibles consecuencias de la infección por Ad-208 tras la proliferación de cardiomiocitos son disminución, aumento o ningún cambio en el número de células. Sin desear limitarse a teoría, es probable que la expresión de miR-208 ralentice la proliferación de cardiomiocitos con respecto a controles ya que miR-208 se expresa normalmente altamente en cardiomiocitos adultos diferenciados.

45

50

[0170] Se ha mostrado que un conjunto de factores de transcripción cardíacos, que incluyen Nkx2.5, MEF2C, GATA4, miocardina y TBX5, se expresa en cardiomiocitos de diferenciación tempranos, haciendo que sean marcadores genéticos tempranos de diferenciación cardíaca. Las proteínas contráctiles específicas para músculo cardíaco, tales como α -MHC, β -MHC, α -CA, y mIV2V, son marcadores de diferenciación terminales de cardiomiocitos. Algunos de estos genes cardíacos se regulan diferencialmente durante el desarrollo. Por ejemplo, β -MHC se expresa altamente en corazón embrionario, pero se regula por disminución pos-neonatalmente, mientras que α -MHC tiene un patrón de expresión opuesto. Con el fin de determinar si miR-208 tiene una función en la regulación de la expresión del gen cardíaco se examina el efecto de la expresión de miR-208 ectópica sobre el marcador de expresión génica cardíaco en cardiomiocitos de rata neonatal. Sin desear limitarse a teoría, se tiene previsto que la expresión de miR-208 disminuya la expresión génica fetal y/o promueva la expresión de genes cardíacos adultos.

55

60

[0171] Usando procedimientos de PCR por transcriptasa inversa (RT-PCR) semi-cuantitativa, se analizan los niveles de transcrito de ARNm relativos de diversos genes de marcadores cardíacos en cardiomiocitos de rata neonatales infectados por Ad-208 frente a Ad-GFP. Las bibliotecas de ADNc se hacen a partir de ARN aislado de cardiomiocitos infectados por técnicas convencionales. GAPDH, que se expresa altamente en casi todos los tejidos, se amplifica y se usa para normalizar niveles de ADNc. Todos los conjuntos de cebadores de PCR se diseñan para amplificar el producto que se extiende uno o más intrones que producirá un mayor producto de PCR amplificado si está presente contaminación de ADN. Adicionalmente, los anticuerpos comercialmente disponibles se usan para examinar niveles de expresión de proteínas de diversos marcadores cardíacos por análisis de transferencia Western para determinar si cualquier cambio detectado en la expresión de proteínas coincide con cambios en los niveles de transcritos de ARNm.

[0172] Además de estudiar los efectos de miR-208 sobre la expresión del gen cardíaco, se determina cualquier efecto sobre la localización de diversas proteínas cardíacas, que incluyen factores de transcripción y componentes estructurales. La observación de cardiomiocitos infectados por Ad-208 sugiere que estas células presentan morfología diferente a los cardiomiocitos infectados por Ad-GFP (Figura 16b). Los cardiomiocitos infectados por Ad-208 aparecieron “redondeados” con respecto a sus homólogos infectados por Ad-GFP.

[0173] Los cardiomiocitos infectados por Ad-208 y Ad-GFP se fijan sobre cubreobjetos de vidrio, se sondan con anticuerpos primarios y secundarios apropiados, se tiñen nuclearmente y se montan en portaobjetos para el análisis por microscopía.

Inactivación de miR-208

[0174] Los efectos de la inhibición de miR-208 usando 2'-O-metiloligonucleótidos antisentido para miR-208 se estudian en paralelo a estudios de expresión en exceso de miR-208. Los 2'-O-metiloligonucleótidos actúan de inhibidores específicos para secuencia e irreversibles de la función de miARN en un modo estequiométrico. Este sistema de inhibición de miARN está adaptado a cardiomiocitos. Los 2'-O-metiloligonucleótidos de miR-208 antisentido o, en controles, 2'-O-metiloligonucleótidos al azar, se transfectan en cardiomiocitos por un reactivo de lípido catiónico, o alternativamente por electroporación. Una construcción de indicador con secuencia de miR-208 antisentido que unió directamente 3' al gen de luciferasa (sensor de luc-miR-208) se usa como control y para probar la eficacia del sistema para bloquear la función de miR-208. Los niveles de ARNm y proteína, además de la localización de proteínas, se estudian como se describe para estudios de expresión en exceso de miR-208.

EJEMPLO 10

[0175] miR-208 se expresa débilmente en el corazón embrionario y su expresión aumenta espectacularmente en el corazón adulto. Este ejemplo analiza si la función de miR-208 es más importante para la regulación de genes en el desarrollo de corazón o en el corazón adulto. Durante el desarrollo podría argumentarse que miR-208 no es probablemente importante, ya que se expresa débilmente en el embrión. Contra ese argumento, la dosificación apropiada de miR-208 podría ser crítica para regular ciertas rutas genéticas durante el desarrollo. Además, el ratón con gen inactivado de su gen α -MHC huésped, que expresa débilmente durante el desarrollo con respecto al estadio adulto, padeció letalidad embrionaria, aunque no se sabe si la expresión de miR-208 es afectada en aquellos animales⁸⁷. La alta expresión de miR-208 detectada en el corazón adulto podría indicar que su función más importante se basa en el posterior desarrollo. Para revisar estos tipos de asuntos se crean dos modelos de ratón para estudiar la función de miR-208: un ratón con gen *miR-208* inactivado y un ratón transgénico que expresa condicionalmente en exceso miR-208.

Diseño de ratones con gen *miR-208* inactivado

[0176] Un ratón funcionalmente nulo para miR-208 se diseña y se crea sin afectar la expresión de su gen α -MHC huésped. La producción de ratones con gen *miR-208* inactivado derivados de citoblastos embrionarios es un procedimiento de tres etapas: producción del vector diana; introducción de secuencias de ADN en citoblastos embrionarios por recombinación homóloga; y producción de ratones genéticamente modificados derivados de citoblastos embrionarios. Los miARN relacionados se agrupan en familias basándose en la homología de secuencias dentro de sus regiones semilla. Estas familias podrían regular redundantemente la expresión de los mismos genes, complicando posiblemente el análisis genético de su función *in vivo*. La región semilla de miR-208 no se agrupa con otros miARN conocidos en un árbol filogenético, haciendo que miR-208 sea un candidato de inactivación de gen de miARN adecuado.

[0177] La construcción que elige miR-208 como diana se construye usando una estrategia llamada ingeniería recombinógena, que usa recombinación homóloga entre fragmentos de ADN lineal y plásmidos circulares^{88,89}. El plásmido circular puede contener un fragmento de 6 – 7 kb del gen α -MHC en el que miR-208 se encuentra dentro centralmente. El fragmento de ADN lineal contiene dos brazos homólogos diseñados para sustituir la secuencia de miR-208 de 22 nt con un casete de selección flanqueado por *lox*. Las bacterias transformadas con el plásmido

circular se electroporan con el fragmento de ADN lineal y, posteriormente, la resistencia codificada por el fragmento lineal se selecciona para colonias recombinantes. La construcción resultante se usa para elegir como diana células ES por recombinación homóloga. Una vez se identifica una célula ES heterocigótica usando un cribado basado en PCR o por transferencia Southern, se usa para generar quimeras por inyección de blastocistos. El diseño de inactivación presentemente desvelado sólo deja una pequeña huella dactilar de ADN exógeno dentro del intrón de α -MHC y ayuda a garantizar que la transcripción de α -MHC o el patrón de corte y empalme de ARNm del α -MHC se mantenga sin afectar.

Diseño condicional de ratones transgénicos

[0178] Se hace un diagrama de la estrategia transgénica condicional en la Figura 17. El enfoque transgénico condicional es un sistema binario que consiste en dos transgenes. Un transgén codifica miR-208 (*tet208*) mientras que el otro transgén codifica un transactivador (*tTA*) que activa el transgén de miR-208 uniendo una secuencia reguladora dentro de su promotor. La unión de *tTA* se inhibe siempre que esté presente doxiciclina (DOX) (es decir, "tet-off" (la doxiciclina impide la expresión del transgén)), permitiendo así la regulación temporal del transgén de miR-208 por tratamiento con DOX.

[0179] Se establece una colonia de ratones homocigótica para el transgén de miR-208. Los ratones para *tet208* se aparean con ratones transgénicos que albergan un transgén *tTA* para crear dobles transgénicos para el estudio. Asumiendo genética mendeliana, 1 de 4 crías será doble transgénica y expresará miR-208 donde se exprese *tTA*. Se utiliza un promotor de α -MHC para dirigir la expresión de *tTA*. El promotor de α -MHC se ha caracterizado bien y es suficiente para la expresión específica para tejido apropiadamente directa en desarrollo temprano⁹⁰. El uso del promotor de α -MHC para expresar *tTA* aumentará la dosificación de miR-208 en los mismos tejidos que miR-208 endógeno en los animales transgénicos dobles, ya que el miR-208 endógeno normalmente se origina a partir de un intrón dentro del gen α -MHC. Existe una línea de ratones transgénicos que usa el promotor de α -MHC de ratón para dirigir la expresión de *tTA* y se ha usado satisfactoriamente^{91,92}. La línea de ratones transgénicos para *tet208* permite que los inventores estudien los efectos de la dosificación de la expresión de miR-208 en el desarrollo del corazón de ratón embrión o adulto independientemente. Normalmente, la letalidad embrionaria temprana en fundadores transgénicos regulares limitaría gravemente el número de embriones de desarrollo detenido disponibles para el estudio y dificultaría el análisis fenotípico. Con la estrategia condicional, los presentes inventores pueden retrasar la expresión de miR-208 transgénico en los ratones transgénicos dobles que debería haber demostrado ser letal en la expresión en exceso de miR-208 más temprana.

Análisis

[0180] Los análisis específicos realizados dependen de cómo se manifiesten los fenotipos. En general, el uso de enfoques histológicos y bioquímicos para caracterizar posibles fenotipos en el desarrollo del embrión y/o adulto es aceptable. Los corazones se examinan para anomalías claras y se seccionan para análisis histológico para identificar defectos del desarrollo posiblemente más ligeros. Las posibilidades de defectos son innumerables y pueden incluir algo de formación defectuosa del tabique a atrios engrosados. Igualmente es posible que el fenotipo pueda ser un defecto de contractilidad que pueda caracterizarse por estudios electrofisiológicos.

EJEMPLO 11

[0181] La identificación de dianas moleculares directas de miR-208 facilita el entendimiento del mecanismo que subyace su función biológica. Las predicciones de diana se utilizan para complementar observaciones relacionadas con la investigación de la función de miR-208 *in vitro* y en modelos de ratón *in vivo*.

[0182] Sin desear limitarse a teoría, se plantea como hipótesis que la expresión de Thrap1 está regulada por miR-208. La 3' UTR de Thrap1 contiene dos sitios de unión a miR-208 predichos (Figura 18). Las dos dianas se localizan ~ 80 pb en la dirección 3' del codón de terminación de Thrap1 y están separadas entre sí sólo ~ 50 pb. Ambas dianas son perfectamente complementarias a la región semilla de miR-208. El gen Thrap1 codifica una subunidad de 240 kd del complejo de TRAP (proteína del receptor de la hormona tiroidea) que se expresa ubicuamente⁹³. TRAP es un complejo de proteínas de multisubunidad que es un coactivador para receptores nucleares. TRAP se caracterizó inicialmente para el receptor nuclear de la hormona tiroidea⁹⁴. Thrap1 no se ha caracterizado, pero se ha mostrado que los defectos en otras subunidades de TRAP afectan la señalización de receptores nucleares. La ablación génica de TRAP220 en ratones alteró el desarrollo del corazón y del sistema nervioso, aunque se requieren homólogos de *Drosophila* de TRAP230 y TRAP240 para el desarrollo apropiado del disco ojo-antena^{95,96}. Se encontraron mutaciones en un gen altamente similar a Thrap1, llamado Thrap2, en pacientes con el defecto congénito del corazón transposición de las grandes arterias⁹⁷. Por tanto, los miembros de la familia TRAP son importantes para el desarrollo apropiado. De particular interés es Thrap1 como diana de miR-208, ya que se sabe que la hormona tiroidea ejerce profundos efectos sobre la contractilidad cardíaca.

[0183] La hormona tiroidea está ligada a cambio de la isoforma de miosina cardíaca. En cardiomiocitos, la

hormona tiroidea produce una rápida acumulación de ARNm de α -MHC, a la vez que simultáneamente inhibe la expresión de β -MHC^{98,99}. Varios elementos de respuesta a tiroidea (TRE) de acción positiva se localizan dentro del promotor de α -MHC y se ha identificado un medio TRE de acción negativa dentro del promotor de β -MHC^{100,101}. Los genes α -MHC y β -MHC están dispuestos en tándem sobre el cromosoma 14 y codifican las dos isoformas de la cadena pesada de la miosina cardíaca que convierten ATP en trabajo mecánico a diferentes tasas y su relación de expresión de proteínas afecta la contractilidad de los sacrómeros cardíacos; α -MHC es "rápido", mientras que β -MHC es "lento". Su expresión está regulada por el desarrollo. En ratón y rata, β -MHC es predominante en la vida fetal tardía, pero poco después del nacimiento α -MHC se convierte en la isoforma cardíaca adulta predominante. La transición se produce probablemente por la fuerza de la hormona tiroidea en circulación que se produce poco después del nacimiento⁵⁸. En mamíferos más grandes, como conejos y seres humanos, β -MHC es la isoforma cardíaca adulta predominante. Sin embargo, los promotores de los genes α -MHC y β -MHC se conservan altamente entre ratón y ser humano, sugiriendo que se regulan similarmente. Dado el origen de miR-208 de un intrón de α -MHC, y sin desear quedar ligado a teoría, es posible que miR-208 actúe de inhibidor específico para tejido de la señalización de la hormona tiroidea en un bucle de retroalimentación negativo para regular la relación de isoformas de la cadena pesada de la miosina cardíaca eligiendo como diana un componente del complejo de TRAP (Figura 19).

[0184] La estrategia de cribado inicial pregunta si la expresión en exceso de miR-208 regula por disminución o no la expresión de un gen indicador que lleva sitios diana putativos en su 3' UTR. Los presentes inventores han insertado la 3' UTR de *Thrap1* directamente detrás de la secuencia codificante de un gen indicador de luciferasa constitutivamente expresado. Los resultados sugieren que miR-208 elige como diana la UTR de *Thrap1* (Figura 18). Para confirmar esta observación, los presentes inventores han mutado las regiones semilla de los dos sitios diana putativos dentro de la UTR de *Thrap1*, por separado y en combinación. El polinucleótido mutado puede probarse para determinar si puede aliviar la represión mediada por miR-208.

[0185] Estudios previos han mostrado que la hormona tiroidea activa transcripcionalmente la expresión de la cadena de α -MHC e inhibe la expresión de β -MHC en cardiomiocitos^{98,99,102}. Los cardiomiocitos se infectan con Ad-208 para determinar si la expresión de miR-208 inhibe o no la señalización de la hormona tiroidea monitorizando niveles de transcritos y de proteínas de α -MHC y β -MHC. La inhibición de la expresión de α -MHC por miR-208 soportaría indirectamente la hipótesis de los presentes inventores de que miR-208 elige como diana un componente de la ruta de señalización de la hormona tiroidea.

[0186] Para validar adicionalmente dianas predichas, puede determinarse si la expresión de miR-208 disminuye los niveles de ARNm o de proteínas en corazones de modelos de ratón transgénico con gen *miR-208* inactivado y para *miR-208*. Se emplean anticuerpos específicos contra las proteínas elegidas como diana. *Thrap1* humano está comercialmente disponible. Si no es eficaz en estudios de ratón, se desarrollan anticuerpos específicos para *Thrap1* de ratón.

Dianas candidatas adicionales para miR-208

[0187] Además de *Thrap1*, los presentes inventores han clonado las 3' UTR de otras cuatro dianas predichas para miR-208 interesantes directamente con el gen de luciferasa para estudios de indicadores. Las 3' UTR son de *SP3* (*factor de transcripción 3 de acción trans para Sp3*), *EYA4* (homólogo 4 ausente de los ojos), *CSNK2A2* (*caseína cinasa 2, polipéptido principal alfa*) y *TTN* (*Titin*).

[0188] La expresión de proteínas de SP3 es opuesta a la expresión de miR-208; SP3 es un factor de transcripción que interactúa con una variedad de promotores que contienen cajas de GC^{103,104,105}. La proteína de SP3 se detecta fácilmente en corazones de ratón fetal, pero apenas es detectable en el corazón adulto. Los patrones de expresión opuestos de SP3 y miR-208 hacen que sea formalmente posible que miR-208 regule la traducción de SP3.

[0189] EYA4 es una posible diana interesante de miR-208 dado su enlace establecido con la patología en el corazón humano. Se han identificado mutaciones en EYA4 humano que producen cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca asociada^{106,107}. EYA4 es un coactivador de la transcripción que interactúa con miembros de la familia *sine-oculis* (*Six1-Six6*) y factores de transcripción *Dach* que conducen a la activación de genes^{108,109}. La caracterización de la mutación humana fue soportada por el trabajo en pez cebra, ya que niveles de EYA4 atenuados produjeron características morfológicas y hemodinámicas de insuficiencia cardíaca¹⁰⁶. Actualmente no se han identificado posibles genes cardíacos de EYA4 en la dirección 3'.

[0190] CSNK2A2 es una proteína serina/treonina cinasa ampliamente expresada que participa en la replicación de ADN, regulación de transcripción basal e inducible, traducción y control del metabolismo^{110,111}. Los presentes inventores están interesados en CSNK2A2 por su posibilidad para regular una variedad de rutas genéticas.

[0191] Similar a EYA4, TTN también es un candidato a diana de miR-208 interesante dada su establecida asociación con la función y patología cardiovascular. TTN es una proteína sacromérica gigante expresada tanto en músculo cardíaco como en tejido esquelético y es importante para el ensamblaje de sacrómeros y la transmisión de fuerza¹¹². Las mutaciones en TTN se han ligado a cardiomiopatías hipertróficas y dilatadas. Dado el requisito de TTN para músculo cardíaco y función esquelética, los presentes inventores dudan que miR-208 regule fuertemente la expresión de TTN, pero es posible que el gen sacromérico (es decir, α -MHC) pueda afinar la expresión de otro (es decir, TTN) para ajustar las propiedades contráctiles de cardiomiocitos.

[0192] La 3' UTR del gen diana predicho se prueba por ensayo de indicadores para determinar si confiere supresión mediada por miR-208. Genes candidatos se caracterizan adicionalmente mutando los sitios diana predichos y probando si disminuyen o no la supresión de miR-208. Después del cribado de indicadores inicial de dianas candidatas se analizan los efectos de la expresión en exceso de miR-208 *in vitro* usando células de cardiomiocito sobre la expresión génica de candidatos a los niveles de transcritos y de proteínas. La relevancia biológica de dianas verificadas se estudia *in vivo* usando los modelos de ratón transgénico con gen *miR-208* inactivado e inducible de los inventores. El análisis de posibles dianas de miR-208 *in vitro* e *in vivo* puede validar predicciones diana y confirmar su relevancia biológica con el fin de entender las rutas genéticas reguladas por miR-208 en el corazón.

EJEMPLO 12

[0193] Los músculos esqueléticos se lesionan y se reparan repetidamente durante toda la vida. La regeneración de músculo mantiene la función locomotora durante el envejecimiento y retrasa la aparición de síntomas clínicos en enfermedades neuromusculares tales como distrofia muscular de Duchenne. Esta capacidad de reparación de tejido es conferida por un subconjunto de células similares a citoblastos llamadas células satélite localizadas entre la lámina basal y la sarcolema de miofibras maduras. Tras la lesión, las células satélite vuelven a entrar en el ciclo celular, proliferan y luego salen del ciclo celular tanto para renovar el conjunto de células satélite quiescente como para diferenciarse en miofibras maduras. Tanto los programas de proliferación como de diferenciación celular son esenciales para la miogénesis.

[0194] La materia presentemente desvelada proporciona datos que demuestran que los miARN son sensibles a la proliferación y diferenciación de células musculares.

Procedimientos:

[0195] Se inyectó cardiotoxina en los músculos tibiales anteriores (TA) de ratones C57BL/6 macho de 6 semanas de edad - según Yan y col.¹¹⁴ Los músculos se recogieron 3 días después de la inyección. Como control se usaron músculos TA sin inyectar. Se extrajo ARN total del músculo TA y se usaron 5 μ g para el análisis de micromatrices de microARN.

Resultados:

[0196] Las Figuras 20A y 20B muestran datos de expresión de matrices de miARN de músculo tibial anterior (TA) inyectado (lesionado) o sin inyectar (control) con cardiotoxina. Los datos logarítmicos normalizados (base 2) se agruparon jerárquicamente por gen y se representan como un mapa de calor. El intervalo de señal fue de - 4 veces a + 4 veces. La sombra clara denota expresión alta y la sombra oscura denota expresión baja, con respecto a la mediana. La Figura 20A muestra miARN que se regulan por disminución en músculo lesionado y la Figura 20B muestra miARN que están regulados por incremento en músculo lesionado.

EJEMPLO 13

[0197] Las células satélite de músculo esquelético son un grupo de células mononucleares pequeñas posicionadas entre la membrana plasmática y la lámina basal de alrededor de las fibras musculares multinucleares maduras. Las células satélite se consideran desde hace tiempo las células precursoras de músculo esquelético adulto. Pruebas recientes soportan la noción de que las células satélite son heterogéneas y tienen potencial similar al de los citoblastos. Estas células se mantienen en un estado quiescente pero, una vez activadas, proliferarán extensivamente para formar un conjunto de mioblastos que se diferenciarán y regenerarán o repararán tejido muscular.

[0198] Están empezando a revelarse rutas genéticas y mecanismos moleculares que mantienen las células satélite en su estado quiescente inactivo bajo condiciones normales, además de cómo se activan en respuesta a lesión muscular para facilitar la regeneración de músculo. Se ha demostrado que Pax3 y Pax7, miembros de una familia de factores de transcripción de caja/homeodominio emparejados, desempeña funciones importantes todavía distintas en la mediación del proceso de regeneración de músculo esquelético relacionado con células satélite. Sin embargo, es menos claro cómo la expresión de proteínas Pax es regulada durante el transcurso del mantenimiento y

la activación de células satélite. De forma intrigante, la expresión de Pax3 y Pax7 se regula por disminución en mioblastos diferenciadores. Y, lo que es más importante, la expresión en exceso ectópica de Pax3 o Pax7 en mioblasto C2C12 bloquea su diferenciación. Aquellas observaciones sugieren que el estado de quiescencia y auto-renovación de células satélite, además de la proliferación y diferenciación de mioblastos, está bajo un estrecho control de la transcripción y la postranscripción.

[0199] Además, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se expresa en células satélite de músculo esquelético e inhibe la diferenciación miogénica. Se encontró y ahora se ha desvelado en este documento que tanto Pax7 como BDNF son dianas reguladoras putativas para miR-1/206, que implica que miR-1/206 desempeña una función vital en la regulación de células satélite de músculo esquelético.

Establecimiento de la expresión en exceso de miARN y sistema de detección en células satélite

[0200] Con el fin de expresar eficientemente en exceso miARN en células satélite ectópicamente se adaptó un sistema de expresión en exceso basado en retrovirus. Las secuencias genómicas que flanquean miR-1 y miR-206 (aproximadamente 300 – 400 pb) están flanqueadas con un donante de corte y empalme (SD) y un aceptor de corte y empalme (SA) dentro de un vector de retrovirus derivado de virus de citoblasto murina (MSCV) en el que una secuencia codificante de proteína verde fluorescente (GFP) se localiza en la dirección 3' de la secuencia de miARN-SDSA. De esta forma, tanto miR-1/206 como GFP se expresarán simultáneamente y la expresión de GFP servirá de una excelente indicación de expresión de miR-1/206 (Figura 23).

[0201] Con el fin de monitorizar la expresión y el efecto inhibitorio de miARN en células satélite, los presentes inventores crearon un "sensor de miARN" en el que la expresión de un gen dsRed está bajo el control de la transcripción de un promotor del CMV constitutivamente activo. La secuencia complementaria de miR-1/206 se ligó a 3' de un gen indicador dsRed y se insertó en un vector de retrovirus derivado de MSCV de manera que un miARN funcional reprimió la traducción de la proteína de dsRed (Figura 22). Usando este sistema, los presentes inventores pueden detectar con precisión la expresión y el efecto inhibitorio de un miARN en células satélite, proveyendo a los inventores de poderosas herramientas para estudiar adicionalmente la función de miARN en músculo esquelético.

Pax7 y BDNF son dianas reguladoras de miR-1/206 en células satélite

[0202] Los presentes inventores encontraron que los genes Pax7 y BDNF contienen sitios diana para miR-1/206 altamente conservados en sus 3' UTR (Figuras 24, 25, 26). Los presentes inventores clonaron estas secuencias de 3' UTR en un indicador de luciferasa y probaron si podían ser reprimido por los miARN. Como se muestra en la Figura 24, tanto miR-1 como miR-206 reprimen potentemente estos indicadores. La represión mediada por miARN es abolida cuando las secuencias de unión de miARN conservadas se mutan, que indica la especificidad de la represión. Estos datos sugieren que miR-1/206 puede controlar la proliferación y diferenciación de células musculares y/o sus precursores reprimiendo genes diana importantes.

Aislamiento de células satélite de miofibras de músculo esquelético individuales

[0203] Las células satélite son células progenitoras de músculo esquelético adulto sensibles al crecimiento y la regeneración postnatal. Sin desear limitarse a teoría, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los miARN también son reguladores de células satélite. Para probar esta hipótesis, los presentes inventores empezaron a aislar células satélite de músculo esquelético de las patas traseras o del diafragma de ratones neonatales o adultos. Los presentes inventores pueden aislar células satélite de miofibras individuales, que da la población de células satélite más pura y proporciona resultados reproducibles. Estas células satélite podrían mantenerse en un estado sin diferenciar cuando bFGF se incluyó en el medio de cultivo, en el que pueden detectarse la expresión de Pax7 y otros marcadores de células satélite. Sin embargo, pueden inducirse para diferenciarse en mioblastos y miotubos tras la eliminación del factor de crecimiento bFGF, imitando fielmente el proceso de diferenciación de músculo esquelético *in vitro* (Figura 28).

miR-1/206 inhibe la proliferación de células satélite

[0204] Para definir la función de miR-1/206 en células progenitoras de músculo esquelético, las células satélite aisladas de miofibras individuales de ratones adultos se siembran en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos y miR-1/206 se introduce en las células usando un retrovirus basado en el vector SDSA. La expresión y actividad de miARN ectópicamente expresados se monitoriza de varias formas: se aplicó análisis de transferencia Northern para detectar y medir cuantitativamente la expresión de miR-1. La actividad de miR-1/206 también se monitoriza usando indicadores de "sensor" en los que la secuencia complementaria para miR-1/206 se clona 3' hacia un gen indicador dsRed.

[0205] Para ensayos de proliferación, el cultivo de células satélite se marcó con BrdU 1 h antes de la recogida. Entonces, las células se fijaron y las células proliferantes se midieron contando células de tinción positiva para BrdU. Como se muestra en la Figura 27, la expresión en exceso de miR-1/206 en células satélite inhibe su proliferación.

miR-1/206 potencia la diferenciación de células satélite

[0206] Para el análisis cinético de diferenciación, las células satélite de miofibras individuales se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas de colágeno en DMEM más 20 % de SBF y 10 ng/ml de bFGF. Las células se sembraron en placa a una densidad de aproximadamente 5×10^3 células/cm² y se infectaron con el retrovirus para miR-1/206 o retrovirus de control. Una vez se elimina el bFGF del medio de cultivo, las células satélite saldrán espontáneamente del ciclo celular y se diferenciarán. Como se muestra en las Figuras 28 y 29, la expresión en exceso de miR-1/206 potencia la diferenciación de células satélite y acelera su diferenciación cinética.

[0207] En resumen, los datos expuestos en el presente ejemplo demuestran que miR-1 y miR-206 desempeñan una función importante en el control del proceso de proliferación y diferenciación de células satélite de músculo esquelético. Dada la función crítica del proceso de regeneración y de reparación de células satélite en músculo esquelético, se sugiere, y sin desear limitarse a teoría, que miR-1, miR-206 y miR-133 son importantes para la regeneración de músculo esquelético (Figura 30).

Referencias

[0208] Las referencias enumeradas a continuación, además de todas las referencias citadas en la memoria descriptiva, se incorporan en este documento por referencia hasta el punto en que complementan, explican, proporcionan un antecedente para o enseñan metodología, técnicas y/o composiciones empleadas en este documento.

1. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281 – 97 (2004).
2. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350 – 5 (2004).
3. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. y Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843 – 54 (1993).
4. Wightman, B., Ha, I. y Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855 – 62 (1993).
5. Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. y Bartel, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83 – 6 (2004).
6. He, L. y col. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828 – 33 (2005).
7. Giraldez, A.J. y col. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833 – 8 (2005).
8. Zhao, Y., Samal, E. y Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature* 436, 214 – 20 (2005).
9. Thomson, J.M., Parker, J., Perou, C.M. y Hammond, S.M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 1, 47 – 53 (2004).
10. Blau, H.M. y col. Plasticity of the differentiated state. *Science* 230, 758 – 66 (1985).
11. Soulez, M. y col. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol* 16, 6065 – 74 (1996).
12. Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L. y Olson, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell* 6, 233 – 44 (2000).
13. Lee, R.C. y Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862 – 4 (2001).
14. Lagos-Quintana, M. y col. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735 – 9 (2002).
15. Sempere, L.F. y col. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13 (2004).
16. Wienholds, E. y col. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310 – 1 (2005).
17. Mansfield, J.H. y col. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079 – 83 (2004).
18. Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. y Zamore, P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function.

- PLoS Biol 2, E98 (2004).
19. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. y Tuschl, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *Rna* 10, 544 – 50 (2004).
20. Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. y Burge, C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787 – 98 (2003).
21. Kiriakidou, M. y col. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165 – 78 (2004).
22. Krek, A. y col. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495 – 500 (2005).
23. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Lu, J. y Olson, E.N. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106 – 11 (2000).
24. Wang, D. y col. Regulation of cardiac growth and development by SRF and its cofactors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, 97 – 105 (2002).
25. Li, S. y col. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1082 – 7 (2005).
26. Wang, D. y col. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851 – 62 (2001).
27. Cao, D. y col. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol* 25, 364 – 76 (2005).
28. Kroll, K.L. y Amaya, E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* 122, 3173 – 83 (1996).
29. Conlon, F.L., Sedgwick, S.G., Weston, K.M. y Smith, J.C. Inhibition of *Xbra* transcription activation causes defects in mesodermal patterning and reveals autoregulation of *Xbra* in dorsal mesoderm. *Development* 122, 2427 – 35 (1996).
30. Brown, D.D. y col. *Tbx5* and *Tbx20* act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* 132, 553 – 63 (2005).
31. Freier y col. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9373 – 9377.
32. Turner y col. (1987) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol LII*: 123 – 133.
33. Smith y Waterman (1981) *Adv Appl Math* 2: 482 – 489.
34. Needleman y Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48: 443 – 453.
35. Pearson y Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2444 – 2448.
36. Ausubel y col., eds (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, New York, United States of America.
37. Altschul y col. (1990) *J Mol Biol* 215: 403 – 410.
38. Henikoff y Henikoff (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10915 – 10919.
39. Karlin y Altschul (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5873 – 5877.
40. Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
41. Agrawal S (ed.) *Methods in Molecular Biology*, volume 20, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America.
42. Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, New York, United States of America.
43. Tibanyenda y col. (1984) *Eur J Biochem* 139: 19 – 27.
44. Ebel y col. (1992) *Biochem* 31: 12083 – 12086.
45. Goeddel (1990) *Gene Expression Technology*. *Methods in Enzymology*, Volume 185, Academic Press, San Diego, California, United States of America.
46. Silhavy (1984) *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, United States of America.
47. Glover y Hames (1995) *DNA Cloning: A Practical Approach*, 2nd ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
48. Adelman y col. (1983) *DNA* 2: 183 – 193.
49. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. y Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843 – 854.
50. Wightman, B., Ha, I. y Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855 – 862.
51. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. y Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051 – 4060.
52. Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P. y Pasquinelli, A. E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *Rna* 10, 1586 – 1594.
53. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. y Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902 – 1910.
54. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. y Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415 – 419.
55. Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R. y Bertrand, E. (2003). Human *let-7* stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 31, 6593 – 6597.

56. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. y Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95 – 98.
57. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. y Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011 – 3016.
58. Yi, R., Doehle, B. P., Qin, Y., Macara, I. G. y Cullen, B. R. (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna* 11, 220 – 226.
59. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. y Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 10, 185 – 191.
60. Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A. M., Evers, S., Macara, I. G. y Dargemont, C. (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* 279, 884 – 891.
61. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G. y Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23 – 34.
62. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. y Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 293, 834 – 838.
63. Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J. y Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654 – 2659.
64. Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. y Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199 – 208.
65. Khvorova, A., Reynolds, A. y Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209 – 216.
66. Pillai, R. S., Artus, C. G. y Filipowicz, W. (2004). Tethering of human go proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* 10, 1518 – 1525.
67. Doench, J. G. y Sharp, P. A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504 – 511.
68. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281 – 297.
69. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V. y Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215 – 217.
70. Harfe, B. D., McManus, M. T., Mansfield, J. H., Homstein, E. y Tabin, C. J. (2005). The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci USA*.
71. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P. y Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833 – 838.
72. Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P. y Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet – specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226 – 230.
73. Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., Sun, Y., Koo, S., Perera, R. J., Jain, R., y col. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279, 52361 – 52365.
74. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernandez-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J. y Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828 – 833.
75. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. y Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83 – 86.
76. Johnston, R. J. y Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845 – 849.
77. Chang, S., Johnston, R. J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S. y Hobert, O. (2004). MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature* 430, 785 – 789.
78. Yekta, S., Shih, I. H. y Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594 – 596.
79. Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., y col. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36, 1079 – 1083.
80. Zhao, Y., Samal, E. y Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214 – 220.
81. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. y Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787 – 798.
82. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C. y Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
83. Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z. y Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165 – 1178.
84. Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M. y Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495 – 500.

85. Rajewsky, N. y Socci, N. D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 267, 529 – 535.
86. Nicol, R. L., Frey, N., Pearson, G., Cobb, M., Richardson, J. y Olson, E. N. (2001). Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *Embo J* 20, 2757 – 2767.
87. Jones, W. K., Grupp, I. L., Doetschman, T., Grupp, G., Osinska, H., Hewett, T. E., Boivin, G., Gulick, J., Ng, W. A. y Robbins, J. (1996). Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart. *J Clin Invest* 98, 1906 – 1917.
88. Liu, P., Jenkins, N. A. y Copeland, N. G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476 – 484.
89. Cotta-de-Almeida, V., Schonhoff, S., Shibata, T., Leiter, A. y Snapper, S. B. (2003). A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res* 13, 2190 – 2194.
90. Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J. y Robbins, J. (1991). Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 266, 24613 – 24620.
91. Sanbe, A., Gulick, J., Hanks, M. C., Liang, Q., Osinska, H. y Robbins, J. (2003). Reengineering inducible cardiac-specific transgenesis with an attenuated myosin heavy chain promoter. *Circ Res* 92, 609 – 616.
92. Czubyrt, M. P., McAnally, J., Fishman, G. I. y Olson, E. N. (2003). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1711 – 1716.
93. Ito, M., Yuan, C. X., Malik, S., Gu, W., Fondell, J. D., Yamamura, S., Fu, Z. Y., Zhang, X., Qin, J. y Roeder, R. G. (1999). Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Mol Cell* 3, 361 – 370.
94. Fondell, J. D., Ge, H. y Roeder, R. G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8329 – 8333.
95. Treisman, J. (2001). Drosophila homologues of the transcriptional coactivation complex subunits TRAP240 and TRAP230 are required for identical processes in eye-antennal disc development. *Development* 128, 603 – 615.
96. Ito, M., Yuan, C. X., Okano, H. J., Darnell, R. B. y Roeder, R. G. (2000). Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* 5, 683 – 693.
97. Muncke, N., Jung, C., Rudiger, H., Ulmer, H., Roeth, R., Hubert, A., Goldmuntz, E., Driscoll, D., Goodship, J., Schon, K. y Rappold, G. (2003). Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* 108, 2843 – 2850.
98. Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B. y Mahdavi, V. (1984). Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* 259, 6437 – 6446.
99. Everett, A. W., Sinha, A. M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M. y Zak, R. (1984). Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry* 23, 1596 – 1599.
100. Darling, D. S., Carter, R. L., Yen, P. M., Welborn, J. M., Chin, W. W. y Umeda, P. K. (1993). Different dimerization activities of alpha and beta thyroid hormone receptor isoforms. *J Biol Chem* 268, 10221 – 10227.
101. Subramaniam, A., Gulick, J., Neumann, J., Knotts, S. y Robbins, J. (1993). Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem* 268, 4331 – 4336.
102. Gustafson, T. A., Markham, B. E., Bahl, J. J. y Morkin, E. (1987). Thyroid hormone regulates expression of a transfected alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3122 – 3126.
103. Santalucia, T., Boheler, K. R., Brand, N. J., Sahye, U., Fandos, C., Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M. y Zorzano, A. (1999). Factors involved in GLUT – 1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem* 274, 17626 – 17634.
104. Hagen, G., Muller, S., Beato, M. y Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* 13, 3843 – 3851.
105. Hagen, G., Muller, S., Beato, M. y Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 20, 5519 – 5525.
106. Schonberger, J., Wang, L., Shin, J. T., Kim, S. D., Depreux, F. F., Zhu, H., Zon, L., Pizard, A., Kim, J. B., Macrae, C. A., y col. (2005). Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 37, 418 – 422.
107. Wayne, S., Robertson, N. G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjarg, L., Morton, C. C., Ryan, A. F., Van Camp, G. y Smith, R. J. (2001). Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10, 195 – 200.
108. Borsani, G., DeGrandi, A., Ballabio, A., Bulfone, A., Bernard, L., Banfi, S., Gattuso, C., Mariani, M., Dixon, M., Donnai, D., y col. (1999). EYA4, a novel vertebrate gene related to Drosophila eyes absent. *Hum Mol Genet* 8, 11 – 23.
109. Bonini, N. M., Leiserson, W. M. y Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing Drosophila eye. *Cell* 72, 379 – 395.
110. Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B. y Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev* 13, 3231 – 3243.
111. Xu, X., Rich, E. S., Jr. y Seldin, D. C. (1998). Murine protein kinase CK2 alpha': cDNA and genomic cloning and

chromosomal mapping. Genomics 48, 79 – 86.

112. Pinna, L. A. y Meggio, F. (1997). Protein kinase CK2 ("casein kinase-2") and its implication in cell division and proliferation. Prog Cell Cycle Res 3, 77 – 97.

5 113. Granzier, H. L. y Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. Circ Res 94, 284 – 295.

114. Yan y col (2003). J. Biol. Chem. 278(10), 8826 – 8836.

10 **[0209]** Se entenderá que diversos detalles de la materia presentemente desvelada pueden cambiarse sin apartarse del alcance de la materia presentemente desvelada. Además, la anterior descripción es con el fin de ilustración solo, y no con el fin de limitación.

LISTA DE SECUENCIAS

[0210]

15 < 110 > Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill
Wang, Da-Zhi

Chen, Jianfu

20 < 120 > MICROARN QUE REGULAN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES

< 130 > 421-166 PCT

< 150 > 60/749.544

< 151 > 12/12/2005

< 160 > 82

25 < 170 > PatentIn versión 3.3

< 210 > 1

< 211 > 21

< 212 > ARN

< 213 > Artificial

< 220 >

30 < 223 > miARN artificialmente sintetizado

< 400 > 1

uggaauguaa agaaguaugu a 21

35 < 210 > 2

< 211 > 22

< 212 > ARN

< 213 > Artificial

< 220 >

40 < 223 > miARN artificialmente sintetizado

< 400 > 2

uugguccccc ucaaccagcu gu 22

45 < 210 > 3

< 211 > 22

< 212 > ARN

< 213 > Artificial

< 220 >

50 < 223 > miARN artificialmente sintetizado

< 400 > 3

uggaauguaa ggaagugugu gg 22

55 < 210 > 4

< 211 > 22

< 212 > ARN

< 213 > Artificial

< 220 >

60 < 223 > miARN artificialmente sintetizado

< 400 > 4

auaagaagag caaaaagcuu gu 22

< 210 > 5
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 5 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 5

10 aagcugccag uugaagaacu gu 22

< 210 > 6
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 15 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 20 < 222 > (11)..(11)
 < 223 > y puede ser C o U
 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 < 222 > (21)..(21)
 25 < 223 > y puede ser C o U
 < 400 > 6

uucaaguaau ycaggauagg yu 22

30 < 210 > 7
 < 211 > 23
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 35 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 < 222 > (10)..(10)
 < 223 > y puede ser C o U
 40 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 < 222 > (18)..(18)
 < 223 > r puede ser G o A
 < 220 >
 45 < 221 > misc_feature
 < 222 > (21)..(21)
 < 223 > k puede ser G o U
 < 400 > 7

50 uagcaccuay ugaaaucrgu kuu 23

< 210 > 8
 < 211 > 23
 < 212 > ARN
 55 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 220 >
 < 221 > misc_feature
 60 < 222 > (1)..(22)
 < 223 > y puede ser C o U; k puede ser G o U; w puede ser U o A; m puede ser C o A; s puede ser G o C; h puede ser A, C o U; v puede ser G, A o C; n puede ser A, G, C o U; b puede ser C G, o U

< 400 > 8

ykuwmaswys shhswyuvnv vbc 23

- 5 < 210 > 9
- < 211 > 22
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial
- < 220 >
- 10 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
- < 220 >
- < 221 > misc_feature
- < 222 > (22)..(22)
- < 223 > y puede ser C o U
- 15 < 400 > 9

ucacagugaa cggucucuu uy 22

- < 210 > 10
- 20 < 211 > 22
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial
- < 220 >
- < 223 > miARN artificialmente sintetizado
- 25 < 400 > 10

ugagaugaag cacuguagcu ca 22

- < 210 > 11
- 30 < 211 > 24
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial
- < 220 >
- < 223 > miARN artificialmente sintetizado
- 35 < 400 > 11

guccaguuuu cccaggaau cccuu 24

- < 210 > 12
- 40 < 211 > 21
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial
- < 220 >
- < 223 > miARN artificialmente sintetizado
- 45 < 400 > 12

uucaaguaau ccaggauagg c 21

- < 210 > 13
- 50 < 211 > 22
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial
- < 220 >
- < 223 > miARN artificialmente sintetizado
- 55 < 400 > 13

uucaaguaau ucaggauagg uu 22

- < 210 > 14
- 60 < 211 > 21
- < 212 > ARN
- < 213 > Artificial

< 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 14

5 uagcaccauc ugaaaucggu 21

< 210 > 15
 < 211 > 23
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

10 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 15

15 uagcaccauu ugaaaucgu 23

< 210 > 16
 < 211 > 20
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

20 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 16

25 uagcaccauu ugaaaucggu 20

< 210 > 17
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

30 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 17

35 cuuucagucg gauguugca gc 22

< 210 > 18
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

40 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 18

45 guaaacauc cuacacucg cu 22

< 210 > 19
 < 211 > 23
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

50 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 19

55 guaaacauc cuacacucc agc 23

< 210 > 20
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial

60 < 220 >
 < 223 > miARN artificialmente sintetizado
 < 400 > 20

	uguuaacauc cccgacugga ag	22	
5	< 210 > 21 < 211 > 21 < 212 > ARN < 213 > Artificial < 220 > < 223 > miARN artificialmente sintetizado		
10	< 400 > 21		
	cuucagucg gauguuuaca g 2	1	
15	< 210 > 22 < 211 > 22 < 212 > ARN < 213 > Artificial < 220 > < 223 > miARN artificialmente sintetizado		
20	< 400 > 22		
	ucacagugaa cggucucuu uu	22	
25	< 210 > 23 < 211 > 22 < 212 > ARN < 213 > Artificial < 220 > < 223 > miARN artificialmente sintetizado		
30	< 400 > 23		
	ucacagugaa cggucucuu uc	22	
35	< 210 > 24 < 211 > 63 < 212 > ADN < 213 > Homo sapiens < 400 > 24		
	tttttttttt tgatecagaac attccttttt tactgggtcac agccacgtgc tcattccatt	60	
40	ctt	63	
45	< 210 > 25 < 211 > 63 < 212 > ADN < 213 > Pan troglodytes < 400 > 25		
	tttttttttt tgatecagaac attccttttt tactgggtcac agccacgtgc tcattccatt	60	
	ctt	63	
50	< 210 > 26 < 211 > 61 < 212 > ADN < 213 > Mus musculus < 400 > 26		
55			

ES 2 387 250 T3

	tgtttctttc ctcagaacat tccttcttca ctggtcacag ccacgtgctc attccatcct	60
	t	61
5	< 210 > 27 < 211 > 65 < 212 > ADN < 213 > Rattus rattus < 400 > 27	
	tgtttctttc ctcagaacat tccttcttcc ttcactgggc ccagcccacgt gtcattcca	60
10	tcctt	65
15	< 210 > 28 < 211 > 61 < 212 > ADN < 213 > Canis familiaris < 400 > 28	
	gttttacttt tcgatacagaa cattcctttc ttactgggca cagccatgtg ctcatccat	60
20	t	61
25	< 210 > 29 < 211 > 64 < 212 > ADN < 213 > Gallus gallus < 400 > 29	
	tttttacttt cgatacggaa cattcctttc ttattagtct cagtcatgta ttcattccat	60
30	tcctt	64
35	< 210 > 30 < 211 > 23 < 212 > ADN < 213 > Homo sapiens < 400 > 30	
	gtctctgggt tggaggaac cac	23
40	< 210 > 31 < 211 > 22 < 212 > ADN < 213 > Homo sapiens < 400 > 31	
	ttagcttacc caatgggacc gt	22
45	< 210 > 32 < 211 > 26 < 212 > ADN < 213 > Rattus rattus < 400 > 32	
	ggggctctg ggtgaaggg aaccac	26
50	< 210 > 33 < 211 > 22 < 212 > ADN < 213 > Rattus rattus	

ES 2 387 250 T3

< 400 > 33

ttagcttacc caatgggacc gt 22

5 < 210 > 34
 < 211 > 83
 < 212 > ARN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 34

10 uuccuuugac gggugagcuu ugggcccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60

aaaaagcuug uggucagag gag 83

15 < 210 > 35
 < 211 > 83
 < 212 > ARN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 35

uuccuuugac gggugagcuu ugggcccggg uuauaccuga' cacucacgua uaagacgagc 60

aaaaagcuug uggucagag gag 83

20 < 210 > 36
 < 211 > 83
 < 212 > ARN
 < 213 > Rattus rattus
 < 400 > 36

uuccuuugac gggugagcuu ugggcccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60

aaaaagcuug uggucagag gag 83

30 < 210 > 37
 < 211 > 71
 < 212 > ARN
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 37

ugacggggcga gcuuuuggcc cggguuuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaaag 60

cuuguugguc a 71

40 < 210 > 38
 < 211 > 24
 < 212 > ARN
 < 213 > Homo sapiens
 < 400 > 38

cuaaaauaua uguaaucguc uuaa 24

45 < 210 > 39
 < 211 > 24
 < 212 > ARN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 39

50 cuaaaauaua uguaaucguc uuaa 24

< 210 > 40

< 211 > 32
 < 212 > ADN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 40
 5 **acc**aaatgca tctctctcca cattctgtgc tc 32

 < 210 > 41
 < 211 > 31
 10 < 212 > ADN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 41

 gtcccagcca agggagcaac attccaacgct 31
 15
 < 210 > 42
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 20 < 220 >
 < 223 > sonda de miR-1
 < 400 > 42

 tacatacttc ttacattcc a 21
 25
 < 210 > 43
 < 211 > 22
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 30 < 220 >
 < 223 > sonda de miR-133
 < 400 > 43

 acagctgggt gaaggggacc aa 22
 35
 < 210 > 44
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 40 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-133a-1
 < 400 > 44

 catgtgaccc ctacacaca 20
 45
 < 210 > 45
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 50 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-133a-1
 < 400 > 45

 acaaggggag cctggatccc 20
 55
 < 210 > 46
 < 211 > 22
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 60 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-133a-2
 < 400 > 46

- ggacatatgc ctaaacaogt ga 22
- 5 < 210 > 47
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-133a-2
 10 < 400 > 47
- gaaacatdt tatccagttt 20
- 15 < 210 > 48
 < 211 > 22
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-1-2
 20 < 400 > 48
- agactgagac acagggcaca cc 22
- 25 < 210 > 49
 < 211 > 22
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1-2
 30 < 400 > 49
- tgccggcca toggccatt gc 22
- 35 < 210 > 50
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-1-1
 40 < 400 > 50
- cadtggatcc attactcttc 20
- 45 < 210 > 51
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1-1
 50 < 400 > 51
- ttggaatggg gctgttagta 20
- 55 < 210 > 52
 < 211 > 43
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-1mut
 60 < 400 > 52

5 tgaacattca gtgcataaa gaagtatgta tttgggtag gta 43
 < 210 > 53
 < 211 > 43
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1mut
 < 400 > 53
 10 tacctacca aaatacatac ttcttatag cactgaatgt tca 43
 < 210 > 54
 < 211 > 48
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-133mut
 < 400 > 54
 15 aatgcctct tcaatggatt tgcaccag ctgtagdat gcattgat 48
 < 210 > 55
 < 211 > 48
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-133mut
 < 400 > 55
 20 atcaatgcat agctacagct ggttgacaaa tccattgaag agggatt 48
 < 210 > 56
 < 211 > 42
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-1 artificialmente sintetizado
 < 400 > 56
 25 uggaauguaa agaaguaugu acauacuucu uuacauucca ua 42
 < 210 > 57
 < 211 > 42
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-1-mut artificialmente sintetizado
 < 400 > 57
 30 uuaccauaa agaaguaugu acauacuucu uuagguuaa ua 42
 < 210 > 58
 < 211 > 44
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-133 artificialmente sintetizado
 < 400 > 58
 35 uuggucccu ucaaccagcu guagcugguu gaaggggacc aaau 44
 < 210 > 53
 < 211 > 43
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1mut
 < 400 > 53
 40 tgaacattca gtgcataaa gaagtatgta tttgggtag gta 43
 < 210 > 53
 < 211 > 43
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1mut
 < 400 > 53
 45 tacctacca aaatacatac ttcttatag cactgaatgt tca 43
 < 210 > 54
 < 211 > 48
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por incremento de miR-133mut
 < 400 > 54
 50 aatgcctct tcaatggatt tgcaccag ctgtagdat gcattgat 48
 < 210 > 55
 < 211 > 48
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-133mut
 < 400 > 55
 55 atcaatgcat agctacagct ggttgacaaa tccattgaag agggatt 48
 < 210 > 56
 < 211 > 42
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-1 artificialmente sintetizado
 < 400 > 56
 60 uggaauguaa agaaguaugu acauacuucu uuacauucca ua 42
 < 210 > 57
 < 211 > 42
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-1-mut artificialmente sintetizado
 < 400 > 57
 65 uuaccauaa agaaguaugu acauacuucu uuagguuaa ua 42
 < 210 > 58
 < 211 > 44
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-133 artificialmente sintetizado
 < 400 > 58
 70 uuggucccu ucaaccagcu guagcugguu gaaggggacc aaau 44
 < 210 > 53
 < 211 > 43
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > sonda de regulación por disminución de miR-1mut
 < 400 > 53

< 210 > 64
 < 211 > 32
 < 212 > ARN
 5 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > 2'-O-metil-miR-208 artificialmente sintetizado
 < 400 > 64

10 gaccaacaag cuuuuugcuc gucuuauacg ug 32

< 210 > 65
 < 211 > 22
 < 212 > ARN
 15 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > 2'-O-metil-GFP artificialmente sintetizado
 < 400 > 65

20 aaggcaagcu gaccugaag uu 22

< 210 > 66
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 25 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > HDAC4-UTR-incremento artificialmente sintetizado
 < 400 > 66

30 cagcactggt gatagactg g 21

< 210 > 67
 < 211 > 23
 < 212 > ADN
 35 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > HDAC4-UTR-disminución artificialmente sintetizado
 < 400 > 67

40 ctaagaata agttcaataa gac 23

< 210 > 68
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 45 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > SRF-UTR-incremento artificialmente sintetizado
 < 400 > 68

50 agatagggg gctgtgccc 20

< 210 > 59
 < 211 > 44
 < 212 > ARN
 55 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > dúplex de miR-133-mut artificialmente sintetizado
 < 400 > 59

60 ucaaguaacu ucaaccagcu guagcugguu gaaguacu gaau 44

< 210 > 60

- < 211 > 44
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 5 < 223 > dúplex de miR-208 artificialmente sintetizado
 < 400 > 60
- aaaagaagag caaaaagcuu gaaagcuuuu ugcucgucu auac 44
- 10 < 210 > 61
 < 211 > 44
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 15 < 223 > dúplex de GFP artificialmente sintetizado
 < 400 > 61
- aacuucaggg ucagcuugcc uuggcaagcu gaccugaag uugg 44
- 20 < 210 > 62
 < 211 > 28
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 25 < 223 > 2'-O-metil-miR-1 artificialmente sintetizado
 < 400 > 62
- aaauacauac uucuuuacau uccauagc 28
- 30 < 210 > 63
 < 211 > 31
 < 212 > ARN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 35 < 223 > 2'-O-metil-miR-133 artificialmente sintetizado
 < 400 > 63
- agcuacagcu gguugaagg gaccaaaucc a 31
- 40 < 210 > 69
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 45 < 223 > SRF-UTR-disminución artificialmente sintetizado
 < 400 > 69
- ctggagaaa ggggtagac 20
- 50 < 210 > 70
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 55 < 223 > Cebador de PCR de miogenina F artificialmente sintetizado
 < 400 > 70
- tggagctgta tgagacatcc c 21
- 60 < 210 > 71
 < 211 > 21
 < 212 > ADN

< 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de miogenina R artificialmente sintetizado
 < 400 > 71

5

tggaacaatgc tcaggggtcc c 21

< 210 > 72
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de MyoD F artificialmente sintetizado
 < 400 > 72

10

15

gcaggctctg ctgocgacc 20

< 210 > 73
 < 211 > 23
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de MyoD R artificialmente sintetizado
 < 400 > 73

20

25

tgcaatgat ctctcaaac acc 23

< 210 > 74
 < 211 > 19
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de actina F esquelética artificialmente sintetizado
 < 400 > 74

30

35

cagagcaagc gaggtatcc 19

< 210 > 75
 < 211 > 19
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de actina R esquelética artificialmente sintetizado
 < 400 > 75

40

45

gtccccagaa tccaacaag 19

< 210 > 76
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de MEF2D F artificialmente sintetizado
 < 400 > 76

50

55

caagctgttc cagtatgcca g 21

< 210 > 77
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial

60

< 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de MEF2D R artificialmente sintetizado
 < 400 > 77

5 aagggatgat gtcaccaggg 20

< 210 > 78
 < 211 > 30
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de HDAC4 F artificialmente sintetizado
 < 400 > 78

15 gagagaattc tgctagcaat gagctcccaa 30

< 210 > 79
 < 211 > 34
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de HDAC4 R artificialmente sintetizado
 < 400 > 79

25 gagactcgag ctatgcaggt tccaagggca gtga 34

< 210 > 80
 < 211 > 21
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de SRF F artificialmente sintetizado
 < 400 > 80

35 gtcccatgc agtgatgat g 21

< 210 > 81
 < 211 > 20
 < 212 > ADN
 < 213 > Artificial
 < 220 >
 < 223 > Cebador de PCR de SRF R artificialmente sintetizado
 < 400 > 81

45 gtagctcggg gaggtgctg 20

< 210 > 82
 < 211 > 2620
 < 212 > ADN
 < 213 > Mus musculus
 < 400 > 82

50

ES 2 387 250 T3

gagcaagttt cactagggcc acacagtatc attgagcact gagcgtggaa ggagacagat	60
gggcccaegt tctctctcct etttctagec ttccttctec ctcccttttc ttatacatta	120
tatcctggcg gcagttttcc ctccctccac tctctccagt tcttcccca cttocattct	180
ccccagatc cattctctt atgccccccc cccccaagag caggctttcc atgaatacc	240
accaaactg gcataacaag ttacaataag atcaggaaca aacctcata tcaaggetgg	300
atgaggcaac ccaacaggag gaaaagggcc ccaagagcag gcaaaaaact cccactgtg	360
tgtcttctgc tagaacacaa agctacacaa ctataatgta tatgcagagg acccagctca	420
gtctcatcag ggtccgtgtt tgttgctaca gtttctgtga acctctgtgg gctctgctta	480
gttggttctg tgggttgtgt tcttgtggca tctcaactc ctctggctcc tacaatctt	540

ES 2 387 250 T3

cctcccactct tctttggagt tcccctggcc atgcctgatg tttggctggc ttggetgtgt 600
 gggcctctgc atttatttcc gtcagttgct ggaaagcacc cctctgttga cagttggctcc 660
 atgcactgat ctatgaggat agcagagtat cactaggaat tactttattg tcttttttgc 720
 cagtcgtttt tggttctctc ccgagtcctc gggetgtcca gtctctggtt cctggccttc 780
 cagacactgt cagttgtggg tccccttttg tgggtgttggc ctcaacttgg ccagtcattg 840
 gttggccatt cccacaagt ctacaccacc attaccctag catgtctcgc aggcaggaca 900
 gattgtacgc ggaaggattt atggctgggt tatgtctcag tcccagggct ggaagccttg 960
 cctggttaaa gaagacagct agttctgact cagtattccc tgttactagc agaattcact 1020
 aggattacc caccctcag ggcatttcca cagcactagg gttctgcatt gcctctccaa 1080
 tccccctcc aattccagtc gcctttccca gaactctcct ccccagcct gatccctatt 1140
 gttcccaccc ccaccaccc ccagtcacc taaaaagctc ttccccttc ccaagaagat 1200
 ccatgagttt ctctgtgtct gtggattgga gtatgatctg tggatttagc agctaattgt 1260
 cacttaaccag tgagtacaca ccgttgtct tttgggtctg ggttacctca ctccagggtg 1320
 attttggatt tttttctttg agtgetatec atttgtctgc aaatgtcatg atgtcatttt 1380
 ttttaacagc tgaggaattc tctcagaacc acatttctct tatccattat tcagattggt 1440
 cccagtttct ggctattata aggctgctat gaacatgggt gaacaagtgt ccttctggta 1500
 tcggtacaca ggatgtggca tcccttgggt atatgcctag gagtgggtat gatgggtctc 1560
 gaggtagatc aattcccgat tttctgagaa actgccatat ctgtttccaa agtggctgtg 1620
 taagtttgcg ctcccaccag caacggagga gtgttctcct tactcctccc acattatcaa 1680
 cagtgtgagc tgtcacttgt gtttttgatc ttageccttc tgacagggtg aagatggaat 1740
 ctcaaagttag ctttgatttg catttccctg ctggctaagg atgttgaaca tttctttaag 1800
 tgtttctcag ccatttgaga tttatccatt gagaattctg tttagatctg aactccacct 1860
 tctaattgga ttatttgggt tttaaaatat ccactttctc gagtcttaa tgggttttgg 1920
 atattagccc tctgtcaaat gtggagtgg tgaagatctt tcccattcg gtaggtttt 1980
 tectattgac agtgtccttt gcttcacaga agcttttcag tttcatgagg tcccatttat 2040
 tgattgttga atcttggctc tcttagtgcc tgtgtattg atgtctattc aggaagtgt 2100
 ctctgtgccc aatgcgtcca aggtatttc ccactttctc tctatttagg ttcagtgtat 2160
 ctcattttat gttgaggct ttgatccact tagagttgag ttttgtgcag agtgatagat 2220
 atggatctat ttgcattctt ctacatgcag atatccagta agaccagcat catttattgc 2280
 ggatgctttt taaatttttt cgttctgtga tttctggctt ctttataaaa atcagggtgt 2340

ES 2 387 250 T3

```
cactgatttc attgatcagc caatgctttt ctgccgatac catgtggttt tattgctata 2400
gctctgaggt acagcttgag tcagggatgt gatgcccttg gacgtccttt tattgtacag 2460
gagtatccta ggtttagcta tcctaggttt ttgggttttc cacatggagt taagtattgt 2520
cctttcaagg tctatagaga attgcattgg gatthttggtg gagattgtat tgcatttgta 2580
gatttggtag ggtggccatt ttactatgg taatcctacc 2620
```

REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso en un procedimiento para tratar una lesión muscular en un sujeto, preferentemente un mamífero, en la que miR-133 y un inhibidor de miR-1 se administran en combinación al sitio de lesión muscular en un primer momento de tiempo y miR-1 y un inhibidor de miR-133 se administran en combinación al sitio de lesión muscular en un segundo momento de tiempo.
2. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que la lesión muscular resulta de un traumatismo muscular mecánico, un trastorno degenerativo muscular, una lesión cardíaca, o una combinación de los mismos.
3. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que miR-1 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°: 1 o una secuencia al menos el 70 % idéntica a SEQ ID N°: 1.
4. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que miR-133 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°: 2 o una secuencia al menos el 70 % idéntica a SEQ ID N°: 2.
5. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de miR-1 es un polinucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 % complementaria a miR-1.
6. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de miR-1 es 2'-O-metil-miR-1 (SEQ ID N°: 62).
7. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de miR-133 es un polinucleótido modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos el 70 % complementaria a miR-133.
8. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de miR-133 es 2'-O-metil-miR-133 (SEQ ID N°: 63).
9. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que miR-1 y/o miR-133 están codificados por un vector.
10. La cantidad eficaz de miR-1, un inhibidor de miR-1, miR-133 y un inhibidor de miR-133 para su uso según la reivindicación 1, en la que el vector comprende:
- (a) un promotor operativamente ligado a una molécula de ácido nucleico que codifica miR-1 y/o miR-133; y
(b) una secuencia de terminación de la transcripción.
11. Una cantidad eficaz de un inhibidor de miR-1 y miR-133 para su uso en un procedimiento para tratar una lesión muscular en un sujeto, preferentemente un mamífero, en la que dicho miR-133 y dicho inhibidor de miR-1 aumentan la proliferación de miocitos cuando se administran en combinación a un sitio de lesión muscular.
12. Una cantidad eficaz de miR-1 y un inhibidor de miR-133 para su uso en un procedimiento para tratar una lesión muscular en un sujeto, preferentemente un mamífero, en la que dicho miR-1 y dicho inhibidor de miR-133 aumentan la diferenciación de miocitos cuando se administran en combinación a un sitio de lesión muscular.
13. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la diferenciación de miocitos que comprende poner en contacto un miocito con miR-1 y un inhibidor de miR-133.
14. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 13, en el que miR-1 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°: 1 o una secuencia al menos el 70 % idéntica a SEQ ID N°: 1.
15. Un procedimiento *in vitro* para aumentar la proliferación de miocitos que comprende poner en contacto un miocito con miR-133 y un inhibidor de miR-1.
16. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 15, en el que miR-133 comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID N°: 2 o una secuencia al menos el 70 % idéntica a SEQ ID N°: 2.
17. El procedimiento *in vitro* según la reivindicación 13 o la reivindicación 15, en el que miR-1 o miR-133 están codificados por un vector.

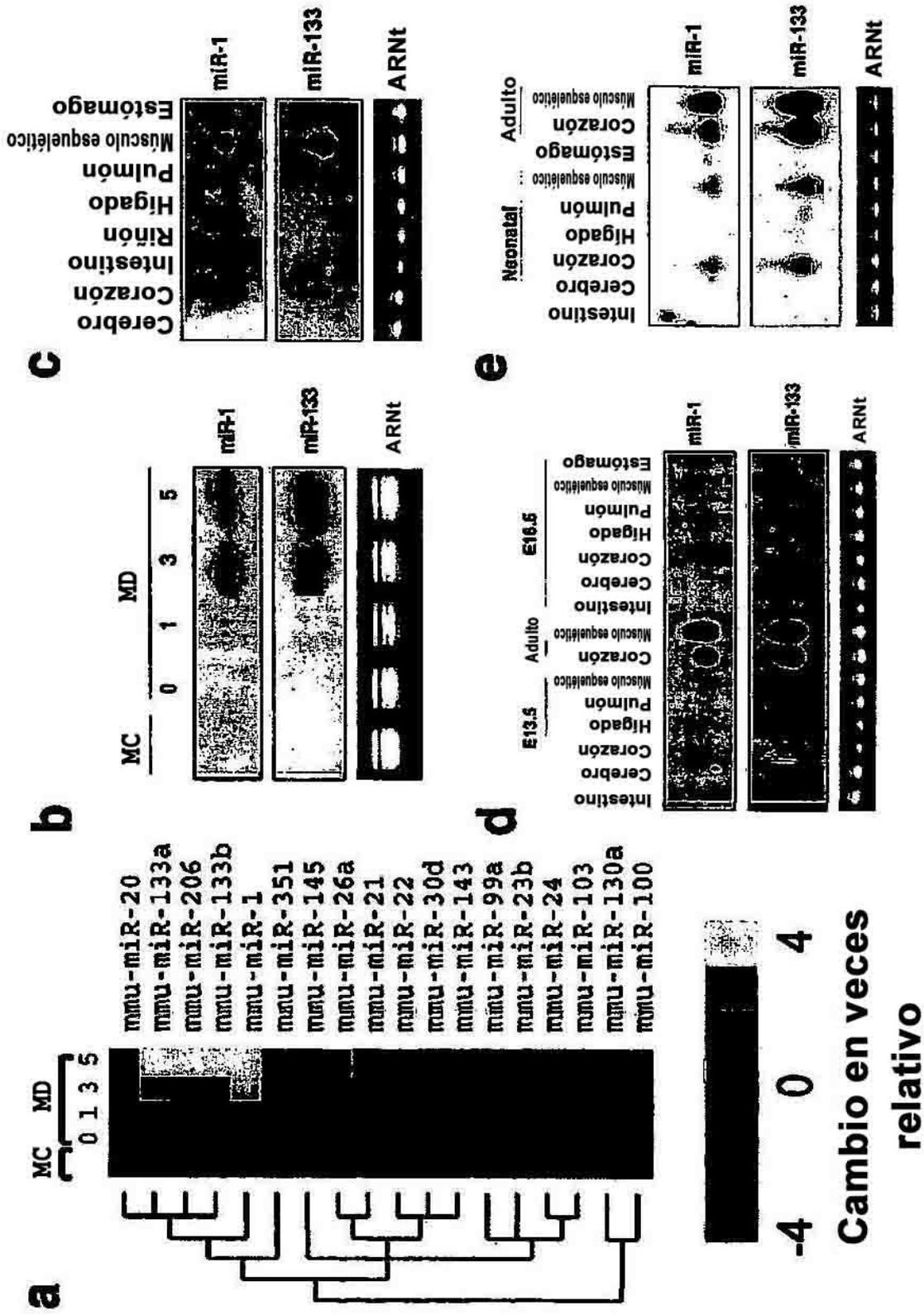


Figura 1

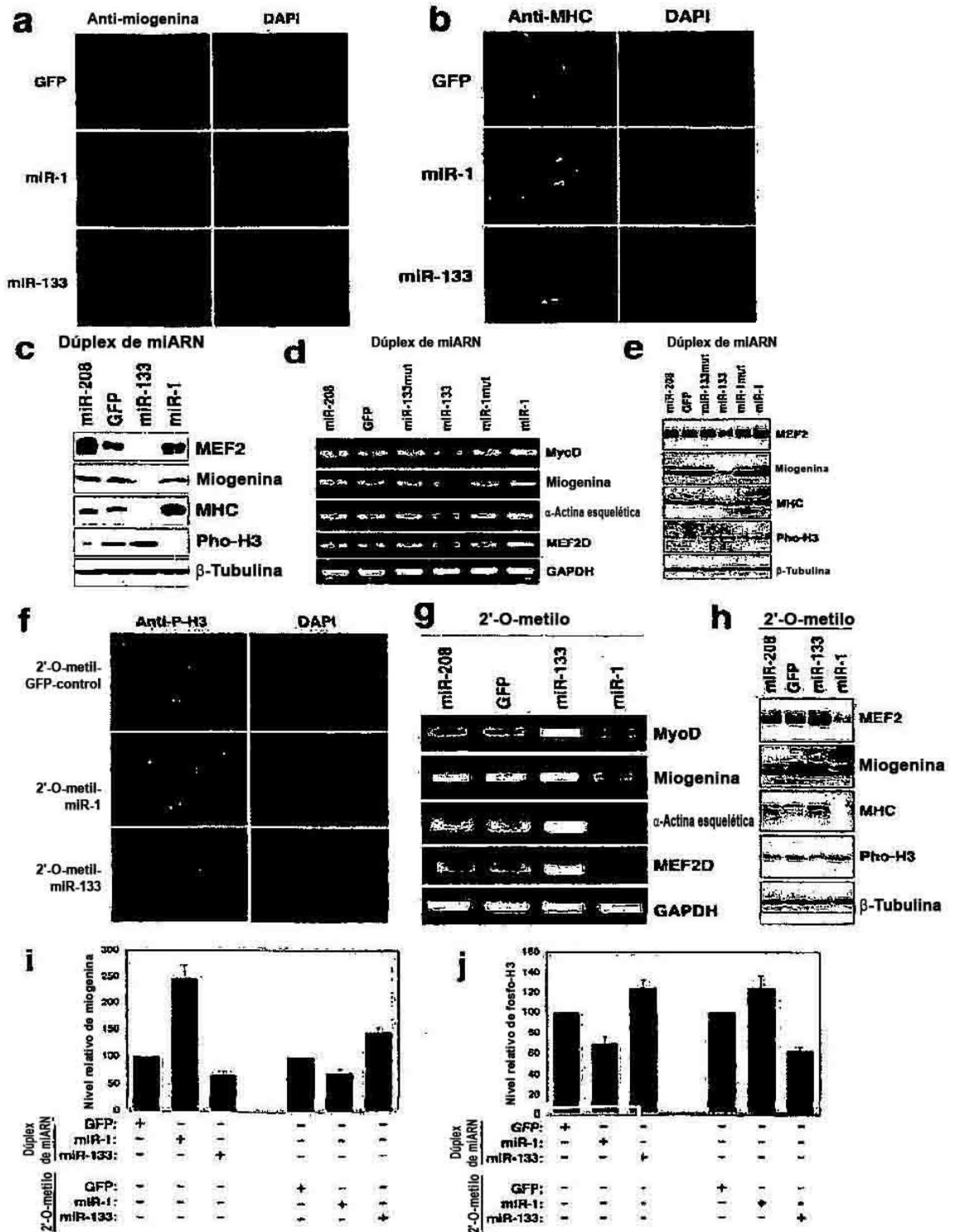


Figura 2

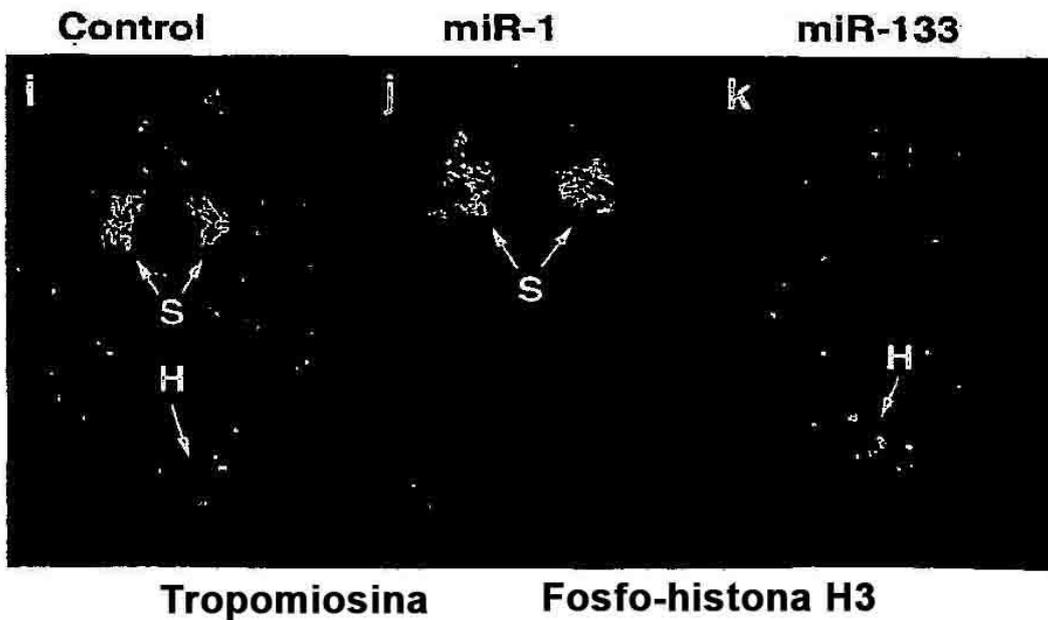
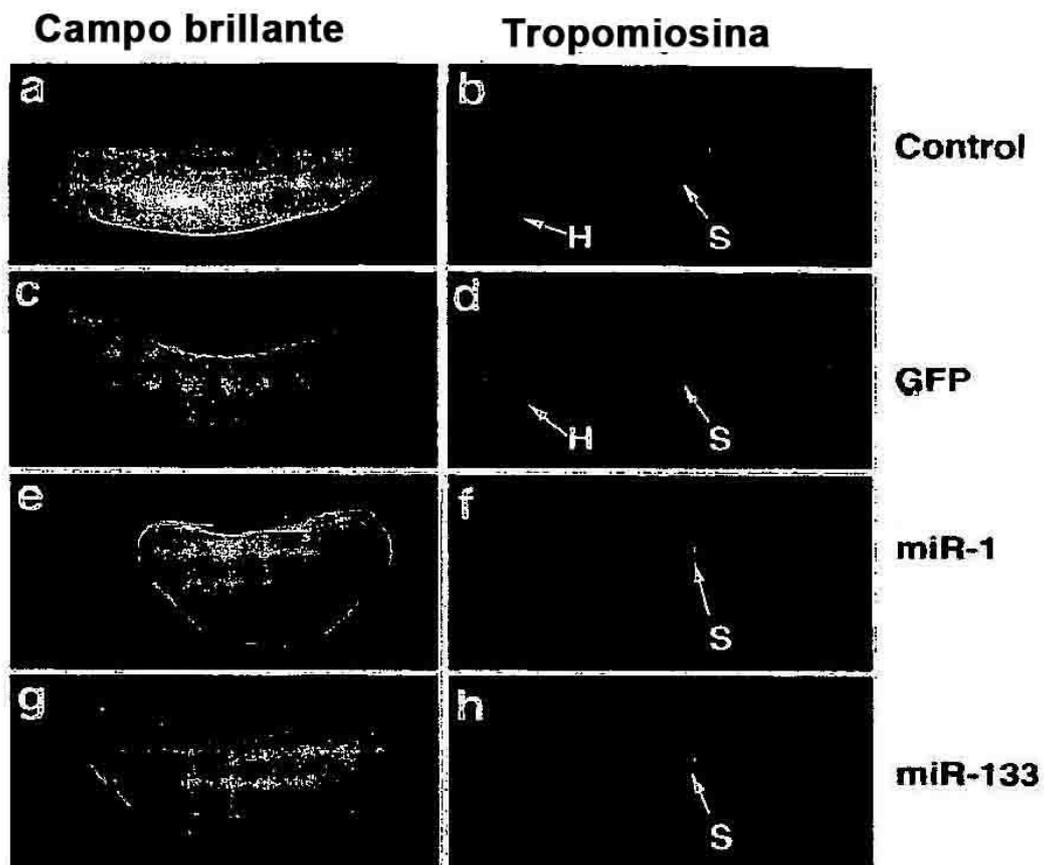


Figura 3

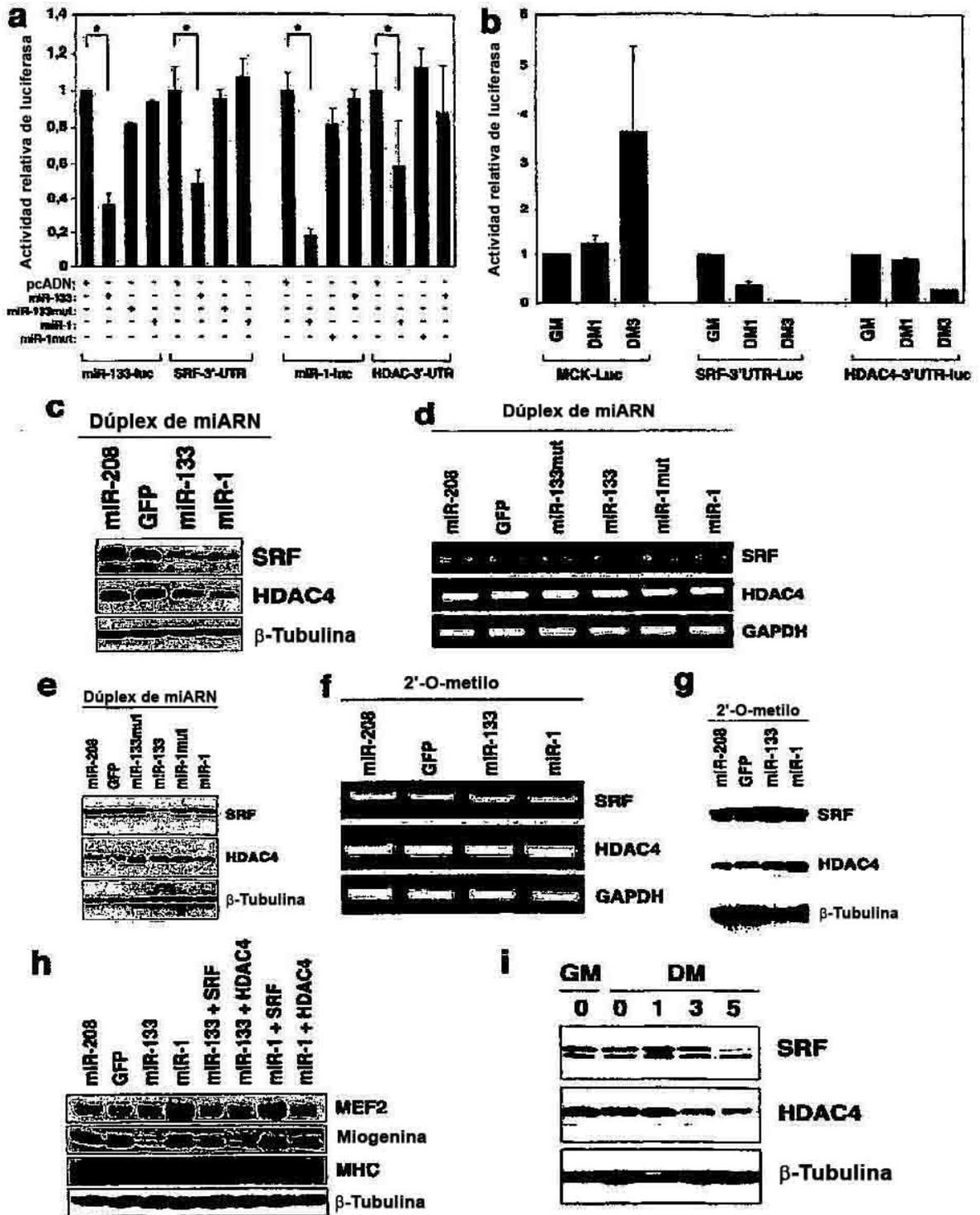


Figura 4

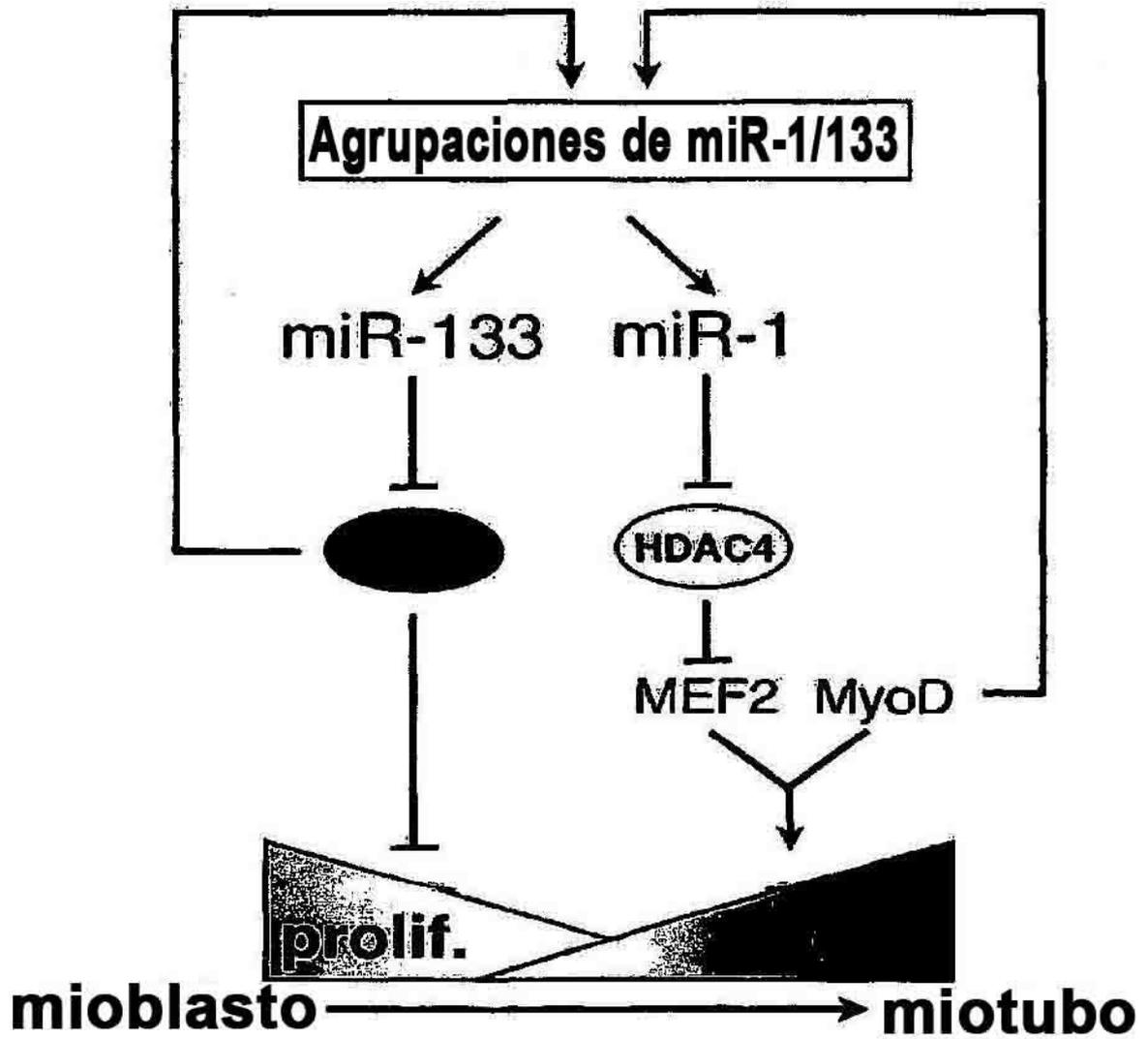


Figura 5

Figura 6

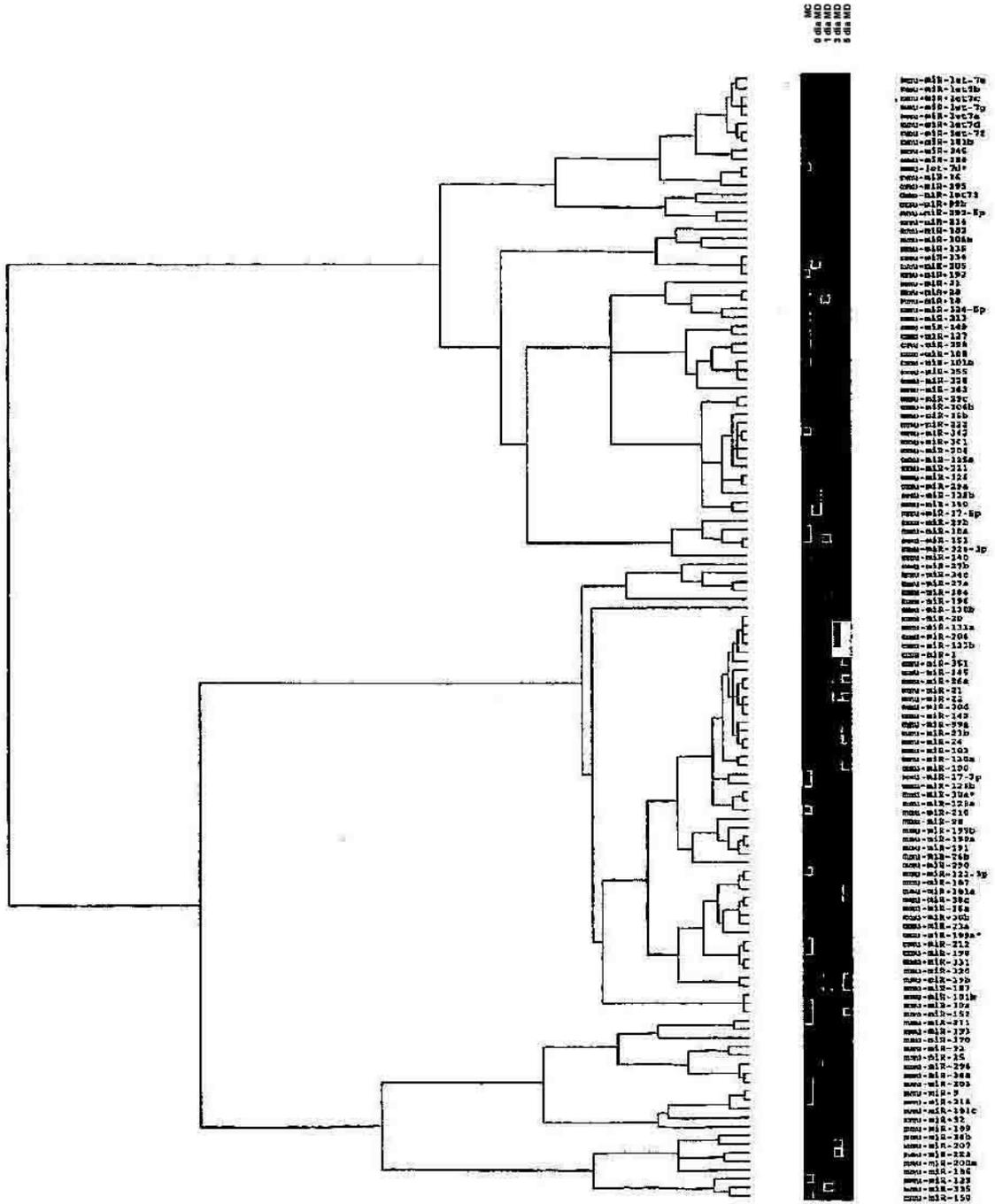


Figura 7

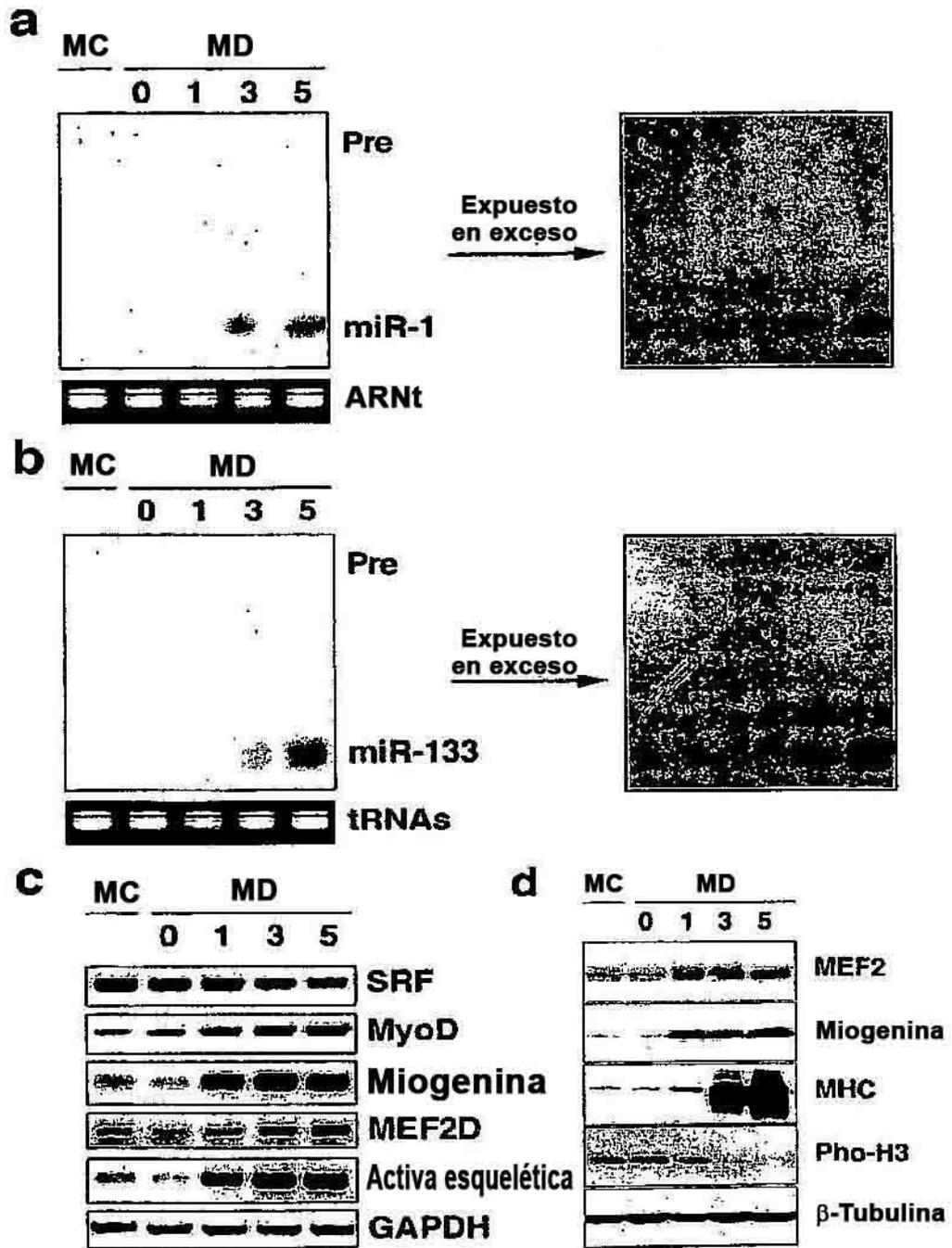


Figura 8

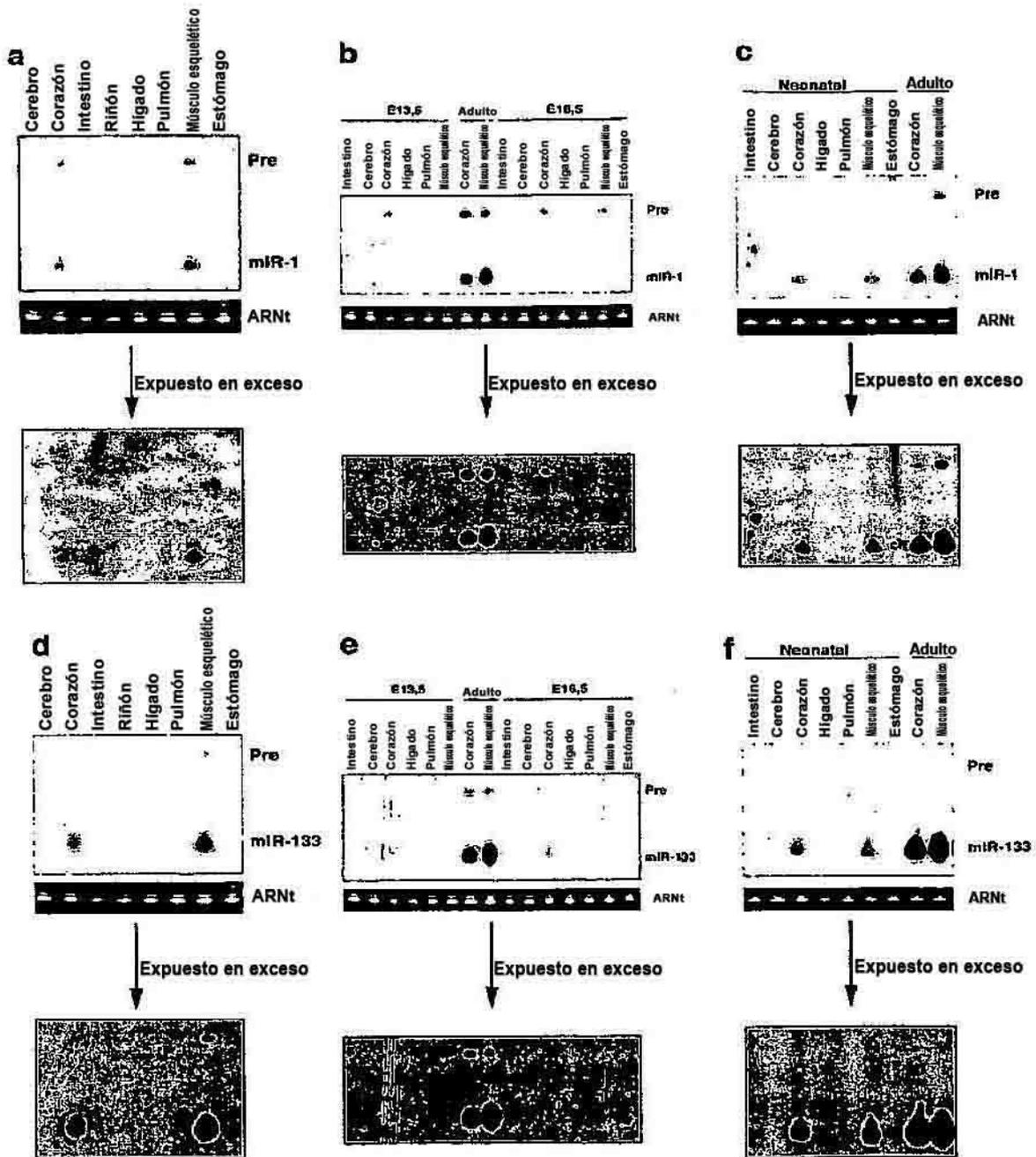


Figura 9

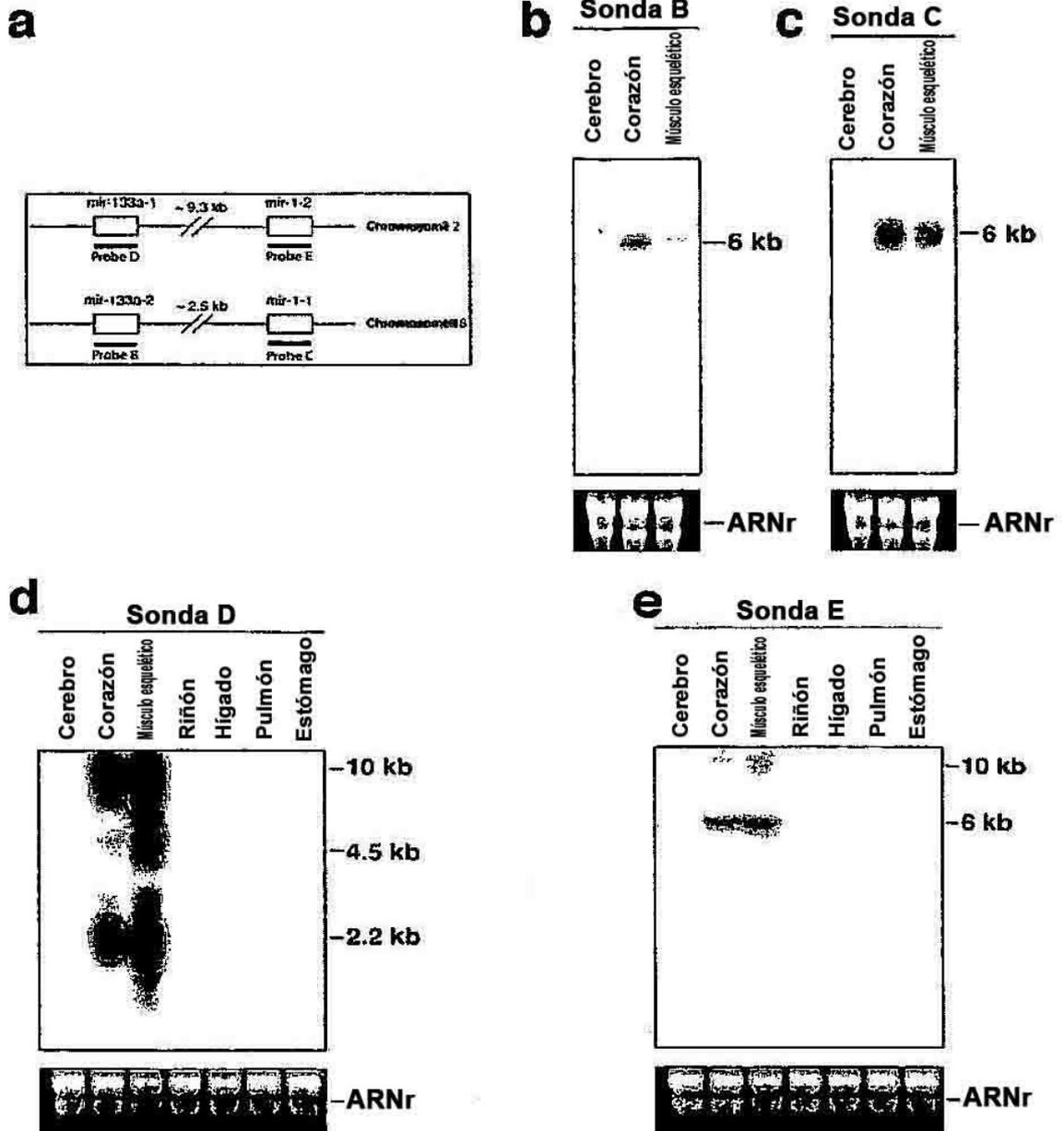


Figura10

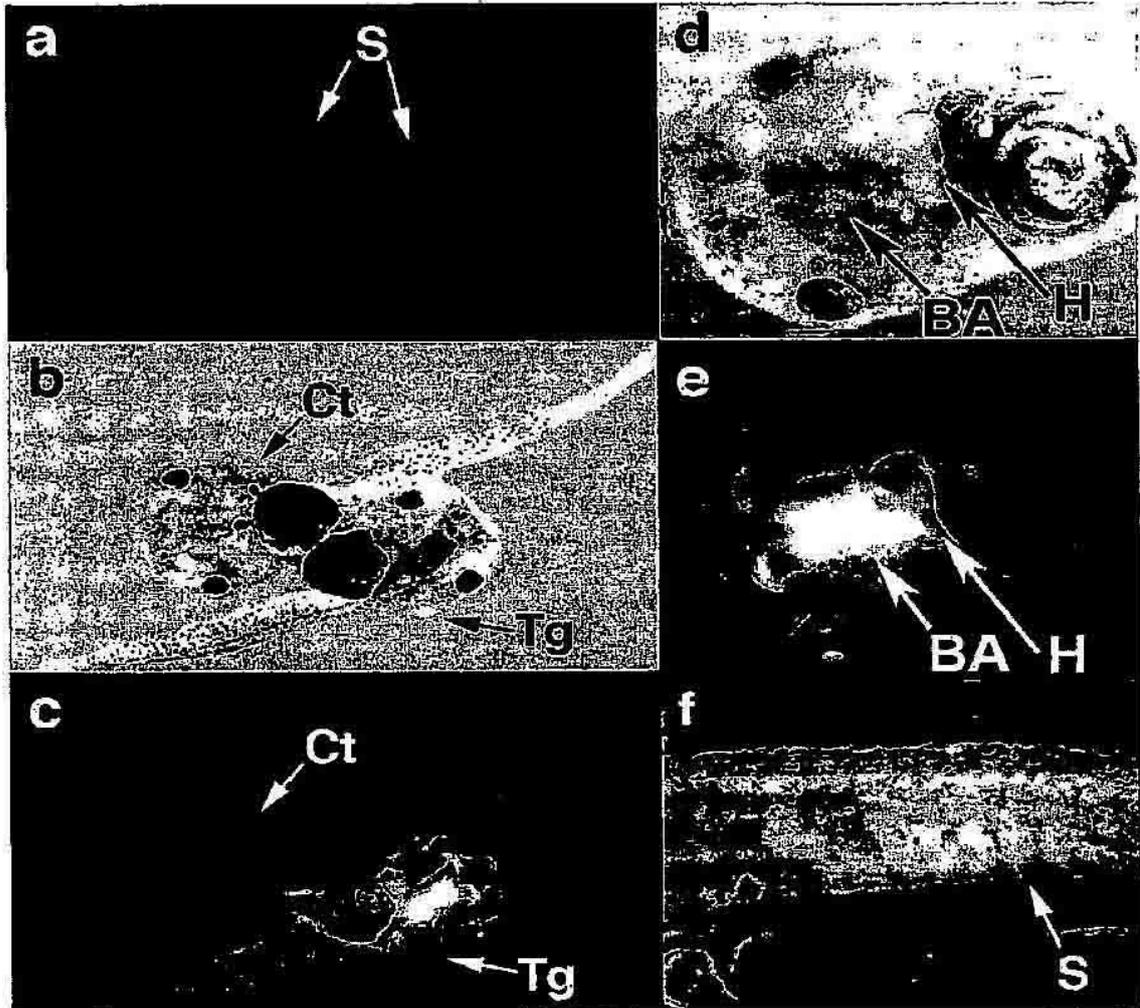


Figura 10G

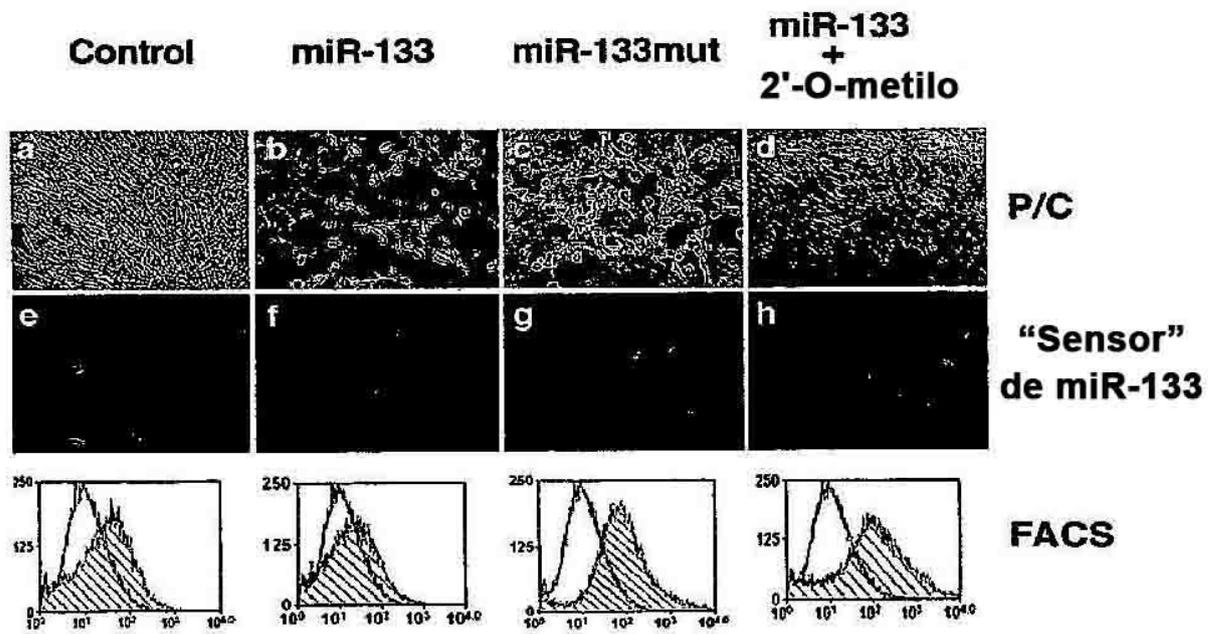
Secuencias potenciadoras de la agrupación miR-1/133 del cromosoma 2

```

1  GAGCAGTTT  CACTAGGCC  ACACAGTATC  ATTGAGCACT  GASCCTGGAA  GGAGACAGAT
61  GGGCCACGTI  TCTCCTCCCT  CTFTCTAGCC  FTCTTCZCC  CTCCCTTTTC  TEATACAITA
121  IATCCTGGCG  GCAGTTTCTC  CTCCCTCCAC  TCCCTCCAGT  TCCCTCCCCA  CTTCATTCTT
181  CCCCAGATC  CATTCTCTT  ATGCCCCCC  CCCCAGAG  CAGGCTTTCC  ATGATACCC
241  RCCAACATG  GCAZACAG  TTACATRAG  ATCAGGARA  AACCTCATA  TCAAGGCTGG
301  AEGAGGCAAC  CCAACAGGAG  GAARAGGCC  CCARAGCAG  GCAAAAAAC  CCCACTGTG
361  TGCTTCTGC  TAGAACAAA  AGCTALCAA  CTATAATGA  TATGCAGAG  ACCCAGCTCA
421  GCTCATCAG  GGTCCGIGT  TGTGTACA  GTTCTGTA  ACCCTGIG  GCTCTGCTA
481  GTGGTCTG  TGGTGTGT  TCTTGGGA  TCTCAACT  CTCGGCTCC  TACAATCTT
541  CTTCCATCT  TCTTGGAGT  TCCCTGGCC  ATGCTGATG  TTYGTTGG  TGGCTGTGT
601  GGGCTCTGC  ATTATCTCC  GTCACTGCT  GGAAGCATC  CCTCTGTA  CAGTTGGTCC
661  ATGCACATG  CTATGAGAT  AGCAGATAT  CACTAGGAT  TACTTATIG  TCTTITTTG
721  CAGTCTGTT  TGGTCTCT  CCGAGTCT  GGGCTGTCA  GTCTGAGT  CCTGGCTTC
781  CAGACATGT  CAGTGTGG  TCCCTTTG  TGGTGTGG  CTCAACTGG  CCAGTCTTG
841  GTTGGCATT  CCAACAGT  CTACACCAC  ATTACCCTAG  CAGTCTCC  AGCCAGACA
901  GATGTACGC  GGAAGGAT  ATGGCTGGT  TATGCTCAG  TCCAGGGCT  GGAAGCTTG
961  CTTGGTAAA  GAGACAGCT  AGTCTGACT  CAGTATCCC  TGTACTAG  AGATCTACT
1021  AGGATACCC  TCACTCCAG  GGCATTTCA  CAGCACTAG  GTTCTGAT  GCCTCTCCA
1081  TACCCCTCC  AATCCAGT  GCCTTCCCA  GAACCTCT  CCCCAGCT  GATCCTAT
1141  GTTCCCTCC  CCACTCCAC  CCACTCCAC  TACAAGCT  TTTCCCTTC  CCAAGAGAT
1201  CACTTACCAG  TTAGTACACA  CCTTTGCT  TTTGGTCTG  GGTACTCA  CTCAGGGTG
1321  AATTGGATT  TTTTITTTG  AGGCTATCC  ATTGTCTGC  AATGTCTAG  ATGTATTIT
1381  TTTTACAGC  TTAGGATTC  TCTCAGAAC  ACATTTCTT  TATCAATAT  TCAATTTGT
1441  CCCAGTTCT  GGCATTTATA  AGGCTGCTAT  GAACATGTT  GAACAGTGT  CTTTGTGTA
      tggTACA
      ca
      (Mutación de MEF)
1501  GGAITGGCA  TCCCTTGGT  ATATGCCAG  GAGTGGTATC  GATGGGTCT  GAGGTAGAEC
1561  AATCCCGAT  TTTCTGAGAA  ACSCCATAT  CTGTTTCAA  AGTGGCTGT  TARGTTCCG
1621  CTCCACCAG  CAACGGAGGA  GTTCTCTCT  TACTCTTCC  ACATTTCAA  CAGTGTGAGC
1681  TGTCACTGT  GTTTTGTAT  TTAGCTTTC  TGCAGGGT  ABAATGAA  CTCRAAGTAG
1741  CTTCATTTG  CATTCTCCT  CTGGCTAAG  AGTGTGACA  TTTCTTAA  TGTTTCTAG
1801  CCAATTGAGA  TTTATCCAT  GAGATTTCT  TTTAGATCT  AACTCCACT  TCTAATTGA
1861  TEATTTGAT  TTTAAAAT  CCCTTTCTC  GAGTCTTA  TGGTITTTG  AATATGCCC
1921  TCTGTCAAT  GTGGAGTTG  TCAAGATCT  TTCCATTCG  GTAGGTTTG  TCTATTGAC
      Caja CarG
1981  AGTGTCTTT  GCTTACAGA  AGCTTTTAC  TTTCAIGAG  TCCATTTAT  TGATTTTGA
      atcTTggT
      ct
      (Mutación de la caja CarG)
2041  TCTTATGTC  TGTGCTATG  ATGTCTATC  AGGAAGTGT  CTCTGTGCC  AATGGTTCA
2101  AGGCTATTC  CCACTTCTC  TTCTATTAG  TCAAGTGT  CTCAITTT  GTTGGGCTT
2161  TEGATCCACT  TAGAGTGG  TTTTGTGAG  AGTGAATAG  ATGATCTAE  TGGCATCTT
2221  CTACATGCAG  AATCCAGTA  AGACCAGCA  CATTATTTG  GGAIGCTTT  TAAATTTT
2281  CGCTTGTGA  TTTCTGCTT  CTTATAAAA  ATCAGGTGT  CACTGATTT  ATTGATCAG
2341  CATTGCTTT  CTGCTGATC  CATGTGGTT  TATGCTATA  GCTCTGAGG  ACAGCTTGA
2401  TCAGGGATG  GATGCCCTG  GACTTCTTT  TATTGTACAG  GAGTATCTA  GGTTAGCTA
2461  TCTTAGTGT  TTTGGTCTC  CACTTGGAT  TAACTATTG  CCTTCAAG  TCEATAGAG
2521  AATGCATGG  GATTTGGTG  GAGATTTAT  TGCATTTGA  GATTTGGAG  GGTGGCCAT
2581  TTTACTATG  TATCCTACC

```

Figura 11



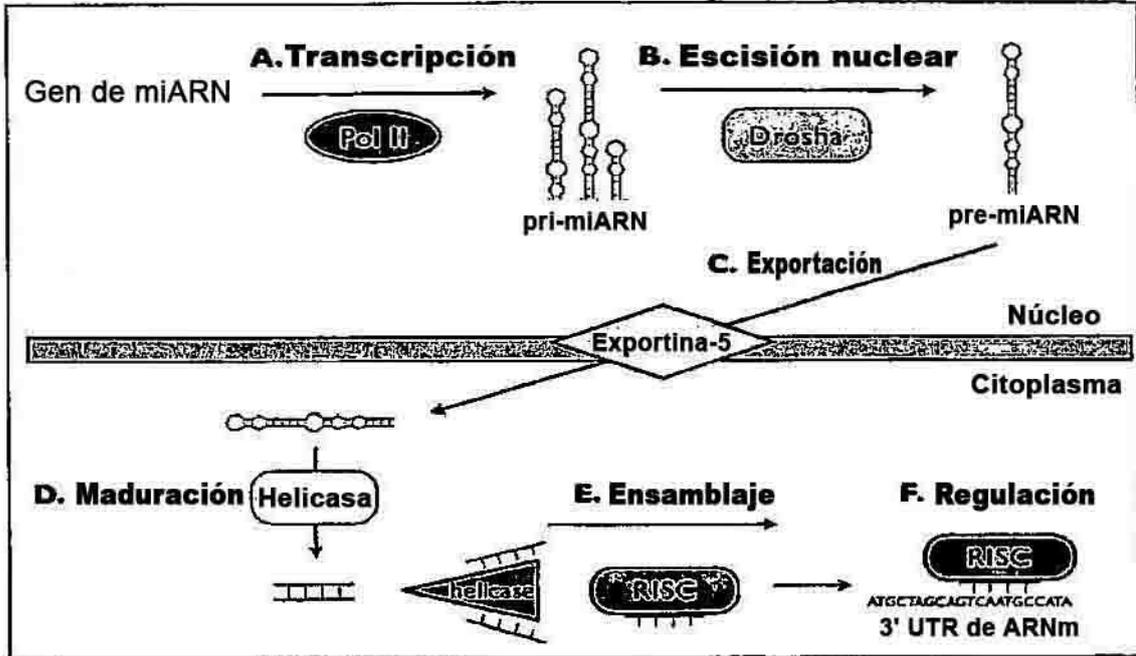


Figura 13

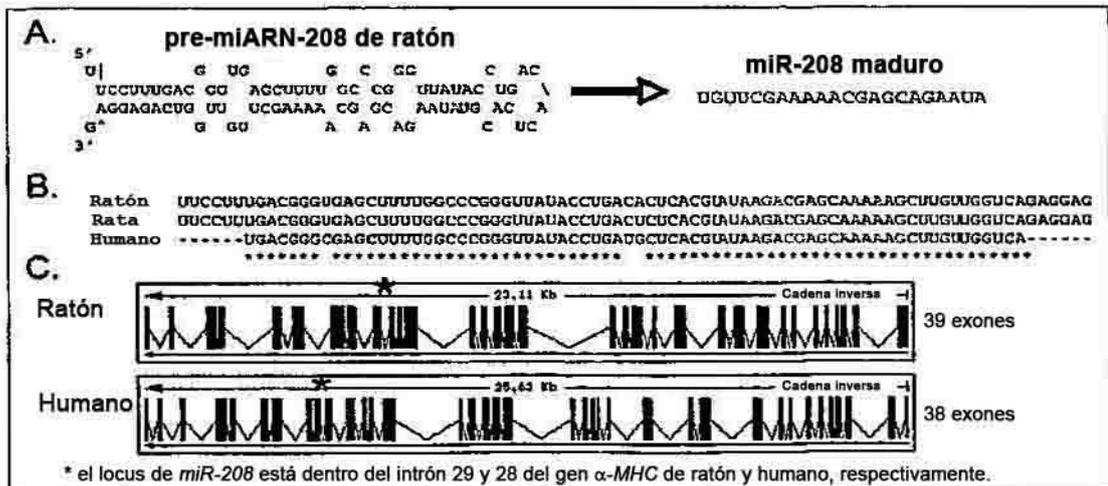


Figura 14

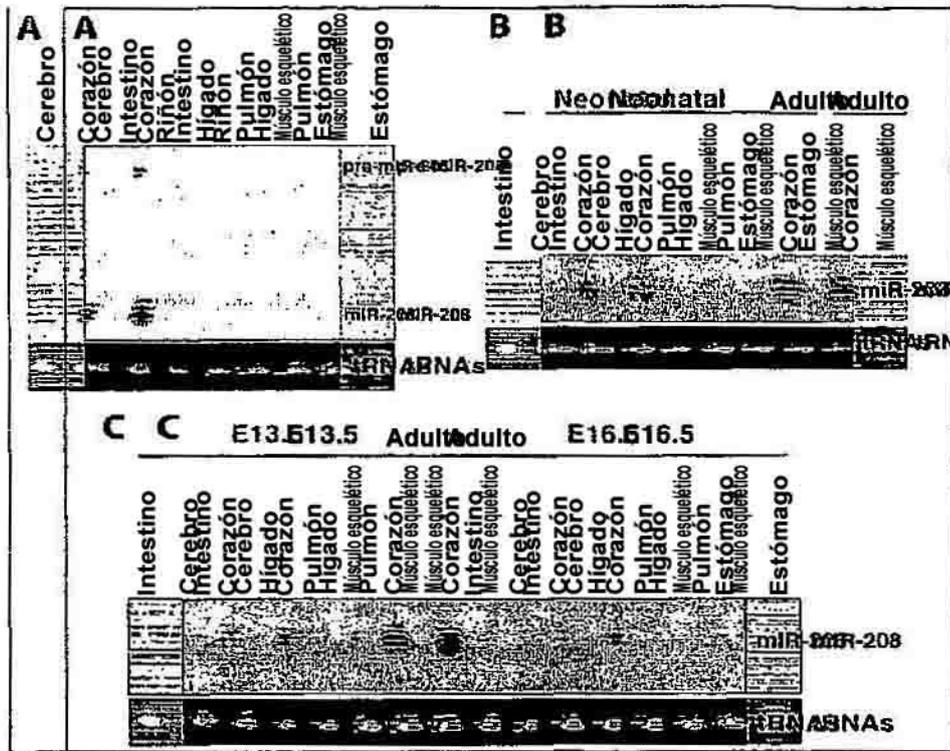


Figura 15

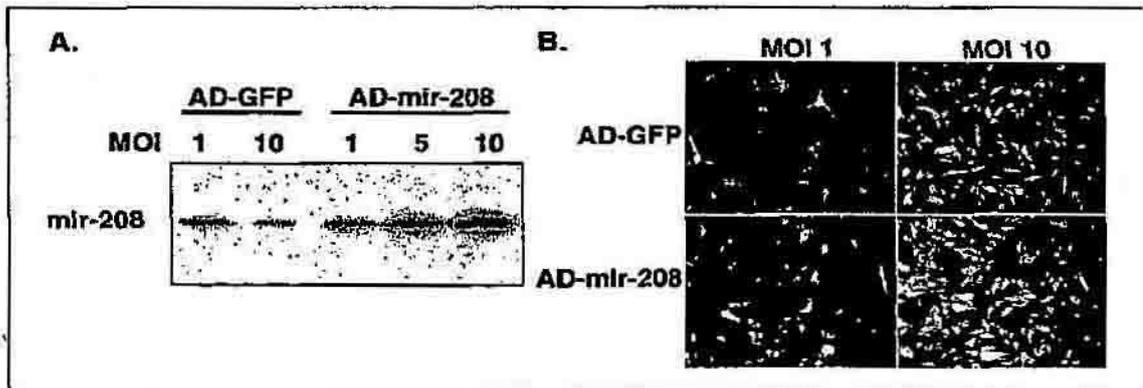


Figura 16



Figura 17

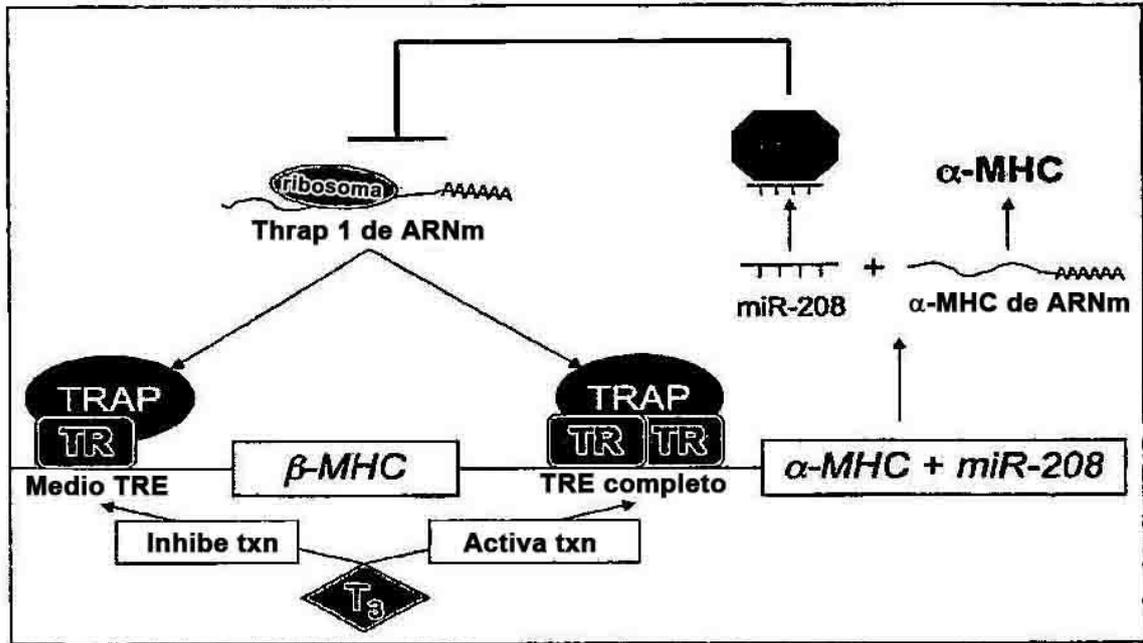


Figura 19

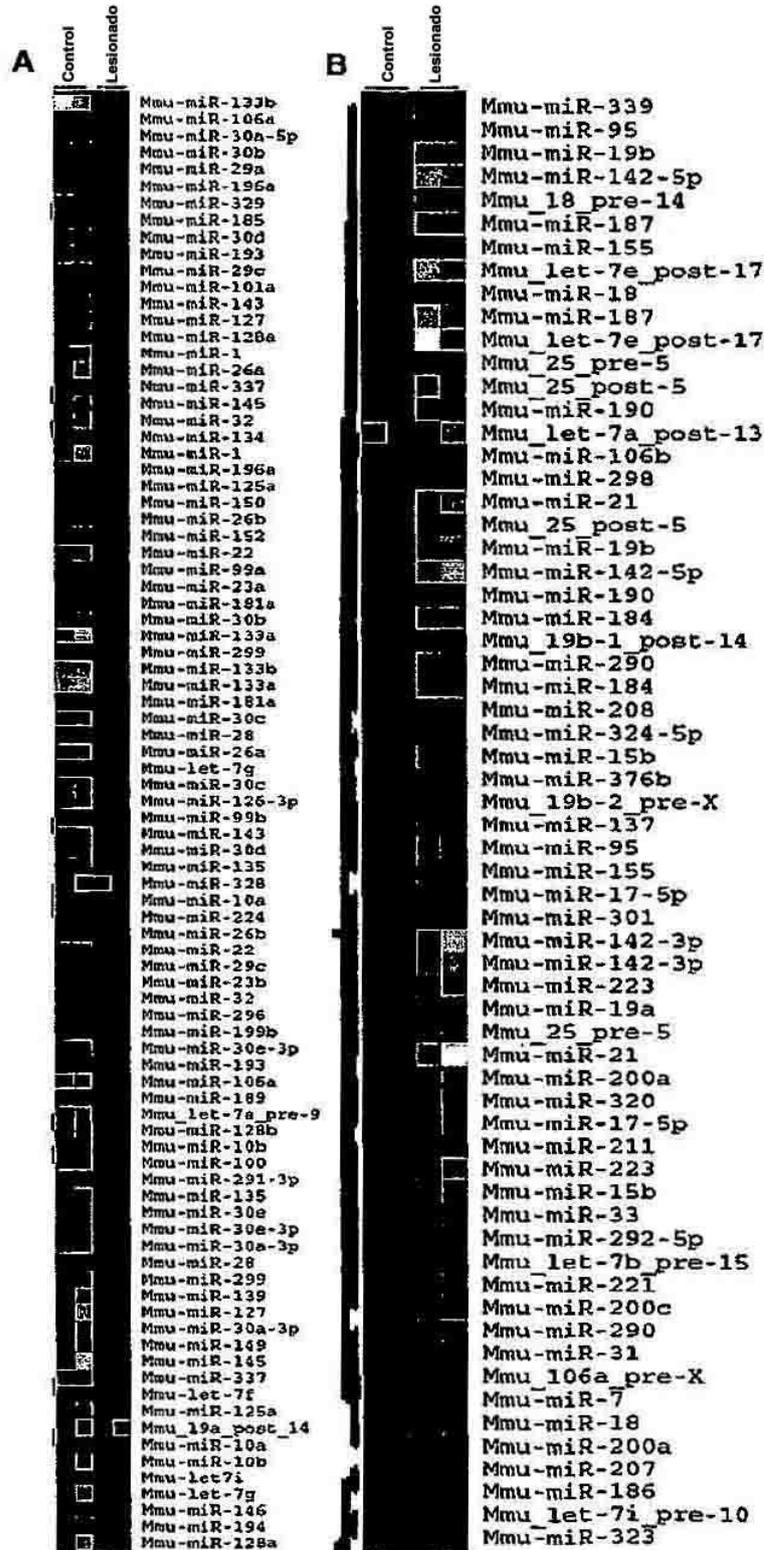


Figura 20

miR-26 (SEQ ID NO:6)

mmu-miR-26a MIMAT0000533
UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC (SEQ ID NO:12)

mmu-miR-26b MIMAT0000534
UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGUU (SEQ ID NO:13)

miR-29 (SEQ ID NO:7)

mmu-miR-29a MIMAT0000535
UAGCACCAUCUGAAAUCGGUU (SEQ ID NO:14)

mmu-miR-29b MIMAT0000127
UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU (SEQ ID NO:15)

mmu-miR-29c MIMAT0000536
UAGCACCAUUUGAAAUCGGU (SEQ ID NO:16)

miR-30 (SEQ ID NO:8)

mmu-miR-30a-3p MIMAT0000129
CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (SEQ ID NO:17)

mmu-miR-30b MIMAT0000130
UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (SEQ ID NO:18)

mmu-miR-30c MIMAT0000514
UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC (SEQ ID NO:19)

mmu-miR-30d MIMAT0000515
UGUAAACAUCCCGACUGGAAG (SEQ ID NO:20)

mmu-miR-30e* MIMAT0000249
CUUUCAGUCGGAUGUUUACAG (SEQ ID NO:21)

miR-128 (SEQ ID NO:9)

mmu-miR-128a MIMAT0000140
UCACAGUGAACCGGUCUCUUU (SEQ ID NO:22)

mmu-miR-128b MIMAT0000675
UCACAGUGAACCGGUCUCUUUC (SEQ ID NO:23)

Figura 21

Figura 22
miR-1 se expresa progresivamente durante la diferenciación de células satélite de músculo esquelético

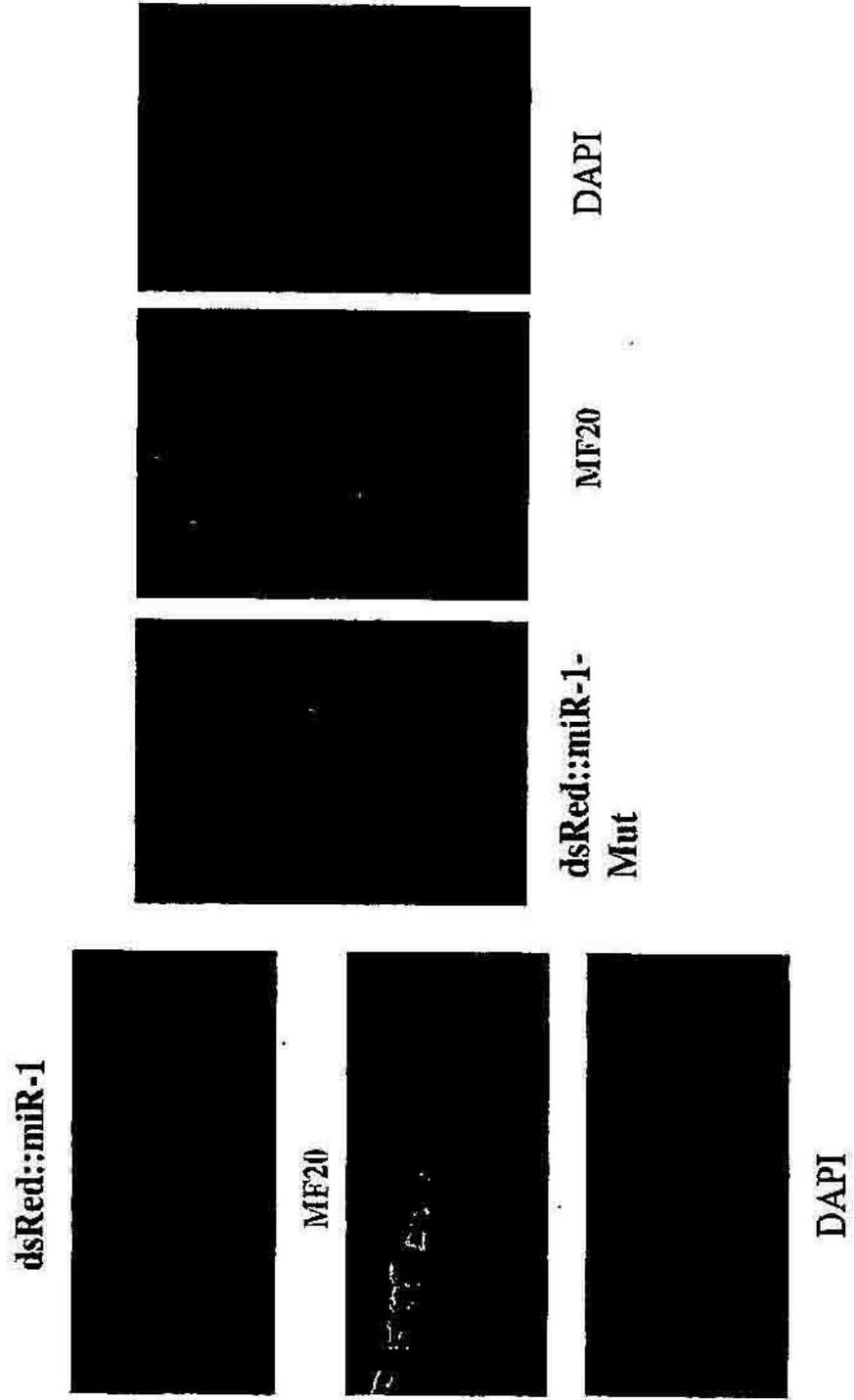


Figura 23

Sistema de expresión de miR-1/206

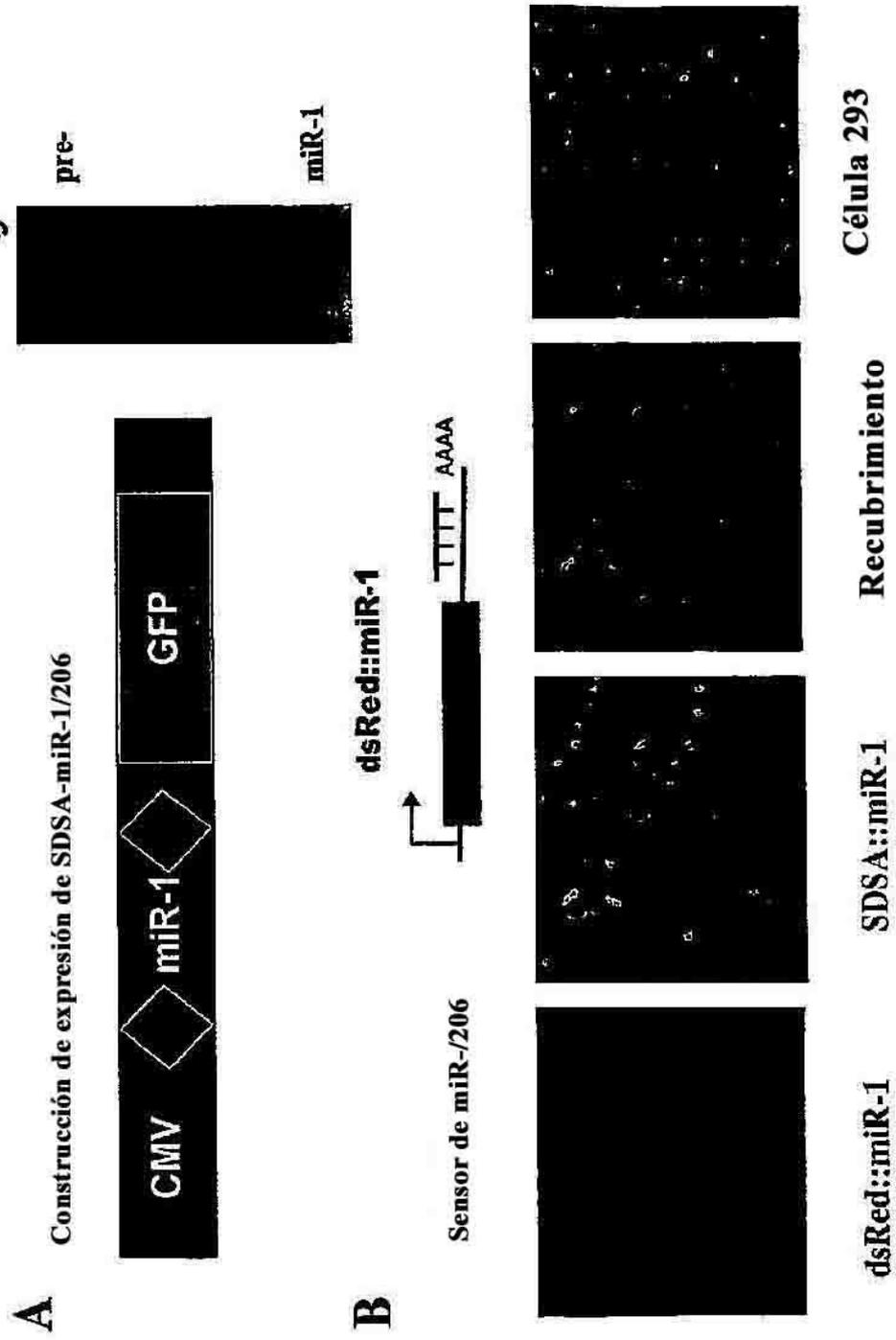


Figura 25

miR-1/206 inhibe la expresión de Pax7, pero no la de Pax3

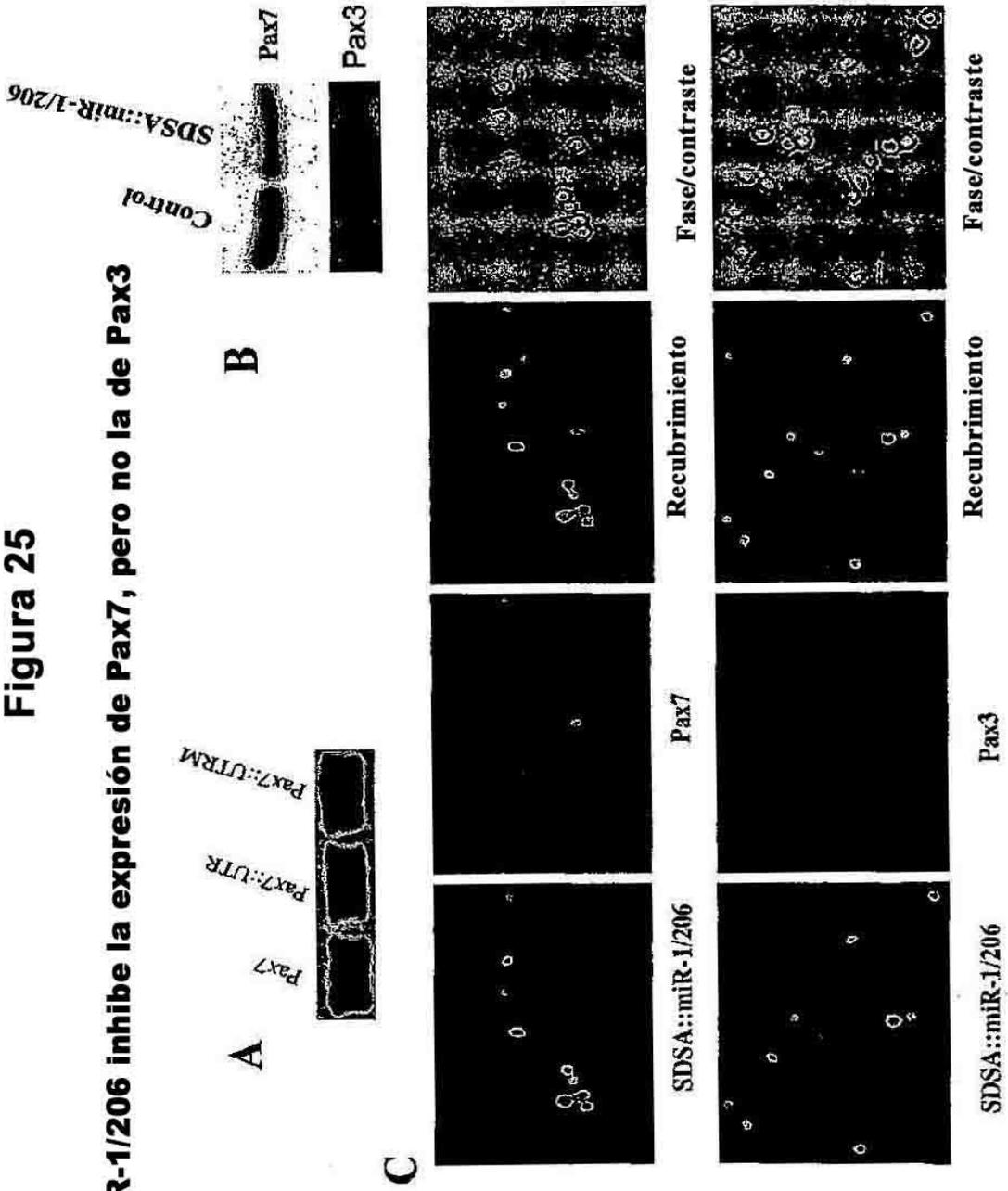


Figura 26

MiR-1/206 inhibe la expresión de BDNF, pero no la de GDNF

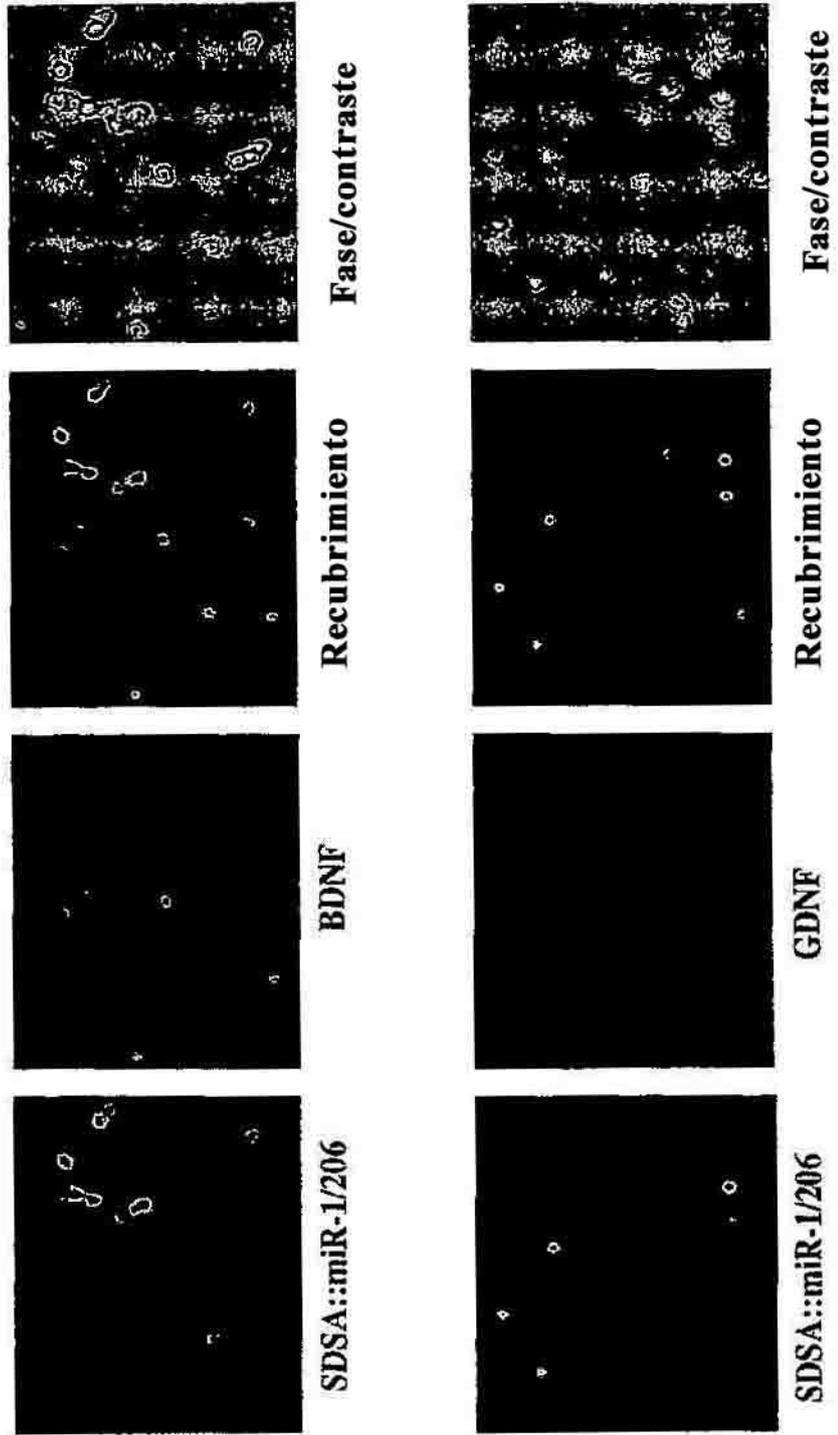


Figura 27

miR-1/206 inhibe la proliferación de células satélite

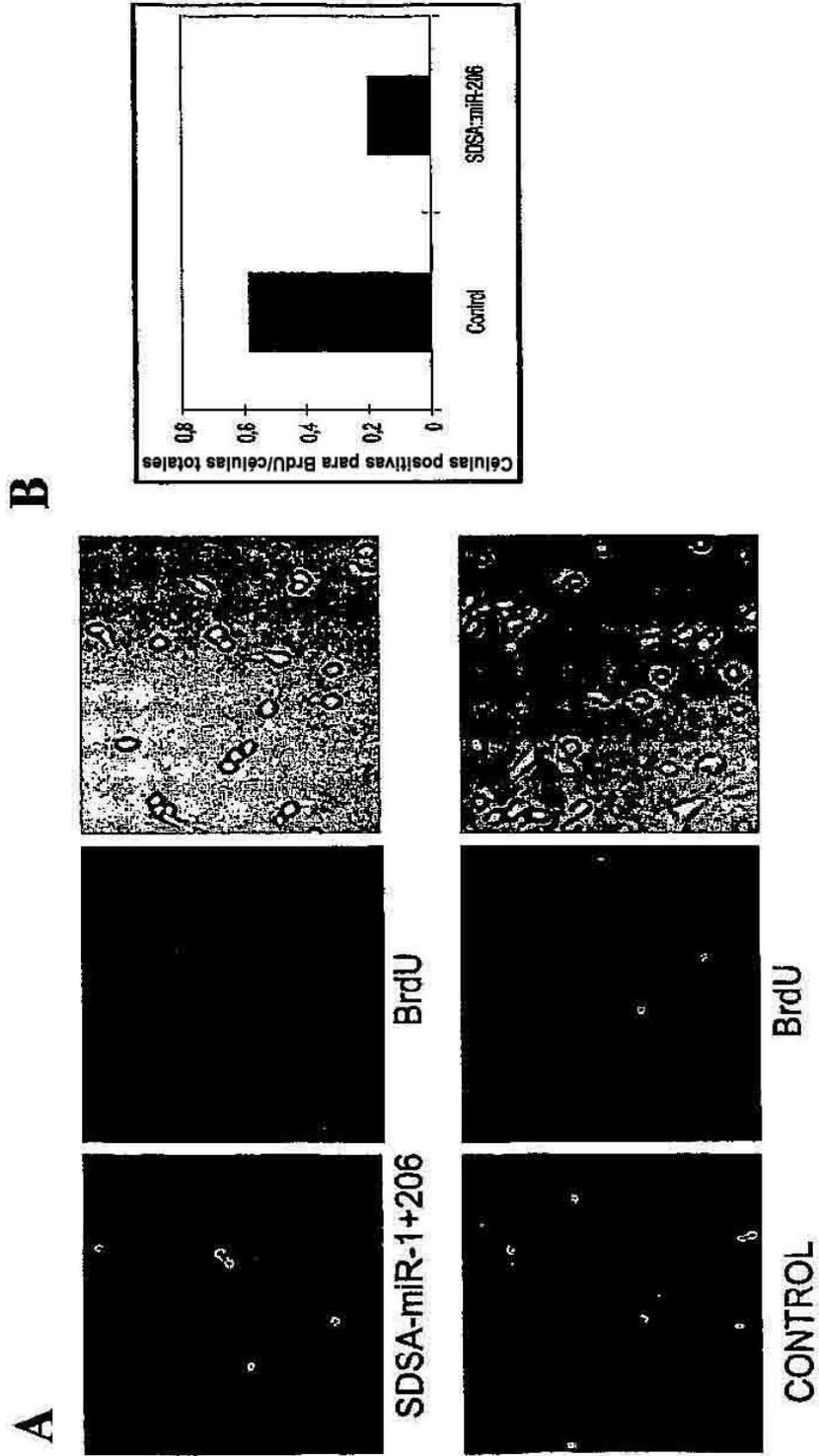
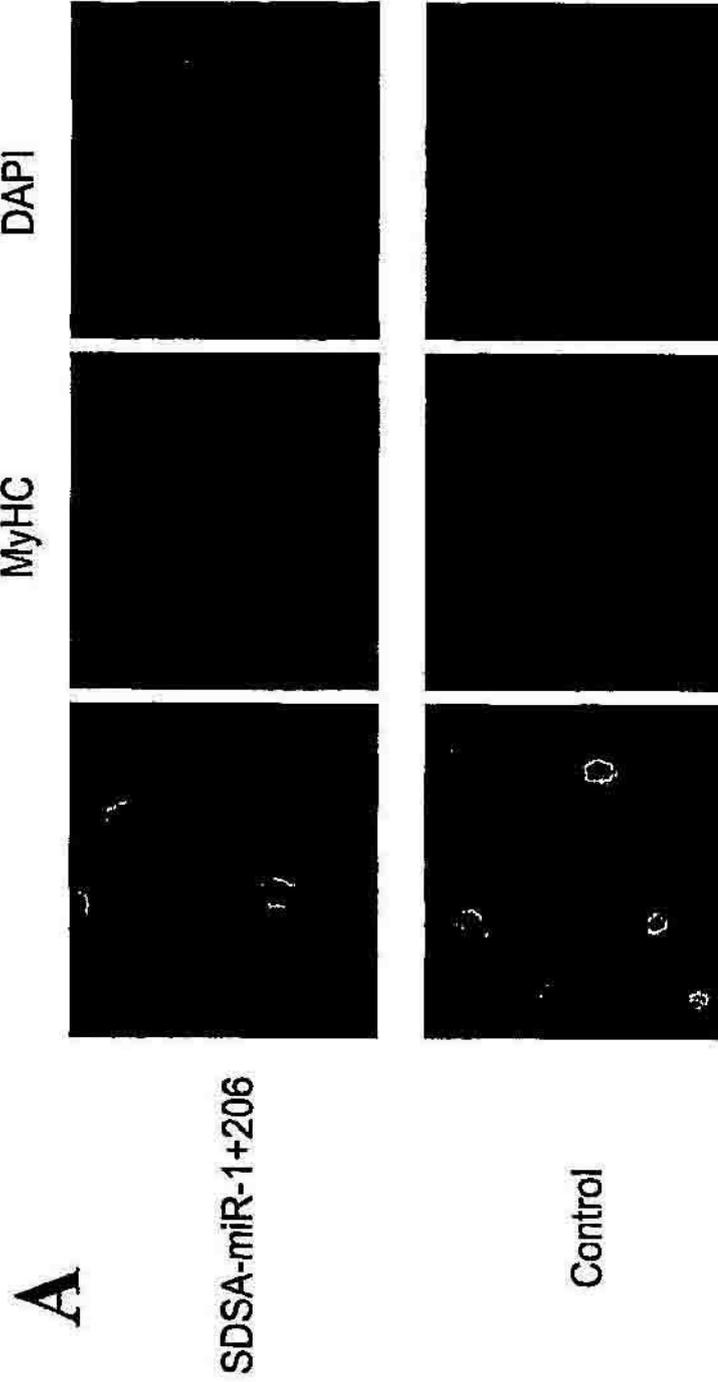


Figura 28
miR-1/206 potencia la diferenciación de células satélite



24 h después de la eliminación de bFGF

Figura 28
B miR-1/206 potencia la diferenciación de células satélite

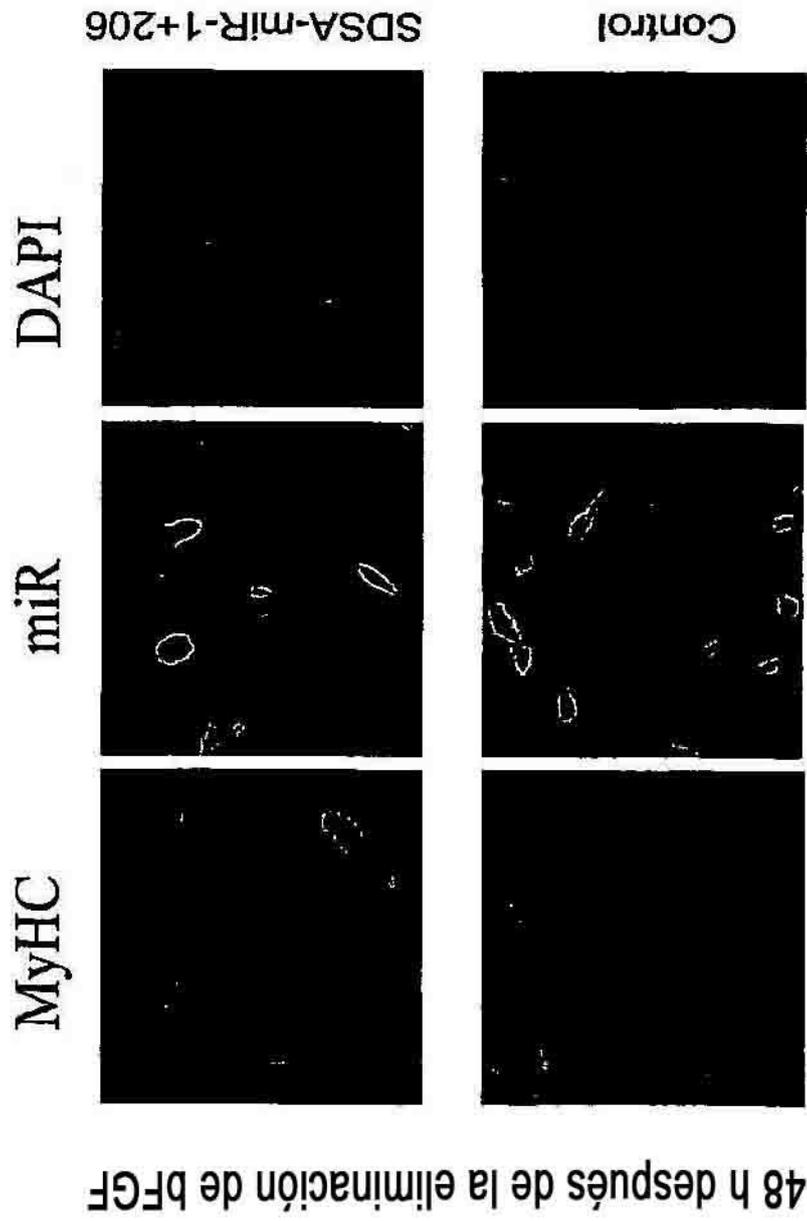
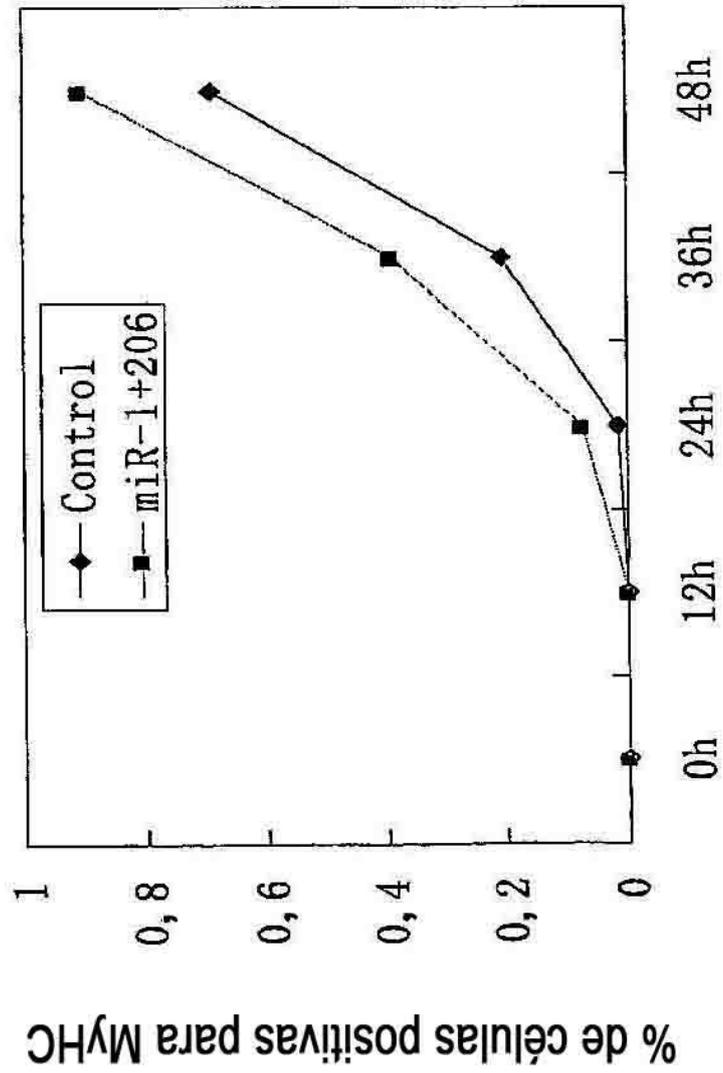


Figura 29

La expresión en exceso de miR-1/206 potencia la cinética de diferenciación de células satélite



Horas después de la eliminación de bFGF

Figura 30

Modelo de trabajo:

La expresión de miR-1/206 facilita la transición del desarrollo de músculo esquelético reprimiendo mensajeros no deseados de BDNF/Pax7, que son perjudiciales para la diferenciación de músculo esquelético.

