

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 054**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09794685 .9**

96 Fecha de presentación: **16.06.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2288703**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2011**

54 Título: **Medios y métodos para contrarrestar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón**

30 Prioridad:

16.06.2008 EP 08158359

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

18.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

18.12.2012

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)

Minderbroedersberg 4-6

6211 LK Maastricht, NL y

ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT

(50.0%)

72 Inventor/es:

DE WINDT, LEON JOHANNES y

DA COSTA MARTINS, PAULA ALEXANDRA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 393 054 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

Medios y métodos para contrarrestar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón

- 5 La invención se refiere a los sectores de la biología molecular y la medicina, más específicamente al tratamiento, demora y prevención de enfermedades del corazón.

10 Las enfermedades del corazón, también denominadas enfermedades cardiovasculares, es una expresión amplia utilizada para describir una gama de enfermedades que afectan al corazón y/o vasos sanguíneos. Las afecciones incluyen enfermedad de las arterias coronarias, ataque al corazón, hipertensión sanguínea, apoplejía e insuficiencia cardíaca. La enfermedad cardiovascular es el asesino mundial número 1 de hombres y mujeres, p. ej. en los Estados Unidos de América es la responsable del 40 por ciento de todas las muertes, más que todas las formas de cáncer combinadas.

15 Una forma común de enfermedad cardiovascular es la enfermedad de las arterias coronarias la cual afecta a las arterias que suministran con sangre al miocardio. A veces, conocidas como CAD (siglas en inglés), la enfermedad de las arterias coronarias es la causa principal de ataques al corazón. Generalmente, esto significa que la sangre que fluye a través de las arterias coronarias ha quedado obstruida, reducido el flujo sanguíneo al miocardio. La causa más común de obstrucciones de este tipo es una afección denominada aterosclerosis, un tipo de enfermedad vascular ampliamente prevenible. La enfermedad de las arterias coronarias y el resultante flujo sanguíneo reducido al miocardio puede conducir a otros problemas cardíacos tales como dolor de pecho (angina) y ataque al corazón (infarto de miocardio).

20 Un ataque al corazón es una lesión al miocardio provocada por una pérdida de suministro de sangre. La expresión médica para el ataque al corazón es "infarto de miocardio", a menudo abreviado como MI (siglas en inglés). Un ataque al corazón se produce habitualmente cuando un coágulo bloquea el flujo de sangre a través de una arteria coronaria – un vaso sanguíneo que alimenta sangre a una parte del miocardio. El flujo sanguíneo interrumpido al corazón puede lesionar o destruir una parte del miocardio.

30 Una enfermedad del corazón que afecta al miocardio propiamente dicho es la denominada cardiomiopatía. Algunos tipos de cardiomiopatía son genéticos, mientras que otros se producen por razones que no se comprenden tan bien. Tipos de cardiomiopatía incluyen la isquémica, que es provocada por pérdida del miocardio debido a un flujo sanguíneo coronario reducido; dilatada, que significa que las cámaras del corazón están dilatadas, hipertrófica, que significa que el miocardio está engrosado; e idiopática, que significa que la causa es desconocida. Uno de los tipos más comunes de cardiomiopatía es la cardiomiopatía idiopática dilatada – un corazón dilatado sin una causa conocida.

40 Las enfermedades del corazón pueden ser adquiridas (en una fase posterior de la vida) o congénitas. Enfermedad del corazón congénita se refiere a una forma de enfermedad del corazón que se desarrolla antes del nacimiento (congénita). Una enfermedad del corazón congénita es una expresión amplia e incluye una amplia gama de enfermedades y afecciones. Estas enfermedades pueden afectar a la formación del miocardio o a sus cámaras o válvulas. Incluyen afecciones tales como el estrechamiento de una sección de la aorta (coartación) u orificios en el corazón (defecto septal atrial o ventricular). Algunos defectos congénitos del corazón pueden manifestarse en el nacimiento, mientras que otros pueden no detectarse hasta una etapa posterior en la vida.

45 Junto al miocardio propiamente dicho, las enfermedades del corazón pueden afectar también a otras estructuras tales como las válvulas del corazón. Cuatro válvulas dentro del corazón mantienen fluyendo a la sangre en la dirección correcta. Las válvulas pueden ser dañadas por una diversidad de afecciones que conducen a un estrechamiento (estenosis), filtración (regurgitación o insuficiencia) o cierre impropio (prolapso). La enfermedad valvular puede ser congénita o las válvulas pueden ser dañadas por afecciones tales como fiebre reumática, infecciones (endocarditis infecciosa), trastornos del tejido conjuntivo y determinadas medicaciones o tratamientos de radiación contra el cáncer.

50 Problemas del ritmo cardíaco (arritmias) se producen cuando los impulsos eléctricos en un corazón que coordina los latidos no funcionan adecuadamente, provocando que dicho corazón lata demasiado rápido, demasiado lento o de manera irregular. Otras formas de enfermedades cardiovasculares pueden provocar indirectamente arritmias.

60 Quizás, la forma más común de enfermedad cardiovascular en el mundo occidental, que afecta aproximadamente a uno de cuatro americanos, es la hipertensión arterial (hipertensión) que significa que la sangre es bombeada con una fuerza excesiva a través de los vasos sanguíneos. A pesar de que potencialmente constituye una amenaza para la vida, es uno de los tipos más prevenibles y tratables de enfermedades cardiovasculares. La hipertensión

también provoca muchos otros tipos de enfermedades cardiovasculares tales como apoplejía e insuficiencia cardiaca.

5 La insuficiencia cardiaca, un trastorno progresivo en el que la lesión del corazón provoca un debilitamiento del sistema cardiovascular, puede resultar de cualquiera de los trastornos cardiacos estructurales o funcionales antes mencionados. Se manifiesta mediante una congestión del fluido o un flujo inadecuado de la sangre a los tejidos como resultado de la incapacidad del corazón de llenar o bombear una cantidad suficiente de sangre a través del cuerpo.

10 Dependiendo del lado del corazón afectado, los síntomas pueden ser diversos y el diagnóstico es imposible basándose solamente en los síntomas. La insuficiencia cardiaca del lado izquierdo tiene como resultado la congestión de las venas pulmonares y síntomas que reflejan esto, así como una deficiente circulación al cuerpo, mientras que la insuficiencia cardiaca del lado de la derecha se presenta, p. ej., con edema periférico y nocturia.

15 La insuficiencia cardiaca puede resultar de una o de la suma de muchas causas. Muchas insuficiencias afectan a ambos lados, tales como la enfermedad del corazón isquémica, arritmias crónicas, cardiomiopatía, fibrosis cardiaca, anemia crónica severa y enfermedad del tiroides, mientras que otras, tales como la hipertensión, enfermedad de la válvula aórtica y mitral y la coartación provocan preferiblemente una insuficiencia cardiaca en el lado izquierdo y una hipertensión pulmonar, y la enfermedad pulmonar o de la válvula tricúspide resulta a menudo en una
20 insuficiencia cardiaca del lado de la derecha.

Estas causas de insuficiencia cardiaca tienen en común el que todas ellas reducen la eficacia del miocardio, o músculo del corazón, a través de una lesión o sobrecarga. Con el tiempo, el incremento resultante en la carga de trabajo producirá cambios en el propio corazón que incluyen, por ejemplo, una capacidad de contracción reducida,
25 un volumen sistólico reducido, una capacidad disponible reducida, ritmo cardiaco incrementado, hipertrofia del miocardio y/o dilatación de los ventrículos. Estos cambios en el corazón tienen como resultado un gasto cardiaco reducido y una sobrecarga incrementada del corazón, lo que aumenta el riesgo de un paro cardiaco y reduce el suministro de sangre al resto del cuerpo.

30 El tratamiento actual de la insuficiencia cardiaca se centra en el tratamiento de los síntomas y signos y en la prevención del progreso de la enfermedad. El tratamiento incluye ejercicio, comer alimentos sanos, reducir los alimentos salados y abstenerse de fumar y de beber alcohol. Además, se puede aplicar un control farmacológico enfocado a síntomas de alivio, a mantener un estado eurolémico y a demorar el progreso de la insuficiencia cardiaca. Los fármacos utilizados incluyen: agentes diuréticos, agentes vasodilatadores, inótrópos positivos,
35 inhibidores de ACE (siglas inglesas de enzima convertidora de angiotensina), bloqueadores beta y antagonistas de aldosterona.

La insuficiencia cardiaca es un trastorno grave que conlleva una esperanza de vida reducida. Muchas formas de insuficiencia cardiaca puede controlarse con la medicación, el cambio en el estilo de vida y la corrección de cualquier trastorno subyacente. Sin embargo, a menudo la insuficiencia cardiaca es una enfermedad crónica y puede empeorar con una infección u otros estresantes físicos. No existe ninguna curación real de la insuficiencia cardiaca.

40 Por lo tanto, existe una necesidad no cubierta de tratamientos alternativos para la insuficiencia cardiaca y las enfermedades del corazón en general.

45 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un tratamiento alternativo, y/o al menos una prevención parcial, de enfermedades del corazón.

Por consiguiente, la presente invención proporciona medios y métodos alternativos para contrarrestar, disminuir, tratar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón.

50 En una realización, la invención proporciona un método para disminuir, contrarrestar, tratar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, que comprende contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad de microARN en una célula.

55 MicroARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN que codifican los genomas de plantas y animales. Estos ARNs ~ 21-meros, altamente conservados, regulan habitualmente la expresión de genes al unirse a las regiones 3'-no traducidas (3'-UTRs) de ARNs específicos. Se piensa que cada uno de los miARN regula múltiples genes y, dado que se presume que cientos de genes de miARN están presentes en eucariotas superiores, la potencial circuitaría reguladora proporcionada por miARN es enorme. Varios grupos de investigación han proporcionado
60 evidencia de que los miARNs pueden actuar como reguladores clave de procesos tan diversos como un desarrollo temprano, proliferación celular y muerte de la célula, apoptosis y metabolismo de las grasas, y diferenciación

celular. Estudios recientes de la expresión de miARN implican miARNs en el desarrollo del cerebro, leucemia linfocítica crónica, adenocarcinoma colónico, linfoma de Burkitt e infección viral, que sugieren posibles enlaces entre miARNs y enfermedades virales, neurodesarrollo y cáncer. Se especula que en eucariotas superiores, el papel de los miARNs para regular la expresión de los genes podría ser tan importante como la de los factores de transcripción.

La expresión aberrante de ARNm, ya sea por una sub- o supra-expresión, puede resultar en muchos tipos de trastornos. Recientemente, se identificaron muchos miARNs diferentes que se refieren a enfermedades específicas. Sin embargo, dado que muchos miARNs regulan varios cientos de genes, para la mayoría de las enfermedades relacionadas con el miARN se desconoce hasta la fecha qué gen es regulado por el miARN identificado y, en última instancia, es el responsable de la enfermedad. Por ejemplo, Sayed et al. (Circ Res 2007; 100: 416-424) han identificado, entre otros, que varios miARNs muestran una expresión incrementada o disminuida durante la hipertrofia cardíaca. Los miARNs supra-regulados más destacados son miR-199a, miR-199a*, miR-199b, miR-21 y miR-214. Hasta la presente invención, sin embargo, no se sabía qué genes pueden ser desregulados por parte de la expresión aberrante de estos miARNs y si la supra-regulación o sub-regulación de cualquiera de estos miARNs provoca una enfermedad del corazón o, por ejemplo, son sólo el resultado de una enfermedad del corazón.

La presente invención proporciona por vez primera el conocimiento de que la expresión incrementada de microARN, por ejemplo miR-199b, provoca enfermedades del corazón y que la inhibición de dicho microARN inhibe la hipertrofia cardíaca. La presente invención proporciona, además, el conocimiento de que la quinasa regulada por fosforilación en tirosina de doble especificidad 1A (Dyrk1a) es un objetivo directo de miR-199b. Por ejemplo, se demuestra que un aumento en la expresión de miR-199b provoca una sub-regulación de Dyrk1a, y que esta sub-regulación de Dyrk1a provoca, entre otras cosas, la hipertrofia de células del miocardio, lo cual conduce finalmente a la insuficiencia cardíaca. El gen Dyrk1a está localizado en el cromosoma 21 humano y, a pesar de que su función no se comprende por completo, ha sido asociado con el desarrollo (embriológico) del sistema nervioso. Su sobre-expresión ha sido asociada con déficits de aprendizaje y de memoria del síndrome de Down, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y alguna otra enfermedad neurológica rara (p. ej. enfermedad de Pick). Todas las enfermedades actualmente asociadas con la expresión aberrante de Dyrk1a son de origen neurológico. Hasta la presente invención, Dyrk1a nunca ha sido asociado con una enfermedad del corazón, ni que hablar de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, la presente invención proporciona el conocimiento de que un aumento de Dyrk1a es capaz de prevenir, disminuir o demorar la hipertrofia del miocardio y, así, de la insuficiencia cardíaca. El incremento de la expresión de Dyrk1a se puede conseguir directa o indirectamente, por ejemplo inhibiendo miR-199b.

Ahora que la invención ha proporcionado el conocimiento de que la inhibición de Dyrk1a conduce a la hipertrofia cardíaca y que el incremento de la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a y/o la inhibición de un microARN capaz de inhibir Dyrk1a es capaz de disminuir dicha hipertrofia cardíaca, en una primera realización, la invención proporciona un método para tratar, disminuir, contrarrestar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de un microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. Por lo tanto, un inhibidor de un microARN, siendo capaz dicho microARN de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a, es particularmente adecuado para uso como un medicamento. Por lo tanto, se proporciona además un inhibidor de un microARN para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de enfermedades del corazón, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. También se proporciona el uso de un inhibidor de este tipo para la preparación de un medicamento. Así, una realización proporciona un uso de un inhibidor de un microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a, para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "inhibidor de microARN" comprende compuestos que son capaces de inhibir, o al menos inhibir parcialmente la expresión, la cantidad y/o la actividad de microARN. En el caso de que la expresión de microARN provoque, agrave y/o mantenga una afección patológica, la inhibición o la inhibición parcial de la expresión de dicho microARN contrarrestará, disminuirá, demorará o evitará, al menos en parte, dicha afección patológica. Si se incrementa la expresión de un microARN en un individuo en comparación con una situación normal, sana, la expresión de dicho microARN se restablece preferiblemente a un valor normal, preferiblemente al nivel de expresión presente en dicho individuo antes de que tuviera lugar dicho incremento.

La inhibición de un microARN se consigue a través de varios métodos. Por ejemplo, se utiliza una molécula de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte funcional de dicho microARN. Dicha parte funcional comprende al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos. Después de la administración a una célula, dicha molécula de ácido nucleico se une entonces a dicho microARN, contrarrestando, retardando y/o al menos inhibiendo en parte con ello la unión de dicho microARN al

gen diana y, con ello, contrarrestando la función de dicho microARN, es decir, la regulación del gen. Una persona experta en la técnica es conocedora de diversos métodos de inhibir o inhibir parcialmente un microARN. Ejemplos no limitantes son, por ejemplo, el uso de un oligo ácido nucleico bloqueado (LNA – siglas en inglés) en el que está presente un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4', en que el puente “bloquea” la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Además, ejemplos no limitantes, comprenden un oligo morfolino, una molécula antisentido modificada que no degrada su molécula de ARN diana, y un oligo ARN 2'-O-metilo.

Por lo tanto, en una realización preferida, se proporcionan un inhibidor, un uso y/o un método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos, que es complementaria a dicho microARN.

Existen varios cientos de distintas moléculas de microARN y sus precursores están formando racimos juntos en base a su distancia relativa en el genoma: en general, los precursores se colocan en el mismo racimo si están separados uno de otro 50 kb o menos. Dado que la invención proporciona el conocimiento de que Dyrk1a es una diana directa de miR-199b, en una realización preferida la invención proporciona un inhibidor de un microARN para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de enfermedades del corazón, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-199b. Por lo tanto, también se proporciona un inhibidor, uso y/o método de acuerdo con la presente invención, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-199b.

Un inhibidor de un microARN es especialmente útil si una cantidad eficaz es capaz de alcanzar un microARN que se supone ha de inhibir. Dado que dicho microARN está típicamente presente dentro de una célula, dicho inhibidor es capaz preferiblemente de inhibir dicho microARN dentro de dicha célula. Dado que dicho inhibidor de microARN es especialmente útil para el tratamiento o la prevención de enfermedades del corazón, dicho inhibidor es incluso más preferiblemente capaz de inhibir la expresión, cantidad y/o actividad de dicho microARN dentro de una célula del miocardio. En una realización, dicho inhibidor es capaz de ser introducido en dicha célula, preferiblemente una célula del miocardio. En una realización, dicho inhibidor de microARN es por sí mismo capaz de penetrar en una membrana celular y entrar en una célula, preferiblemente una célula del miocardio. Sin embargo, también es posible modificar dicho inhibidor de modo que, después de ello, sea capaz de entrar en una célula, preferiblemente una célula del miocardio. Sin embargo, esto no es necesario, ya que se conocen muchos sistemas de transporte capaces de introducir un compuesto en una célula.

Así, en una realización preferida, se proporciona un inhibidor, un uso y/o un método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar, inhibir y/o disminuir la expresión, cantidad y/o actividad de dicho microARN en una célula, más preferiblemente en una célula del miocardio. Una célula del miocardio, también denominada una célula del músculo cardíaco o un cardiomiocito, es una célula similar a, que procede de o que se deriva de una célula muscular que en una situación natural está presente en el corazón de un organismo vertebrado. Dicha célula no necesita ser directamente obtenida del tejido del corazón, ya que también es posible cultivar y/o almacenar este tipo de células *in vitro*.

Métodos para introducir un inhibidor de un microARN en una célula son conocidos en la técnica. Métodos para introducir inhibidores, preferiblemente ácido nucleico antisentido, comprenden, por ejemplo, la transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación o transfección mediada por liposomas. Alternativamente, se emplea la inyección directa del inhibidor. Sin embargo, preferiblemente, un ácido nucleico que es un inhibidor y/o que codifica un inhibidor, se introduce en una célula mediante un vector, preferiblemente un vector viral. En la técnica se conocen diversos términos que se refieren a la introducción de ácido nucleico en una célula por parte de un vector. Ejemplos de términos de este tipo son “transducción”, “transfección” y “transformación”. Técnicas para generar un vector con una secuencia de ácidos nucleicos y para introducir dicho vector en una célula se conocen en la técnica. Genes marcadores tales como, por ejemplo, genes de resistencia o sensibilidad a antibióticos y/o genes que codifican marcadores tales como antígenos de la superficie celular o proteínas fluorescentes tales como la proteína de fluorescencia verde se utilizan preferiblemente para identificar células que contengan el ácido nucleico introducido, tal como se conoce bien en la técnica.

Preferiblemente, se proporciona un inhibidor de acuerdo con la invención que es capaz de ser introducido en una célula de mamífero *in vivo*. Ejemplos no limitantes de métodos de acuerdo con la invención son el acoplamiento de dicho inhibidor a péptidos que penetran en las células, o el uso de liposomas que contienen dicho inhibidor. Preferiblemente, dicho inhibidor fija como objetivo células del miocardio, por ejemplo utilizando partículas artificiales similares a HDL unidas a dicho inhibidor, potenciando el suministro al miocardio.

La inhibición de un microARN en una célula, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a, conduce a un aumento o restablecimiento de la expresión de Dyrk1a en dicha célula. Por lo tanto, en

una realización preferida, se proporciona un inhibidor, uso y/o método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor de microARN es capaz de aumentar y/o restablecer la expresión de Dyrk1a en una célula. Con el fin de ser capaz de contrarrestar la función de un microARN en una célula, dicho inhibidor es preferiblemente capaz de penetrar en el núcleo. Generalmente, se acepta que pequeñas moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas antisentido tales como los oligos LNA, morfolino o ARN 2'-O-metilo antes mencionados pueden moverse libremente entre el citosol y el núcleo. Sin embargo, en una realización, se modifica un inhibidor que no es capaz de moverse libremente entre el citosol y el núcleo, de modo que fije como objetivo y penetre en la membrana nuclear. Métodos para fijar como objetivo el núcleo son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de un vector de fijación como objetivo nuclear tal como un vector de adenovirus.

En una realización preferida, se proporciona un inhibidor de un microARN, un uso y/o un método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido. Preferiblemente, se utiliza una molécula de ácido nucleico antisentido contra un microARN capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. Dicha molécula antisentido comprende preferiblemente al menos 15 nucleótidos. Incluso más preferiblemente, dicha molécula antisentido comprende al menos 18 nucleótidos. Lo más preferiblemente, dicha molécula antisentido comprende al menos 20 nucleótidos.

Tal como se ha dicho antes, la invención proporciona el conocimiento de que miR-199b disminuye la expresión de Dyrk1a que está implicado en y/o potencia enfermedades del corazón. Por lo tanto, un inhibidor de la invención inhibe preferiblemente miR-199b. Por lo tanto, también se proporcionan un inhibidor, uso y/o método de acuerdo con la invención, en donde dicho microARN es miR-199b. Preferiblemente, dicho inhibidor de miR-199b comprende una secuencia de ácidos nucleicos capaz de unirse a miR-199b bajo condiciones fisiológicas. La Figura 6A comprende un ejemplo no limitante de una secuencia que es capaz de unirse a miR-199b. Habitualmente se piensa que con el fin de poder unirse e inhibir la función de microARN, se permite que un ácido nucleico antisentido tenga unos pocos errores de apareamiento (preferiblemente 1 ó 2). Así, por ejemplo en el caso de una secuencia según se representa en la Figura 6A, al menos 20 nucleótidos son preferiblemente idénticos a la secuencia complementaria de miR-199b. Además de ello, se permite que un ácido nucleico antisentido sea algo más corto que su secuencia diana. Un antisentido contra miR-199b es preferiblemente de al menos 20 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, en una realización preferida se proporciona un inhibidor, uso y/o método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia con una longitud de al menos 18, preferiblemente al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos 18, preferiblemente al menos 20 nucleótidos de miR-199b; o el complemento de la misma. En una realización, dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% a al menos parte de una secuencia mostrada en la Figura 6A, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos. Dicha secuencia de ácidos nucleicos es, preferiblemente, al menos un 90% idéntica a la secuencia GAACAGGUAGUCUAAACACU.

Una realización particularmente preferida proporciona un inhibidor, un uso y/o un método de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor comprende:

- una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte de la secuencia CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (hsa-miR-199b-5p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos, y/o
- una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte de la secuencia ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (hsa-miR-199b-3p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos. Una secuencia de ácidos nucleicos de este tipo con una longitud de al menos 20 nucleótidos es particularmente adecuada para contrarrestar miR-199b, aumentando y/o restableciendo con ello la expresión de Dyrk1a en una célula. Por lo tanto, como resultado, dicha secuencia de ácidos nucleicos es particularmente adecuada para contrarrestar enfermedades del corazón y para la preparación de un medicamento para contrarrestar y/o prevenir enfermedades del corazón.

La expresión "% de identidad de la secuencia" se define en esta memoria como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntico con los nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos de interés después de alinear las secuencias e introducir opcionalmente huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de la secuencia. Métodos y programas de ordenador para las alineaciones son bien conocidos en la técnica. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "secuencia de ácidos nucleicos" y "nucleótidos" abarca también moléculas no naturales basadas en y/o derivadas de secuencias de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos artificialmente modificadas, ácidos nucleicos peptídicos así como secuencias de ácidos nucleicos que comprenden al menos un nucleótido modificado y/o nucleótido no natural tal como, por ejemplo, inosina.

Un inhibidor tal como se describe antes es, así, especialmente adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente insuficiencia cardiaca. En una realización, la invención proporciona, por lo tanto, un uso de un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente la insuficiencia cardiaca. En una realización preferida, se proporciona un uso de acuerdo con la invención en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico que es complementaria a al menos 15 nucleótidos, preferiblemente a al menos 18 nucleótidos, lo más preferiblemente a al menos 20 nucleótidos de dicho microARN. Se proporciona, además, un uso de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-199b. En una realización preferida, dicho inhibidor es capaz de inhibir o disminuir la expresión de dicho microARN en una célula, aumentando o restableciendo con ello preferiblemente la expresión de Dyrk1a en dicha célula. Dicha célula es preferiblemente una célula del miocardio. Todavía en otra realización preferida, se proporciona un uso de acuerdo con la invención, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido con una longitud de al menos 20 nucleótidos, preferiblemente con al menos una identidad de la secuencia del 90% con una secuencia mostrada en la Figura 6A o el complemento de la misma. Secuencias de ácidos nucleicos antisentido particularmente preferidas son secuencias con una longitud de al menos 20 nucleótidos, con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte de la secuencia CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (hsa-miR-199b-5p) o ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (hsa-miR-199b-3p) o el complemento de cualquiera de estas secuencias, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos. En una realización preferida, la invención proporciona, por lo tanto, un uso de una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte de la secuencia CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (hsa-miR-199b-5p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos, para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente la insuficiencia cardiaca. Otra realización preferida proporciona un uso de una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos una parte de la secuencia ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (hsa-miR-199b-3p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos, para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente la insuficiencia cardiaca.

Con un uso de acuerdo con la invención es así posible tratar, disminuir, demorar o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón.

En una realización, la invención proporciona un método para tratar, disminuir, contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. En una realización, a dicho individuo se le ha diagnosticado una enfermedad del corazón antes del tratamiento. Por lo tanto, también se proporciona un método que comprende determinar si un sujeto está padeciendo una enfermedad del corazón y, si aparece que dicho sujeto está padeciendo la enfermedad del corazón, tratar a dicha persona con un método de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, se proporciona un método de acuerdo con la invención en el que dicho inhibidor comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 18, lo más preferiblemente al menos 20 nucleótidos que es al menos 90% complementaria a dicho microARN, secuencia de ácidos nucleicos que es preferiblemente capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-199b. Dicha secuencia de ácidos nucleicos es preferiblemente al menos 90% complementaria a miR-199b. Incluso de manera más preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención, en el que dicho inhibidor es capaz de inhibir o disminuir la expresión de dicho microARN en una célula, incluso más preferiblemente en una célula del miocardio. Todavía en otra realización preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención, en el que dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido, preferiblemente con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con una secuencia mostrada en la Figura 6A o el complemento de la misma.

En otra realización de la invención, se proporciona un método para contrarrestar la expresión de microARN, en el que un inhibidor de acuerdo con la invención se expresa en una célula diana. En una realización, se utiliza un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende y/o codifica dicho inhibidor de acuerdo con la invención.

La invención proporciona también, así, un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, secuencia que comprende o codifica un inhibidor de la expresión de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. Dicho vector comprende preferiblemente un vector retroviral, adenoviral, viral adeno-asociado o lentiviral.

Tal como ya se ha descrito antes, se prefiere aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a con el fin de contrarrestar, demorar o al menos prevenir en parte enfermedades del corazón. Esto se puede conseguir de modo indirecto, por ejemplo disminuyendo la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b, o de manera directa, a través del aumento de la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a. La expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b se contrarrestan preferiblemente mediante una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90% complementaria a al menos 18, preferiblemente a al menos 20 nucleótidos de miR-199b. Por lo tanto, se proporciona, además, un vector de acuerdo con la invención, que comprende una molécula de ácido nucleico con una longitud de al menos 18 nucleótidos que es al menos 90% complementaria a al menos 18 nucleótidos del microARN miR-199b. Dicho vector comprende preferiblemente:

- una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos una parte de la secuencia CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (hsa-miR-199b-5p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos, y/o
- una secuencia de ácidos nucleicos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos una parte de la secuencia ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (hsa-miR-199b-3p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos.

Como se ha dicho antes, también es posible aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a directamente. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante el uso de un vector que comprende o codifica un compuesto que incrementa Dyrk1a.

Una realización proporciona un vector de acuerdo con la invención que comprende un promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero. En una realización, dicho promotor está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico capaz de incrementar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a. En otra realización, dicho promotor está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-199b. En una realización particularmente preferida, un vector de acuerdo con la invención es adecuado para la expresión en una célula del miocardio. En ese caso, dicho vector comprende preferiblemente un promotor adecuado para la expresión en una célula del miocardio. En una realización, un vector de acuerdo con la invención comprende un promotor ubicuo o un promotor específico para el órgano, preferiblemente un promotor específico para células del miocardio. Un vector de este tipo es especialmente útil para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un uso de un vector de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón.

La invención proporciona también una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor de acuerdo con la invención. Dicha célula comprende preferiblemente una célula de mamífero. En una realización particularmente preferida, dicha célula comprende una célula del miocardio. Una célula aislada de este tipo que comprende un vector y/o un inhibidor de acuerdo con la invención es especialmente útil para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón. Por lo tanto, en una realización, se proporciona una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor de acuerdo con la invención para el uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.

Preferiblemente, dicha célula aislada comprende una célula del miocardio, una célula progenitora del miocardio o una célula madre. En una realización, una célula del miocardio, progenitora o madre de este tipo se inyecta en un miocardio, preferiblemente en una parte dañada de un corazón, en donde dicha célula es capaz de expandirse y reparar la parte dañada. En otra realización, una célula de acuerdo con la invención se inyecta en la circulación de un individuo, permitiendo que la célula se injerte en el corazón de dicho individuo, preferiblemente en una parte dañada del corazón y repare (al menos parcialmente) la parte dañada.

En una realización preferida, se proporciona una célula aislada de acuerdo con la invención en donde está presente una secuencia de ácidos nucleicos que comprende o codifica un inhibidor de acuerdo con la invención. Dicha secuencia de ácidos nucleicos está preferiblemente enlazada operativamente a un elemento regulador exógeno que es específico para células del miocardio. Dicho elemento regulador exógeno está, por ejemplo, operativamente enlazado a un ácido nucleico antisentido de miR-199b, ácido nucleico antisentido que es al menos un 90% idéntico a al menos 18 nucleótidos, preferiblemente a al menos 20 nucleótidos de miR-199b, con el fin de potenciar la expresión de dicho ácido nucleico antisentido en células del miocardio. Un uso de un elemento regulador exógeno que es específico para células del miocardio proporciona diversas ventajas. Por ejemplo, después de la transducción de células madre y/o células progenitoras, un inhibidor de acuerdo con la invención no será expresado en todos los tipos de células diferenciadas, sino principalmente en células del miocardio, facilitando el enriquecimiento y/o aislamiento de células del miocardio.

Una célula aislada de acuerdo con la invención que comprende un vector y/o un inhibidor es también especialmente útil para la preparación de un medicamento, preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón. Así, la invención proporciona también un uso de una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento, preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

Además de ello, se proporciona un método para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un vector y/o una célula de acuerdo con la invención. La invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a, comprendiendo además dicha composición farmacéutica un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho inhibidor comprende preferiblemente un inhibidor de miR-199b, preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 18, preferiblemente al menos 20 nucleótidos, que es al menos 90% idéntica a al menos 18, preferiblemente al menos 20 nucleótidos de miR-199b o el complemento del mismo. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector y/o una célula aislada de acuerdo con la invención, que comprende, además, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Vehículos, diluyentes, excipientes y similares adecuados son comúnmente conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden encontrar fácilmente y aplicar por parte del experto, siendo referencias, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. 1985.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se presenta en cualquier forma, por ejemplo como un comprimido, como un fluido inyectable o como un fluido para infusión, etc. Además de ello, dicho inhibidor, vector y/o célula de acuerdo con la invención se puede administrar a través de diferentes vías, por ejemplo la intravenosa, bronquial u oral. Todavía otra vía de administración adecuada es la inyección local, preferiblemente en el miocardio.

En una realización preferida, la vía de administración utilizada es la intravenosa. Resulta claro para la persona experta que se suministra preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor, vector y/o célula de acuerdo con la invención. Intervalos de dosis de inhibidores, vectores, células y/u otras moléculas de acuerdo con la invención a utilizar en las aplicaciones terapéuticas según se describen en esta memoria están diseñadas sobre la base de estudios de dosis crecientes en la clínica en ensayos clínicos para los que existen rigurosos requisitos de protocolo. Como un punto de partida se utiliza una dosis entre 0,01 y 100 mg/kg/día.

La presente invención proporciona el conocimiento de que la inhibición de Dyrk1a conduce a una enfermedad del corazón que puede ser contrarrestada, disminuida, demorada y/o prevenida aumentando la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a y/o la inhibición de un microARN capaz de inhibir Dyrk1a. Por lo tanto, la invención proporciona, además, un uso, un método, un vector, un inhibidor, una célula aislada y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en donde dicha enfermedad del corazón está asociada con la expresión de microARN y/o la expresión disminuida o inhibida de Dyrk1a. Preferiblemente, dicho microARN es miR-199b.

La disminución de la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b, y/o el incremento de la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a es particularmente útil para contrarrestar, disminuir, demorar o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón hipertrófica y/o insuficiencia cardíaca y/o una enfermedad del corazón que está relacionada con una afección después de isquemia del corazón, diabetes, hipertensión y/o al menos una mutación genética heredada que provoca cualquier forma de enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío.

Se proporciona, además, por lo tanto un uso, un método, un vector, un inhibidor, una célula aislada y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, en donde dicha enfermedad del corazón es una enfermedad del corazón hipertrófica, preferiblemente una insuficiencia cardíaca. En una realización preferida, dicha enfermedad del corazón está asociada con una afección después de isquemia del corazón, diabetes y/o hipertensión, y/o está asociada de forma relacionada con al menos una mutación genética heredada que provoca una enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío. En una realización preferida, la invención proporciona un método para contrarrestar, disminuir, tratar, demorar o prevenir una enfermedad del corazón asociada con una afección después de isquemia del corazón, diabetes y/o hipertensión, y/o asociada con al menos una mutación genética heredada que provoca una forma de enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un vector, un inhibidor, una célula aislada y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, preferiblemente después de que dicho sujeto ha sido diagnosticado con dicha enfermedad del corazón.

Todavía en otra realización, la invención proporciona un animal de ensayo no humano al que se le ha proporcionado un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de Dyrk1a. Dicho inhibidor comprende preferiblemente un inhibidor de miR-199b. También se proporciona un animal de ensayo no humano al cual se le ha proporcionado un vector, una célula aislada y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Un animal de ensayo no humano de este tipo es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de inhibir o disminuir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b. Un animal de ensayo no humano de este tipo también es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de aumentar y/o restaurar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a. Por lo tanto, un animal de ensayo no humano de acuerdo con la invención es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de contrarrestar, disminuir, demorar o prevenir una enfermedad del corazón.

Métodos de rastreo para compuestos candidatos son especialmente útiles para identificar nuevos inhibidores y, por lo tanto, también se proporcionan con esta memoria. Un método de rastreo comprende, por ejemplo, poner en contacto un compuesto candidato con una célula aislada y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a. Dicha expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a se compara preferiblemente con la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a del mismo tipo de célula o animal sin dicho compuesto candidato. Una expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-199b y/o incrementada de Dyrk1a con relación a dicha célula o animal sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir enfermedades del corazón. Se proporciona, además, así un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano, y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a en dicha célula y/o dicho animal, que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida con la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a en el mismo tipo de célula o animal sin dicho compuesto candidato, en donde la expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-199b y/o incrementada de Dyrk1a con relación a dicha célula o animal sin compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón. Preferiblemente, dicho compuesto candidato se pone en contacto con una célula que muestra una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b y/o disminuida de Dyrk1a en comparación con una célula o animal sano. Dicha expresión, cantidad y/o actividad incrementada en miR-199b y/o disminuida en Dyrk1a resulta preferiblemente en una hipertrofia en la célula. El contacto de dicha célula hipertrofica con un compuesto candidato y la medición de la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a y/o la medición de la forma y tamaño de dicha célula y la comparación con dichas mediciones con valores de referencia, por ejemplo de dicha célula antes de poner en contacto dicha célula con dicho compuesto candidato o, por ejemplo, una célula aislada que no se pone en contacto con dicho compuesto candidato, identifica compuestos que son capaces de inhibir miR-199b y aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a y/o disminuir o inhibir la hipertrofia de dicha célula.

Una realización proporciona un método de rastreo que comprende administrar un compuesto candidato a un animal de ensayo no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a y comparar dicha o dichas mediciones con un valor de referencia según se describe arriba. Preferiblemente, dicho animal de ensayo no humano exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b y/o disminuida de Dyrk1a antes de poner en contacto dicha célula o dicho animal con dicho compuesto. La invención proporciona el conocimiento de que un animal de ensayo no humano de este tipo se encuentra en un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad del corazón, en particular insuficiencia cardíaca. La puesta en contacto de dicho animal con un inhibidor de acuerdo con la invención contrarrestará, prevendrá, demorará o disminuirá dicha enfermedad del corazón. Un animal de este tipo es, así, especialmente útil para rastrear un compuesto candidato en cuanto a su capacidad para prevenir, tratar, demorar y/o disminuir una enfermedad del corazón. Adicional o alternativamente, se utiliza una célula de acuerdo con la invención. Por lo tanto, en una realización la invención proporciona un método para rastrear un compuesto candidato, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a en dicha célula y/o en dicho animal y comparar dicha medición con un valor de referencia obtenido, por ejemplo, de dicha célula o dicho animal antes de poner en contacto dicha célula o dicho animal con dicho compuesto candidato o, por ejemplo, de otra célula o animal que no ha sido puesto en contacto con dicho compuesto candidato. Una disminución en miR-199b y/o un incremento en Dyrk1a de la expresión, cantidad y/o actividad demuestra que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, en particular una insuficiencia cardíaca.

En una realización preferida, dicho compuesto candidato se pone en contacto con una célula o animal de ensayo no humano aislado que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b o disminuida de Dyrk1a en comparación con una célula o animal normal y sano del mismo tipo. Una célula aislada que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b y/o disminuida de Dyrk1a es especialmente útil, ya que

- cambia su forma y tamaño, es decir, la célula se vuelve hipertrófica. Contrarrestar dicho incremento de miR-199b y/o disminución de Dyrk1a contrarresta dicho cambio en la forma y tamaño y, así, una célula de este tipo es particularmente útil para fines de rastreo, dado que la lectura de dicho rastreo se realiza fácilmente, por ejemplo, con un microscopio. Un animal de ensayo no humano que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b y/o disminuida de Dyrk1a es también particularmente útil para fines de rastreo, ya que un animal de este tipo está desarrollando una enfermedad del corazón o está en riesgo de desarrollar una enfermedad del corazón. Un compuesto candidato capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón es, así, fácilmente identificado en dicho animal.
- Así, la invención proporciona un método de rastreo, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con una célula o animal de ensayo no humano aislado, preferiblemente que muestra una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b o disminuida de Dyrk1a, que comprende, además, evaluar la forma y/o tamaño de dicha célula aislada y/o la gravedad y/o el riesgo de una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardiaca, en dicho animal de ensayo no humano, y comparar dicho tamaño y/o forma de dicha célula y/o gravedad y/o riesgo de dicha enfermedad del corazón en dicho animal de ensayo no humano con un valor de referencia. Dicho valor de referencia se puede obtener de la misma célula o del mismo animal, por ejemplo antes de poner en contacto dicha célula o animal con dicho compuesto candidato. Dicho valor de referencia también se puede obtener de otra célula o animal que, por ejemplo, no se pone en contacto con dicho compuesto candidato. Un cambio en el valor, preferiblemente una disminución en el tamaño de la célula y/o una disminución en el riesgo y/o gravedad de la enfermedad del corazón indica si dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar una enfermedad del corazón.
- Una realización preferida proporciona, por lo tanto, un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano, en donde dicha célula aislada y/o dicho animal de ensayo no humano muestra preferiblemente una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b o disminuida de Dyrk1a, y en donde se mide la forma y tamaño de dicha célula aislada y/o la gravedad y/o el riesgo de desarrollar una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardiaca, en dicho animal de ensayo no humano, que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida, dicha forma y/o tamaño, y/o dicho riesgo y/o gravedad con los valores correspondientes del mismo tipo de célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato, en donde la expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-199b y/o incrementada de Dyrk1a, un cambio en el tamaño y forma, preferiblemente una disminución en el tamaño y/o una disminución en el riesgo y/o gravedad de una enfermedad del corazón con relación a dicha célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón.
- Compuestos candidatos, identificados con un método de acuerdo con la presente invención, son especialmente útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con miR-199b y/o relacionadas con Dyrk1a, por ejemplo a través de la inhibición de miR-199b, incluido el tratamiento de una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardiaca. Por lo tanto, también se proporcionan compuestos de este tipo, así como su uso contra una enfermedad del corazón, así como su uso para la preparación de un medicamento contra una enfermedad del corazón.
- La invención proporciona el conocimiento de que una enfermedad del corazón, por ejemplo insuficiencia cardiaca, está relacionada con una expresión disminuida de Dyrk1a, y que miR-199b es capaz de lograr precisamente esto. Sin embargo, tal como se ha esbozado antes, existen cientos de microARNs ya conocidos y se ha presumido que existe en mamíferos un cierto número de varios miles de microARNs diferentes, y generalmente se piensa que cada uno de ellos regula cientos de genes. Así, junto a miR-199b, existen otros microARNs que son capaces de regular la expresión de Dyrk1a. Cualquiera de estos microARNs son útiles para aumentar o restablecer la expresión de Dyrk1a. También es posible inhibir o disminuir indirectamente la expresión de miR-199b, p. ej. a través de la manipulación de factores de transcripción que regulan miR-199b, aumentado con ello indirectamente la expresión de Dyrk1a. Los actuales criterios en la técnica sugieren que la expresión de un microARN es principalmente controlada al nivel de la transcripción.
- En una realización, por lo tanto, la invención proporciona, además, un método para tratar, disminuir, demorar o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende disminuir o inhibir la expresión de miR-199b y/o aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a en un sujeto que padece o está en riesgo de padecer dicha enfermedad del corazón.
- Naturalmente, también es posible influir directamente sobre Dyrk1a sin el uso de, por ejemplo, miR-199b. Por ejemplo, es posible aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a endógeno o administrar Dyrk1a

exógeno y/o un ácido nucleico que codifica Dyrk1a con el fin de aumentar la cantidad la cantidad y/o actividad (global) de Dyrk1a.

Todavía en otra realización, la invención proporciona, así, un compuesto capaz de aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a para uso como un medicamento. Un compuesto capaz de aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de Dyrk1a se utiliza preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, o para la preparación de un medicamento contra enfermedades del corazón. En una realización preferida, dicho compuesto comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica Dyrk1a o un equivalente funcional del mismo.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven meramente para clarificar la invención.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones. En calidad de modelos de animales experimentales, los autores de la invención hicieron uso de ratones B6CBA de tipo salvaje y MHC-CnA transgénicos, de 2 meses de edad, que expresan un mutante activado de calcineurina bajo el control del promotor de la cadena pesada de α -miosina cardiaca murino (*Myh6*)^{1,2} de 5,5 kb. Todos los protocolos se realizaron de acuerdo con directrices institucionales y fueron aprobados por los Comités locales para el Cuidado y Uso de Animales.

Bandeo aórtico. El bandeo aórtico transversal (TAC – siglas en inglés) o la cirugía simulada se realizó en B6CBA de tipo salvaje de 2 meses de edad, sometiendo la aorta a una constricción de calibre 27, definida, entre el primer y segundo tronco del arco aórtico según se describe previamente en detalle³. Se utilizó una ecocardiografía Doppler para calcular el gradiente de presión entre los sitios proximal y distal de la constricción aórtica transversal utilizando la ecuación de Bernoulli estimada mediante Doppler⁴, y solamente se incluyeron ratones con un gradiente de presión > 20 mm de Hg.

Aislamiento de ARN procedente de tejido de ratón o líneas de células de mamífero estables. Los autores de la invención aislaron ARN total a partir de diferentes tejidos de ratón o a partir de células de mamífero cultivadas. Ratones de tipo salvaje y MHC-CnA transgénicos fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia con isoflurano. Se retiraron los corazones enteros y pequeñas muestras de cerebro, timo, riñón, intestino, colon y testículos, se limpiaron en PBS, se colocaron en un tubo marcado que contenía 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen) e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido. Los tejidos se homogeneizaron varias veces a la velocidad máxima, cada vez durante aproximadamente 1 minuto (para prevenir un sobrecalentamiento) hasta la alteración completa. Las células, cultivadas en placas de 6 pocillos hasta un 100% de confluencia, se lavaron dos veces con PBS antes de añadir 1 ml de TRIzol por pocillo y se recogieron los lisados de células en tubos exentos de RNasa. Después de agitar los productos homogeneizados durante 10 minutos a 4°C (para permitir la disociación completa de complejos de nucleoproteínas) se añadieron a cada una de las muestras 0,3 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol. La centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C resulta en la separación de ARN (fase acuosa superior) a partir de ADN y proteínas (fase orgánica inferior e intermedia). Las fases acuosas (60% del volumen de la muestra) se recogieron en nuevos tubos exentos de RNasa, y el ARN se precipitó con 0,5 ml de isopropanol mediante incubación a -20°C durante al menos 1 hora y centrifugación a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sedimentos, que contenían el ARN, se lavaron dos veces con 1 ml de etanol al 70% a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. Después de la decantación del etanol y de la separación total mediante evaporación, las muestras se disolvieron en 20-30 μ l de agua exenta de RNasa. La cantidad de ARN procedente de los tejidos individuales se midió con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Wilmington), y la calidad del ARN se vigiló utilizando un bioanalizador Agilent 2100.

Perfilado de Expresión de microARN Exiqon y Análisis de los Datos. El análisis de expresión de 483 miARNs se realizó mediante un servicio de perfilado de miARN (Exiqon, Dinamarca), utilizando matrices miRCURY de LNA. En síntesis, dos μ g de ARN total agrupado de 3 muestras (3 corazones transgénicos de MHC-CnA) y agrupación de referencia (3 corazones no transgénicos) se marcaron con el marcador fluorescente Hy3™ y Hy5™, respectivamente, utilizando el kit de marcaje de matrices miRCURY™ de LNA. Las muestras marcadas con Hy3™ y una muestra de ARN de la agrupación de referencia marcada con Hy5™ se mezclaron por pares y se hibridaron a la matriz miRCURY™ de LNA versión 8.1 que contiene sondas de captura que fijan como objetivo todos los miARNs para todas las especies registradas en la miRBASE versión 8.1 en el Instituto Sanger. La hibridación se realizó de acuerdo con el manual de matrices miRCURY™ de LNA utilizando una estación de hibridación Tecan HS4800 (Tecan, Austria). Después de la hibridación, los portaobjetos de las micromatrices se escanearon y se

almacenaron en un entorno exento de ozono (nivel de ozono por debajo de 2,0 ppb) con el fin de evitar un blanqueo potencial de los colorantes fluorescentes. Los portaobjetos de matrices de LNA se escanearon utilizando el Sistema de Escaneo de Micromatrices Agilent G2505B (Agilent Technologies, Inc., EE.UU.) y el análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software ImaGene 7.0 (BioDiscovery, Inc., EE.UU.). La señal bruta para cada una de las sondas se obtuvo sustrayendo el máximo del fondo local y señales control negativas a partir de la señal en primer plano. Los datos se pre-procesaron para eliminar manchas de baja calidad y se utilizó la normalización para eliminar cualquier desviación sistemática. Las señales cuantificadas se normalizaron utilizando el algoritmo de regresión global Lowess (LOcally WEighted Scatterplot Smoothing – suavizado móvil mediante regresión ponderada localmente) (Exiqon).

Transferencia Northern. Tres microgramos de ARN total procedente de corazón u otros tejidos diferentes se fraccionaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% que contenía urea 8 M, se transfirieron a una membrana Nytran N (Schleicher & Schuell, Alemania) por el método capilar y se fijaron mediante reticulación UV de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas se hibridaron con sondas de detección de LNA marcadas con 5'-Dig-oxigenina (Dig) específicas (Exiqon) para miR-199b o U6 (testigo de carga). La detección se realizó con un anticuerpo contra Dig (Roche).

Adenovirus recombinantes, oligonucleótidos de LNA y moléculas precursoras de miARN. Un adenovirus que expresa un mutante activado de calcineurina (AdCnA) se describió anteriormente⁵. AdLacZ se describió previamente⁶. Oligonucleótidos antisentido que fijan como objetivo miR-199b se obtuvieron de Exiqon (oligo mmu-miR-199b inactivado miRCURY de LNA, LNA miR-199b) y moléculas precursoras de miR-199b se obtuvieron de Ambion (precursor de miARN mmu-miR-199b pre-miR™, pre-miR-199b).

Cultivos de cardiomiocitos de rata neonatales primarios. Miocitos ventriculares de rata neonatales se obtuvieron mediante disociación enzimática de ventrículos neonatales de rata de 1-2 días de edad según se describe previamente en detalle⁷. Los ventrículos se almacenaron en DMEM tamponado con HEPES (pH 7,4) antes de realizar múltiples rondas de digestión enzimática en base de DMEM mezcla de nutrientes F-12 Ham (Sigma), suplementados con 0,7 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Invitrogen) y 1 mg/ml de pancreatina (Sigma). Las células se recogieron mediante centrifugación a 61 x g durante 10 min, se volvieron a suspender en suero de ternero neonatal (Invitrogen) y se almacenaron en una incubadora a 37°C. Todas las suspensiones celulares se agruparon, se centrifugaron a 61 x g durante 10 min y se volvieron a suspender en DMEM (Invitrogen) suplementado con suero de caballo al 10% (Invitrogen) y suero de ternero fetal al 5% (Invitrogen). Subsiguientemente, las células se extendieron diferencialmente durante 3 h en placas de cultivo celular no revestidas para eliminar no miocitos contaminantes. Los cardiomiocitos (que contenían menos de 5% de no miocitos) se extendieron luego en placas de cultivo de 6 pocillos no revestidas con fibronectina (Sigma). Aproximadamente 24 horas después de la extensión en placas, el medio se reemplazó por medio DMEM:M199 (4:1) (medio exento de suero).

Transfección transitoria de cardiomiocitos neonatales primarios. Para la transfección, cardiomiocitos de ratas neonatales se extendieron en placas en DMEM suplementado con Nutridoma (Roche) en placas revestidas con fibronectina de 6 pocillos con una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Al día siguiente, las células se transfectaron transitoriamente con 30 nM de LNA-miR-199b, pre-miR-199b o testigos revueltos respectivos, con reactivo oligo-pectamina (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se lavaron al día siguiente y se dejaron sin tratar, se estimularon con 10 μ M de fenilefrina (PE) o se infestaron con AdLacZ o AdCnA durante 24 horas antes de la fijación de las células o el aislamiento de ARN.

Inmunocitoquímica y microscopía confocal. Para visualizar el tamaño de los cardiomiocitos y la organización sarcomérica, cardiomiocitos cultivados se fijaron durante 10 min en paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron utilizando BSA al 1% en TBS y las incubaciones se llevaron a cabo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos, se montaron con cubreobjetos en medio de montaje Vectashield para fluorescencia (Vector Laboratories) y se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss LSM 510 META. Los anticuerpos utilizados incluían anti α -actinina monoclonal de ratón (Sigma, 1:500); anti ANF policlonal de conejo (Peninsula Laboratories), anti-conejo de cabra Cy5 y anti-ratón de cabra Cy3 (Jackson Immuno Research, 1:100 y 1:500, respectivamente); y TOPRO-3 (1:100, Invitrogen). Las superficies específicas de las células se determinaron utilizando el software de visualización de imágenes SPOT (Diagnostic Instruments) en 80-100 cardiomiocitos en 10 a 20 campos en tres experimentos independientes.

Predicción de la diana, diseño del cebador y PCR en tiempo real. Para encontrar los genes diana de un microARN específico, los autores de la invención hicieron uso de varios servidores de la web basados en algoritmos bio-informáticos predictivos (PicTar, miRanda, miRBase). Estos son interfases intuitivas que incorporan algoritmos de procesamiento y potentes herramientas de búsqueda de dianas miARN para investigar las dianas miARN frente

a las secuencia 3'UTR más conservadas procedentes de UCSC Genome Browser. Comparando las listas de genes diana que resultan de cada uno de los algoritmos, los autores de la invención acortaron las listas iniciales de cientos de genes diana potenciales a una lista de 32 genes comunes a todos los algoritmos utilizados.

5 Los autores de la invención diseñaron cebadores dirigidos contra transcritos de 20 de los genes predichos y L7. Los cebadores eran específicos para secuencias de ratón (www.ensembl.org) y se seleccionaron utilizando el software Beacon Designer (Invitrogen) basado en los siguientes requisitos: i) temperatura de fusión del cebador de ~ 60°C, ii) contenido en GC de ~ 55%, iii) preferiblemente ninguna G en el extremo 5', iv) evitar operaciones de más de 3 nucleótidos idénticos y v) longitud del amplicón de ~ 100 nucleótidos. La especificidad se verificó con la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica - Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y el punto de fusión específico de los amplicones se analizó utilizando el software de curva de Disociación Biorad (iCycler, Biorad). Todos los conjuntos de cebadores se sometieron a ensayo en cuanto a la eficacia de la PCR, y se diseñaron cebadores alternativos en el caso de que cayeran por fuera del intervalo de eficacia del 5% ($3,14 \leq$ pendiente $\leq 3,47$). Tres µg de ARN procedente de corazones indicados se transcribió inversamente utilizando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La amplificación por PCR se realizó (por duplicado) en forma de una reacción en singleplex con cebadores directos e inversos 400 nM en 40 ng de ADNc en un volumen total de la reacción de 25 µl. La PCR se cicló entre 95°C/30 s y 60°C/30s durante 40 ciclos, siguiendo una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min. Los resultados de la PCR en tiempo real se verificaron mediante electroforesis del material transcrito inversamente en geles de agarosa al 1,2% y se visualizó bajo iluminación UV después de tinción con bromuro de etidio. Se compararon las cantidades de transcrito con la cantidad de testigo endógeno (L7).

Generación de líneas de células cardíacas estables. Los autores de la invención desarrollaron un modelo de células para validar varios de los genes diana predichos. Se generaron células doblemente estables, inducibles por miR-199b, utilizando el sistema T-REX (Invitrogen) con modificaciones. En síntesis, se transfectaron células utilizando reactivo FUGENE 6 (Roche) con 8 µg de pCagBTrs-hygro, un vector que expresa el represor Tet (TR) bajo el control de un promotor de 6-actina (generosamente proporcionado por Hans Clevers, The Hubrecht Institute) y se seleccionaron clones estables con 250 µg/µl de higromicina. Colonias seleccionadas fueron transitoriamente transfectadas con 0,2 µg de pcDNA4/TO-luciferasa (Invitrogen) utilizando el reactivo FUGENE 6 (Roche) para someter a ensayo su capacidad de respuesta a doxiciclina (Dox) utilizando el sistema de ensayo Dual de Luciferasa (Promega). Dos clones represores de Tet diferentes (TR1 y TR4), que muestran una elevada actividad de luciferasa y un bajo fondo, fueron transfectados subsiguientemente con 8,5 µg de pcDNA4/TO-miR-199b y fueron cultivados en presencia de higromicina y 750 µg/µl de zeocina para generar líneas de células doblemente estables. Clones resistentes a zeocina/higromicina fueron transfectados transitoriamente con una construcción informadora que codifica luciferasa de luciérnaga bajo el control de la región de promotor proximal del gen ANF de rata (pares de bases -3003 a +1 con relación al comienzo del exón 1) para someter a ensayo su perfil de activación transcripcional de miR-199b inducible por DOX. Los autores de la invención seleccionaron dos clones (TR1-2 y TR4-7) que mostraban sistemáticamente una significativa inducción de niveles de expresión de miR-199b en presencia de doxiciclina en el medio de cultivo. De este modo, los autores de la invención establecieron un sistema celular con una activación inducible de miR-199b y una represión de la traducción concomitante de los genes diana miR-199b endógenos (véase la Figura 4).

Análisis de Transferencia Western. Se extrajeron proteínas de los clones TR1-2 y TR4-7, se dejaron sin tratar o se trataron con Dox, utilizando tampón de lisis celular (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche). Se realizaron una electroforesis SDS-PAGE y transferencia según se describe en detalle⁸. Los anticuerpos utilizados incluían el anticuerpo policlonal de conejo contra Dyrk1A y el anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (ambos de Santa Cruz), seguido de correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO) y detección ECL.

Validación de genes diana. Secuencias reguladoras 3' UTR han demostrado ser importantes para la estabilidad, traducción y transporte de ARNm. Los autores de la invención diseñaron cebadores específicos para secuencias de ratón (www.ensembl.org) que fijan como objetivo el sitio de unión específico de miR-199b en la 3' UTR de Dyrk1a (nucleótidos 1536-1365, <http://cbio.msk-cc.org/cgi-bin/mirnaviewer/>). Después de la amplificación por PCR de esta secuencia específica, se visualizó un producto de la PCR con el tamaño esperado (286 pb) y se aisló a partir de un gel de agarosa 1.2. Después de purificación, el fragmento 3'UTR se clonó en un vector informador de la expresión de miARN pMIR-REPORT™ (Ambion). Este vector contiene luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de mamíferos CMV, con una región de clonación diana de miARN situada más abajo de la secuencia de traducción de luciferasa. Este vector está optimizado para clonar dianas de miARN y para la evaluación de la regulación de miARN y, por lo tanto, se puede utilizar como una herramienta de rastreo para identificar dianas de miARN. Después del aislamiento y la secuenciación del plásmido, el plásmido se utilizó para transfectar los clones TR-

miR199b doblemente estables. Se cultivaron células en placas de 96 pocillos, se transfectaron con el plásmido de Dyrk1a pmir-informador-3'UTR o el vector vacío y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de 1 lavado con PBS, las células se dejaron sin tratar o se trataron con Dox durante 48 horas antes de medir la actividad de luciferasa.

5 *Análisis estadístico.* Los resultados se presentan como valores medios \pm error típico de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad Software Inc.) y consistían en ANOVA seguido de un post-ensayo de Turkey cuando se detectaron diferencias entre grupos a un nivel de significancia de 5%, o el test-t de Student cuando se comparan dos grupos experimentales.

10

RESULTADOS

Expresión diferencial de microARNs en ratones transgénicos con calcineurina. Los autores de la invención perfilaron los niveles de expresión de miARNs cardiacos en ratones transgénicos con calcineurina. El ARN se aisló de corazones de ratones de tipo salvaje y MHC-CnA transgénicos de 2 meses de edad, y realizaron el perfilado de miARN en estas muestras. Las muestras marcadas con Hy3 y una muestra de ARN de la agrupación de referencia marcada con Hy5 se mezclaron por pares y se hibridaron a matrices miRCURY de LNA, que contienen sondas de captura que fijan como objetivo todos los miARNs registrados en la miRBASE versión 8.1 en el Instituto Sanger (345 miARNs) y sondas que fijan como objetivo secuencias humanas licenciadas, todavía no anotadas en la miRBase (138 miRPlus, Exiqon). Los autores de la invención detectaron microARNs que están co-regulados con el desarrollo de insuficiencia cardíaca inducida por calcineurina utilizando micromatrices de microARN de oligonucleótidos comercialmente disponibles (Fig. 1a) y analizaron la localización genómica de un microARN específico: mmu-miR-199b y el ortólogo humano hsa-miR-199b (Fig. 1b). miR-199b humano es un microARN intragénico codificado en el gen dinamina 1 (Dnm 1) en la cadena opuesta entre los exones 14 y 15 (Fig. 1b). El análisis de transferencia Northern de tejido cardiaco aislado de ratones MHC-CnA transgénicos y ratones sobrecargados con una presión operados de una constricción aórtica transversal (TAC), así como dos modelos bien establecidos de hipertrofia cardiaca patológica, confirmaron que miR-199b-5p está de hecho fuertemente suprarregulado en el corazón enfermo (Fig. 2a, c). Seguidamente, los autores de la invención analizaron su patrón de expresión en diferentes tejidos murinos, incluidos corazón, cerebro, timo, riñón, intestino, colon y testículos mediante transferencia Northern (Fig. 2b). Aunque no es específico cardiaco, miR-199b-5p emergió como muy abundante en el tejido cardiaco. Además, miR-199b-5p también se expresa más abundantemente en biopsias de tejidos cardiacos humanos de pacientes con insuficiencia cardiaca, en comparación con tejido de corazón sano humano, testigo (Fig. 2d). Finalmente, miR-199b es un gen diana inmediato de las vías de calcineurina/NFAT, dado que los corazones procedentes de ratones que albergan un alelo nulo de NFATc2 mostraron una menor expresión de miR-199b, ambos bajo condiciones de la línea de referencia así como después de activación crónica de la señalización con calcineurina (Fig. 2e).

La expresión incrementada de miR-199b en miocitos cardiacos induce la hipertrofia. Para abordar el papel de miR-199b en la remodelación de cardiomiocitos, los autores de la invención transfectaron cardiomiocitos de ratas neonatales primarios con moléculas de precursor de miR-199b para sobre-expresar miR-199b, y los compararon con cultivos de cardiomiocitos que habían sido infestados con un adenovirus que expresa LacZ, y adenovirus que expresa una forma activada de calcineurina (AdCnA) o que habían sido expuestos a fenilefrina 10 mM (PE; Fig. 3a). Para vigilar el cambio en el tamaño de las células o la organización de sarcómeros inducida por los diferentes tratamientos, los cardiomiocitos se tiñeron para α -actinina sarcomérica (Fig. 3b). Como era de esperar, el tratamiento con AdCnA o PE dio como resultado una intensa respuesta de hipertrofia tal como se muestra por el incremento significativo en el tamaño de las células y en la presencia perinuclear de ANF. Sorprendentemente, un incremento similar en el tamaño de las células y en la expresión de ANF se observó en cardiomiocitos que sobre-expresan miR-199b (Fig. 3b).

La inhibición de miR-199b reduce la hipertrofia de cardiomiocitos. Para empezar a evaluar el requisito de miR-199b situado más abajo de la hipertrofia de cardiomiocitos (mediada por calcineurina), los autores de la invención utilizaron oligonucleótidos antisentido que fijan como objetivo miR-199b endógeno (LNA-miR-199b) y transfectaron estos oligonucleótidos en cultivos de cardiomiocitos primarios. En calidad de testigo, cardiomiocitos fueron también transfectados con un oligonucleótido testigo no específico (Fig. 3c, d, e). A continuación, los autores de la invención infestaron los cultivos de cardiomiocitos con un adenovirus que expresa una forma activada de calcineurina (AdCnA) o los expusieron a fenilefrina (EP) 10 mM. Para vigilar el cambio en el tamaño de las células o la organización de sarcómeros, los cardiomiocitos se tiñeron para la α -actinina sarcomérica. El tratamiento con AdCnA o PE dio como resultado una fuerte respuesta hipertrofica cuando las células fueron tratadas con el oligonucleótido testigo. En contraposición, el pretratamiento con el LNA-miR-199b abolió por completo el fenotipo de hipertrofia clásico en respuesta a la infección con AdCnA o el tratamiento con PE (Fig. 3d). La cuantificación de los datos indicaba un incremento doble en la superficie específica de las células en células infestadas con AdCnA o tratadas

con PE, previamente tratadas con el oligonucleótido testigo. Estos efectos pro-hipertróficos de AdCnA y PE se abolieron mediante el bloqueo de la unión de miR-199b a su ARNm diana (Fig. 3e).

Se predice que miR-199b fija como objetivo diferentes genes situados más abajo de la vía de señalización de calcineurina-NFAT.

A pesar del gran número de miARNs identificados en varias situaciones patológicas, sólo se han caracterizado funcionalmente un puñado de miARNs. Los complicados modelos de expresión y los grandes números de genes diana predichos excluyen un análisis directo de su función biológica precisa. Con el fin de comprender el papel de miR-199b en la insuficiencia cardíaca inducida por calcineurina, los autores de la invención realizaron un análisis de la expresión de dianas de ARNm mmu-miR-199b predichas, listadas en varios conjuntos de datos públicos desarrollados en base a varios estudios⁸⁻¹⁷. Mediante RT-PCR, los autores de la invención encontraron que no todos los ARNms diana predichos para miR-199b se expresaban diferencialmente en corazones de MHC-CnA transgénicos, en comparación con los corazones de tipo salvaje (Fig. 4a). Sin embargo, genes tales como Mylb6, M11S1, Grpc5a y, en particular, Dyrk1a estaban fuertemente sub-regulados en corazones de MHC-CnA transgénicos. Sin embargo, ninguno de estos genes, excepto Dyrk1a se ha descrito que esté ligado a la vía de señalización de calcineurina/NFAT.

La sobre-expresión de miR-199b resulta en la sub-regulación de la quinasa regulada por fosforilación en tirosina de doble especificidad, Dyrk 1a.

De los genes que estaban sub-regulados en corazones de MHC-CnA transgénicos al nivel de transcrito, sólo Dyrk1a ha demostrado estar directamente conectado a esta vía. Recientemente, dos grupos independientes obtuvieron evidencia de la desregulación de enlace de la señalización de NFAT en el síndrome de Down¹⁸⁻²⁰. La familia NFAT de factores de transcripción, que son críticos para el desarrollo, reside en el citoplasma en una forma hiperfosforilada; éstos son desfosforilados por calcineurina en respuesta al influjo de calcio y se translocan al núcleo para activar genes diana. Ratones que carecen de diversos genes *Nfatc* mostraron anomalías en comparación con los de personas con el síndrome de Down. El examen de la región del cromosoma 21 humano, que se pensaba contenía genes responsables del fenotipo síndrome de Down, revelaron dos reguladores potenciales de la señalización de NFAT: DSCR1 (que codifica un inhibidor de calcineurina) y DYRK1A (quinasa regulada por fosforilación en tirosina de doble especificidad) que codifica una serina/treonina quinasa nuclear. DYRK1A y DSCR1 inhibían sinérgicamente la transcripción dependiente de NFAT en neuronas cultivadas. Además de ello, DYRK1A demostró fosforilar NFAT y cebarlo para una fosforilación ulterior por parte de glucógeno sintasa quinasa 3 (GSF3) y, por lo tanto, fomentar su exportación desde el núcleo. Ratones transgénicos que sobre-expresaban *Dyrk1a* y *Dscr1* mostraron anomalías cardiovasculares, lo más probablemente relacionadas con la localización citoplásmica de NFAT endocardial. En base a estos hallazgos, los autores de la invención expusieron la hipótesis de que la activación de miR-199b, dependiente de calcineurina/NFAT, resulta en una subregulación directa de la expresión de Dyrk1a. Siendo esto cierto, esto daría como resultado una fosforilación disminuida de NFAT nuclear, una translocación disminuida de NFAT fosforilado al citoplasma y la subsiguiente inducción de la remodelación cardíaca y la respuesta hipertrófica. Para someter a ensayo esta hipótesis, los autores de la invención generaron un sistema celular con activación inducible de miR-199b (Fig. 4b) y, en teoría, la represión de la traducción concomitante de los genes diana miR-199b endógenos. De hecho, el tratamiento de estas células con Dox mostró un incremento en la expresión de miR-199b mediante análisis de transferencia Northern en contraposición con las células no tratadas que expresaban niveles muy bajos del miR (Fig. 4c, NB). Correlacionado con un incremento en la expresión de miR-199b, los autores de la invención observaron una disminución concomitante en los niveles de proteínas para Dyrk1a, demostrando que Dyrk1a es, de hecho, una diana directa de miR-199b (Fig. 4c, WB).

***Dyrk1a* es un gen diana directo de miR-199b.**

Para analizar adicionalmente si Dyrk1a es un gen diana directo de miR-199b, los autores de la invención observaron con mayor detenimiento la secuencia 3'UTR de Dyrk1a, más específicamente la región de siembra de miR-199b. La Figura 5a muestra que esta región está altamente conservada entre los seres humanos y ratones, sugiriendo que ésta es, de hecho, una secuencia diana de miR-199b. Para confirmar esto, los autores de la invención hicieron uso de un vector informador de la expresión de miARN (informador pMiR, Ambion). Este vector contiene luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de mamíferos CMV. La 8'UTR del gen de la luciferasa contiene un sitio de clonación múltiple para la inserción de dianas de unión a miARN predichas u otras secuencias de nucleótidos. Al clonar la secuencia 3'UTR de Dyrk1a, a la que se predice que se une miR199b, en el vector pMIR-REPORT, el informador de luciferasa será sometido a la regulación que mimetiza la regulación de la diana miARN (en este caso, Dyrk1a; Fig. 5a). Si la sobre-expresión de miR-199b resultara en una disminución en la actividad de luciferasa, esto demostraría que la secuencia 3'UTR de Dyrk1a sería una diana directa de este miR. De hecho, esto es lo que observaron los autores de la invención (Fig. 5b). Además, éstos crearon un vector en el que introdujeron dos mutaciones puntuales en la región de siembra de miR-199b dentro de la secuencia 3'UTR de Dyrk1a en calidad de testigo (Fig. 5a). En el p-MIR-informador-3'UTR, Dyrk1a era sensible a la expresión de miR-199b por parte de la expresión de miR-199b tras la adición de DOX a clones que expresan miR-199b inducibles (Fig. 5b) y de una manera dependiente de la dosis mediante co-transfección transitoria de un vector que expresa miR-199b (Fig. 5c), mientras que no se observó sensibilidad

alguna para una co-expresión de microARN no relacionado, miR-216a (Fig. 5c). Además, clones inducibles por miR-199b, tratados o no con Dox durante 48 horas, fueron pre-transfectados con el p-MIR-informador-3'UTR Dyrk1a. La actividad de luciferasa estaba fuertemente inhibida en las células que sobre-expresan miR-199b, en comparación con las células que no fueron tratadas ni transfectadas con el vector vacío, mientras que un p-MIR-informador-3'UTR Dyrk1a mutado no mostró sensibilidad a la expresión de miR-199b (Fig. 5d). Combinados, estos datos demuestran la presencia de una región de siembra de miR-199b funcional y evolutivamente conservada en la 3'UTR de Dyrk1a.

Antagomir-199b rescata la insuficiencia cardíaca inducida por calcineurina restaurando los niveles de expresión de Dyrk1a. Finalmente, los autores de la invención hicieron uso de una estrategia de antagomir diseñada para bloquear la expresión de miR-199b endógeno *in vivo* (Fig. 6a). Para este fin, los autores de la invención realizaron un experimento en el que un oligonucleótido antisentido químicamente modificado, específico para miR-199b (antagomir-199b) fue suministrado mediante inyección IP tres días consecutivos a ratones de tipo salvaje y transgénicos con calcineurina de 14 días de edad después del nacimiento (p14; Fig. 6b). Los ratones toleraban antagomir-199b bien sin síntomas obvios de enfermedad ni molestias. Cuatro días después de la última inyección, los autores de la invención analizaron la morfología en bruto de los corazones, encontrando que ratones transgénicos con calcineurina tratados con antagomir-199b tenían un tamaño del corazón casi normalizado (Fig. 6c, d) en comparación con camadas tratadas con vehículo. La transferencia Northern de tejido cardíaco reveló una casi completación de la expresión de miR-199b tanto en ratones de tipo salvaje como transgénicos con calcineurina, indicando la eficacia del diseño de antagomir-199b (Fig. 6e). De manera interesante, los niveles de expresión de Dyrk1a estaban subregulados en aproximadamente el 50% en ratones transgénicos con calcineurina tratados con vehículo en comparación con ratones de tipo salvaje tratados con vehículo (Fig. 6f). En contraposición, animales tratados con antagomir-199b demostraron niveles de proteína Dyrk1a restablecidos. Esto iba acompañado por niveles de actividad NFAT normalizados, tal como se mide por los niveles de expresión relativa de abundancia de transcrito RCAN1.4 (Fig. 6g).

Inversamente, los autores de la invención generaron líneas de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-199b en el miocardio postnatal utilizando el promotor de cadena pesada alfa-miosina (Fig. 7a). También fueron capaces de generar 3 líneas transgénicas, cada una con una diferente sobre-expresión de miR-199b tal como se evalúa mediante transferencia Northern (Fig. 7a). A la edad de 3 semanas, la sobre-expresión de miR-199b no mostraba un fenotipo cardíaco obvio. Cuando los autores de la invención cruzaron ratones transgénicos miR-199b con ratones transgénicos con calcineurina, observaron, sin embargo, un fenotipo cardíaco más exagerado que los ratones que sólo albergan el transgen calcineurina (Fig. 7b). El fenotipo cardíaco se reflejó al nivel de expresión relativo de miR-199b (Fig. 7c) así como por los pesos relativos del corazón. Finalmente, los autores de la invención observaron también niveles de expresión de la proteína Dyrk1a reducidos en biopsias de pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica que se correlacionaban inversamente con su expresión de miR-199b (Fig. 7b).

En conjunto, los datos obtenidos por los autores de la invención demuestran por vez primera que miR-199b juega un papel importante en la hipertrofia cardíaca inducida por calcineurina. De manera más importante, estos autores han identificado el mecanismo con el que miR-199b potencia la hipertrofia de cardiomiocitos inducida por calcineurina/NFAT y, por lo tanto, la hipertrofia cardíaca patológica mediante la sub-regulación activa de su gen diana directo, Dyrk1a.

Referencias

- Palermo J, Gulick J, Colbert M, Fewell J, Robbins J. Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart. *Circ Res.* 1996;78:504-509.
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 1998;93:215-228.
- van Empel VP, Bertrand AT, van der Nagel R, Kostin S, Doevendans PA, Crijns HJ, de Wit E, Sluiter W, Ackerman SL, De Windt LJ. Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ Res.* 2005;96:e92-e101.
- Schultz JE, Witt SA, Nieman ML, Reiser PJ, Engle SJ, Zhou M, Pawlowski SA, Lorenz JN, Kimball TR, Doetschman T. Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *J Clin Invest.* 1999;104:709-719.
- De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, Molkentin JD. Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res.* 2000;86:255-263.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2509-2514.
- Van Rooij E, Doevendans PA, De Theije CC, Babiker FA, Molkentin JD, De Windt LJ. Requirement

- of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 2002;50:48617-48626.
8. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS: MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 2003;5:R1.
- 5 9. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS: Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004;2:e363.
10. Kiriakidou M, Nelson PT, Kouranov A, Fitziev P, Bouyioukos C, Mourelatos Z, Hatzigeorgiou A: A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 2004;18:1165-1178.
11. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da P, I, Gunsalus KC, Stoffel M et al.: Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005;37:495-500.
12. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003;115:787-798.
13. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15-20.
14. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP: Prediction of plant microRNA targets. *Cell.* 2002;110:513-520.
15. Robins H, Li Y, Padgett RW: Incorporating structure to predict microRNA targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:4006-4009.
16. Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM: Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2003;1:E60.
17. Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T: Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* 2004;5:R65.
18. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang C-P, Wu H, Gao X, Neilson JR, Chen L, Heit JJ, Kim SK, Yamasaki N, Miyakawa T, France U, Graef IA, Crabtree GR: NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature.* 2006;441:595-600.
19. Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A: A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature.* 2006;441:646-650.
20. Epstein CJ: Down's syndrome: Critical genes in a critical region. *Nature.* 2006;441: 582-583.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Localización genómica de microARN-199b. (a) El perfilado de microARN revela un conjunto de microARNs que estaban diferencialmente expresados en tejido cardíaco de ratones transgénicos α MHC-CnA (α MHC-CnA) de 2 meses de edad. (b) Localización genómica del microARN intragénico miR-199b, situado en el cromosoma 9, en la cadena opuesta en el gen Dnm1.

Figura 2. MicroARN-199b está supra-regulado en la hipertrofia cardíaca inducida por calcineurina. (a) Validación de la matriz de perfilado mediante análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-199b en tejido cardíaco procedente de ratones transgénicos α MHC-CnA y procedente de ratones sometidos a TAC (barra: 5 mm). (b) Modelo de expresión de miR-199b en diferentes tejidos murinos analizados mediante transferencia Northern. (c) Análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-199b en varios corazones procedentes de ratones transgénicos α MHC-CnA y procedente de ratones sometidos a TAC. (d) Análisis de transferencia Northern de miR-199b en biopsias humanas de corazones testigo y con insuficiencia. (e) miR-199b está supra-regulado en corazones procedentes de ratones transgénicos α MHC-CnA y está reducido en corazones procedentes de ratones inactivados que carecen de NFATc2, sugiriendo que miR-199b es un gen diana directo de calcineurina/NFAT.

Figura 3. El desarrollo de la hipertrofia de cardiomiocitos se puede modular mediante la expresión o inhibición incrementada de miR-199b

(a) Validación de transferencia Northern de la sobre-expresión de miR-199b en cardiomiocitos de ratas neonatales mediante infección con un adenovirus que expresa una forma constitutivamente activada de calcineurina (AdCnA), estimulación con fenilefrina (PE) o transfección de una molécula precursora para miR-199b. (b) Imagen confocal representativa de cardiomiocitos de ratas neonatales infestadas con un adenovirus testigo (AdLacZ), un adenovirus que expresa CnA activa (AdCnA) o tratado con PE o una molécula precursora de miR-199b. Las células se tiñeron para α -actinina, ANF y una contra-tinción nuclear (TO-PRO-3). Los datos muestran cardiomiocitos drásticamente dilatados con inducción de ANF perinuclear tras la sobre-expresión de miR-199b, similar a los estímulos hipertroáficos conocidos tales como calcineurina activa y PE. (c) Análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-199b en cardiomiocitos de ratas neonatales pretratadas con una sonda de LNA revuelta o una sonda de miR-199b de LNA, e infestados con AdLacZ, AdCnA, o tratados

con PE. (d) Imagen confocal representativa de cardiomiocitos de ratas neonatales pretratados con un testigo o una sonda de miR-199b de LNA e infestados con AdLacZ, AdCnA o tratados con PE. Las células se tiñeron para α -actinina y una contra-tinción nuclear (TO-PRO-3). (e) La cuantificación de las superficies específicas de las células bajo las condiciones indicadas confirma el rescate del fenotipo hipertrofico tras inhibición de miR-199b en cardiomiocitos (barra: 20 μ m).

Figura 4. Se predice que miR-199b fija como objetivo Dyrk1a. (a) Los ARNs procedente de ratones de tipo salvaje (no transgénicos) y MHC-CnA transgénicos se analizaron mediante RT-PCR utilizando cebadores diseñados contra genes diana predichos. Los datos demuestran que, a pesar de que no todos los genes predichos mostraban una expresión alterada en los corazones de MHC-CnA transgénicos, la expresión de genes tales Mylb6, M11S1, Grpc5a y Dyrk1a estaba claramente disminuida. (b) Representación esquemática de la manipulación de la expresión de miR-199b mediante Dox en las células doblemente estables e inducibles por miR-199b. (c) Análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-199b en dos clones de células inducibles por miR-199b (TR4-7 y TR1-2) tratados o no con DOX, demuestran claramente una supra-regulación de miR-199b mediante tratamiento con Dox. También se determinaron niveles de proteínas de Dyrk1a (como una diana predicha de miR-199b) en ambos clones mediante análisis de transferencia Western. Los datos demuestran claramente que una vez que miR-199b está supra-regulado mediante tratamiento con Dox, los niveles de proteínas de Dyrk1a disminuyen drásticamente.

Figura 5. Dyrk1a es un gen diana directo de miR-199b. (a) Representación esquemática de la 3'UTR de Dyrk1a, mostrando la secuencia en la que se predice que se une la región de siembra de miR-199b. Representación esquemática de pMIR-informador-3'UTR Dyrk1a. (b) Clones inducibles por miR-199b fueron transfectados con el plásmido mMIR-informador-3'UTR Dyrk1a. Después de la estimulación con DOX, disminuye la actividad de luciferasa. (c) Células HEK293 fueron co-transfectadas con cantidades crecientes de un vector de expresión con el precursor para miR-199b, dando como resultado una disminución dependiente de la dosis en la actividad de luciferasa. En contraposición, un vector de expresión con un precursor para un microARN no relacionado (miR-216a) no tiene efecto alguno sobre la actividad de luciferasa. (d) Células TR4-7 se dejaron sin tratar o se trataron con Dox durante 48 horas (para inducir la expresión de miR-199b) antes de medir la actividad de luciferasa. La gráfica demuestra que tras la sobre-expresión de miR-199b (+Dox) decaía fuertemente la actividad de luciferasa de las células transfectadas con el plásmido pMIR-informador-3'UTR Dyrk1a, indicando que miR-199b se une directamente a la 3'UTR de Dyrk1a. En contraposición, un pMIR-informador-3'UTR de Dyrk1a mutado no reaccionaba al tratamiento con Dox, demostrando que se requiere la región de siembra en la 3'UTR de Dyrk1a para la sensibilidad inducida por miR-199b.

Figura 6. El tratamiento con antagomir-199b rescata la hipertrofia cardiaca inducida por calcineurina *in vivo* normalizando la expresión de Dyrk1a. (a) Ejemplo no limitante de una secuencia de nucleótidos capaz de inhibir miR-199b. Descripción oligo (antagomir): 20-23 nucleótidos (nt) de longitud, todos 2'-Ome, modificación con 3'-colesterol de tipo 1, 5-7 enlaces PS, purificado por PAGE o HPLC. (b) Representación esquemática del esquema de tratamiento, en el que a ratones de 2 semanas de edad (camadas transgénicas con calcineurina y de tipo salvaje) se les inyectó antagomir contra miR-199b (antagomir-199b) mediante inyecciones intraperitoneales (IP) diarias, tres días consecutivos. (c) La morfología bruta de los corazones aislados de animales tratados con vehículo o con antagomir-199b mostró un rescate drástico de la dilatación cardiaca en ratones transgénicos con calcineurina mediante tratamiento con antagomir-199b. (d) Las relaciones del peso del corazón al peso corporal confirman el rescate en el tamaño del corazón mediante tratamiento con antagomir-199b en ratones transgénicos con calcineurina. (e) Validación de la transferencia Northern de la eficacia del tratamiento con antagomir-199b sobre el agotamiento de la expresión de miR-199b en tejido de corazón a partir del tratamiento indicado y genotipos. (f) Análisis de transferencia Western de Dyrk1a, que muestra una subregulación en ratones transgénicos con calcineurina tratados con vehículo y la normalización de la expresión de Dyrk1a a niveles de tipo salvaje mediante tratamiento con antagomir-199b. (g) Normalización de la actividad NFAT en tejido cardiaco mediante análisis por PCR en tiempo real de la isoforma de corte y empalme del exón 4 de RCAN1, un gen diana directo de calcineurina/NFAT.

Figura 7. La sobre-expresión cardiaca transgénica de miR-199b aumenta la susceptibilidad a señales de insuficiencia cardiaca. (a) Generación de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-199b en el miocardio postnatal bajo el control del promotor de cadena pesada de alfa-miosina (MHC; véase más arriba) y análisis de transferencia Northern de la expresión de miR-199b en 3 líneas transgénicas diferentes. (b) La línea de sobre-expresión de MHC-miR-199b más elevada se cruzó con ratones transgénicos con calcineurina, dando como resultado una dilatación cardiaca más drástica en ratones transgénicos dobles comparado con ratones transgénicos con calcineurina solos. (c) Niveles de expresión de miR-199b relativos en tejido de corazón procedente de los grupos indicados. (d) Niveles de expresión de miR-199b (borrones Northern, parte superior) se correlacionan inversamente con la expresión de proteínas Dyrk1a (borrones Western, parte inferior) en tejido de corazón humano procedente de corazones testigo y pacientes con insuficiencia cardiaca.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición que comprende una molécula de miARN-199b antisentido o el complemento de la misma, para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.
- 10 2.- Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha molécula de miARN-199b antisentido comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte de la secuencia CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC (hsa-miR-199b-5p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos, y/o una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 20 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos una parte de la secuencia ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (hsa-miR-199b-3p) o el complemento de la misma, teniendo dicha parte al menos 20 nucleótidos.
- 15 3.- Una composición para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha molécula de miARN-199b antisentido o el complemento de la misma está constituido por un vector que comprende un promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, en donde el promotor está enlazado de modo operativo a dicha molécula de miARN-199b antisentido o al complemento de la misma de modo que se puede aumentar la expresión o cantidad de dicha molécula de miARN-199b antisentido.
- 20 4.- Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el promotor es adecuado para la expresión en una célula del miocardio.
- 25 5.- Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición comprende, además, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 6.- Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha enfermedad del corazón está asociada con una expresión disminuida o inhibida de Dyrk1a.
- 35 7.- Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad del corazón comprende enfermedad del corazón hipertrófico y/o insuficiencia cardiaca.
- 40 8.- Una composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha enfermedad del corazón está asociada con una afección después de isquemia del corazón, diabetes y/o hipertensión, y/o está asociada con al menos una mutación genética alterada que provoca una enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío.
- 45 9.- Una célula de mamífero aislada que comprende un vector que comprende un promotor adecuado para la expresión en dicha célula de mamífero, en donde el promotor está operativamente enlazado a una molécula de miARN-199b antisentido o al complemento de la misma, de modo que se puede incrementar la expresión o cantidad de dicha molécula de miARN-199b antisentido.
- 50 10.- Una célula de mamífero aislada de acuerdo con la reivindicación 9, que es una célula de miocardio.
- 55 11.- Una célula de mamífero aislada de acuerdo con las reivindicaciones 9 ó 10, para el uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.
- 60 12.- Un animal de ensayo no humano al que se le ha provisto de un vector que comprende un promotor adecuado para la expresión en dicha célula de mamífero, en donde el promotor está operativamente enlazado a una molécula de miARN-199b antisentido o al complemento de la misma de modo que se puede aumentar la expresión o cantidad de dicha molécula de miARN-199b antisentido.
- 65 13.- Un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a en dicha célula y/o dicho animal que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida con la expresión, cantidad y/o actividad de miR-199b y/o Dyrk1a en el mismo tipo de célula o animal sin dicho compuesto candidato, en donde una expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-199b y/o incrementada de Dyrk1a con relación a dicha célula o animal sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

14.- Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho compuesto candidato se pone en contacto con una célula aislada o un animal de ensayo no humano que muestra una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b o disminuida de Dyrk1a en comparación con una célula o animal sano.

- 5 15.- Un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano, en donde dicha célula aislada y/o dicho animal de ensayo no humano muestran una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-199b o disminuida de Dyrk1a, y en donde se mide la forma y tamaño de dicha célula aislada y/o la gravedad y/o riesgo de desarrollar una enfermedad del corazón,
- 10 insuficiencia cardíaca en dicho animal de ensayo no humano, que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida, dicha forma y/o tamaño y/o dicho riesgo y/o gravedad con los valores correspondientes de una célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato, en el que la expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-199b y/o incrementada de Dyrk1a, un cambio en el tamaño y forma, una disminución en el tamaño y/o una disminución en el riesgo y/o gravedad de la enfermedad del corazón con relación
- 15 a dicha célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

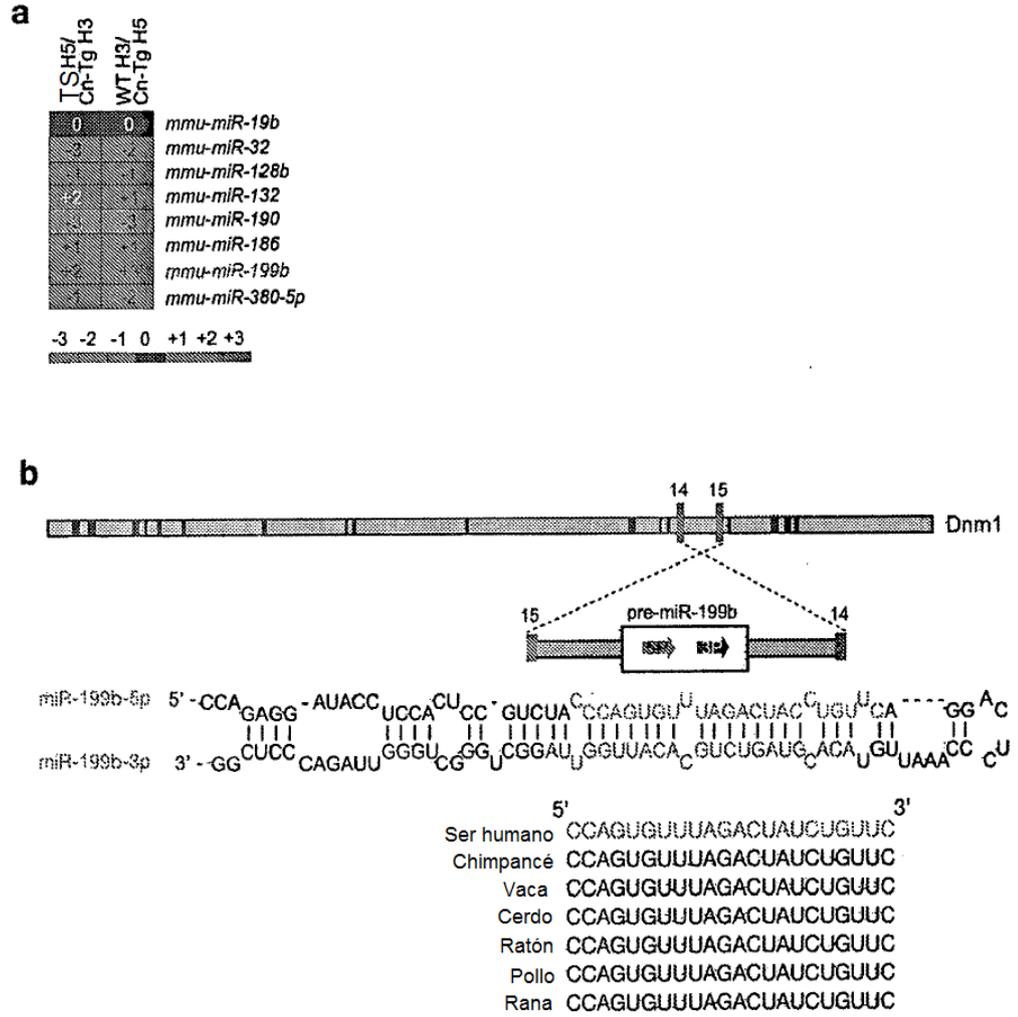


Figura 1

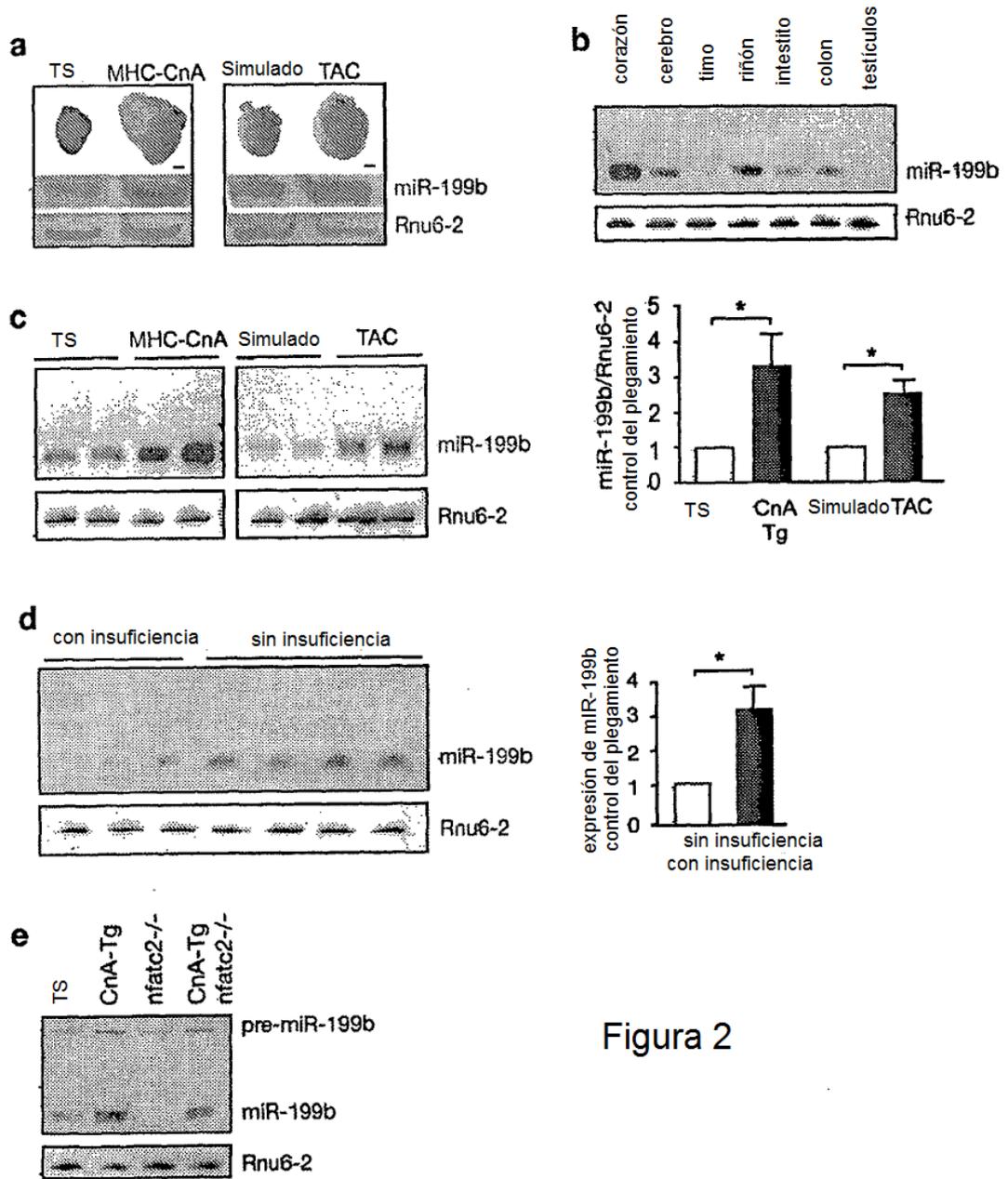


Figura 2

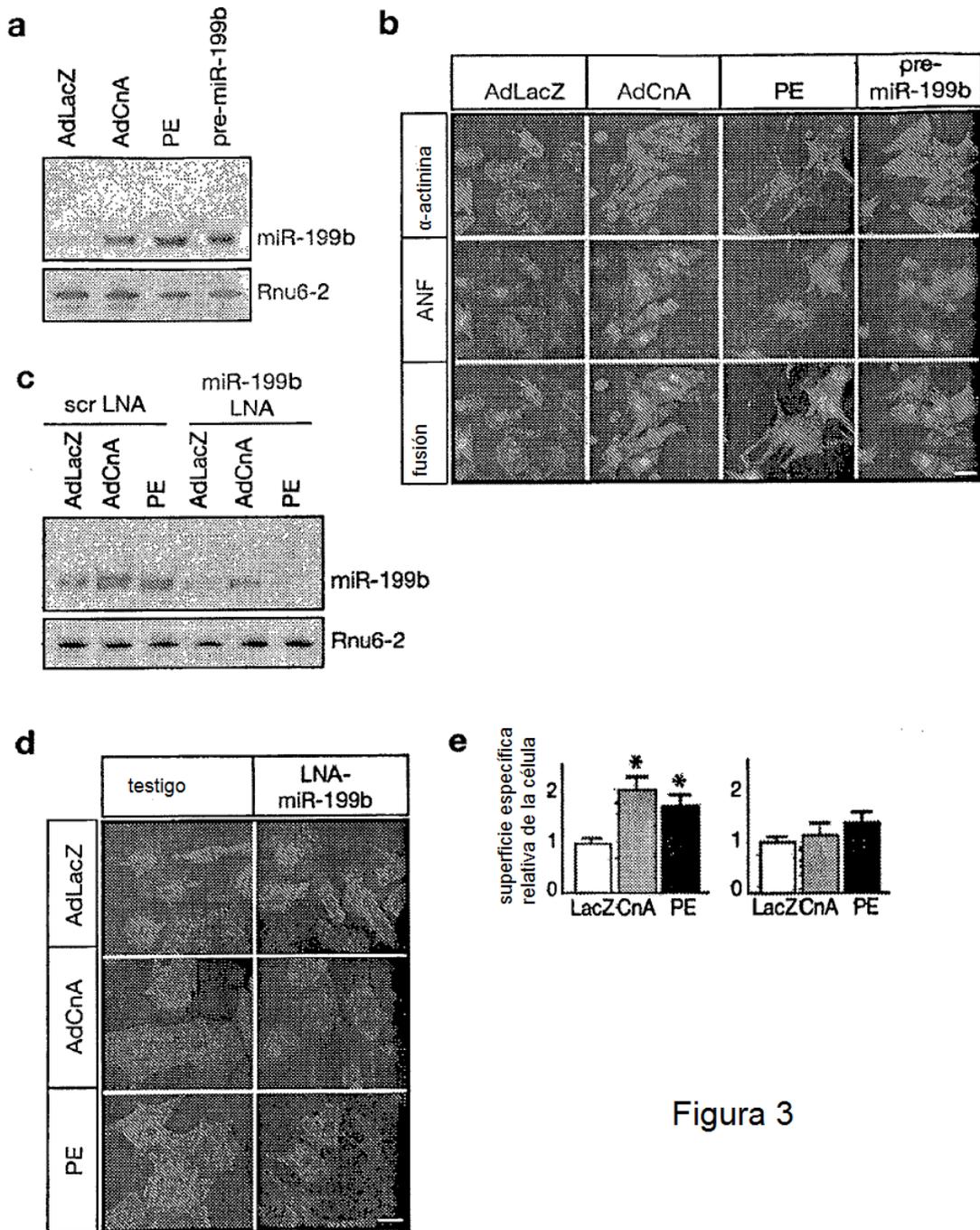


Figura 3

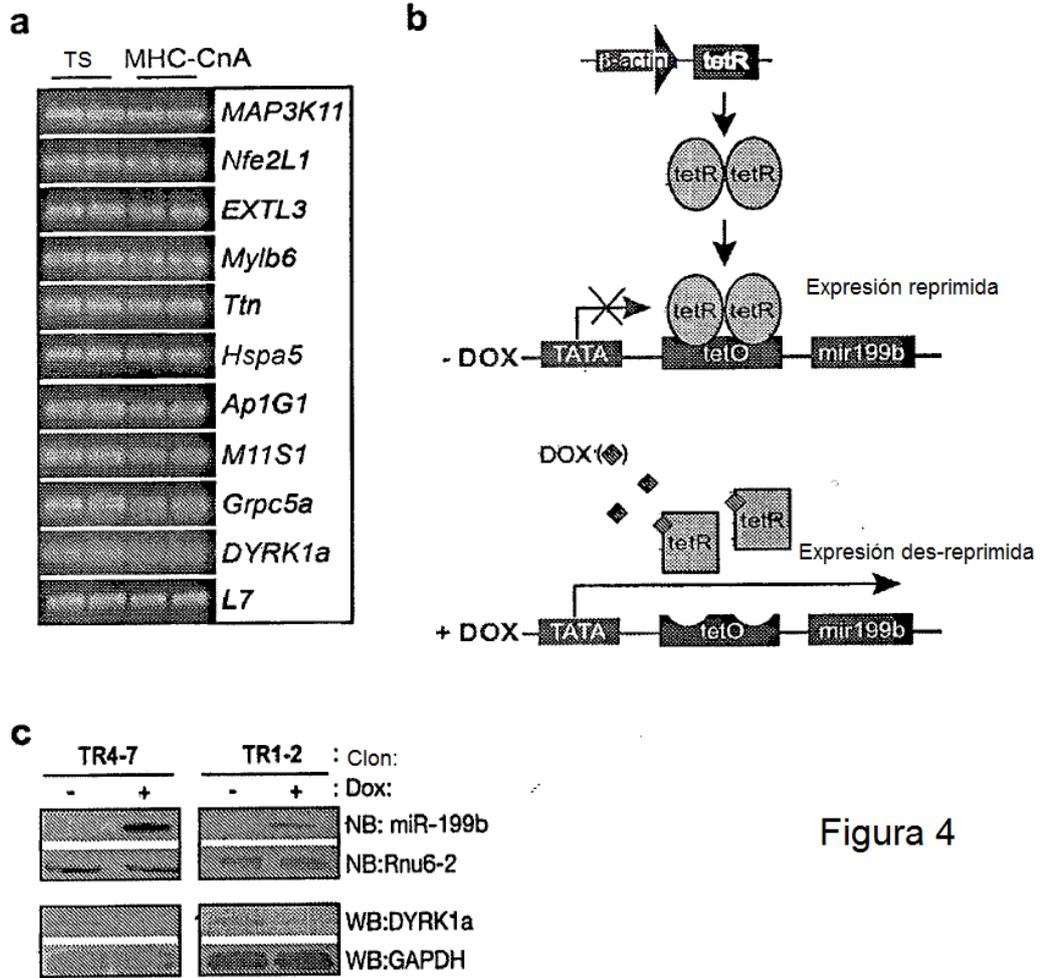


Figura 4

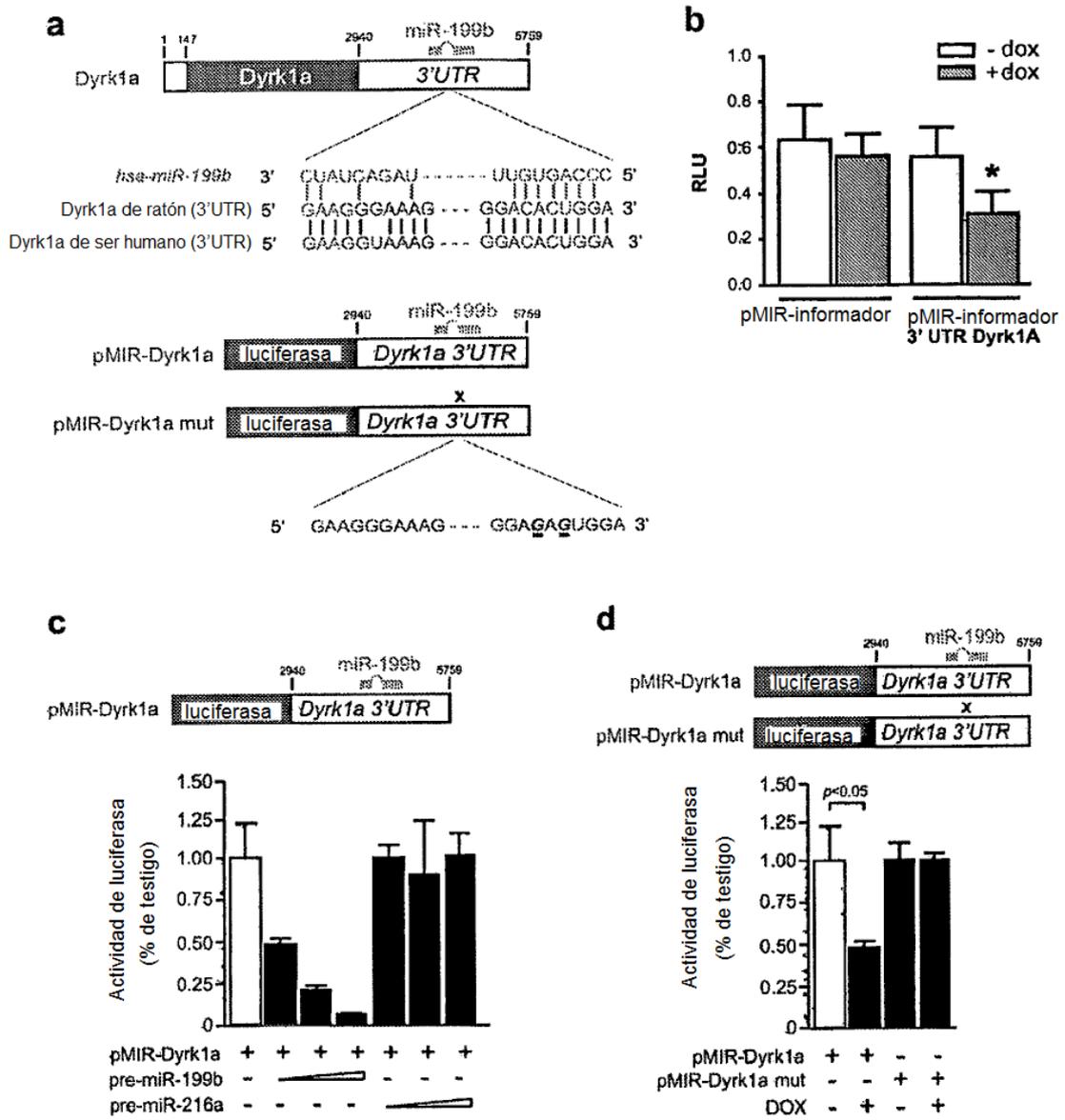
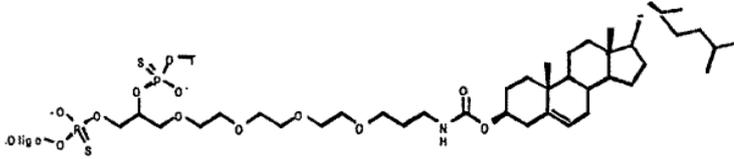


Figura 5

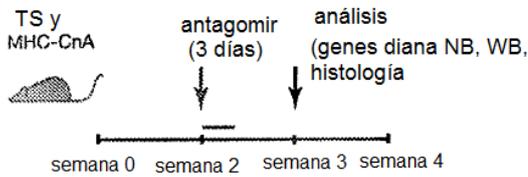
a

secuencia de hsa-miR-199b-5p: 5'- OCCAGUGUUUAGACUACCCUGUUC -3'

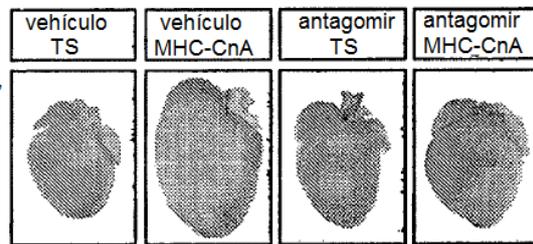
antagonista capaz de bloquear hsa-miR-199b or mmu-miR-199b: 5'- G*A*ACAGGUAGUCUAAACACU*G*G*G*Chol*T -3'



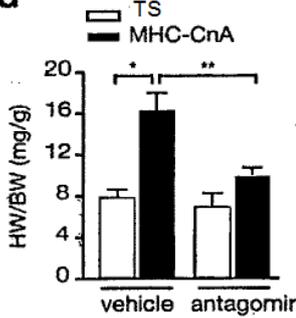
b



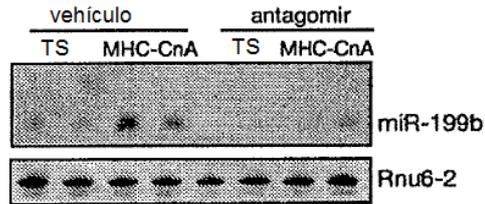
c



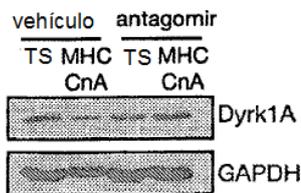
d



e



f



g

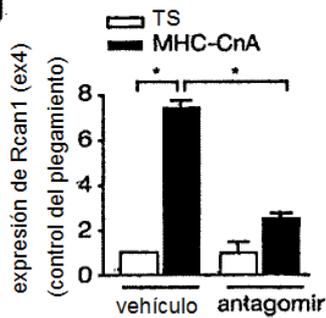


Figura 6

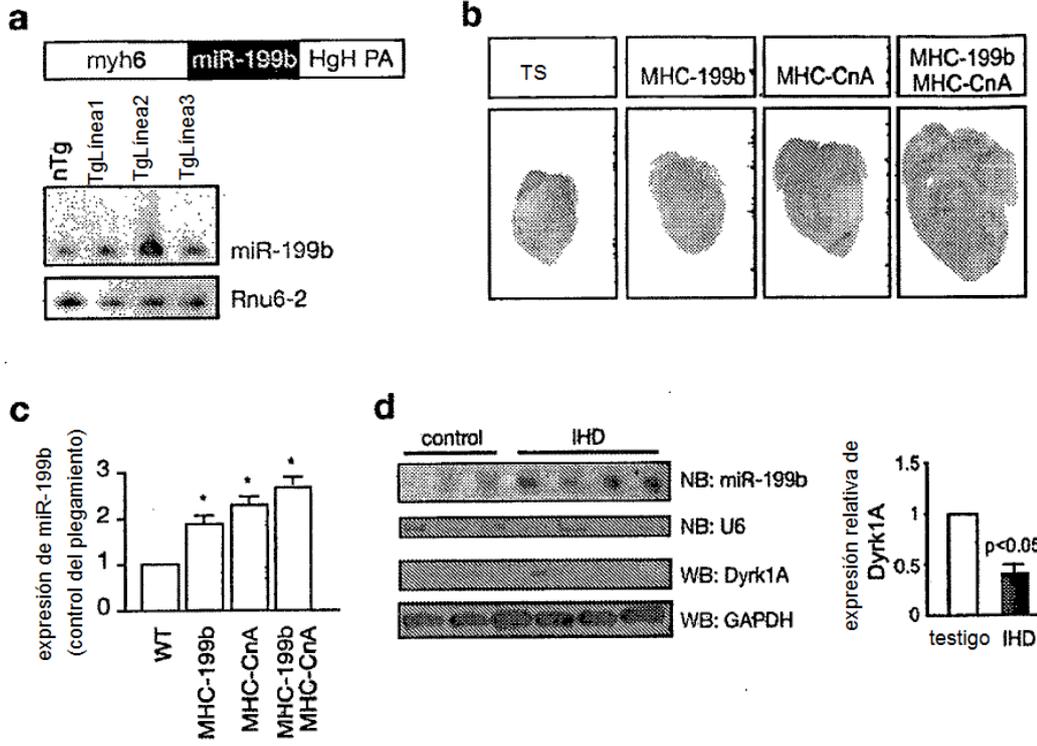


Figura 7