

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 439**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2007 E 07813595 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2056882**

54 Título: **Identificación de un microARN que activa la expresión de la cadena pesada de la miosina**

30 Prioridad:

01.08.2006 US 834667 P

31.07.2007 US 952911 P

31.07.2007 US 952917 P

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

07.03.2013

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 WEST 7TH STREET, SUITE 820
AUSTIN, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**OLSON, ERIC y
VAN ROOIJ, EVA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 397 439 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de la biología del desarrollo y la biología molecular. Más especialmente, se refiere a la regulación génica y la fisiología celular en miocardiocitos y células del músculo esquelético. Específicamente, la invención se refiere a la inhibición de un miARN que resulta en una reducción de la expresión de la cadena pesada β de la miosina (β -MHC), tratando de este modo la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca.

2. Descripción de la técnica relacionada

La hipertrofia cardíaca en respuesta a un aumento de la carga de trabajo impuesta sobre el corazón es un mecanismo adaptativo fundamental. Es un proceso especializado que refleja un aumento cuantitativo del tamaño y la masa celulares (más que del número de células) como resultado de cualquier estímulo neural, endocrino o mecánico o de una combinación de estos. La hipertensión, otro factor implicado en la hipertrofia cardíaca, es un precursor frecuente de la insuficiencia cardíaca congestiva. Cuando se produce una insuficiencia cardíaca, normalmente el ventrículo izquierdo se hipertrofia y dilata y los índices de la función sistólica, como la fracción de eyección, disminuyen. Claramente, la respuesta hipertrófica cardíaca es un síndrome complejo y la elucidación de las rutas que conducen a la hipertrofia cardíaca será beneficiosa para el tratamiento de las cardiopatías que resultan de diversos estímulos.

La hipertrofia miocárdica patológica se caracteriza por un aumento de la proteína de miocardiocitos y por la expresión de un perfil génico reminiscente del desarrollo embrionario temprano. Específicamente, aumenta la expresión de la cadena pesada β de la miosina (β -MHC), la α -actina de músculo esquelético (sACT) y los péptidos natriuréticos atriales y cerebrales (ANP y BNP, respectivamente), mientras que disminuye la de los genes específicos del músculo cardíaco adulto, la cadena pesada α de la miosina (α -MHC) y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA). En particular, hay evidencia convincente que indica que los cambios en la expresión de las isoformas de la MHC desempeñan un papel en la patogénesis de la insuficiencia cardíaca en humanos. De hecho, los niveles de ARNm y proteína de la α -MHC están notablemente reducidos en corazones humanos con insuficiencia cardíaca y una mejora de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo mediante el tratamiento con betabloqueantes se asocia con la normalización de la expresión de la α -MHC. Adicionalmente, se ha identificado una mutación en el gen de la α -MHC humana

asociada con la miocardiopatía hipertrófica, lo que demuestra que, a pesar de su poca abundancia, el nivel de expresión de la α -MHC es crítico para una función cardíaca normal. Por lo tanto, está claro que tanto la α -MHC como la β -MHC desempeñan un papel en la aparición de la hipertrofia cardíaca, pero las características concretas mediante las que estos productos actúan para crear y/o mantener el estado patológico siguen siendo desconocidas.

RESUMEN

De acuerdo con la presente invención, se proporciona lo siguiente:

- 10 1. Un inhibidor de miR-208 para uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica, la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio, en que el inhibidor de miR-208 es un oligonucleótido no codificante con una secuencia que es complementaria de una secuencia de miR-208.
- 15 2. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que el inhibidor es un oligonucleótido monocatenario de poca longitud, manipulado químicamente y complementario de miR-208 que bloquea la función de miR-208.
3. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que el oligonucleótido no codificante tiene una secuencia complementaria de SEQ ID NO:5.
4. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que el oligonucleótido no codificante contiene al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.
- 20 5. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que el inhibidor se administra a un sujeto que lo necesita por vía intravenosa, oral, transdérmica, por liberación mantenida, liberación controlada, liberación retardada, mediante supositorios, por vía subcutánea, intraperitoneal o sublingual o por inyección directa en el tejido cardíaco.
- 25 6. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que el inhibidor se administra a un sujeto que lo necesita en combinación con un segundo tratamiento cardíaco.
- 30 7. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 6, en que dicho segundo tratamiento se selecciona del grupo que consta de un betabloqueante, un inótropo, un diurético, un inhibidor de ECA, un antagonista de A II, BNP, un bloqueante de Ca^{2+} , un antagonista de receptores de endotelina y un inhibidor de HDAC.
8. El inhibidor para uso de acuerdo con el punto 1, en que la administración del inhibidor mejora uno o más síntomas de la hipertrofia cardíaca patológica, la

insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio en un sujeto, en que dicha mejora de uno o más síntomas se selecciona del grupo que consta de un aumento de la capacidad de ejercicio, un aumento del volumen de eyección cardíaca, una disminución de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, una disminución de la presión de enclavamiento capilar pulmonar, un aumento del gasto cardíaco o del índice cardíaco, una reducción de las presiones de las arterias pulmonares, una disminución de las dimensiones sistólica y diastólica finales del ventrículo izquierdo, una disminución del estrés de las paredes de los ventrículos izquierdo y derecho, una disminución de la tensión de la pared, un aumento de la calidad de vida y una disminución de la morbilidad o la mortalidad relacionadas con la enfermedad.

9. El uso de un inhibidor de miR-208 para la preparación de una composición farmacéutica para uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica, la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio, en que el inhibidor de miR-208 es un oligonucleótido no codificante con una secuencia que es complementaria de una secuencia de miR-208.

Se desvela un procedimiento para regular la contractilidad y la remodelación cardíacas que comprende la administración de un modulador de la expresión o la actividad de miR-208 a células del corazón. Se desvela un procedimiento para regular la expresión génica de las proteínas contráctiles cardíacas que comprende la administración de un modulador de la expresión o la actividad de miR-208 a células del corazón. El modulador puede ser un agonista o un antagonista de la expresión o la actividad de miR-208. Se desvela un procedimiento para reducir la expresión de β -MHC en células del corazón que comprende la administración de un inhibidor de la expresión o la actividad de miR-208 a las células del corazón. Se desvela un procedimiento para aumentar la expresión de β -MHC en células del corazón que comprende el aumento de la expresión o la actividad del miR-208 endógeno o la administración de un miR-208 exógeno a las células del corazón. Se desvela un procedimiento para aumentar la expresión de un gen de una proteína contráctil del músculo esquelético rápido en células del corazón que comprende la administración de un inhibidor de la expresión o la actividad de miR-208 a las células del corazón. Se desvela un procedimiento para disminuir la expresión de un gen de una proteína contráctil del músculo esquelético rápido en células del corazón que comprende el aumento de la expresión o la actividad del miR-208 endógeno o la administración de un miR-208 exógeno a las células del corazón. Algunos ejemplos de genes de proteínas contráctiles del músculo esquelético rápido que pueden aumentarse o disminuirse de acuerdo con los procedimientos desvelados incluyen: troponina I de músculo esquelético, troponina T3, cadena ligera de miosina o α -actina de músculo esquelético.

Se desvela un procedimiento para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica o la insuficiencia cardíaca que comprende: la identificación de un paciente con hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca o remodelación después de un infarto de miocardio; y la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón del paciente. Se desvela un procedimiento para la prevención de la hipertrofia patológica o la insuficiencia cardíaca que comprende: la identificación de un paciente con riesgo de padecer una hipertrofia cardíaca patológica o una insuficiencia cardíaca; y la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón del paciente.

Se desvela un procedimiento para el tratamiento del infarto de miocardio que comprende la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón de dicho sujeto. Se desvela un procedimiento para la prevención de la hipertrofia cardíaca y la miocardiopatía dilatada que comprende la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón de un sujeto. Se desvela un procedimiento para inhibir la progresión de la hipertrofia cardíaca que comprende la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón de un sujeto. Se desvela un procedimiento para aumentar la tolerancia al ejercicio, reducir la hospitalización, mejorar la calidad de vida, disminuir la morbilidad y/o disminuir la mortalidad en un sujeto con insuficiencia cardíaca o hipertrofia cardíaca que comprende la inhibición de la expresión o la actividad de miR-208 en células del corazón del sujeto. Se desvela un procedimiento para aumentar la expresión de α -MHC en células del corazón mediante la administración de un inhibidor de miR-208 en las condiciones patológicas.

En ciertos aspectos de la invención se proporciona un antagomir de miR-208 para uso en un procedimiento para inhibir la expresión o la actividad de miR-208, en que el antagomir se administra. En una realización, la presente invención proporciona un antagomir de miR-208. La administración del antagomir o de otro modulador de la expresión o la actividad de miR-208 puede tener lugar por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica para la administración al órgano, tejido o tipo celular deseado. Por ejemplo, el modulador de miR-208 puede administrarse por inyección intravenosa, inyección intraarterial, inyección intrapericárdica o inyección directa en el tejido (p. ej., tejido cardíaco, tejido muscular esquelético). En algunos aspectos, la administración comprende la administración de miR-208 por vía oral, transdérmica, intraperitoneal, subcutánea, de liberación sostenida, liberación controlada, liberación retardada, mediante supositorios o por vía sublingual.

En ciertos aspectos de la invención, se proporciona un inhibidor de miR-208 para uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca

patológica o la insuficiencia cardíaca en un paciente que comprende además la administración al paciente de un segundo tratamiento para la hipertrofia cardíaca. El segundo tratamiento puede ser, por ejemplo, betabloqueante, un inótropo, un diurético, un inhibidor de ECA, un antagonista de All, BNP, un bloqueante de Ca^{2+} y ERA o un
5 inhibidor de HDAC. Dicho segundo tratamiento puede administrarse antes, simultáneamente o después de la inhibición de miR-208.

El tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica o la insuficiencia cardíaca puede definirse como la mejora de uno o más síntomas de la hipertrofia cardíaca patológica o la insuficiencia cardíaca. Los síntomas mejorados pueden ser, por
10 ejemplo, un aumento de la capacidad de ejercicio, un aumento del volumen de eyección cardíaca, una disminución de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, una disminución de la presión de enclavamiento capilar pulmonar, un aumento del gasto cardíaco o del índice cardíaco, una reducción de las presiones de las arterias pulmonares, una disminución de las dimensiones sistólica y diastólica
15 finales del ventrículo izquierdo, una disminución del estrés de las paredes de los ventrículos izquierdo y derecho, una disminución de la tensión de la pared, un aumento de la calidad de vida y una disminución de la morbilidad o la mortalidad relacionadas con la enfermedad. El tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica puede definirse también como un retraso de la transición de la hipertrofia cardíaca a la insuficiencia
20 cardíaca.

Se desvelan procedimientos para la prevención de la hipertrofia patológica o la insuficiencia cardíaca en un paciente con riesgo de padecer hipertrofia cardíaca patológica o insuficiencia cardíaca. El paciente con riesgo de padecer hipertrofia
25 cardíaca patológica o insuficiencia cardíaca puede mostrar uno o más factores de riesgo incluidos, por ejemplo, hipertensión incontrolada de larga duración, valvulopatía no corregida, angina crónica, infarto de miocardio reciente, predisposición congénita a cardiopatías o hipertrofia patológica. En ciertos aspectos, al paciente de riesgo puede habersele diagnosticado una predisposición genética a la hipertrofia cardíaca. En algunos aspectos, el paciente de riesgo puede tener un historial familiar de hipertrofia
30 cardíaca.

Se desvela un procedimiento para disminuir la expresión o la actividad de un gen de una proteína contráctil del músculo esquelético rápido en células del músculo esquelético que comprende la administración de miR-208 a las células del músculo esquelético. Se desvela un procedimiento para el tratamiento o la prevención de un
35 trastorno musculoesquelético en un sujeto que comprende: la identificación de un paciente que padece o presenta riesgo de padecer un trastorno musculoesquelético; y el aumento de la expresión y/o la actividad de miR-208 en células del músculo

esquelético de dicho paciente. El trastorno musculoesquelético puede ser, por ejemplo, atrofia por desuso, desgaste muscular en respuesta a microgravedad o desnervación. En ciertos aspectos, el procedimiento para el tratamiento o la prevención del trastorno musculoesquelético comprende además la administración de un segundo tratamiento sin uso de miR-208.

El aumento de la expresión y/o la actividad de miR-208 puede comprender la administración de miR-208 al sujeto o la administración de un vector de expresión que expresa miR-208 al sujeto. El vector de expresión es un vector de expresión vírico. El vector de expresión vírico puede ser, por ejemplo, un vector de expresión adenovírico o retrovírico. En ciertos aspectos, el vector de expresión es un vector de expresión no vírico. En ciertos aspectos de la invención, se asocia miR-208 o un vector de expresión que codifica miR-208 con un vehículo lipídico. Alternativamente, es posible administrar simplemente miR-208 como tal, incluido opcionalmente en un vehículo de administración, como liposomas o nanopartículas. El hecho de que miR-208 es específico del corazón evita efectos secundarios indeseados en otros órganos.

Se desvela un procedimiento para la identificación de un modulador de miR-208 que comprende: (a) la puesta en contacto de una célula con un compuesto candidato; la evaluación de la actividad o la expresión de miR-208; y (b) la comparación de la actividad o la expresión en la etapa (b) con la actividad o la expresión en ausencia del compuesto candidato, en que la diferencia entre las actividades o la expresión medidas indica que el compuesto candidato es un modulador de miR-208. En ciertos aspectos, la célula se pone en contacto con el compuesto candidato *in vitro*. En otros aspectos, la célula se pone en contacto con el compuesto candidato *in vivo*. El modulador de miR-208 puede ser un agonista o un antagonista de miR-208. Algunos ejemplos de compuestos candidatos que pueden cribarse de acuerdo con los procedimientos descritos son péptidos, polipéptidos, polinucleótidos o moléculas pequeñas.

La evaluación de la actividad o la expresión de miR-208 puede comprender la evaluación del nivel de expresión de miR-208. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con diversos procedimientos para evaluar los niveles de expresión de ARN que incluyen, por ejemplo, la transferencia de ARN o RT-PCR. La evaluación de la actividad o la expresión de miR-208 puede comprender la evaluación de la actividad de miR-208. En algunos aspectos, la evaluación de la actividad de miR-208 comprende la evaluación de la expresión o la actividad de un gen regulado por miR-208. Los genes regulados por miR-208 incluyen, por ejemplo, las cadenas pesadas α y β de la miosina y genes de proteínas del músculo esquelético rápido como troponina I de músculo esquelético rápido, troponina T3, cadena ligera de miosina y α -actina de músculo esquelético. En algunos aspectos, la evaluación de la actividad de miR-208 comprende

la evaluación de la relación entre el nivel de expresión de la cadena pesada α de la miosina y el nivel de expresión de la cadena pesada β de la miosina. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con diversos procedimientos para evaluar la actividad o la expresión de genes regulados por miR-208. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, transferencia de ARN, RT-PCR, ELISA o inmunotransferencia.

Se desvela un modulador de miR-208 identificado por un procedimiento que comprende: (a) la puesta en contacto de una célula con un compuesto candidato; la evaluación de la actividad o la expresión de miR-208; y (b) la comparación de la actividad o la expresión en la etapa (b) con la actividad o la expresión en ausencia del compuesto candidato, en que la diferencia entre las actividades o la expresión medidas indica que el compuesto candidato es un modulador de miR-208. Los moduladores de miR-208 pueden incluirse en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos cardíacos y/o trastornos musculoesqueléticos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Se desvela un inhibidor de miR-208 identificado por un procedimiento que comprende: (a) la puesta en contacto de una célula con un compuesto candidato; (b) la evaluación de la actividad o la expresión de miR-208; y (c) la comparación de la actividad o la expresión en la etapa (b) con la actividad o la expresión en ausencia del compuesto candidato, en que una reducción de la actividad o la expresión en la célula puesta en contacto con el compuesto candidato en comparación con la actividad o la expresión en la célula en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un inhibidor de miR-208.

Se desvela un procedimiento para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica o la insuficiencia cardíaca que comprende: la identificación de un paciente con hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca; y la administración de un inhibidor de miR-208 al paciente. En algunos aspectos, el inhibidor de miR-208 puede identificarse por un procedimiento que comprende: (a) la puesta en contacto de una célula con un compuesto candidato; (b) la evaluación de la actividad o la expresión de miR-208; y (c) la comparación de la actividad o la expresión en la etapa (b) con la actividad o la expresión en ausencia del compuesto candidato, en que una reducción de la actividad o la expresión de miR-208 en la célula puesta en contacto con el compuesto candidato en comparación con la actividad o la expresión en la célula en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un inhibidor de miR-208.

Se desvela un procedimiento para el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos que comprende: la identificación de un paciente que padece o presenta el riesgo de padecer un trastorno musculoesquelético; y la administración de

un agonista de miR-208 al paciente. En ciertos aspectos, el agonista de miR-208 puede identificarse por un procedimiento que comprende: (a) la puesta en contacto de una célula con un compuesto candidato; (b) la evaluación de la actividad o la expresión de miR-208; y (c) la comparación de la actividad o la expresión en la etapa (b) con la actividad o la expresión en ausencia del compuesto candidato, en que un aumento de la actividad o la expresión de miR-208 en la célula puesta en contacto con el compuesto candidato en comparación con la actividad o la expresión en la célula en ausencia del compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un agonista de miR-208.

Se desvela un mamífero transgénico no humano, cuyas células no pueden expresar un miR-208 funcional. Se desvela un mamífero transgénico no humano, cuyas células comprenden una región codificante de miR-208 bajo el control de un promotor heterólogo activo en las células de dicho mamífero no humano. El mamífero transgénico puede ser, por ejemplo, un ratón o una rata. El promotor puede ser un promotor específico de un tejido como, por ejemplo, un promotor específico del músculo esquelético o un promotor específico del músculo cardíaco. Se desvela una célula de mamífero transgénico no humano que carece de uno o los dos alelos nativos de miR-208.

El uso de la palabra “un” o “uno/a”, cuando se usa junto con el término “comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria, puede significar “uno/a”, pero también es coherente con el significado de “uno/a o más”, “al menos uno/a” y “uno/a o más de uno/a”.

Se contempla que cualquier realización discutida en este documento puede implementarse con respecto a cualquier composición de la invención y viceversa. Además, las composiciones de la invención pueden usarse para llevar a cabo los procedimientos desvelados.

A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la desviación o el error estándar para el dispositivo o el procedimiento que se emplea para determinar el valor.

El término “o” en las reivindicaciones se usa para significar “y/o”, a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción apoye una definición que se refiera a alternativas solamente y a “y/o”.

Según se usa en esta memoria y reivindicación(es), las palabras “comprender” (y cualquier forma de comprender como “comprende” y “comprenden”), “tener” (y

cualquier forma de tener como “tiene” y “tienen”), “incluir” (y cualquier forma de incluir como “incluye” e “incluyen”) o “contener” (y cualquier forma de contener como “contiene” y “contienen”) son incluyentes o abiertas y no excluyen elementos o etapas de procedimiento adicionales no mencionados

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos siguientes forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar mejor ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

10 **FIG. 1 - miR-208 está incluido en el gen de la α -MHC cardíaca.** miR-208 está codificado por el intrón 27 del gen de α -MHC. Los asteriscos muestran la secuencia conservada.

15 **FIG. 2 - miR-208 tiene el mismo patrón de expresión que α -MHC.** Detección de transcritos de miR-208 por análisis de transferencia de ARN de tejidos de ratones adultos. Como control de carga se usa ARNm de U6.

20 **FIGS. 3A-C - Regulación de la expresión de miR-208 por hormonas tiroideas.** (FIG. 3A) Diagrama de la regulación de α -MHC y β -MHC por PTU/T3. (FIG. 3B) Se trataron ratas con PTU durante una semana en presencia y en ausencia de T3 y se detectaron los ARNm de α -MHC y β -MHC por PCR en tiempo real. (FIG. 3C) Se trataron ratas con PTU o con PTU + T3, según se indica, durante una semana y se detectó la expresión de miR-208 por transferencia de ARN. Se analizaron los corazones de cuatro animales para cada condición.

25 **FIGS. 4A-C - La inhibición de la expresión de α -MHC conduce a la disminución de los niveles de miR-208.** (FIGS. 4A-B) Niveles de expresión relativa de los transcritos de α -MHC y β -MHC a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días. (FIG. 4C) Análisis de transferencia de ARN con miR-208 en tejido cardíaco de rata en los puntos temporales indicados durante el tratamiento con PTU.

30 **FIGS. 5A-B - Un gen de miR-208 inactivado.** (FIG. 5A) Estrategia para generar ratones mutantes para miR-208 por recombinación homóloga. La secuencia precursora del miARN (pre-miARN) se sustituyó por una casete de resistencia a neomicina (Neo) flanqueada por sitios loxP. La casete de neomicina se eliminó en la línea germinal de los ratones mediante el cruzamiento de ratones heterocigotos con ratones transgénicos que contenían el transgén CAG-Cre. DTA, toxina A de la difteria. (FIG. 5B) Detección de los transcritos de miR-208 por análisis de transferencia de ARN de corazones de
35 ratones no manipulados genéticamente (WT) y de mutantes para miR-208 (KO).

FIGS. 6A-B - La delección de miR-208 no altera la expresión de α -MHC. (FIG. 6A) Análisis de los transcritos de α -MHC por RT-PCR a partir de ARN de corazones de ratones de los genotipos indicados. Se muestran las posiciones de los cebadores con respecto a los exones de α -MHC y los pares de cebadores se indican sobre cada conjunto de muestras. (FIG. 6B) Análisis por inmunotransferencia de los niveles de las proteínas α -MHC y β -MHC en corazones de ratones neonatos de los genotipos indicados. Se analizaron dos ratones de cada genotipo. Se detectó gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como control de carga.

FIG. 7 - Regulación por aumento de genes del músculo esquelético rápido en animales con miR-208 inactivado.

FIG. 8 - Desregulación de los genes de la respuesta al estrés cardíaco en ratones con miR-208 inactivado.

FIG. 9 - Un modelo para el papel de miR-208 en la regulación de los genes cardíacos. El gen de α -MHC codifica miR-208, que regula negativamente la expresión de THRAP1 y de los genes del músculo esquelético (y probablemente otras dianas adicionales). Los genes de α -MHC y β -MHC están ligados y miR-208 se requiere para la regulación por aumento de β -MHC en respuesta a señales de estrés y al bloqueo de la señalización de T3 por PTU. Las proteínas α -MHC y β -MHC estimulan una contractilidad rápida y lenta, respectivamente.

FIG. 10 - Muestras de corazón humano: sin insuficiencia y con insuficiencia.

FIG. 11 - THRAP1 como diana prevista para miR-208. El alineamiento de secuencias del supuesto sitio de unión de miR-208 a la región 3'-UTR de THRAP1 muestra un alto nivel de complementariedad y de conservación de secuencia.

FIG. 12 - Ensayo de la región 3'-UTR de THRAP1 unida a luciferasa.

FIG. 13 - Regulación por aumento de genes del músculo esquelético rápido en corazones de ratones mutantes para miR-208.

FIGS. 14A-E - Análisis de animales no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después de una ligadura de la aorta torácica (TAB). (FIG. 14A) La expresión del ARNm de α -MHC se detectó por PCR en tiempo real en ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después de una operación simulada o de una operación TAB durante 21 días. (FIG. 14B). Se detectó miR-208 por transferencia de ARN de tejido cardíaco de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-}. (FIG. 14C) El análisis ecocardiográfico indicó una disminución de la fracción de acortamiento (FS) debido a un aumento de la dilatación del ventrículo izquierdo en la sístole (LVIDs) en

animales miR-208^{-/-} y en animales de la misma camada no manipulados genéticamente en respuesta a la operación TAB. Los espesores de las paredes anterior y posterior (AW y PW) en la sístole (s) o la diástole (d) después de la operación TAB indican una respuesta hipertrófica debilitada en los animales miR-208^{-/-} en comparación con los animales no manipulados genéticamente (n = 5-7 por grupo). * p < 0,05 en comparación con el grupo no manipulado genéticamente correspondiente. (FIG. 14D) Detección de transcritos de miR-208 por análisis de transferencia de ARN de corazones de ratones no manipulados genéticamente y transgénicos para miR-208. (FIG. 14E). Los transcritos de α -MHC, β -MHC, ANF y BNP se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de los genotipos indicados. Los valores se expresan como factores de incremento de la expresión (\pm ESM) en comparación con los ratones no manipulados genéticamente (n = 3).

FIG. 15A-G - Los ratones miR-208^{-/-} muestran una reducción de la hipertrofia cardíaca en respuesta a una sobrecarga de presión. (FIG. 15A) Secciones histológicas de corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} teñidos por tinción tricómica de Masson. La ausencia de miR-208 disminuye la hipertrofia y la fibrosis observada en ratones no manipulados genéticamente sometidos a la operación TAB durante 21 días. La barra de escala equivale a 2 mm en el panel superior y a 20 μ m en el panel inferior. (FIG. 15B) Los transcritos de β -MHC, ANF y BNP se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después de una operación simulada o de la operación TAB. Los valores se expresan como factores de incremento de la expresión (\pm ESM) en comparación con los ratones no manipulados genéticamente sometidos a una operación simulada (n = 3). (FIG. 15C) Análisis de inmunotransferencia de los niveles de proteína de α -MHC y β -MHC en ratones adultos no manipulados genéticamente y mutantes para miR-208, 21 días después de una operación simulada y de la operación TAB. (FIG. 15D) Secciones histológicas de corazones de ratones de seis semanas de edad que expresan un transgén de calcineurina (CnA-Tg) y de corazones de ratones miR-208^{-/-}; sección de CnA-Tg teñida por tinción tricómica de Masson. La ausencia de miR-208 disminuye la hipertrofia y la fibrosis observada en los ratones CnA-Tg. La barra de escala equivale a 2 mm en el panel superior y a 20 μ m en el panel inferior. (FIG. 15 E) Los transcritos de β -MHC, ANF y BNP se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de los genotipos indicados. Los valores se expresan como factores de incremento de la expresión (\pm ESM) en comparación con los ratones no manipulados genéticamente (n = 3). (FIG. 15F) Análisis de inmunotransferencia de los niveles de proteína de α -MHC y β -MHC en ratones adultos no manipulados genéticamente y mutantes para miR-208 con y sin la presencia del transgén CnA. (FIG. 15G) Análisis de

inmunotransferencia de los niveles de proteína de α -MHC y β -MHC en animales adultos no manipulados genéticamente y transgénicos para miR-208.

FIG. 16A-C - Análisis de animales no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después de un tratamiento con PTU. (FIG. 16A) Se detectó miR-208 por transferencia de ARN de tejido cardíaco de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después de un tratamiento con PTU. (FIG. 16B) La ecocardiografía mostró una disminución comparable de la frecuencia cardíaca (HR) y la fracción de acortamiento (FS) en ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} en respuesta a PTU, debido al aumento de la dilatación del ventrículo izquierdo (LVID) tanto en la diástole (d) como en la sístole (s) y un adelgazamiento de las paredes anterior y posterior del ventrículo izquierdo (AW, PW) (n = 6). * p < 0,05 en comparación con el grupo no manipulado genéticamente correspondiente. (FIG. 16C) Los transcritos de ANF y BNP se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después del tratamiento con PTU. Los valores se expresan como factores de incremento de la expresión (\pm ESM) en comparación con ratones no manipulados genéticamente que habían recibido pienso normal (n = 3).

FIGS. 17-A-B - Regulación de la capacidad de respuesta a hormonas tiroideas del gen de β -MHC por miR-208. (FIG. 17A) Análisis de inmunotransferencia de la expresión de α -MHC y β -MHC en ratones no manipulados genéticamente y en mutantes para miR-208 en el estado inicial y dos semanas después del tratamiento con PTU. (FIG. 17B) Los transcritos de α -MHC y β -MHC se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-} después del tratamiento con PTU. Los valores se expresan como factores de incremento de la expresión (\pm ESM) en comparación con ratones no manipulados genéticamente que habían recibido pienso normal (n = 3).

FIGS. 18A-D - miR-208 reconoce THRAP1 como diana. (FIG. 18A) El alineamiento de secuencias del supuesto sitio de unión de miR-208 a la región 3'-UTR de THRAP1 muestra un alto nivel de complementariedad y de conservación de secuencia. (FIG. 18B) Se transfectaron células COS1 con una construcción 3'-UTR de THRAP1-luciferasa, junto con plásmidos de expresión para miR-126 y miR-208. Los valores se indican como factores de cambio de la expresión de la luciferasa (\pm DE), en comparación con el gen indicador solo. (FIG. 18C) Se transfectaron células COS1 con HA-MCD-UTR no mutada o HA-MCD-UTR mutada junto con dosis crecientes de pCMV-miR-208 en el intervalo de 0,1-2 μ g. Los niveles de HA se detectaron mediante inmunotransferencia. (FIG. 18D) Inmunotransferencia de THRAP1 con el uso de un anticuerpo específico de THRAP1 sobre lisados de células cardíacas inmunoprecipitados con THRAP1, con 400 μ g de proteína de animales no manipulados genéticamente o miR-208^{-/-}.

FIG. 19 - Análisis de transcritos de THRAP1 por RT-PCR. Análisis de los transcritos de THRAP1 por RT-PCR a partir de ARN de corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-}. Se indican las posiciones de los cebadores en el transcrito de ARNm.

5 **FIG. 20** - Análisis por PCR en tiempo real de dianas de señalización para receptores de hormonas tiroideas. Los transcritos de SERCA2 α , PLB y GLUT4 se detectaron por PCR en tiempo real en corazones de ratones no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-}. Los valores se expresan como factores de cambio de la expresión (\pm ESM) en comparación con los ratones no manipulados genéticamente.

10 **FIG. 21** - Transferencia de ARN que muestra la expresión de miR-499 en corazones de ratones no manipulados genéticamente, miR-208^{+/-} y miR-208^{-/-}. Existe una correlación directa entre la expresión de miR-208 y miR-499, así como de Myh7b en ratones no manipulados genéticamente y en ratones mutantes.

15 **FIG. 22** - Estructura del locus Myh7b y la posición de la región codificante de miR-499 dentro de este.

FIG. 23 - Transferencia de ARN que muestra la expresión de miR-499 en el corazón y en el músculo sóleo. miR-499 no se expresa en las fibras de un músculo esquelético rápido como el músculo gastrocnemio/plantar (GP), tibial anterior (TA) o extensor largo de los dedos (EDL).

20 **FIG. 24** - Transferencia de ARN que muestra la expresión de miR-499 en ratones no manipulados genéticamente con una cardiopatía. MI, infarto de miocardio, CnA-Tg, ratones transgénicos para calcineurina.

FIG. 25 - Diagrama esquemático de la regulación de miR-499 y miR-208 en el músculo cardíaco.

25 **FIGS. 26A-C** - Expresión de miARN durante la hipertrofia cardíaca. (FIG. 26A) Secciones teñidas con hematoxilina-eosina de corazones representativos de ratones después de una operación simulada o de la operación TAB durante 21 días y de ratones CnA-Tg. Las barras de escala equivalen a 2 mm. (FIG. 26B) A continuación se muestran diagramas de Venn que indican cuántos microARN experimentaron cambios en la expresión en cada tipo de corazón. (FIG. 26C) Transferencias de ARN de microARN que experimentan cambios en la expresión durante la hipertrofia. Como control de carga se detectó ARN de U6.

30

FIG. 27 - La expresión de miR-29 se regula por disminución en respuesta al estrés cardíaco. A la izquierda se muestran corazones de ratones no manipulados

genéticamente (WT) y de ratones con hipertrofia y fibrosis inducidas por un transgén de calcineurina (CnA) o una intervención TAB. El nivel de expresión relativa de miR-29 en cada tipo de corazón se muestra a la derecha.

5 **FIG. 28** - Análisis de micromatrices de corazones de ratones con miR-208 inactivado en comparación con ratones no manipulados genéticamente. El Análisis de micromatrices se llevó a cabo con ARNm aislado de corazones de ratones no manipulados genéticamente y de mutantes nulos para miR-208 de seis semanas de edad. El miARN que muestra una mayor regulación por disminución, además de miR-208, es miR-499.

10 **FIG. 29** - La familia de miR-29 experimenta una notable regulación por aumento en corazones de mutantes nulos para miR-208.

FIG. 30 - La familia de miR-29 reconoce como diana los ARNm que codifican colágenos y otros componentes de la matriz extracelular asociados con la fibrosis.

15 **FIG. 31** - Modelo para el control de la fibrosis cardíaca por la familia de miR-208 y miR-29. En el corazón normal, miR-208 inhibe la expresión de miR-29. En ausencia de miR-208, la expresión de miR-29 está regulada por aumento, lo que impide la expresión de la matriz extracelular y la fibrosis en respuesta a estrés. Las funciones de miR-208, miR-499 y miR-29 están interrelacionadas. La pérdida de mi-208 puede tener un efecto cardioprotector al impedir la expresión de miR-499 y regular por aumento la
20 expresión de miR-29, con el consecuente bloqueo de la fibrosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

La insuficiencia cardíaca es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. Solamente en los EE. UU., las estimaciones indican que tres millones de personas viven actualmente con una miocardiopatía y se diagnostican otras
25 400.000 cada año. La miocardiopatía dilatada (MCD), también denominada “miocardiopatía congestiva” es la forma más común de las miocardiopatías y se presenta con una frecuencia de casi 40 por cada 100.000 individuos (Durand y col., 1995). Aunque hay otras causas para la MCD, se ha indicado de la miocardiopatía dilatada familiar representa aproximadamente el 20% de la MCD “idiopática”.
30 Aproximadamente la mitad de los casos de MCD son idiopáticos, estando los restantes asociados con procesos patológicos conocidos. Por ejemplo, ciertos medicamentos usados en la quimioterapia del cáncer (p. ej., doxorubicina y daunorrubicina) pueden producir daños graves en el miocardio. Además, muchos pacientes de MCD son alcohólicos crónicos. Afortunadamente para estos pacientes, la progresión de la
35 disfunción miocárdica puede detenerse o revertirse si se reduce el consumo de alcohol

durante la enfermedad. La miocardiopatía periparto es otra forma idiopática de MCD, como enfermedad asociada con secuelas infecciosas. En suma, las miocardiopatías, incluida la MCD, constituyen problemas de salud pública significativos.

Las cardiopatías y sus manifestaciones, incluidas la arteriopatía coronaria, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva y la hipertrofia cardíaca, presentan claramente un importante riesgo para la salud en los Estados Unidos actualmente. Los costes del diagnóstico, el tratamiento y la asistencia a los pacientes que padecen estas enfermedades superan los miles de millones de dólares. Dos manifestaciones especialmente graves de cardiopatía son el infarto de miocardio y la hipertrofia cardíaca. Con respecto al infarto de miocardio, típicamente se produce una oclusión trombocítica aguda en una arteria coronaria como resultado de aterosclerosis que causa la muerte de las células del miocardio. Dado que los miocardiocitos, las células musculares del corazón, están diferenciadas terminalmente y son generalmente incapaces de dividirse, normalmente son reemplazadas por tejido cicatricial cuando mueren en el transcurso de un infarto de miocardio agudo. El tejido cicatricial no es contráctil, no puede contribuir a la función cardíaca y con frecuencia desempeña un papel perjudicial en la función cardíaca al expandirse durante la contracción cardíaca o por el aumento del tamaño y el radio efectivo del ventrículo, por ejemplo, que se vuelve hipertrófico. Con respecto a la hipertrofia cardíaca, una teoría la considera como una enfermedad que se asemeja al desarrollo aberrante y, como tal, plantea la cuestión de si las señales del desarrollo en el corazón pueden contribuir a la enfermedad hipertrófica. La hipertrofia cardíaca es una respuesta adaptativa del corazón a prácticamente todas las formas de cardiopatía, incluidas aquellas ocasionadas por hipertensión, carga mecánica, infarto de miocardio, arritmias cardíacas, trastornos endocrinos y mutaciones genéticas en genes de proteínas contráctiles cardíacas. Mientras que, inicialmente, la respuesta hipertrófica es un mecanismo de compensación que aumenta el gasto cardíaco, la hipertrofia prolongada puede conducir a MCD, insuficiencia cardíaca y muerte súbita. En los Estados Unidos, se le diagnostica insuficiencia cardíaca cada año a aproximadamente medio millón de individuos, con una tasa de mortalidad cercana al 50%.

Las causas y efectos de la hipertrofia cardíaca han sido extensamente documentados, pero no se han elucidado los mecanismos moleculares subyacentes. La comprensión de estos mecanismos es de gran interés en la prevención y el tratamiento de las cardiopatías y serán decisivos como modalidad terapéutica en el diseño de nuevos medicamentos dirigidos específicamente contra la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca. Dado que, típicamente, la hipertrofia cardíaca patológica no produce ningún síntoma hasta que el daño cardíaco es lo suficientemente

grave como para causar insuficiencia cardíaca, los síntomas de la miocardiopatía son aquellos asociados con la insuficiencia cardíaca. Estos síntomas incluyen, dificultad respiratoria, fatiga con el esfuerzo, incapacidad de yacer sin dificultad respiratoria (ortopnea), disnea nocturna paroxística, aumento de las dimensiones cardíacas y/o hinchazón de la parte inferior de las piernas. Con frecuencia, los pacientes presentan también un aumento de la presión sanguínea, ruidos cardíacos adicionales, soplos cardíacos, émbolos pulmonares y sistémicos, dolor en el pecho, congestión pulmonar y palpitaciones. Además, la MCD causa una disminución de las fracciones de eyección (es decir, una medida de la función sistólica intrínseca y la remodelación). Esta enfermedad se caracteriza adicionalmente por la dilatación ventricular y por una función sistólica extremadamente mermada, debido a la disminución de la contractilidad miocárdica, lo que resulta en insuficiencia cardíaca dilatada en muchos pacientes. Los corazones afectados experimentan también una remodelación celular/de cámaras como resultado de la disfunción miocítica/miocárdica, lo que contribuye al “fenotipo MCD”. A medida que progresa la enfermedad, también lo hacen los síntomas. Los pacientes con MCD presentan también un gran aumento de la incidencia de arritmias peligrosas, incluida la taquicardia ventricular izquierda y la fibrilación ventricular. En estos pacientes, un síncope (mareo) se considera como un presagio de muerte súbita.

El diagnóstico de la miocardiopatía dilatada depende típicamente de la demostración de unas cámaras del corazón agrandadas, en particular de ventrículos agrandados. Normalmente, el agrandamiento puede observarse en radiografías de tórax, pero se evalúa de manera más precisa mediante ecocardiogramas. Frecuentemente, la MCD es difícil de distinguir de la miocarditis aguda, la valvulopatía cardíaca, la arteriopatía coronaria y la cardiopatía hipertensiva. Una vez que se ha diagnosticado la miocardiopatía dilatada, todos los esfuerzos se dirigen a la identificación y el tratamiento de las causas potencialmente reversibles y a la prevención de daños adicionales en el corazón. Por ejemplo, deben descartarse la arteriopatía coronaria y la valvulopatía. Es necesario abordar y controlar la anemia, las taquicardias anormales, las deficiencias nutricionales, el alcoholismo, las enfermedades tiroideas y/u otros problemas.

Según se menciona anteriormente, el tratamiento con agentes farmacológicos todavía representa el mecanismo primario para reducir o eliminar las manifestaciones de la insuficiencia cardíaca. Los diuréticos constituyen la primera línea de tratamiento para una insuficiencia cardíaca de suave a moderada. Desafortunadamente, muchos de los diuréticos usados comúnmente (p. ej., las tiazidas) tienen numerosos efectos adversos. Por ejemplo, ciertos diuréticos pueden aumentar el colesterol y los triglicéridos en el suero. Además, generalmente los diuréticos son ineficaces para pacientes que padecen una insuficiencia cardíaca grave.

Si los diuréticos son ineficaces, pueden usarse agentes vasodilatadores; los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) (p. ej., enalapril y lisinopril) no solamente proporcionan un alivio sintomático, sino que también se ha descrito que reducen la mortalidad (Young y col., 1989). De nuevo, sin embargo, los inhibidores de ECA se asocian con efectos adversos que resultan en su contraindicación para pacientes con ciertos estados patológicos (p. ej., estenosis de la arteria renal). De manera similar, el tratamiento con un agente inotrópico (es decir, un medicamento que mejora el gasto cardíaco mediante el aumento de la fuerza de la contracción del músculo miocárdico) se asocia con un conjunto de reacciones adversas que incluye problemas gastrointestinales y la disfunción del sistema nervioso central.

Por lo tanto, los agentes farmacológicos usados actualmente presentan graves desventajas en determinadas poblaciones de pacientes. Sin duda, la disponibilidad de agentes nuevos, seguros y eficaces beneficiaría a los pacientes que no pueden usar las modalidades farmacológicas disponibles en el presente o que no reciben el alivio adecuado con estas modalidades. El pronóstico para pacientes con MCD es variable y depende del grado de disfunción ventricular, produciéndose la mayoría de las muertes dentro de un plazo de cinco años desde el diagnóstico.

I. La presente invención

La proporción entre las isoformas α -MHC y β -MHC en el corazón adulto es un determinante fundamental de la contractilidad cardíaca. La β -MHC, la principal isoforma de la miosina en el corazón adulto, muestra relativamente baja actividad ATPasa, mientras que la α -MHC tiene una alta actividad ATP-asa. En respuesta a diversos estímulos patológicos como el infarto de miocardio, la hipertensión y otros trastornos, la expresión de β -MHC aumenta y la expresión de α -MHC disminuye, con la consiguiente reducción de actividad ATPasa miofibrilar y reducción de la velocidad de acortamiento de las miofibras cardíacas, lo que conduce finalmente a una disfunción contráctil. Notablemente, cambios menores en el contenido de α -MHC del corazón pueden tener una profunda influencia en el rendimiento cardíaco.

Los microARN (miR) son pequeños ARN de aproximadamente 22 nucleótidos, derivados de precursores (pre-miARN) de mayor longitud. Los miR actúan como represores de ARNm diana y estimulan su degradación cuando las secuencias son perfectamente complementarias o inhiben su traducción cuando las secuencias contienen apareamientos erróneos. El microARN 208 (miR-208) está codificado por un intrón del gen de α -MHC y se expresa específicamente en el corazón. Los inventores han creado ratones con miR-208 inactivado y han descubierto que se requiere miR-208 para la activación de la expresión del gen de β -MHC en el corazón adulto, así como

para la expresión de otros genes de proteínas contráctiles. Además, la inhibición de miR-208 conduce a una fuerte reducción de la fibrosis cardíaca. Estos resultados sugieren que las estrategias para modular la expresión de miR-208 tendrán profundos efectos en la contractilidad cardíaca en humanos, por ejemplo, la inhibición de miR-208 para impedir la expresión de β -MHC y mantener la expresión de α -MHC en el corazón después de una lesión cardíaca.

Se desvela el agonismo de la expresión o la actividad de miR-208, mediante la activación terapéutica del gen endógeno de miR-208 o mediante la introducción de un miR-208 exógeno en el corazón por medio de vectores adenovíricos u otros – de nuevo, no hay necesidad de usar un sistema adenovírico como medio de expresión ectópica para aumentar la expresión de β -MHC– para el tratamiento de individuos con una mutación en el gen de α -MHC. La regulación por aumento de varios genes de proteínas contráctiles del músculo esquelético rápido en los corazones de ratones mutantes para miR-208 sugiere también que, típicamente, miR-208 reprime el programa génico del músculo esquelético rápido. La activación de estos genes en el corazón representa una estrategia potencial para regular la contractilidad cardíaca.

Se desvela el uso de miR-208 para reprimir los genes de las fibras rápidas en el músculo esquelético y de este modo activar la expresión recíproca de los genes de las fibras lentas, lo que se acopla con un aumento de la sensibilidad a la insulina y de la resistencia del músculo esquelético. La represión de los genes de las fibras lentas y la activación de los genes de las fibras rápidas en el músculo esquelético se asocian con numerosos trastornos musculoesqueléticos, incluidas la atrofia por desuso, el desgaste muscular en respuesta a la antigraedad y la desnervación.

Por lo tanto, los presentes inventores han descubierto que miR-208 es un regulador esencial y específico del músculo de la expresión del gen de β -MHC en el corazón que además regula la fibrosis cardíaca. El descubrimiento de que miR-208 regula la expresión de β -MHC y la expresión de los genes del músculo esquelético rápido es completamente novedosa, así como el uso de este microARN para controlar la contractilidad cardíaca y la función del músculo esquelético.

30 II. miARN

A. Antecedentes

En 2001, varios grupos usaron un nuevo procedimiento de clonación para aislar e identificar un extenso grupo de “microARN” (miARN) de *C. elegans*, *Drosophila* y humanos (Lagos-Quintana y col., 2001; Lau y col., 2001; Lee y Ambros, 2001). Se han identificado varios cientos de miARN en plantas y animales, incluidos los humanos,

que no parecen tener siARN endógenos. Por no tanto, aunque son similares a los siARN, los miARN son distintos.

Los miARN observados hasta el momento tienen una longitud aproximada de 21-22 nucleótidos y se originan a partir de precursores de mayor longitud que se transcriben a partir de genes que no codifican proteínas. Véase una revisión de Carrington y col. (2003). Los precursores forman estructuras que se repliegan sobre sí mismas en regiones de autocomplementariedad; después son procesados por la nucleasa Dicer en animales o por DCL1 en plantas. Las moléculas de miARN interrumpen la traducción a través de un apareamiento de bases preciso o impreciso con sus dianas.

Los miARN intervienen en la regulación génica. Algunos miARN, incluidos lin-4 y let-7, inhiben la síntesis de proteínas al unirse a regiones no traducidas del extremo 3' (3'-UTR) parcialmente complementarias de los ARNm diana. Otros, incluido el miARN Scarecrow encontrado en plantas, funcionan como siARN y se unen a secuencias perfectamente complementarias del ARNm para destruir el transcrito diana (Grishok y col., 2001).

La investigación sobre los microARN está aumentando a medida que los científicos empiezan a apreciar el amplio papel que desempeñan estas moléculas en la regulación de la expresión génica en eucariotas. Los miARN mejor comprendidos, lin-4 y let-7, regulan la sincronización del desarrollo en *C. elegans* mediante la regulación de la traducción de una familia de ARNm clave (revisado en Pasquinelli, 2002). Se han identificado varios cientos de miARN en *C. elegans*, *Drosophila*, ratón y humanos. Como se esperaría de moléculas que regulan la expresión génica, se ha observado que los niveles de miARN varían entre tejidos y estados de desarrollo. Además, un estudio demuestra una gran correlación entre una reducida expresión de dos miARN y la leucemia linfocítica crónica, lo que proporciona una posible relación entre los miARN y el cáncer (Calin, 2002). Aunque el campo todavía es joven, existe la especulación de que los miARN podrían ser tan importantes como los factores de transcripción para la regulación de la expresión génica en eucariotas superiores.

Hay unos pocos ejemplos de miARN que desempeñan papeles críticos en la diferenciación celular, el desarrollo temprano y procesos celulares como la apoptosis y el metabolismo de las grasas. Ambos lin-4 y let-7 regulan el paso desde un estado de larva a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). mir-14 y bantam son miARN de *Drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente por regulación de la expresión de genes implicados en la apoptosis (Brennecke y col., 2003; Xu y col., 2003). A miR-14 también se le atribuye la intervención en el

metabolismo de las grasas (Xu y col., 2003). Lsy-6 y mir-273 son miARN de *C. elegans* que regulan la asimetría en neuronas quimiosensitivas (Chang y col., 2004). Otro miARN en animales que regula la diferenciación celular es miR-181, que guía la diferenciación celular hematopoyética (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan la gama completa de miARN en animales con funciones conocidas. Sin duda, una mejor comprensión de las funciones de los miARN revelará redes de regulación que contribuyen a un normal desarrollo, diferenciación, comunicación intercelular e intracelular, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis y muchos otros procesos celulares. Dados sus importantes papeles en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para la intervención terapéutica o el análisis de diagnóstico.

Con frecuencia, la caracterización de las funciones de biomoléculas como los miARN implica la introducción de las moléculas en células o la eliminación de las moléculas de las células y la medición del resultado. Si la introducción de un miARN en células resulta en apoptosis, indudablemente, el miARN participa en una ruta de la apoptosis. Se han descrito procedimientos para la introducción y la eliminación de miARN en células. Dos publicaciones recientes describen moléculas no codificantes que pueden usarse para inhibir la actividad de miARN específicos (Meister y col., 2004; Hutvanger y col., 2004). Otra publicación describe el uso de plásmidos que son transcritos por ARN-polimerasas endógenas y que producen miARN específicos cuando se transfectan en células (Zeng y col., 2002). Estos dos conjuntos de reactivos se han usado para evaluar miARN individuales.

B. miR-208

El miR-208 es un miARN intrónico localizado dentro del intrón n.º 27 del gen de α -MHC. FIG. 1. Las secuencias que codifican los pre-miARN de miR-208 para humanos, ratón, rata y perro se proporcionan en SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17, respectivamente. La secuencia del miR-208 maduro se proporciona en SEQ ID NO:5. Al igual que α -MHC, miR-208 se expresa solamente en el corazón. FIG. 2.

Mediante el algoritmo PicTar para la identificación de dianas de miARN (Krek y col., 2005), los inventores identificaron la proteína asociada a receptores de hormonas tiroideas 1 (THRAP1) como una diana prevista para miR-208. Las secuencias de la región 3'-UTR de THRAP1 humana, de chimpancé, ratón, rata, perro, pollo, fugu y pez cebra se proporcionan en SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13, respectivamente.

C. Inhibidores de miR-208

En general, los inhibidores de los miARN toman la forma de “antagomires”, oligonucleótidos monocatenarios de poca longitud manipulados químicamente y complementarios de los miARN que bloquean la función de dichos miARN (Krützfeldt y col., 2005). Otras estrategias incluyen la inhibición de los miARN con oligorribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'-OMe) y pequeños ARN bicatenarios interferentes (siARN) manipulados para tener ciertas propiedades “de tipo fármaco” (modificaciones químicas para estabilidad, conjugación con colesterol para administración) (Krützfeldt y col., 2005).

10 III. Procedimientos de tratamiento de la hipertrofia cardíaca

A. Regímenes terapéuticos

El tratamiento médico actual de la hipertrofia cardíaca en el contexto de un trastorno cardiovascular incluye el uso de al menos dos tipos de fármacos: inhibidores del sistema renina-angiotensina y agentes bloqueantes β -adrenérgicos (Bristow, 1999). Los agentes terapéuticos para el tratamiento de la hipertrofia patológica en el contexto de la insuficiencia cardíaca incluyen inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina II (ECA) y agentes bloqueantes del receptor β -adrenérgico (Eichhorn y Bristow, 1996). Otros agentes farmacéuticos que se han desvelado para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca incluyen antagonistas de receptores de la angiotensina II (patente de los EE. UU. 5.604.251) y antagonistas del neuropéptido Y (documento WO 98/33791). A pesar de los compuestos farmacéuticos disponibles actualmente, la prevención y el tratamiento de la hipertrofia cardíaca y de la subsiguiente insuficiencia cardíaca continúan presentando un reto terapéutico.

Los tratamientos no farmacológicos se usan fundamentalmente como auxiliares del tratamiento farmacológico. Una forma de tratamiento no farmacológico implica la reducción del sodio en la dieta. Adicionalmente, un tratamiento no farmacológico supone también la eliminación de determinados fármacos desencadenantes, incluidos agentes inotrópicos negativos (p. ej., ciertos fármacos bloqueantes de canales de calcio y antiarrítmicos como disopiramida), cardiotoxinas (p. ej., anfetaminas) y expansores del volumen plasmático (p. ej., agentes antiinflamatorios no esteroideos y glucocorticoides).

En una realización de la presente invención, se proporcionan inhibidores de miR-208 para uso en procedimientos para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca o la insuficiencia cardíaca. Para los fines de la presente solicitud, el tratamiento comprende la reducción de uno o más de los síntomas de la hipertrofia cardíaca, como la reducción

de la capacidad de ejercicio, la reducción del volumen de eyección sanguínea, el aumento de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, el aumento de la presión de enclavamiento capilar pulmonar, la reducción del gasto cardíaco o índice cardíaco, el aumento de las presiones de las arterias pulmonares, el aumento de las dimensiones
 5 sistólica y diastólica finales del ventrículo izquierdo y el aumento del estrés de la pared, de la tensión de la pared y del espesor de la pared del ventrículo izquierdo y lo mismo para el ventrículo derecho. Además, el uso de inhibidores de miR-208 puede impedir que se produzca una hipertrofia cardíaca y los síntomas asociados a esta.

Los regímenes de tratamiento variarán en función de la situación clínica. Sin
 10 embargo, un mantenimiento a largo plazo podría parecer apropiado en la mayoría de los casos. También puede ser deseable tratar la hipertrofia con inhibidores de miR-208 de manera intermitente, por ejemplo dentro de una breve ventana temporal durante la evolución de la enfermedad.

B. Tratamiento combinado

En otra realización, se considera el uso de un inhibidor de miR-208 de la
 15 invención en combinación con otras modalidades terapéuticas. De este modo, además de los tratamientos descritos anteriormente, pueden proporcionarse al paciente tratamientos cardíacos farmacéuticos más “estándar”. Algunos ejemplos de otros
 20 tratamientos incluyen, sin limitación, los denominados “betabloqueantes”, antihipertensivos, cardiotónicos, antitrombóticos, vasodilatadores, antagonistas de hormonas, inótrópos, diuréticos, antagonistas de receptores de endotelina, bloqueantes de canales de calcio, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de ECA, antagonistas de angiotensina de tipo 2 y bloqueantes/inhibidores de citocinas e inhibidores de HDAC.

Las combinaciones pueden llevarse a cabo mediante la puesta en contacto de
 25 células cardíacas con una única composición o formulación farmacológica que incluye los dos agentes o mediante la puesta en contacto de la célula con dos composiciones o formulaciones distintas simultáneamente, en que una composición incluye la construcción de expresión y la otra incluye el agente. Alternativamente, el tratamiento
 30 con el uso de un inhibidor de miR-208 puede preceder o seguir a la administración del/de los otro(s) agente(s) en intervalos de minutos a semanas. En las realizaciones en las que el otro agente y la construcción de expresión se administran por separado a la célula, sería necesario asegurarse de que no transcurre un periodo de tiempo significativo entre los momentos de cada administración, de modo que el agente y la
 35 construcción de expresión sean aún capaces de ejercer un efecto combinado ventajoso sobre la célula. En tales casos, se contempla típicamente la puesta en contacto de la

célula con las dos modalidades dentro de un plazo de aproximadamente 12-24 horas entre ambas y con mayor preferencia, dentro de un plazo de aproximadamente 6-12 horas entre ambas, en que una diferencia de solo aproximadamente 12 horas es la más preferida. En algunas situaciones, sin embargo, puede ser deseable extender significativamente el periodo de tiempo del tratamiento, con lapsos de varios días (dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) a varias semanas (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho) entre las respectivas administraciones.

También es concebible que se desee más de una administración del inhibidor de miR-208 o del otro agente. A este respecto, pueden emplearse diversas combinaciones. A modo de ilustración, con "A" como el inhibidor de miR-208 y "B" como el otro agente, son ejemplares las siguientes permutaciones basadas en tres y cuatro administraciones en total:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Igualmente se contemplan otras combinaciones.

C. Agentes terapéuticos farmacológicos

Los agentes farmacológicos terapéuticos y los procedimientos de administración, dosis, etc. son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, "Physicians Desk Reference", "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Klaassen, "Remington's Pharmaceutical Sciences" y "The Merck Index", 11.^a edición) y pueden combinarse con la invención a la vista de las descripciones de este documento. Necesariamente habrá algunas variaciones en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto que se trate. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto individual y tales determinaciones individuales se hallan dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de agentes terapéuticos farmacológicos que pueden usarse en la presente invención incluyen un agente antihiperlipoproteinémico, un agente antiarterioesclerótico, un agente antitrombótico/fibrinolítico, un coagulante sanguíneo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensivo, un vasopresor, un agente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, un agente antianginoso, un agente antibacteriano o una combinación de estos.

Además, debe señalarse que cualquiera de los siguientes puede usarse para desarrollar nuevos conjuntos de genes diana para el tratamiento cardíaco, como los

betabloqueantes usados en los presentes ejemplos (ver más adelante). Mientras que es de esperar un posible solapamiento de muchos de estos genes, es probable que puedan desarrollarse nuevas dianas génicas.

i. Antihiperlipoproteinémicos

5 En algunos casos, la administración de un agente que reduce la concentración de uno más lípidos y/o lipoproteínas de la sangre, conocido en este documento como “antihiperlipoproteinémico”, puede combinarse con un tratamiento cardiovascular desvelado en el presente documento, en particular en el tratamiento de aterosclerosis y engrosamientos o bloqueos de tejidos vasculares. En ciertos aspectos, un agente
10 antihiperlipoproteinémico puede comprender un derivado de ácido ariloxialcanoico/fíbrico, una resina fijadora de ácido biliar, un inhibidor de la HMG-CoA-reductasa, un derivado de ácido nicotínico, una hormona tiroidea o un análogo de hormona tiroidea, un agente misceláneo o una combinación de estos.

a. Derivados de ácido ariloxialcanoico/ácido fíbrico

15 Algunos ejemplos no limitantes de derivados de ácido ariloxialcanoico/fíbrico incluyen beclobrato, bezafibrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato (atromide-S), ácido clofibrato, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo (Lobid), nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato y teofibrato.

b. Resinas fijadoras de ácidos biliares

20 Algunos ejemplos no limitantes de resinas fijadoras de ácidos biliares incluyen colestiramina (Cholybar, Questran), colestipol (Colestid) y polidexida.

c. Inhibidores de HMG-CoA-reductasa

Algunos ejemplos no limitantes de inhibidores de HMG-CoA-reductasa incluyen lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravochol) o simvastatina (Zocor).

d. Derivados de ácido nicotínico

25 Algunos ejemplos de derivados de ácido nicotínico incluyen nicotinato, acepimox, niceritrol, nicoclonato, nicomol y ácido oxiniácico.

e. Hormonas tiroideas y análogos

30 Algunos ejemplos de hormonas tiroideas y análogos de estas incluyen etoroxato, ácido tiroprópico y tiroxina.

f. Antihiperlipoproteinémicos diversos

Algunos ejemplos de antihiperlipoproteinémicos diversos incluyen acifrano, azacosterol, benfluorex, β -benzalbutiramida, carnitina, sulfato de condroitina, clomestrona, detaxtrano, dextranosulfato de sodio, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, eritadenina, fenilbutiramida, furazabol, meglutol, melinamida, mitatrienodiol, ornitina, γ -orizanol, pantetina, tetraacetato de pentaeritritol, α -fenilbutiramida, pirozadilo, probucol (Lorelco), β -sitosterol, sal de piperazina del ácido sultosílico, tiadenol, triparanol y xembucina.

ii. Antiarterioscleróticos

Un ejemplo de un antiarteriosclerótico incluye carbamato de piridinol.

10 iii. Agentes antitrombóticos/fibrinolíticos

En ciertas realizaciones, puede combinarse la administración de un agente que ayuda en la eliminación o la prevención de coágulos sanguíneos con la administración de un modulador, en particular en el tratamiento de la aterosclerosis y bloqueos de la vasculatura (p. ej. arterial). Algunos ejemplos no limitantes de agentes antitrombóticos y/o fibrinolíticos incluyen anticoagulantes, antagonistas de anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antagonistas de agentes trombolíticos o combinaciones de estos.

En ciertos aspectos, se prefieren los agentes antitrombóticos que pueden administrarse por vía oral, como por ejemplo, aspirina y warfarina (Coumadina).

20 a. Anticoagulantes

Algunos ejemplos de anticoagulantes incluyen acenocumarol, ancrodo, anisindiona, bromindiona, clorindiona, cumetarol, ciclocumarol, dextranosulfato de sodio, dicumarol, difenadiona, biscumacetato de etilo, etilidendicumarol, fluidindiona, heparina, hirudina, liapolato de sodio, oxazidiona, polisulfato de pentosán, fenindiona, fenprocumona, fosvitina, picotamida, tiocloamarol y warfarina.

b. Agentes antiplaquetarios

Algunos ejemplos de agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (Persantin), heparina, sulfipirazona (Anturane) y triclopidina (Triclid).

c. Agentes trombolíticos

30 Algunos ejemplos de agentes trombolíticos incluyen el activador del plasminógeno tisular (Activase), plasmina, prourocinasa, urocinasa (Abbokinase), estreptocinase (Streptase), anistreplase/APSAC (Eminase).

iv. Coagulantes sanguíneos

En ciertas realizaciones en las que un paciente padece una hemorragia o un aumento del riesgo de hemorragia, puede usarse un agente que puede incrementar la coagulación sanguínea. Algunos ejemplos no limitantes de agentes estimulantes de la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes.

a. Antagonistas de anticoagulantes

Algunos ejemplos de antagonistas de anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.

10 b. Antagonistas de agentes trombolíticos y antitrombóticos

Algunos ejemplos de antagonistas de agentes trombolíticos incluyen ácido aminocaproico (Amicar) y ácido tranexámico (Amstat). Algunos ejemplos no limitantes de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatrobán, cilostazol, daltrobán, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparán, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

v. Agentes antiarrítmicos

Algunos ejemplos de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de canales de sodio), agentes antiarrítmicos de clase II (bloqueantes β -adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de clase III (fármacos prolongadores de la repolarización), agentes antiarrítmicos de clase IV (bloqueantes de canales de calcio) y agentes antiarrítmicos diversos.

a. Bloqueantes de canales de sodio

Algunos ejemplos de bloqueantes de canales de sodio incluyen agentes antiarrítmicos de la clase IA, la clase IB y la clase IC. Algunos ejemplos de agentes antiarrítmicos de la clase IA incluyen disopiramida (Norpace), procainamida (Pronestyl) y quinidina (Quinidex). Algunos ejemplos no limitantes de agentes antiarrítmicos de la clase IB incluyen lidocaína (Xylocaine), tocainida (Tonocard) y mexiletina (Mexitil). Algunos ejemplos de agentes antiarrítmicos de la clase IC incluyen encainida (Enkaid) y flecainida (Tambocor).

30 b. Betabloqueantes

Algunos ejemplos de betabloqueantes, también conocidos como bloqueantes β -adrenérgicos, antagonistas β -adrenérgicos o agentes antiarrítmicos de clase II incluyen acebutolol (Sectral), alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol,

bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, clorhidrato de butidrina, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol (Brevibloc), indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, 5 oxprenolol, penbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propanolol (Inderal), sotalol (betapace), sulfmalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. In algunos aspectos, el betabloqueante comprende un derivado de ariloxipropanolamina. Algunos ejemplos de derivados de ariloxipropanolamina incluyen acebutolol, alprenolol, arotinolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bunitrolol, butofilolol, 10 carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, epanolol, indenolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

c. Agentes prolongadores de la repolarización

Algunos ejemplos de agentes prolongadores de la polarización, también 15 conocidos como agentes antiarrítmicos de clase III incluyen amiodarona (Cordarone) y sotalol (Betapace).

d. Bloqueantes/antagonistas de canales de calcio

Algunos ejemplos de bloqueantes de canales de calcio, también conocidos como 20 agentes antiarrítmicos de clase IV incluyen una arilalquilamina (p. ej., bepridilo, diltiazem, fendilina, galopamilo, prenilamina, terodilina, verapamilo), un derivado de dihidropiridina (felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina), un derivado de piperazina (p. ej., cinarizina, flunarizina, lidoflazina) o bloqueantes de canales de calcio diversos como benciclano, etafenona, magnesio, mibefadrilo o perhexilina. En ciertas realizaciones, un bloqueante de un canal de calcio 25 comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina (de tipo nifedipina) de efecto prolongado.

e. Agentes antiarrítmicos diversos

Algunos ejemplos de agentes antiarrítmicos diversos incluyen adenosina 30 (Adenocard), digoxina (Lanoxin), acecainida, ajmalina, amoproxano, aprindina, tosilato de bretilio, bunaftina, butobendina, ácido capobénico, cifenlina, disopiramida, hidroquinidina, indecainida, ipatropio, bromuro, lidocaína, lorajmina, lorcainida, meobentina, moricizina, pirmenol, prajmalina, propafenona, pirinolina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina y viquidilo.

vi. Agentes antihipertensivos

Algunos ejemplos de agentes antihipertensivos incluyen simpaticolíticos, alfa/betabloqueantes, alfabloqueantes, agentes contra la angiotensina II, betabloqueantes, bloqueantes de canales de calcio, vasodilatadores y antihipertensivos
5 diversos.

a. Alfabloqueantes

Algunos ejemplos de alfabloqueantes, también conocidos como bloqueantes α -adrenérgicos o antagonistas α -adrenérgicos, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosina, mesilatos ergoloides, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina,
10 prazosina, terazosina, tolazolina, trimazosina y yohimbina. En ciertas realizaciones, un alfabloqueante puede comprender un derivado de quinazolina. Algunos ejemplos de derivados de quinazolina incluyen alfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina.

b. Alfa/betabloqueantes

En ciertas realizaciones, un agente antihipertensivo es un antagonista tanto α como β -adrenérgico. Algunos ejemplos de un alfa/betabloqueante comprenden labetalol (Normodyne, Trandate).
15

c. Agentes contra la angiotensina II

Algunos ejemplos de agentes contra la angiotensina II incluyen inhibidores de la
20 enzima de conversión de la angiotensina y antagonistas de receptores de la angiotensina II. Algunos ejemplos de inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (Inhibidores de ECA) incluyen alaceprilo, enalaprilol (Vasotec), captoprilo, cilazaprilol, delaprilol, enalaprilato, fosinoprilol, lisinoprilol, moveltoprilol, perindoprilol, quinaprilol y ramiprilol. Algunos ejemplos de bloqueantes de receptores de la
25 angiotensina II, también conocidos como antagonistas de receptores de la angiotensina II, bloqueantes de receptores de ANG o bloqueantes de receptores de ANG-II de tipo 1 (ARBS) incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán.

d. Simpaticolíticos

Algunos ejemplos de simpaticolíticos incluyen simpaticolíticos de acción central o
30 simpaticolíticos de acción periférica. Algunos ejemplos de simpaticolíticos de acción central, también conocidos como simpaticolíticos del sistema nervioso central (SNC) incluyen clonidina (Catapres), guanabenzol (Wytensin), guanfacina (Tenex) y metildopa (Aldomet). Algunos ejemplos de simpaticolíticos de acción periférica incluyen un agente bloqueante de ganglios, un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas, un

agente bloqueante β -adrenérgico o un agente bloqueante α -adrenérgico. Algunos ejemplos de agentes bloqueantes de ganglios incluyen mecamilamina (Inversine) y trimetafán (Arfonad). Algunos ejemplos de bloqueantes de neuronas adrenérgicas incluyen guanetidina (Ismelin) y reserpina (Serpasil). Algunos ejemplos de bloqueantes β -adrenérgicos incluyen acenitolol (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), carteolol (Cartrol), labetalol (Normodyne, Trandate), metoprolol (Lopressor), nadanol (Corgard), penbutolol (Levatol), pindolol (Visken), propranolol (Inderal) y timolol (Blocadren). Algunos ejemplos de bloqueantes α -adrenérgicos incluyen prazosina (Minipress), doxazocina (Cardura) y terazosina (Hytrin).

10 **e. Vasodilatadores**

En ciertas realizaciones, un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (p. ej., un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico. En ciertas realizaciones preferidas, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Algunos ejemplos de vasodilatadores coronarios incluyen amotrifeno, bendazol, hemisuccinato de benfurodilo, benziodarona, cloracizina, cromonar, clobenfurol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrato de eritritilo, etafenona, fendilina, floretilo, ganglefeno, bis(β -dietilaminoetileter) de herestrol, hexobendina, tosilato de itramina, kelina, lidoflazina, hexanitrato de manitol, medibazina, nitroglicerina, tetranitrato de pentaeritritol, pentritinol, perhexilina, pimefilina, trapidilo, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trolnitrato y visnadina.

En ciertos aspectos, un vasodilatador puede comprender un vasodilatador de tratamiento crónico o un vasodilatador para crisis hipertensivas. Algunos ejemplos de vasodilatadores de tratamiento crónico incluyen hidralazina (Apresoline) y minoxidilo (Loniten). Algunos ejemplos de vasodilatadores para crisis hipertensivas incluyen nitroprusido (Nipride), diazóxido (Hyperstat IV), hidralazina (Apresoline), minoxidilo (Loniten) y verapamilo.

f. Antihipertensivos diversos

Algunos ejemplos de antihipertensivos diversos incluyen ajmalina, ácido γ -aminobutírico, bufeniolo, cicletanina, ciclosidomina, un tanato de criptenamina, fenoldopam, flosequinano, ketanserina, mebutamato, mecamilamina, metildopa, tiosemicarbazona de metil-4-piridilcetona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidilo, piperoxano, primaperona, una protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenidina, saralazina, nitroprusido de sodio, ticrinafeno, camsilato de trimetafán, tirosinasa y urapidilo.

En ciertos aspectos, un antihipertensivo puede comprender un derivado de ariletanolamina, un derivado de benzotiadiazina, un derivado de *N*-carboxialquil(péptido/lactama), un derivado de dihidropiridina, un derivado de guanidina, una hidrazina/ftalazina, un derivado de imidazol, un compuesto de amonio cuaternario, un derivado de reserpina o un derivado de sulfonamida.

Derivados de ariletanolamina. Algunos ejemplos de derivados de ariletanolamina incluyen amosulalol, bufuralol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol.

Derivados de benzotiadiazina. Algunos ejemplos de derivados de benzotiadiazina incluyen altiazida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, diazóxido, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politiazida, tetraclormetiazida y triclorometiazida.

Derivados de *N*-carboxialquil(péptido/lactama). Algunos ejemplos de derivados de *N*-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alaceprilo, captoprilo, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilato, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril.

Derivados de dihidropiridina. Algunos ejemplos de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipina, felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nisoldipina y nitrendipina.

Derivados de guanidina. Algunos ejemplos de derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanacina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfancina, guanocloro, guanoxabenz y guanoxán.

Hidrazinas/ftalazinas. Algunos ejemplos de hidrazinas/ftalazinas incluyen budralazina, cadralazina, dihidralazina, endralazina, hidracarbazina, hidralazina, feniprazina, pildralazina y todralazina.

Derivados de imidazol. Algunos ejemplos de derivados de imidazol incluyen clonidina, lofexidina, fentolamina, tiamenidina y tolonidina.

Compuestos de amonio cuaternario. Algunos ejemplos de compuestos de amonio cuaternario incluyen bromuro de azametonio, cloruro de clorisondamina, hexametonio, bis(metilsulfato) de pentacinio, bromuro de pentametonio, tartrato de pentolinio, cloruro de fenactropinio y metosulfato de trimetidinio.

Derivados de reserpina. Algunos ejemplos de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinamina, reserpina y sirosingopina.

Derivados de sulfonamida. Algunos ejemplos de derivados de sulfonamida incluyen ambusida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida.

g. Vasopresores

Generalmente, los vasopresores se usan para aumentar la presión sanguínea durante el estado de choque que puede presentarse durante una intervención quirúrgica. Algunos ejemplos de vasopresores, también conocidos como antihipotensivos, incluyen metilsulfato de amezinio, amida de angiotensina, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foledrina y sinefrina.

vii. Agentes para tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva

Algunos ejemplos de agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen agentes contra la angiotensina II, un tratamiento de reducción de la postcarga-precarga, diuréticos y agentes inotrópicos.

a. Reducción de la postcarga-precarga

En ciertas realizaciones, un paciente animal que no puede tolerar un antagonista de angiotensina puede tratarse con un tratamiento combinado. Este tratamiento puede combinar la administración de hidralazina (Apresoline) y dinitrato de isosorbida (Isordil, Sorbitrate).

b. Diuréticos

Algunos ejemplos de diuréticos incluyen un derivado de tiazida o benzotiadiazina (p. ej., altiazida, bendroflumetiazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, epitiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politiazida, tetraclormetiazida, triclorometiazida), un compuesto organomercúrico (p. ej., clormerodrino, meralurida, mercanfamida, mercaptomerina de sodio, ácido mercumalílico, mercumatilina de sodio, cloruro de mercurio, mersalilo), una pteridina (p. ej., furtereno, triamtereno), purinas (p. ej., acefilina, 7-morfolinometilteofilina, pamobromo, proteobromina, teobromina), esteroides, incluidos antagonistas de aldosterona (p. ej., canrenona, oleandrina, espirolactona), un derivado de sulfonamida (p. ej., acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloramifenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenilmetano-

4,4'disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretanida, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (p. ej., aminometradina, amisometradina), un antagonista ahorrador de potasio (p. ej., amilorida, triamtereno) o un diurético diverso como aminosina, arbutina, clorazano, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metochalcona, muzolimina, perhexilina, ticrinafeno y urea.

c. Agentes inotrópicos

Algunos ejemplos de agentes inotrópicos positivos, también conocidos como cardiotónicos, incluyen acefilina, una acetildigitoxina, 2-amino-4-picolina, amrinona, hemisuccinato de benfurodilo, bucladesina, cerberosina, camfotamida, convalatoxina, cimarina, denopamina, deslanosida, digitalina, digitalis, digitoxina, digoxina, dobutamina, dopamina, dopexamina, enoximona, eritrofleína, fenalcomina, gitalina, gitoxina, glicociamina, heptaminol, hidrastinina, ibopamina, una lanatosida, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaína, oxifedrina, prenalterol, proscillaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En aspectos concretos, un agente inotrópico es un glucósido cardíaco, un agonista β -adrenérgico o un inhibidor de fosfodiesterasa. Algunos ejemplos de glucósidos cardíacos incluyen digoxina (Lanoxin) y digitoxina (Crystodigin). Algunos ejemplos de agonistas β -adrenérgicos incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetodrina, dobutamina (Dobutrex), dopamina (Intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, etilnorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopamina, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protokilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, sotereno, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Un ejemplo de inhibidor de fosfodiesterasa incluye amrinona (Inacor).

d. Agentes antianginosos

Los agentes antianginosos pueden comprender nitratos orgánicos, bloqueantes de canales de calcio, betabloqueantes y combinaciones de estos.

Algunos ejemplos de nitratos orgánicos, también conocidos como nitrovasodilatadores, incluyen nitroglicerina (Nitro-bid, Nitrostat), dinitrato de isosorbida (Isordil, Sorbitrate) y nitrato de amilo (Aspirol, Vaporole).

viii. Antagonistas de receptores de endotelina

La endotelina (EN) es un péptido de 21 aminoácidos con potentes efectos fisiológicos y patofisiológicos que parecen estar implicados en la aparición de la

insuficiencia cardíaca. Los efectos de la ET tienen lugar a través de la interacción con dos clases de receptores de la superficie celular. El receptor de tipo A (ET-A) está asociado con la vasoconstricción y el crecimiento celular, mientras que el receptor de tipo B (ET-B) está asociado con la vasodilatación mediada por células endoteliales y con la secreción de otras neurohormonas, como aldosterona. En la técnica se conocen agentes farmacológicos que pueden inhibir la producción de ET o su capacidad de estimulación de las células pertinentes. La inhibición de la producción de ET supone el uso de agentes que bloquean una enzima denominada enzima de conversión de la endotelina, implicada en el procesamiento del péptido activo a partir de su precursor. La inhibición de la capacidad de ET para estimular células supone el uso de agentes que bloquean la interacción de ET con sus receptores. Algunos ejemplos no limitantes de antagonistas de receptores de endotelina (ARE) incluyen bosentán, enrasentán, ambrisentán, darusentán, tezoseptán, atrasentán, avosentán, clazosentán, edonentán, sitaxentán, TBC 3711, BQ 123 y BQ 788.

15 **D. Agentes terapéuticos quirúrgicos**

En ciertos aspectos, el agente terapéutico secundario puede comprender cirugía de algún tipo que incluye, por ejemplo cirugía preventiva, de diagnóstico o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía, y en particular la cirugía curativa, puede usarse junto con otros tratamientos, como los desvelados en este documento y uno o más agentes adicionales.

Tales agentes terapéuticos quirúrgicos para enfermedades y trastornos vasculares y cardiovasculares son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden comprender, pero no se limitan a la realización de intervenciones quirúrgicas en un organismo, colocación de prótesis mecánicas cardiovasculares, angioplastia, perfusión de la arteria coronaria, ablación con catéter, colocación de un desfibrilador cardioversor implantable al sujeto, apoyo circulatorio mecánico o una combinación de estos. Algunos ejemplos de apoyos circulatorios mecánicos que pueden usarse en la presente invención comprenden la contrapulsación con balón intraaórtico, un dispositivo auxiliar para el ventrículo izquierdo o una combinación de estos.

30 **E. Formulaciones de los fármacos y vías de administración a los pacientes**

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, las composiciones farmacéuticas se prepararán en una forma apropiada para la aplicación deseada. En general, esto supondrá la preparación de composiciones esencialmente sin pirógenos, así como otras impurezas que puedan ser dañinas para humanos o animales.

En general, se deseará emplear sales y tampones apropiados para que los vectores de administración resulten estables y permitan su absorción por las células diana. También se emplearán tampones cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una
5 cantidad eficaz del vector o de las células disuelta o dispersa en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en un medio acuoso. Las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones desfavorables cuando se administran a un animal o un
10 humano. Según se usa en este documento, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye disolventes, tampones, disoluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, aceptables para uso en la formulación de productos farmacéuticos, como los productos farmacéuticos adecuados para su administración a
15 humanos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Se contempla el uso de cualquier medio o agente convencional en las composiciones terapéuticas, excepto cuando sean incompatibles con los principios activos de la presente invención. También es posible incorporar principios activos suplementarios en las composiciones, siempre que no inactiven los
20 vectores o las células de las composiciones.

Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones de acuerdo con la presente invención puede tener lugar por cualquier vía normal, siempre que el tejido diana esté disponible por esta vía. Esto incluye la vía oral, nasal o bucal.
25 Alternativamente, la administración puede ser por inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa o por inyección directa en el tejido cardíaco. Normalmente, tales composiciones se administrarán como composiciones farmacéuticamente aceptables, según se ha descrito anteriormente.

Los compuestos activos pueden administrarse también por vía parenteral o
30 intraperitoneal. A modo de ilustración, pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables en agua, mezcladas adecuadamente con un tensioactivo como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos y en aceites. En las condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, las preparaciones
35 contienen generalmente un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen, por ejemplo, disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación en

el momento de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Generalmente, estas preparaciones son estériles y suficientemente fluidas para ser fácilmente inyectables. Las preparaciones deben ser estables en las condiciones de preparación y almacenamiento y deben protegerse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. Los disolventes o medios de dispersión apropiados pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol, (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada pueden mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por medio de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina, en dichas composiciones.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de los compuestos activos en una cantidad apropiada en un disolvente, junto con cualquier otro ingrediente (por ejemplo, según se enumeran anteriormente) según se desee, seguida de una esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes deseados, por ejemplo, según se han enumerado anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos incluyen técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del(los) principio(s) activo(s) más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de estos previamente esterilizada por filtración.

Para su administración por vía oral, los polipéptidos de la presente invención pueden mezclarse generalmente con excipientes y usarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Un enjuague bucal puede prepararse mediante la incorporación del principio activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, como una disolución de borato de sodio (disolución Dobell). Alternativamente, el principio activo puede incorporarse en un enjuague antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El principio activo puede dispersarse también en dentífricos, incluidos: geles, pastas, polvos y lechadas. El principio activo puede

añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, saborizantes, espumantes y humectantes.

5 Generalmente, las composiciones de la presente invención pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) derivadas de ácidos inorgánicos (p. ej., ácidos clorhídrico o fosfórico) o de ácidos orgánicos (p. ej., ácidos acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares). Las sales formadas con los grupos carboxilo libres de la proteína pueden derivar también de bases inorgánicas (p. ej., hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro) o de bases orgánicas (p. ej., isopropilamina, trietilamina, histidina, procaína y similares).

10 Después de la formulación, las disoluciones se administran preferentemente de manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en diversas formas de dosificación, como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Por ejemplo, para la administración por vía parenteral en una disolución acuosa, generalmente la disolución se tampona adecuadamente y el líquido diluyente se hace primeramente isotónico, por ejemplo con la suficiente disolución salina o glucosa. Tales disoluciones acuosas pueden usarse, por ejemplo, para administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferentemente se emplean medios acuosos estériles conocidos por los expertos en la técnica, en particular, a la luz de la presente descripción. A modo de ilustración, una dosis individual puede disolverse en 1 ml de una disolución isotónica de NaCl y bien añadirse a 1.000 ml de líquido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15.^a edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente habrá algunas variaciones en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto que se trate. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto individual. Además, para la administración a humanos, las preparaciones deberán satisfacer los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiere la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

IV. Procedimientos para el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y fibrosis

En los corazones de ratones mutantes para miR-208 se observó la regulación por aumento de varios genes de proteínas contráctiles del músculo esquelético rápido. Esta regulación por aumento de genes de proteínas contráctiles del músculo esquelético rápido en los corazones de ratones mutantes para miR-208 indica que miR-

208 reprime el programa génico del músculo esquelético rápido. En el músculo esquelético, la represión de los genes de las fibras lentas y la activación de los genes de las fibras rápidas están asociadas con numerosos trastornos musculoesqueléticos que incluyen la atrofia por desuso, el desgaste muscular en respuesta a antigравidad y la desnervación. Por lo tanto, la expresión de miR-208 en células del músculo esquelético puede ser útil para reprimir los genes de las fibras rápidas y, de este modo, activar la expresión recíproca de los genes de las fibras lentas. Por consiguiente, se desvelan procedimientos para el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos mediante la administración de miR-208 al músculo esquelético de un sujeto que padece o presenta el riesgo de padecer un trastorno musculoesquelético.

Las fibras del músculo esquelético adulto pueden clasificarse en subtipos de contracción rápida y lenta, sobre la base de propiedades contráctiles y metabólicas especializadas. Estas propiedades reflejan la expresión de conjuntos específicos de isoformas de proteínas contráctiles rápidas y lentas de las cadenas pesadas y ligeras de la miosina, la tropomiosina y las troponinas, así como la mioglobina (Naya y col., 2000). Los músculos de contracción lenta se usan principalmente en actividades crónicas como el mantenimiento de la posición y la actividad locomotora sostenida. Las fibras de contracción rápida se usan principalmente para actividades repentinas de gran fuerza. El fenotipo del músculo esquelético adulto no es estático, sino que retiene la capacidad de ajustarse a variaciones de la carga soportada y de los patrones de uso contráctil, lo que resulta en adaptaciones de la morfología el fenotipo y las propiedades contráctiles. Por ejemplo, la eliminación de la carga sobre el cuerpo en el entorno de microgravedad de un viaje espacial resulta en un grado notable de atrofia muscular y en un fenotipo proteínico alterado que se correlaciona con un cambio de lento a rápido en las propiedades contráctiles y metabólicas tanto para roedores como humanos (Tsika y col., 2002; Baldwin y Haddad, 2001; Edgerton y Roy, 2000; Fitts y col., 2000). Por lo tanto, se desvelan procedimientos para el tratamiento o la prevención del desgaste muscular en respuesta a un entorno de gravedad reducida mediante la administración de miR-208 al músculo esquelético.

La atrofia por desuso es una atrofia muscular que resulta de la falta de uso de los músculos. La atrofia por desuso se observa típicamente en personas postradas en la cama, personas con miembros escayolados o aquellas personas inactivas por otras razones. Las perturbaciones de la actividad eléctrica de las miofibras, incluida la desnervación, también conducen a la atrofia muscular. La atrofia muscular es reversible después de cortos periodos de desuso. Sin embargo, el extremo desuso de un músculo puede resultar en una pérdida permanente de las fibras musculares esqueléticas y el reemplazamiento de estas fibras por tejido conectivo. Se contempla que al reprimir los

genes de las fibras rápidas en el músculo esquelético, activando de este modo la expresión recíproca de los genes de las fibras lentas, es posible reducir o prevenir los síntomas de la atrofia muscular. Por lo tanto, se desvelan procedimientos para el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular mediante la administración de miR-208 al músculo esquelético.

Además de desempeñar un papel importante en el control de la fibrosis en el corazón, la expresión ubicua de la familia de moléculas de miR-29 significa que también puede desempeñar un papel en otras indicaciones fibrosas, como aquellas que afectan al riñón, el hígado o los pulmones. La fibrosis también se observa como efecto secundario de la diabetes. Los pacientes diabéticos de los tipos 1 y 2 presentan un mayor riesgo de miocardiopatía. La miocardiopatía en la diabetes está asociada a un conjunto de características que incluyen una disminución de la distensibilidad diastólica, fibrosis intersticial e hipertrofia miocítica. Dado que miR-208 inhibe a miR-29, la inhibición de miR-208 puede usarse para bloquear tanto la fibrosis cardíaca como la fibrosis no cardíaca.

La fibrosis hepática congénita (FHC) es una rara enfermedad que afecta al hígado y a los riñones. El paciente la hereda como un carácter autosómico recesivo. Las anomalías del hígado son hepatomegalia, aumento de la presión en el sistema venoso que lleva la sangre al hígado desde diferentes órganos (hipertensión portal) y tejido conectivo similar a fibras que se extiende sobre y a través del hígado (fibrosis hepática), a lo que frecuentemente se hace referencia como lesiones hepáticas. Los individuos afectados presentan también mermas en la función renal, causada normalmente por una enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ERPAR). La merma de la función renal asociada con la FHC en adultos está causada por una enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD).

La pérdida progresiva de la función renal no solo se asocia con la aparición de glomeruloesclerosis, sino también con la aparición de fibrosis intersticial. La fibrosis intersticial se caracteriza por la destrucción de los túbulos renales y los capilares intersticiales, así como por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular. Durante mucho tiempo, la gravedad de la fibrosis tubulointersticial se ha considerado como un determinante decisivo de la lesión renal progresiva en humanos y en glomerulonefritis experimental.

La fibrosis pulmonar o cicatrización del pulmón resulta de la sustitución gradual de los alveolos pulmonares normales por tejido fibroso. Cuando se forma la cicatriz, aumenta el grosor del tejido, lo que causa una pérdida irreversible de la capacidad del tejido para transferir oxígeno a la corriente sanguínea. Los síntomas incluyen dificultad

respiratoria (especialmente con esfuerzo), tos seca crónica, fatiga y debilidad, molestias en el pecho, pérdida del apetito y rápida pérdida de peso.

Se ha postulado que la fibrosis pulmonar podría ser un trastorno autoinmunitario o la consecuencia de una infección vírica. Sin embargo, hay una
5 tendencia creciente a creer que la predisposición genética es un factor clave. Se ha encontrado que existe una mutación de la proteína SP-C en las familias con un historial de fibrosis pulmonar. La creencia más actual es que el proceso fibroso es una reacción (predispuesta por la genética) a lesiones microscópicas en el pulmón. Mientras que las causas exactas se desconocen, se han hecho asociaciones con la
10 inhalación de contaminantes ambientales y ocupacionales, el tabaco, enfermedades como esclerodermia, artritis reumatoide, lupus y sarcoidosis, ciertas medicaciones y radioterapia.

La miocardiopatía diabética en pacientes se caracteriza por hipertrofia miocárdica, fibrosis intersticial, cambios endoteliales capilares y engrosamiento de las
15 láminas basales de los capilares y es una consecuencia de alteraciones en la estructura del colágeno. El aumento de la acumulación de colágeno se observa principalmente en las regiones epicárdica y perivascular, en las que induce una merma de la función diastólica del ventrículo izquierdo que conduce frecuentemente a la insuficiencia cardíaca.

20 **V. Kits**

Cualquiera de las composiciones descritas en este documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo, un miARN individual se incluye en un kit. El kit puede incluir además agua y un tampón de hibridación para facilitar la hibridación de las dos hebras del miARN. El kit puede incluir también uno o más reactivo(s) de
25 transfección para facilitar la administración del miARN a las células.

Los componentes de los kits pueden envasarse en medio acuoso o en forma liofilizada. El medio de contención de los kits incluirá generalmente al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa u otro medio de envasado en el que pueda colocarse un componente y, preferentemente, en alícuotas adecuadas. Cuando
30 hay más de un componente en el kit (el reactivo de marcado y el marcador pueden envasarse conjuntamente), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro envase adicional en los que puedan colocarse separados los componentes adicionales. Sin embargo, diversas combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Por lo tanto, típicamente, los kits incluirán también un medio
35 para la contención de ácidos nucleicos y otros envases de reactivos cualesquiera empaquetados en poco espacio para la venta comercial. Tales envases pueden incluir

envases de plástico moldeados por inyección o por soplado, en los que se guardan los viales deseados.

5 Cuando los componentes del kit se suministran en una y/o más disoluciones líquidas, la disolución líquida es una disolución acuosa, en que se prefiere especialmente una disolución acuosa estéril.

Sin embargo, los componentes del kit pueden suministrarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se suministran como polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente pueda suministrarse también en otro medio de contención.

10 El medio de contención incluirá generalmente al menos un vial, un tubo de ensayo, un frasco, una botella, una jeringa y/u otro medio de contención en el que se ponen las formulaciones de ácidos nucleicos, preferentemente en alícuotas adecuadas. Los kits pueden comprender también un segundo medio de contención para la contención de un tampón farmacéuticamente aceptable estéril y/u otro diluyente.

15 Típicamente, los kits incluirán también un medio para la contención de los viales empaquetados en poco espacio para su venta comercial como, por ejemplo, envases de plástico moldeados por inyección y/o por soplado en los que se guardan los viales deseados.

20 Tales kits pueden incluir también componentes que conserven o mantengan el miARN o que lo protejan contra la degradación. Tales componentes pueden no contener ARNasas o proteger contra ARNasas. Generalmente, tales kits comprenderán, en los medios adecuados, distintos envases para cada reactivo o disolución individual.

25 El kit incluirá también instrucciones para el empleo de sus componentes, así como para el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse.

Se contempla que tales reactivos son componentes de los kits. Sin embargo, tales kits no se limitan a los elementos concretos identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o la caracterización de miARN.

30 VI. Procedimientos de cribado

Se desvelan procedimientos para la identificación de inhibidores de miR-208 útiles para la prevención, el tratamiento o la reversión de la hipertrofia cardíaca o la insuficiencia cardíaca. Estos ensayos pueden comprender un cribado al azar de extensas colecciones de sustancias candidatas; alternativamente, los ensayos pueden

usarse para centrarse en clases concretas de compuestos seleccionados teniendo en cuenta los atributos estructurales considerados responsables de que los compuestos tengan una mayor probabilidad de inhibir la expresión y/o función de miR-208.

5 Para identificar un modulador de miR-208, generalmente se determinará la función de un miR-208 en presencia y en ausencia de la sustancia candidata. Por ejemplo, un procedimiento generalmente comprende:

(a) el suministro de un modulador candidato;

(b) la mezcla del modulador candidato con un miR-208;

(c) la medida de la actividad de miR-208; y

10 (d) la comparación de la actividad en (c) con la actividad en ausencia del modulador candidato, en que la diferencia entre las actividades medidas indica que el modulador candidato es, de hecho, un modulador de miR-208.

Los ensayos pueden llevarse a cabo en células u órganos aislados o en organismos vivos.

15 Por supuesto, se entenderá que todos los procedimientos de cribado son útiles por sí mismos a pesar de que puedan no encontrarse candidatos eficaces

A. Moduladores

Según se usa en este documento, el término “sustancia candidata” se refiere a cualquier molécula que pueda modular potencialmente la función inductora de miR-208 de β -MHC. Típicamente, se adquirirán colecciones moleculares de diversas fuentes comerciales, de las que se piensa que satisfacen los criterios básicos de fármacos útiles en un esfuerzo para identificar compuestos útiles por “fuerza bruta”. El cribado de estas colecciones, incluidas colecciones generadas por combinatoria (p. ej., colecciones de antagomires), es una manera rápida y eficaz de cribar un gran número de compuestos relacionados (y no relacionados) según su actividad. Las estrategias combinatorias también conducen por sí mismas a la rápida evolución de fármacos potenciales mediante la creación de compuestos de segunda, tercera y cuarta generación, modelados sobre compuestos activos, pero, por otro lado, no deseables.

B. Ensayos *in vitro*

30 Un ensayo rápido, poco costoso y fácil de realizar es un ensayo *in vitro*. Generalmente, estos ensayos usan moléculas aisladas, pueden realizarse rápidamente y en gran número, con lo que aumenta la cantidad de información obtenible en un corto periodo de tiempo. Para realizar los ensayos pueden usarse

diversos recipientes, incluidos tubos de ensayo, placas, platillos y otras superficies como varillas o esferas.

En el documento WO 84/03564 se describe una técnica para un cribado de compuestos de alto rendimiento. Se puede sintetizar un gran número de pequeños compuestos antagomires sobre un sustrato sólido, como patillas de plástico o alguna otra superficie. Tales moléculas pueden cribarse rápidamente según su capacidad de hibridar con miR-208.

C. Ensayos en células

Se desvela el cribado de compuestos según su capacidad para modular la expresión y la función de miR-208 en células. Para tales ensayos de cribado pueden usarse diversas líneas celulares, incluidas aquellas derivadas de células del músculo esquelético e incluidas células manipuladas específicamente para este fin. También pueden usarse células cardíacas primarias, como la línea celular H9C2.

D. Ensayos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* implican el uso de diversos modelos animales de cardiopatía o de enfermedad musculoesquelética, incluidos animales transgénicos que han sido manipulados para presentar defectos específicos o para portar marcadores que pueden usarse para medir la capacidad de una sustancia candidata para alcanzar y ejercer un efecto sobre diferentes células dentro del organismo. Debido a su tamaño y facilidad de manejo y a la información sobre su fisiología y estructura genética, los ratones constituyen la realización preferida, especialmente en el caso de animales transgénicos. Sin embargo, también hay otros animales adecuados, incluidos ratas, conejos, hámsteres, cobayas, gerbos, marmotas, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos y monos (incluidos chimpancés, gibones y babuinos). Los ensayos para encontrar inhibidores pueden llevarse a cabo con un modelo animal derivado de cualquiera de estas especies.

El tratamiento de los animales con los compuestos de ensayo implicará la administración del compuesto al animal en la forma apropiada. La administración tendrá lugar por cualquier vía que pueda usarse para fines clínicos. La determinación de la eficacia de un compuesto *in vivo* puede implicar diversos criterios diferentes, incluidos, pero sin limitarse a la alteración de las rutas de señalización hipertrófica y los síntomas físicos de la hipertrofia. Además, la medida de la toxicidad y de la respuesta a la dosis pueden realizarse en animales de manera más significativa que en los ensayos *in vitro* o en células.

VII. Vectores para clonación, transferencia génica y expresión

Dentro de ciertas realizaciones se emplean vectores de expresión para expresar miR-208 o un inhibidor de este. La expresión requiere que se disponga en los vectores de las señales apropiadas, que incluyen diversos elementos reguladores como potenciadores/promotores de fuentes tanto víricas como de mamíferos que controlan la expresión de los genes de interés en las células huésped. También se definen elementos diseñados para optimizar la estabilidad y la traducibilidad del ARN mensajero en las células huésped. Además se proporcionan las condiciones para el uso de una serie de marcadores dominantes de selección por fármacos para establecer clones celulares estables y permanentes que expresen los productos, así como un elemento que liga la expresión de los marcadores de selección por fármacos con la expresión del polipéptido.

A. Elementos reguladores

A lo largo de esta solicitud, el término “construcción de expresión” pretende incluir cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico, en que parte o toda la secuencia codificante del ácido nucleico es capaz de transcribirse. El transcrito puede traducirse para dar lugar a una proteína, pero no necesariamente. En ciertos aspectos, la expresión incluye la transcripción de un gen y la traducción del ARNm a un producto génico. En otras realizaciones, la expresión solo incluye la transcripción del ácido nucleico que codifica un gen de interés.

En ciertos aspectos, el ácido nucleico que codifica un producto génico está bajo el control transcripcional de un promotor. Un “promotor” se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria de síntesis de la célula o la maquinaria de síntesis introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. La expresión “bajo control transcripcional” significa que el promotor está en la posición y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar la iniciación por la ARN-polimerasa y la expresión del gen.

El término promotor se usará en este documento para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados alrededor del sitio de iniciación para la ARN-polimerasa II. Muchas de las ideas sobre cómo están organizados los promotores derivan del análisis de diversos promotores víricos, incluidos aquellos para la timidina-cinasa (tk) del VHS y las unidades de transcripción temprana de SV40. Estos estudios, complementados por trabajo más reciente, han demostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, cada uno de los cuales consta de aproximadamente 7-20 pb de ADN y contiene uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras o represoras de la transcripción.

Al menos un módulo en cada promotor funciona para situar el sitio de iniciación para la síntesis de ARN. El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de la caja TATA, como el promotor del gen de la desoxinucleotidiltransferasa terminal de mamíferos y el promotor de los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que se solapa con el sitio de inicio mismo ayuda a fijar el lugar de iniciación.

Otros elementos adicionales del promotor regulan la frecuencia de la iniciación transcripcional. Típicamente estos están situados en la región situada 30-110 pb por delante del sitio de iniciación, aunque recientemente se ha demostrado que algunos promotores también contienen elementos funcionales por detrás del sitio de iniciación. Con frecuencia, el espaciamiento entre los elementos del promotor es flexible, de modo que la función del promotor se mantiene cuando los elementos se invierten o se desplazan relativamente entre sí. En el promotor tk, el espaciamiento entre los elementos del promotor puede aumentarse hasta una separación de 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o independiente para activar la transcripción.

En otros aspectos, para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia codificante de interés, pueden usarse el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la insulina de rata y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa. También se contempla el uso de otros promotores víricos, de células de mamíferos o de fagos bacterianos, bien conocidos en la técnica, para conseguir la expresión de una secuencia codificante de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para el fin dado.

Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, pueden optimizarse el nivel y el patrón de expresión de la proteína de interés después de la transfección o transformación. Además, la selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Las tablas 1 y 2 presentan varios elementos reguladores que pueden emplearse en el contexto de la presente invención para regular la expresión del gen de interés. La lista no pretende ser exhaustiva con todos los posibles elementos implicados en el control de la expresión génica, sino ser solo un ejemplo de estos.

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción a partir de un promotor situado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Los potenciadores están organizados de manera muy similar a los promotores. Es

decir, están compuestos de numerosos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales.

La distinción básica entre potenciadores y promotores es operacional. Una región potenciadora en conjunto debe ser capaz de estimular la transcripción a distancia; esto no necesita ser cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen la iniciación de la síntesis de ARN en un sitio concreto y en una orientación concreta, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Con frecuencia, los promotores y los potenciadores son solapantes y contiguos y a menudo parecen tener una organización modular muy similar.

A continuación se muestra una lista de promotores víricos, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles que podrían usarse en combinación con el ácido nucleico codificante de un gen de interés en una construcción de expresión (tabla 1 y tabla 2). Además, podría usarse también cualquier combinación de promotores/potenciadores (según la base de datos de promotores eucarióticos, EPDB) para dirigir la expresión del gen. Las células eucariotas pueden admitir la transcripción citoplásmica a partir de ciertos promotores bacterianos si se suministra la polimerasa bacteriana apropiada, bien como parte del complejo de administración o como una construcción de expresión genética adicional.

TABLA 1	
Promotor y/o potenciador	
Promotor/potenciador	Referencias
Cadena pesada de inmunoglobulina	Banerji y col., 1983, Gilles y col., 1983; Grosschedl y col., 1985; Atchinson y col., 1986, 1987; Imler y col., 1987; Weinberger y col., 1984; Kiledjian y col., 1988; Porton y col., 1990
Cadena ligera de inmunoglobulina	Queen y col., 1983; Picard y col., 1984
Receptor de linfocitos T	Luria y col., 1987; Winoto y col., 1989; Redondo y col., 1990
HLA DQ α y/o DQ β	Sullivan y col., 1987
Interferón β	Goodbourn y col., 1986; Fujita y col., 1987; Goodbourn y col., 1988
Interleucina 2	Greene y col., 1989
Receptor de interleucina 2	Greene y col., 1989; Lin y col., 1990
CMH de clase II 5	Koch y col., 1989
CMH de clase II HLA-DR α	Sherman y col., 1989
β -actina	Kawamoto y col., 1988; Ng y col., 1989
Creatina-cinasa muscular (MCK)	Jaynes y col., 1988, Horlick y col., 1989; Johnson y col., 1989
Prealbúmina (transtiretina)	Costa y col., 1988
Elastasa I	Ornitz y col., 1987
Metalotioneína (MTII)	Karin y col., 1987; Culotta y col., 1989
Colagenasa	Pinkert y col., 1987; Angel y col., 1987a
Albúmina	Pinkert y col., 1987; Tronche y col., 1989, 1990

α -fetoproteína	Godbout y col., 1988; Campere y col., 1989
γ -globina	Bodine y col., 1987; Perez-Stable y col., 1990
β -globina	Trudel y col., 1987
c-fos	Cohen y col., 1987
c-HA-ras	Triesman 1986; Deschamps y col., 1985
Insulina	Edlund y col., 1985
Molécula de adhesión celular neural (NCAM)	Hirsch y col., 1990
α 1-antitripsina	Latimer y col., 1990
Histona H2B (TH2B)	Hwang y col., 1990
Colágeno de ratón y/o de tipo I	Ripe y col., 1989
Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78)	Chang y col., 1989
Hormona de crecimiento de rata	Larsen y col., 1986
Proteína amiloide sérica humana A (SAA)	Edbrooke y col., 1989
Troponina I (TN I)	Yutzey y col., 1989
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Pech y col., 1989
Distrofia muscular de Duchenne	Klamut y col., 1990
SV40	Banerji y col., 1981; Moreau y col., 1981; Sleigh y col., 1985; Firak y col., 1986; Herr y col., 1986; Imbra y col., 1986; Kadesch y col., 1986; Wang y col., 1986; Ondek y col., 1987; Kuhl y col., 1987; Schaffner y col., 1988

Polioma	Swartzenbruder y col., 1975; Vasseur y col., 1980; Katinka y col., 1980, 1981; Tyndell y col., 1981; Dandolo y col., 1983; de Villiers y col., 1984; Hen y col., 1986; Satake y col., 1988; Campbell y Villarreal, 1998
Retrovirus	Kriegler y col., 1982, 1983; Levinson y col., 1982; Kriegler y col., 1983, 1984a, 1988; Bosze y col., 1986; Miksicek y col., 1986; Celandier y col., 1987, Thiesen y col., 1988; Celandier y col., 1988; Choi y col., 1988; Reisman y col., 1989
Virus del papiloma	Campo y col., 1983; Lusky y col., 1983; Spandidos y Wilkie, 1983; Spalholz y col., 1985; Lusky y col., 1986; Cripe y col., 1987; Gloss y col., 1987; Hirochika y col., 1987; Stephens y col., 1987
Virus de la hepatitis B	Bulla y col., 1986; Jameel y col., 1986; Shaul y col., 1987; Spandau y col., 1988; Vannice y col., 1988
Virus de la inmunodeficiencia humana	Muesing y col., 1987; Hauber y col., 1988; Jakobovits y col., 1988; Feng y col., 1988; Tabeke y col., 1988; Rosen y col., 1988; Berkhout y col., 1989; Laspia y col., 1989; Sharp y col., 1989; Braddock y col., 1989
Citomegalovirus (CMV)	Weber y col., 1984; Boshart y col., 1985; Foeking y col., 1986
Virus de la leucemia del gibón	Holbrook y col., 1987; Quinn y col., 1989

TABLA 2		
Elementos inducibles		
Elemento	Inductor	Referencias
MT II	Ester de forbol (TFA), metales pesados	Palmiter y col., 1982; Haslinger y col., 1985; Saarle y col., 1985; Stuart y col., 1985; Imagawa y col., 1987; Karin y col., 1987; Angel y col, 1987b; McNeall y col., 1989
MMTV (virus del tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides	Huang y col., 1981; Lee y col., 1981; Majors y col., 1983; Chandler y col., 1983; Ponta y col., 1985; Sakai y col., 1988
Interferón β	Poli(rl) x poli(rC)	Tavernier y col., 1983
Adenovirus 5 E2	E1A	Imperiale y col., 1984
Colagenasa	Ester de phorbol (TPA)	Angel y col., 1987a
Estromelsina	Ester de phorbol (TPA)	Angel y col., 1987b
SV40	Ester de phorbol (TPA)	Angel y col., 1987b
Gen MX murino	Interferón, virus de la enfermedad de Newcastle	Hug y col., 1988
Gen de GRP78	A23187	Resendez y col., 1988
α 2-macroglobulina	IL-6	Kunz y col., 1989
Vimentina	Suero	Rittling y col., 1989
Gen H-2kB del CMH de clase I	Interferón	Blanar y col., 1989

HSP70	E1A, antígeno T mayor de SV40	Taylor y col., 1989, 1990a, 1990b
Proliferina	Ester de forbol - TPA	Mordacq y col., 1989
Factor de necrosis tumoral	PMA	Hensel y col., 1989
Gen de la hormona estimulante del tiroides α	Hormonas tiroideas	Catterjee y col., 1989

De interés especial son los promotores específicos del músculo, y más especialmente, los promotores específicos cardíacos. Estos incluyen el promotor de la cadena ligera 2 de la miosina (Franz y col., 1994; Kelly y col., 1995), el promotor de la α -actina (Moss y col., 1996), el promotor de la troponina I (Bhavsar y col., 1996), el promotor del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Barnes y col., 1997), el promotor de la distrofina (Kimura y col., 1997), el promotor de la $\alpha 7$ -integrina (Ziober y Kramer, 1996), el promotor del péptido natriurético cerebral (LaPointe y col., 1996) y el promotor de la cristalina αB / proteína pequeña de choque térmico (Gopal-Srivastava, 1995) el promotor de la cadena pesada α de la miosina (Yamaguchi-Takihara y col., 1989) y el promotor de ANF (LaPointe y col., 1988).

Cuando se emplea un inserto de ADNc, típicamente se deseará incluir una señal de poliadenilación para conseguir una poliadenilación correcta del transcrito génico. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crítica para la práctica con éxito de la invención y puede emplearse cualquier secuencia de este tipo, como la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana y de SV40. También se contempla un terminador como elemento de la casete de expresión. Estos elementos pueden servir para aumentar la producción del mensaje y para minimizar la lectura más allá de la casete en otras secuencias.

20 **B. Marcadores seleccionables**

En ciertos aspectos en que las células contienen construcciones de ácidos nucleicos, una célula puede identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en la construcción de expresión. Tales marcadores conferirán un cambio identificable a la célula, lo que permite la fácil identificación de las células que contienen la construcción de expresión. Normalmente, la inclusión de un marcador de selección por un fármaco facilita la clonación y la selección de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles.

Alternativamente, pueden usarse enzimas como la timidina-cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT). También pueden emplearse marcadores inmunológicos. No se cree que el marcador empleado sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que
 5 codifica el producto. Otros ejemplos adicionales de marcadores seleccionables son bien conocidos por los expertos en la técnica.

C. Construcciones multigénicas e IRES

En ciertos aspectos, se usan sitios de unión interna para los ribosomas (IRES) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces
 10 de sortear el sistema de barrido del ribosoma con una traducción dependiente de un extremo 5' protegido por metilación y comienzan la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito los elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los
 15 elementos IRES pueden ligarse a marcos abiertos de lectura heterólogos. Es posible transcribir conjuntamente marcos abiertos de lectura múltiples, cada uno de ellos separado por un IRES, con lo que se crean mensajes policistrónicos. Por medio del elemento IRES, cada marco abierto de lectura es accesible a los ribosomas para su traducción eficiente. Los genes múltiples pueden expresarse eficientemente mediante
 20 el uso de un solo promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje.

Cualquier marco abierto de lectura heterólogo puede ligarse a elementos IRES. Aquí se incluyen genes para proteínas segregadas, proteínas con varias subunidades codificadas por genes independientes, proteínas intracelulares o unidas a la membrana y marcadores seleccionables. De esta manera, puede conseguirse la expresión
 25 simultánea de varias proteínas en una célula con una sola construcción y un solo marcador de selección.

D. Administración de vectores de expresión

Existen numerosas maneras de introducir los vectores de expresión en las células. En algunos aspectos, la construcción de expresión comprende un virus o una
 30 construcción manipulada derivada de un genoma vírico. La capacidad de ciertos virus para penetrar en las células por endocitosis mediada por receptores, para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar los genes víricos de forma estable y eficiente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes exógenos a células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y
 35 Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores génicos fueron virus de ADN, incluidos los papovavirus (virus del simio 40, virus del papiloma bovino y

polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y los adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Estos tiene una capacidad relativamente baja para secuencias de ADN exógenas y una gama de huéspedes restringida. Además, su potencial oncogénico y efectos citopáticos en las células permisivas suponen
5 problemas de seguridad. Pueden acomodar solamente hasta 8 kb de material genético exógeno, pero pueden introducirse fácilmente en diversas líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

Uno de los procedimientos preferidos para la administración *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Un “vector de expresión de adenovirus”
10 pretende incluir aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) lograr el empaquetamiento de la construcción y (b) expresar un polinucleótido no codificante clonado dentro de la misma. En este contexto, la expresión no requiere la síntesis del producto génico.

El vector de expresión comprende una forma manipulada genéticamente de
15 adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes regiones del ADN adenovírico por secuencias exógenas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). A diferencia de los retrovirus, la infección de las células huésped por adenovirus no resulta en la integración cromosómica, porque el ADN adenovírico puede replicarse de
20 manera episómica sin potencial genotoxicidad. Además, los adenovirus son estructuralmente estables y no se han detectado reorganizaciones genómicas después de una extensa amplificación. El adenovirus puede infectar prácticamente todas las células epiteliales, independientemente de su estado en el ciclo celular. Hasta ahora, la infección por adenovirus solamente parece estar asociada a enfermedades leves como
25 la enfermedad respiratoria aguda en humanos.

El adenovirus es especialmente adecuado para uso como vector de transferencia génica por su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, elevado título, amplia gama de células diana y gran infectividad. Los dos extremos del genoma vírico contienen repeticiones invertidas de 100-200 pares de bases (ITR), que
30 son elementos en *cis* necesarios para la replicación del ADN y el empaquetamiento. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma contienen distintas unidades de transcripción que se dividen por el inicio de la replicación de ADN vírico. La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma vírico y unos pocos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B)
35 resulta en la síntesis de las proteínas para la replicación del ADN vírico. Estas proteínas intervienen en la replicación del ADN, la expresión de los genes tardíos y el bloqueo de las células huésped (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos,

incluidas la mayoría de las proteínas de la cápsida vírica, se expresan solo después de un procesamiento significativo de un único transcrito primario producido a partir del promotor tardío principal (MLP). El MLP (situado a 16,8 m. u.) es especialmente eficiente durante la fase tardía de la infección y todos los ARNm producidos a partir de este promotor tienen una secuencia líder tripartita en el extremo 5' (TPL), que los hace ARNm preferidos para la traducción.

En un sistema actual, un adenovirus recombinante se genera por recombinación homóloga entre un vector lanzadera y un vector provírico. Debido a la posibilidad de recombinación entre dos vectores províricos, en este proceso pueden generarse adenovirus naturales. Por lo tanto, es crítico aislar un solo clon del virus a partir de una placa individual y examinar su estructura genómica.

La generación y la propagación de los vectores de adenovirus actuales, que son defectuosos en cuanto a replicación, dependen de una línea celular auxiliar única, denominada 293, que ha sido transformada a partir de células embrionarias de riñón humanas mediante fragmentos de ADN de Ad5 y que expresa constitutivamente las proteínas E1 (Graham y col., 1977). Dado que puede prescindirse de la región E3 en el genoma de adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de las células 293, portan el ADN exógeno en las regiones E1 o E3, o en las dos regiones (Graham y Prevec, 1991). En la naturaleza, los adenovirus pueden empaquetar aproximadamente el 105% del genoma natural (Ghosh-Choudhury y col., 1987), lo que proporciona una capacidad para aproximadamente 2 kb adicionales de ADN. Junto con las aproximadamente 5,5 kb de ADN que pueden sustituirse en las regiones E1 y E3, la máxima capacidad de los vectores actuales de adenovirus es inferior a 7,5 kb o de aproximadamente el 15% de la longitud total del vector. Más del 80% del genoma vírico de adenovirus permanece en la estructura del vector y es la fuente de la citotoxicidad originada por el vector. Además, la deficiencia de la replicación del virus con E1 deletado es incompleta.

Las líneas celulares auxiliares pueden derivar de células humanas, como células embrionarias humanas de riñón, musculares, hematopoyéticas u otras células embrionarias mesenquimales o epiteliales humanas. Alternativamente, las células auxiliares pueden derivar de las células de otras especies de mamíferos que sean permisivas para adenovirus humanos. Tales células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células embrionarias mesenquimales o epiteliales de mono. Según se ha expuesto anteriormente, la línea celular preferida es 293.

Racher y col., (1995) desvelaron procedimientos mejorados para el cultivo de las células 293 y la propagación de adenovirus. En un formato, se cultivan agregados

celulares naturales mediante la inoculación de células individuales en 1 litro de frascos de centrífuga siliconizados (Techne, Cambridge, Reino Unido) que contienen 100-200 ml de medio. Después de una agitación a 40 rpm, se estima la viabilidad de las células con azul de tripano. En otro formato, se emplean microvehículos Fibra-Cell (Bibby Sterlin, Stone, Reino Unido) (5 g/l) de la manera siguiente. Un inóculo celular, resuspendido en 5 ml de medio, se añade al vehículo (50 ml) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se deja en reposo con agitación ocasional durante una a cuatro horas. El medio se sustituye entonces por 50 ml de medio fresco y se inicia la agitación. Para la producción de virus, se permite el crecimiento de las células hasta aproximadamente el 80% de confluencia, después de lo cual se sustituye el medio (hasta el 25% del volumen final) y se añade el adenovirus a una MDI de 0,05. Los cultivos se dejan en reposo durante la noche, después de lo cual el volumen se aumenta hasta el 100% y se inicia la agitación durante otras 72 horas.

Aparte del requerimiento de que el adenovirus sea defectuoso en cuanto a replicación o al menos condicionalmente defectuoso, no se cree que la naturaleza del vector de adenovirus sea decisiva para la práctica con éxito de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos diferentes conocidos o subgrupos A-F. El adenovirus del tipo 5 del subgrupo C es el material de partida preferido para obtener el vector de adenovirus condicionalmente defectuoso en cuanto a replicación. Esto es porque el adenovirus de tipo 5 es un adenovirus humano del que se conoce una gran cantidad de información bioquímica y genética y ha sido usado históricamente para la mayoría de las construcciones que emplean adenovirus como vector.

Según se ha expuesto anteriormente, el vector típico es defectuoso en cuanto a replicación y no contiene la región E1 de adenovirus. Por lo tanto, lo más conveniente será introducir el polinucleótido que codifica el gen de interés en la posición en la que se han eliminado las secuencias que codifican E1. Sin embargo, la posición de la inserción de la construcción en las secuencias de adenovirus no es crítica para la invención. El polinucleótido que codifica el gen de interés puede insertarse también en el lugar de la región E3 delecionada en los vectores de sustitución de E3, según describen Karlsson y col. (1986), o en la región E4, en el caso en que una línea celular auxiliar o un virus auxiliar complementen la deficiencia de E4.

Los adenovirus son fáciles de cultivar y manipular y muestran una amplia gama de huéspedes *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse con títulos altos, por ejemplo, de 10^9 - 10^{12} unidades formadoras de placas por ml, y son muy infectivos. El ciclo vital de adenovirus no requiere su integración en el genoma de la célula huésped. Los genes exógenos administrados mediante vectores de adenovirus son

episómicos y, por tanto, presentan poca genotoxicidad para las células huésped. No se han descrito efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus naturales (Couch y col., 1963; Top y col., 1971), lo que demuestra su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia génica *in vivo*.

5 Los vectores de adenovirus se han usado en la expresión de genes eucarióticos (Levrero y col., 1991; Gomez-Foix y col., 1992) y el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1991). Recientemente, algunos estudios con animales han sugerido que podría ser posible usar adenovirus recombinantes para la terapia génica (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet y col.,
10 1990; Rich y col., 1993). Algunos estudios sobre la administración de adenovirus recombinantes a diferentes tejidos incluyen la instilación traqueal (Rosenfeld y col., 1991; Rosenfeld y col., 1992), inyección muscular (Ragot y col., 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) y la inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle y col., 1993).

15 Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenario caracterizados por la capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en las células infectadas mediante un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990). El ADN resultante se integra entonces de manera estable en los cromosomas celulares como un provirus y dirige la síntesis de las proteínas víricas. La integración resulta en la retención de las
20 secuencias génicas víricas en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retrovírico contiene tres genes, gag, pol y env, que codifican las proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia situada por delante del gen gag contiene una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. En los extremos 5' y 3' del genoma vírico
25 hay dos secuencias repetidas terminales largas (LTR). Estas contienen potentes secuencias promotoras y potenciadoras y también se requieren para la integración en el genoma de la célula huésped (Coffin, 1990).

Para construir un vector retrovírico, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés en el genoma vírico, en el lugar de ciertas secuencias víricas, para
30 producir un virus defectuoso en cuanto a replicación. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular empaquetadora que contiene los genes gag, pol y env, pero sin las secuencias LTR ni los componentes de empaquetamiento (Mann y col., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc junto con las secuencias LTR retrovíricas y las secuencias de empaquetamiento se introduce en esta línea
35 celular (por ejemplo, por precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite empaquetar el transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas víricas, que entonces se secretan al medio de cultivo (Nicolas y

Rubenstein, 1988; Termin, 1986; Mann y col., 1983). El medio que contiene los virus recombinantes se recoge después, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovéricos son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable
5 requieren la división de la célula huésped (Paskind y col., 1975).

Recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia diseñada para el reconocimiento específico de dianas por parte de los vectores de retrovirus basada en la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación podría permitir la infección específica de hepatocitos
10 a través de los receptores de sialoglucoproteínas.

Se ha diseñado una estrategia diferente para el reconocimiento de dianas por parte de retrovirus recombinantes, con el uso de anticuerpos biotinilados dirigidos contra una proteína de la envoltura retrovítica y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina mediante el uso
15 de estreptavidina (Roux y col., 1989). Mediante anticuerpos dirigidos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y de clase II, se demostró la infección de diversas células humanas que portaban estos antígenos superficiales *in vitro* con un virus ecotrópico (Roux y col., 1989).

Existen ciertas limitaciones para el uso de los vectores de retrovirus. Por ejemplo, los vectores de retrovirus se integran normalmente en sitios al azar en el
20 genoma celular. Esto puede conducir a mutagénesis insercional por la interrupción de genes del huésped o por la inserción de secuencias reguladoras víricas que pueden interferir con la función de los genes flanqueantes (Varmus y col., 1981). Otro problema con el uso de vectores de retrovirus defectuosos es la potencial
25 aparición de virus naturales con capacidad de replicación en las células de empaquetamiento. Esto puede producirse a partir de sucesos de recombinación en los que la secuencia intacta del virus recombinante se inserta por delante de la secuencia de gag, pol y env integrada en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, ahora se dispone de nuevas líneas celulares de empaquetamiento que
30 deberían reducir en gran medida la probabilidad de recombinación (Markowitz y col., 1988; Hersdorffer y col., 1990).

Otros vectores víricos pueden emplearse como construcciones de expresión en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus como el virus de la vacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus
35 adenoasociado (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y virus del herpes. Estos virus ofrecen varias características atractivas

para diversas células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

Con la identificación de virus de la hepatitis B defectuosos se adquirió nueva información sobre la relación entre la estructura y la función de distintas secuencias víricas. Estudios *in vitro* demostraron que el virus podía retener la capacidad de empaquetamiento dependiente de un auxiliar y de transcripción inversa, a pesar de la 5 delección de hasta el 80% de su genoma (Horwich y col., 1990). Esto sugirió que sería posible sustituir grandes porciones del genoma por material genético exógeno. El hepatotropismo y la persistencia (integración) eran características especialmente 10 atractivas para la transferencia génica dirigida al hígado. Chang y col., introdujeron el gen de la cloranfenicol-acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis B de pato en el lugar de las secuencias codificantes de la polimerasa, la superficie y la presuperficie. El virus se cotransfectó con un virus natural en una línea celular de hepatoma aviar. Se usaron medios de cultivo que contenían títulos altos del virus 15 recombinante para infectar hepatocitos primarios de crías de pato. Se detectó una expresión estable del gen de CAT durante al menos 24 días después de la transfección (Chang y col., 1991).

Para conseguir la expresión de construcciones génicas codificantes o no codificantes, la construcción de expresión debe administrarse a una célula. Esta 20 administración puede llevarse a cabo *in vitro*, como en los procedimientos de laboratorio para la transformación de líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de ciertos estados patológicos. Un mecanismo para la administración es por medio de una infección vírica, en que la construcción de expresión está encapsidada en una partícula vírica infecciosa.

En la presente invención se contemplan también varios procedimientos no víricos para la transferencia de construcciones de expresión a células cultivadas de 25 mamíferos. Estos incluyen la precipitación mediante fosfato de calcio (Graham y Van Der Erb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990), DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984), microinyección 30 directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados de ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979) y complejos de lipofectamina y ADN, tratamiento de las células con ultrasonidos (Frechheimer y col., 1987), bombardeo de genes con microproyectiles de alta velocidad (Yang y col., 1990) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de estas técnicas pueden 35 adaptarse con éxito para uso *in vivo* o *ex vivo*.

Una vez que la construcción de expresión se ha administrado a la célula, el ácido nucleico que codifica el gen de interés puede situarse y expresarse en distintos sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el gen puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración puede tener lugar en
5 una posición y orientación afines por medio de recombinación homóloga (sustitución génica) o en una posición aleatoria inespecífica (aumento génico). En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede mantenerse de manera estable en la célula como un segmento episómico, separado de ADN. Tales segmentos de ácido nucleico o “episomas” codifican secuencias suficientes para permitir su mantenimiento
10 y replicación independientemente del ciclo de la célula huésped o en sincronización con este. La manera en que la construcción de expresión se administra a una célula y el lugar de la célula en el que el ácido nucleico permanece dependen del tipo de construcción de expresión empleado.

En otro aspecto adicional, la construcción de expresión puede constar
15 simplemente de ADN recombinante sin envoltura o de plásmidos. La transferencia de la construcción puede realizarse por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente que permeabilizan la membrana física o químicamente. Esto es especialmente aplicable para la transferencia *in vitro*, pero puede aplicarse también al uso *in vivo*. Dubensky y col. (1984) inyectaron con éxito ADN de virus del polio en
20 forma de precipitados de fosfato de calcio en el hígado y el bazo de ratones adultos y neonatos y demostraron una replicación vírica activa y una infección aguda. Benvenisty y Neshif (1986) también demostraron que la inyección directa intraperitoneal de plásmidos precipitados con fosfato de calcio resultaba en la expresión de los genes transfectados. Se ha anticipado que un ADN que codifica un gen de interés puede
25 transferirse también de manera similar *in vivo* y expresar el producto génico.

En otro aspecto adicional, la transferencia de una construcción de expresión de ADN sin envoltura a las células puede incluir el bombardeo de partículas. Este procedimiento depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos de ADN a una alta velocidad que les permite perforar las membranas celulares y penetrar
30 en las células sin destruirlas (Klein y col., 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para la aceleración de partículas pequeñas. Uno de estos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang y col., 1990). Los microproyectiles usados constaban de sustancias biológicamente inertes como bolas de tungsteno o de oro.

Algunos órganos seleccionados como el hígado, la piel y el tejido muscular de ratas y ratones se han bombardeado *in vivo* (Yang y col., 1990; Zelenin y col., 1991). Esto puede requerir la exposición quirúrgica del tejido o las células, para eliminar

cualquier tejido intermedio entre el dispositivo y el órgano diana, es decir, un tratamiento *ex vivo*. De nuevo, el ADN que codifica un gen concreto puede administrarse por medio de este procedimiento e incorporarse también en la presente invención.

5 En otro aspecto, la construcción de expresión puede estar atrapada en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en una disolución acuosa en exceso. Los
10 componentes lipídicos experimentan una reorganización antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan complejos de lipofectamina y ADN.

La administración de ácidos nucleicos y la expresión de ADN exógeno por medio
15 de liposomas *in vitro* han tenido mucho éxito. Wong y col. (1980) demostraron la factibilidad de la administración y la expresión de ADN exógeno por medio de liposomas en embriones de pollo cultivados, células HeLa y células de hepatoma. Nicolau y col. (1987) llevaron a cabo con éxito una transferencia génica por medio de liposomas en ratas después de una inyección intravenosa.

20 En ciertos aspectos, los liposomas puede formar complejos con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y estimula la penetración en la célula del ADN encapsulado en los liposomas (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, los liposomas puede formar complejos o emplearse junto con proteínas cromosómicas nucleares no histónicas (HMG-1) (Kato y
25 col., 1991). En otras realizaciones adicionales, los liposomas pueden formar complejos o emplearse junto con ambos VHJ y HMG-1. Dado que tales construcciones de expresión se han empleado con éxito para la transferencia y expresión de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo*, son aplicables para la presente invención. Si se emplea un promotor bacteriano en la construcción de ADN, también se deseará incluir dentro de
30 los liposomas una polimerasa bacteriana apropiada.

Otras construcciones de expresión que pueden emplearse para administrar un ácido nucleico que codifica un gen concreto a células son vehículos de administración mediados por receptores. Estos aprovechan la absorción selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptores en casi todas las células eucariotas. Debido a
35 la distribución específica del tipo celular de los diversos receptores, la administración puede ser muy específica (Wu y Wu, 1993).

Los vehículos de administración génica mediada por receptores constan generalmente de dos componentes: un ligando específico del receptor y un agente de unión a ADN. Para la transferencia génica mediada por receptores se han usado varios ligandos. Los ligandos caracterizados más exhaustivamente son asialoorosomucoide (ASOR) (Wu y Wu, 1987) y transferrina (Wagner y col., 1990). Recientemente, se ha usado una neoglicoproteína sintética que reconoce el mismo receptor que ASOR como vehículo de administración génica (Ferkol y col., 1993; Perales y col., 1994) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) también se ha usado para administrar genes a células de carcinoma escamoso (Myers, documento EPO 0273085).

En otras realizaciones, el vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, Nicolau y col. (1987) emplearon lactosilceramida, un asialgangliósido con galactosa terminal, incorporada en liposomas y observaron un aumento de la absorción del gen de la insulina por hepatocitos. Por lo tanto, es factible que un ácido nucleico que codifica un gen concreto pueda administrarse específicamente a un tipo celular por cualquier serie de sistemas de receptor y ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede usarse como receptor para la administración mediada de un ácido nucleico a células que muestran una regulación por aumento del receptor de EGF. La manosa puede usarse para reconocer como diana el receptor de manosa en células hepáticas. Además, los anticuerpos dirigidos contra CD5 (CLL), CD22 (linfoma), CD25 (leucemia de linfocitos T) y MAA (melanoma) pueden usarse de manera similar como porciones de reconocimiento.

En un ejemplo concreto, el oligonucleótido puede administrarse en combinación con un lípido catiónico. Algunos ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a lipofectina, DOTMA, DOPE y DOTAP. La publicación WO0071096 describe diferentes formulaciones, como una formulación de DOTAP:colesterol o de un derivado de colesterol, que pueden usarse eficazmente para terapia génica. Otras descripciones discuten también diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas, incluidas nanopartículas, y procedimientos de administración; estas incluyen, pero no se limitan a las publicaciones de patente de los EE. UU. 20030203865, 20020150626, 20030032615 y 20040048787. En las patentes de los EE. UU. 5.844.107, 5.877.302, 6.008.336, 6.077.835, 5.972.901, 6.200.801 y 5.972.900 también se describen procedimientos para la formación de partículas.

En ciertos aspectos, la transferencia génica puede realizarse más fácilmente en condiciones *ex vivo*. La terapia génica *ex vivo* se refiere al aislamiento de células de un animal, la administración de un ácido nucleico a las células *in vitro*, y el retorno de las células modificadas al animal. Esto puede implicar la extirpación quirúrgica de tejidos u órganos de un animal o el cultivo primario de células y tejidos.

VIII. Procedimientos para la producción de ratones transgénicos

También se desvelan animales transgénicos que carecen de uno o los dos alelos miR-208 funcionales. Los animales transgénicos que expresan miR-208 bajo el control de un promotor inducible, selectivo de tejidos o constitutivo, las líneas celulares recombinantes derivadas de tales animales y los embriones transgénicos también pueden ser útiles para determinar el papel exacto que desempeña miR-208 en el desarrollo y la diferenciación de los miocardiocitos y en la aparición de la hipertrofia cardíaca patológica y la insuficiencia cardíaca. Además, estos animales transgénicos pueden proporcionar información sobre el desarrollo del corazón. El uso de un ácido nucleico que codifica un miR-208 de expresión constitutiva proporciona un modelo de expresión en exceso o desregulada. Asimismo se contemplan animales con miR-208 inactivado (“knocked-out”) en uno o los dos alelos.

En un aspecto general, un animal transgénico se produce por la integración de un transgén dado en el genoma de manera tal que permite la expresión del transgén. Los procedimientos para la producción de animales transgénicos se describen en general por Wagner y Hoppe (patente de los EE. UU. 4.873.191).

Típicamente, un gen flanqueado por secuencias genómicas se transfiere por microinyección a un óvulo fertilizado. Los óvulos microinyectados se implantan en una hembra huésped y la progenie se criba con respecto a la expresión del transgén. Es posible producir animales transgénicos a partir de óvulos fertilizados en una serie de animales, incluidos, pero sin limitarse a reptiles, anfibios, aves, mamíferos y peces.

Los clones de ADN para microinyección pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, los clones de ADN para microinyección pueden cortarse con enzimas apropiadas para la escisión de secuencias de plásmidos bacterianos y los fragmentos de ADN pueden separarse por electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TBE mediante técnicas estándar. Las bandas de ADN se visualizan por tinción con bromuro de etidio y se extirpa la banda que contiene las secuencias de expresión. La banda extirpada se coloca después en bolsas de diálisis con acetato de sodio 0,3 M, pH 7,0. El ADN se electroeluye en las bolsas de diálisis, se extrae con una disolución 1:1 de fenol:cloroformo y se precipita con dos volúmenes de etanol. El ADN se redisuelve en 1 ml de un tampón de baja concentración salina (NaCl 0,2 M, Tris 20 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM) y se purifica con una columna Elutip-D™. La columna se ceba primeramente con 3 ml de un tampón de alta concentración salina (NaCl 1M, Tris 20 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM), a lo que sigue un lavado con 5 ml del tampón de baja concentración salina. Las disoluciones de ADN se pasan tres veces a través de la columna para unir

el ADN a la matriz de la columna. Después de un lavado con 3 ml del tampón de baja concentración salina, el ADN se eluye con 0,4 ml del tampón de alta concentración salina y se precipita con dos volúmenes de etanol. Las concentraciones de ADN se miden por absorción a 260 nm en un espectrómetro de UV. Para la microinyección, las concentraciones de ADN se ajustan a 3 µg/ml en Tris 5 mM, pH 7,4 y EDTA 0,1 mM. Otros procedimientos para la purificación del ADN para microinyección se describen en Palmiter y col. (1982) y en Sambrook y col. (2001).

En un procedimiento ejemplar de microinyección, se induce la sobreovulación en hembras de ratón de seis semanas de edad con una inyección de 5 UI (0,1 cm³, i.p.) de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG; Sigma), seguida a las 48 horas de una inyección de 5 UI (0,1 cm³, i.p.) de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma). Las hembras se ponen en contacto con machos inmediatamente después de la inyección de hCG. A las 21 horas después de la inyección de hCG, las hembras apareadas se sacrifican por asfixia con CO₂ o dislocación cervical y los embriones se recuperan de oviductos extirpados y se colocan en tampón fosfato salino de Dulbecco con albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA; Sigma). Las células del cúmulo circundantes se eliminan con hialuronidasa (1 mg/ml). A continuación, los embriones pronucleares se lavan y se colocan en disolución salina equilibrada de Earle con BSA al 0,5% (EBSS) en una incubadora a 37,5°C, con una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ y el 95% de aire hasta el momento de la inyección. Los embriones pueden implantarse en el estado de dos células.

Se aparean ratones hembra adultos en fases aleatorias del ciclo con machos vasectomizados. Para este fin pueden usarse ratones C57BL/6 o Swiss u otras cepas comparables. Las hembras receptoras se aparean al mismo tiempo que las hembras donadoras. En el momento de la transferencia de los embriones, las hembras receptoras se anestesian con una inyección intraperitoneal de 0,015 ml de avertina al 2,5% por gramo de peso corporal. Los oviductos se exponen mediante una única incisión en la línea media dorsal. Después se hace una incisión a través de la pared corporal directamente sobre el oviducto. A continuación, la bolsa ovárica se rasga con pinzas de relojero. Los embriones que han de transferirse se colocan en DPBS (tampón fosfato salino de Dulbecco) y en la punta de una pipeta de transferencia (aproximadamente 10 a 12 embriones). La punta de la pipeta se inserta en el infundíbulo y se transfieren los embriones. Después de la transferencia, la incisión se cierra con dos suturas.

IX. Definiciones

Según se usa en este documento, el término “insuficiencia cardíaca” se usa ampliamente para indicar cualquier estado que reduce la capacidad del corazón para

bombear sangre. Como resultado, se produce congestión y edema en los tejidos. Con mayor frecuencia, la insuficiencia cardíaca está causada por una disminución de la contractilidad del miocardio, lo que resulta de una reducción del flujo sanguíneo coronario; sin embargo, muchos otros factores pueden dar lugar a una insuficiencia cardíaca, incluidos daños en las válvulas cardíacas, deficiencias vitamínicas y enfermedades primarias del músculo cardíaco. A pesar de que los mecanismos fisiológicos exactos de la insuficiencia cardíaca no se comprenden enteramente, generalmente se piensa que la insuficiencia cardíaca implica trastornos en varias propiedades autonómicas cardíacas, incluidas respuestas simpáticas, parasimpáticas y de barorreceptores. La “expresión “manifestaciones de la insuficiencia cardíaca” se usa ampliamente para abarcar todas las secuelas asociadas con la insuficiencia cardíaca, como dificultad respiratoria, edema con fóvea, un hígado sensible aumentado de tamaño, venas del cuello dilatadas, ruidos pulmonares y similares, incluidos los resultados de laboratorio asociados con la insuficiencia cardíaca.

El término “tratamiento” o sus equivalentes gramaticales abarca la mejora y/o reversión de los síntomas de la insuficiencia cardíaca (es decir, la capacidad del corazón para bombear sangre). La “mejora de la función fisiológica” del corazón puede evaluarse mediante cualquiera de las medidas descritas en este documento (p. ej., medida de la fracción de eyección, fracción de acortamiento, dimensión interna del ventrículo izquierdo, frecuencia cardíaca, etc.), así como cualquier efecto sobre la supervivencia del animal. Al usar modelos animales, se comparan las respuestas de animales transgénicos tratados y de animales transgénicos sin tratar mediante cualquiera de los ensayos descritos en este documento (además, pueden incluirse animales no transgénicos tratados y sin tratar como controles). Un compuesto que produce una mejora en cualquier parámetro asociado con la insuficiencia cardíaca usado en los procedimientos de cribado descritos en el presente documento puede identificarse de este modo como compuesto terapéutico.

El término “miocardiopatía dilatada” se refiere a un tipo de insuficiencia cardíaca caracterizado por la presencia de un ventrículo izquierdo dilatado simétricamente con una deficiente función contráctil sistólica que, además, con frecuencia afecta al ventrículo derecho.

El término “compuesto” se refiere a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco y similares que pueden usarse para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, dolencia, malestar o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Puede determinarse que un compuesto es terapéutico por cribado mediante los procedimientos de cribado desvelados en el presente documento. Un “compuesto

5 terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico del que se ha demostrado (p. ej., a través de ensayos con animales o por experiencia previa en la administración a humanos) que es eficaz en un tratamiento tal. En otras palabras, un compuesto terapéutico conocido no se limita a un compuesto eficaz en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

10 Según se usa en este documento, el término “agonista” se refiere a moléculas o compuestos que mimetizan la acción de un compuesto “nativo” o “natural”. Los agonistas pueden ser homólogos a estos compuestos naturales con respecto a la conformación, carga u otras características. Por lo tanto, los agonistas pueden ser reconocidos por receptores expresados en las superficies celulares. Este reconocimiento puede resultar en cambios fisiológicos y/o bioquímicos dentro de la célula, de modo que dicha célula reacciona a la presencia del agonista de la misma manera que si estuviera presente el compuesto natural. Los agonistas pueden incluir, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que interaccione con una molécula, receptor y/o ruta de interés.

15 Según se usa en este documento, el término “hipertrofia cardíaca” se refiere al proceso en el que miocitos cardíacos adultos responden al estrés a través del crecimiento hipertrófico. Tal crecimiento se caracteriza por aumentos del tamaño de las células sin división celular, ensamblaje de sarcómeros adicionales dentro de la célula para maximizar la generación de fuerza y la activación de un programa génico cardíaco fetal. Con frecuencia, la hipertrofia cardíaca se asocia a un aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad y, por lo tanto, los estudios dirigidos a la comprensión de los mecanismos moleculares de la hipertrofia cardíaca podrían tener un impacto significativo en la salud humana.

25 Según se usan en este documento, los términos “antagonista” e “inhibidor” se refieren a moléculas, compuestos o ácidos nucleicos que inhiben la acción de un factor celular que puede estar implicado en la hipertrofia cardíaca. Los antagonistas pueden ser homólogos o no a estos compuestos naturales, con respecto a conformación, carga u otras características. Por lo tanto, los antagonistas pueden ser reconocidos por los mismos o por distintos receptores que un agonista. Los antagonistas pueden tener efectos alostéricos que impiden la acción de un agonista. Alternativamente, los antagonistas pueden impedir la función del agonista. A diferencia de los agonistas, los compuestos antagonistas no resultan en cambios patológicos y/o bioquímicos dentro de la célula tales que las células reaccionen a la presencia del antagonista de la misma manera que si el factor celular estuviera presente. Los antagonistas e inhibidores pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se una o interaccione con un receptor, molécula y/o ruta de interés.

Según se usa en este documento, el término “modular” se refiere a un cambio o una alteración en una actividad biológica. La modulación puede ser un aumento o una disminución de la actividad de una proteína, un cambio en la actividad cinásica, un cambio en las características de unión o cualquier otro cambio en las propiedades biológicas, funcionales o inmunológicas asociadas con la actividad de una proteína u otra estructura de interés. El término “modulador” se refiere a cualquier molécula o compuesto que sea capaz de cambiar o alterar la actividad biológica según se ha descrito anteriormente.

El término “antagonista de receptores β -adrenérgicos” se refiere a un compuesto químico o entidad capaz de bloquear, parcial o totalmente, los receptores adrenérgicos del tipo β (es decir, receptores del sistema adrenérgico que responden a catecolaminas, especialmente norepinefrina). Algunos antagonistas de receptores β -adrenérgicos muestran un grado de especificidad para un subtipo de receptores (generalmente β_1); tales antagonistas se denominan “antagonistas de receptores adrenérgicos específicos de β_1 ” y “antagonistas de receptores adrenérgicos específicos de β_2 ”. El término “antagonistas de receptores β -adrenérgicos” se refiere a compuestos químicos que son antagonistas selectivos y no selectivos. Algunos ejemplos de antagonistas de receptores β -adrenérgicos incluyen, pero no se limitan a acebutolol, atenolol, butoxamina, carteolol, esmolol, labetalol, metoprolol, nadolol, penbutolol, propranolol y timolol. El uso de derivados de antagonistas de receptores β -adrenérgicos conocidos está incluido en los procedimientos desvelados en el presente documento. De hecho, cualquier compuesto que se comporte funcionalmente como un antagonista de receptores β -adrenérgicos está incluido en los procedimientos de la presente invención.

Los términos “inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina” o “inhibidor de ECA” se refieren a un compuesto químico o entidad capaz de inhibir, parcial o totalmente, la enzima implicada en la conversión de la relativamente inactiva angiotensina I en la activa angiotensina II en el sistema renina-angiotensina. Además, los inhibidores de ECA inhiben de manera concomitante la degradación de bradiquinina, lo que probablemente aumenta significativamente el efecto antihipertensivo de los inhibidores de ECA. Algunos ejemplos de inhibidores de ECA incluyen, pero no se limitan a benazeprilo, captoprilo, enalaprilo, fosinoprilo, lisinoprilo, quiaprilol y ramiprilol. El uso de derivados de inhibidores de ECA conocidos está incluido en los procedimientos desvelados en el presente documento. De hecho, cualquier compuesto que se comporte funcionalmente como un inhibidor de ECA está incluido en los procedimientos desvelados en el presente documento.

Según se usa en este documento, el término “genotipos” se refiere a la estructura genética precisa de un organismo, mientras que “fenotipos” se refieren a las

características físicas exhibidas por un individuo. Además, el “fenotipo” es el resultado de la expresión selectiva del genoma (es decir, es una expresión de la historia de la célula y su respuesta al entorno extracelular). De hecho, el genoma humano contiene, como estimación, 30.000-35.000 genes. En cada tipo celular solo se expresa una
5 pequeña fracción (es decir, del 10-15%) de estos genes.

X. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se incluyen para ilustrar mejor diversos aspectos de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas y/o composiciones de las que el inventor ha
10 descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1 - Materiales y procedimientos

Análisis de transferencia de ARN. Las muestras de tejido cardíaco de ventrículos izquierdos de humanos anónimos diagnosticados con o sin insuficiencia
15 cardíaca se obtuvieron de Gilead Colorado (Westminster, CO, EE. UU.). Se aisló el ARN total de muestras de tejido cardíaco de ratón, rata y humano mediante el reactivo Trizol (Gibco/BRL). Las transferencias de ARN para detectar los microARN se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (1). Como control de carga se usó una sonda U6 (cebador directo de U6: 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGC-3' (SEQ ID NO:18); cebador
20 inverso de U6: 5'-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3' (SEQ ID NO:19)). Para detectar la expresión de α -MHC se hibridó un filtro que contenía 10 μ g de ARN de tejido cardíaco de animales adultos no manipulados genéticamente y mutantes para miR-208 con un fragmento de ADNc de α -MHC que cubría parte de la región 5'-UTR y el primer exón.

Tratamiento con PTU. Una deficiencia de hormonas tiroideas se indujo por alimentación de los animales durante los periodos indicados con pienso sin yodo
25 complementado con el 0,15% de PTU adquirido de Harlan Teklad Co. (TD 97061) (Madison, WI, EE. UU.).

Análisis de micromatrices y PCR en tiempo real. El ARN total de tejido
30 cardíaco se aisló mediante Trizol (Invitrogen). El análisis de micromatrices se realizó con la matriz 430 2.0 de genoma de ratón (Affymetrix). El análisis de RT-PCR se llevó a cabo con cebadores hexámeros aleatorios (Invitrogen) sobre muestras de ARN, después de lo cual se analizó la expresión de subconjunto de genes por PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman adquiridas de ABI.

Generación de ratones mutantes para miR-208. Para generar el vector de reconocimiento de miR-208, se digirió con *SacII* y *NotI* un fragmento de 0,4 kb (brazo 5') que se extendía por delante de la región codificante de miR-208 y se ligó en el plásmido pGKneoF2L2dta, por delante de los sitios loxP y la casete de neomicina flanqueada por Frt. Un fragmento de 3,3 kb (brazo 3') se digirió con *SalI* y *HindIII* y se ligó en el vector entre la casete de resistencia a neomicina y la casete de selección negativa Dta. Las células ES diana que portaban el alelo interrumpido se identificaron por análisis de transferencia de Southern con sondas 5' y 3'. Se identificaron tres clones ES con miR-208 interrumpido, que se usaron para inyección de blastocistos. Los ratones quiméricos resultantes se cruzaron con ratones C57BL/6 para obtener la transmisión germinal del alelo mutante. Las secuencias de los cebadores de PCR están disponibles si se solicita.

Inmunotransferencia. La miosina se extrajo de tejido cardíaco según se ha descrito (Morkin, 2000). Las isoformas de MHC se separaron por SDS PAGE y se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra α -MHC (BA-G5) (ATCC, Rockville, MD. EE. UU.) y un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra miosina (de músculo esquelético lento, M8421) (Sigma, MO, EE, UU.), de gran especificidad para β -MHC. Para detectar toda la miosina del músculo estriado se usó un anticuerpo pan-específico (monoclonal de ratón 3-48; Accurate Chemical & Scientific Corporation, NY, EE. UU.). La proteína THRAP1 se detectó por inmunoprecipitación de 400 μ g de lisado de proteínas cardíacas. Después de una clarificación previa de las muestras durante una hora a 4°C, el sobrenadante se incubó durante la noche a 4°C con 1 μ l de un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra THRAP1 (donado amablemente por R. Roeder, Universidad Rockefeller, EE. UU.) y 15 μ l de esferas de proteína A. Las esferas se lavaron tres veces con tampón de lisis y se hirvieron en tampón para muestras con SDS. La proteína THRPA1 inmunoprecipitada se separó por SDS-PAGE y se analizó con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra THRAP1 en una dilución de 1:3.000 y un anticuerpo dirigido contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución de 1:5.000, con detección con el reactivo Luminol (Santa Cruz).

Análisis histológico e hibridación *in situ* de ARN. Los tejidos usados para histología se incubaron en la disolución de Krebs-Henselheit, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se seccionaron y procesaron para tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción tricómica de Masson o para hibridación *in situ* mediante técnicas estándar (Krenz y Robbins, 2004). Las muestras marcadas con 35 S se generaron con un kit Maxiscript (Amersham). Las señales se pseudocolorearon en rojo mediante Adobe Photoshop.

Ecocardiografía transtorácica. La función cardíaca y las dimensiones del corazón se evaluaron mediante ecocardiografía bidimensional en ratones conscientes con un sistema Vingmed (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Noruega) y un transductor de matriz lineal de 11,5 MHz. Se utilizaron trazados en modo M para medir el espesor de las paredes anterior y posterior al final de la diástole y al final de la sístole. El diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID) se midió como el mayor diámetro anteroposterior en la diástole (LVIDd) o en la sístole (LVIDs). Los datos fueron analizados por un único observador con el genotipo del ratón enmascarado. La fracción de acortamiento (FS) del ventrículo izquierdo se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente: FS (%) = [(LVIDd - LVIDs) / LVIDd] x 100.

Generación de ratones transgénicos. Un fragmento genómico de ratón que flanqueaba el miARN de interés se subclonó en un plásmido de expresión específico cardíaco que contenía el gen de α -MHC y la señal de poli(A)* de la GH humana (Kiriazis y Kranias, 2000). El ADN genómico se aisló de biopsias de cola de ratón y se analizó por PCR con cebadores específicos para la señal de poli(A)+ de la GH humana.

Plásmidos y ensayos de transfección. Un fragmento genómico de 305 pb que abarcaba la región codificante de miR-208 se amplificó por PCR y se ligó en pCMV6. Un fragmento de 1 kb que abarcaba la UTR completa de THRAP1 de ratón se amplificó por PCR y se ligó en una construcción de expresión pCMV6 marcada con HA y en la construcción indicadora con luciferasa de luciérnaga (f-luc) (pMIR-REPORT™, Ambion). Mediante mutagénesis basada en PCR se produjo una mutación de la secuencia de unión inicial de miR-208 UCGUCUUA.

Ejemplo 2 - Resultados

miR-208 es un regulador central de la función contráctil cardíaca. Los microARN intrónicos se transcriben como parte del transcrito génico del huésped, se cortan y empalman y se procesan para dar lugar a los miARN maduros. El miR-208 es un miARN intrónico localizado dentro del 27.º intrón del gen de α -MHC. FIG. 1. Al igual que α -MHC, miR-208 se expresa solamente en el corazón. FIG. 2. Postnatalmente, las hormonas tiroideas regulan la expresión de las isoenzimas de la miosina ventricular mediante estimulación de la síntesis de α -MHC e inhibición de la expresión de β -MHC. Para examinar si el bloqueo de la señalización de las hormonas tiroideas también influye en la expresión de miR-208, los inventores usaron muestras cardíacas de rata que habían sido expuestas a propiltiouracilo (PTU) durante un periodo de tiempo. El PTU bloquea la biosíntesis de las hormonas tiroideas e inhibe la “organificación” del yodo”, su incorporación en T3 y T4, y de este modo reprime la expresión de α -MHC y aumenta la de β -MHC. El análisis de transferencia de ARN indicó una perfecta

correlación entre el nivel de expresión de α -MHC y el nivel de pre-miARN, la denominada “horquilla”, mientras que el miARN maduro se mantuvo presente durante varias semanas después. FIGS. 3A-C y FIGS. 4A-C.

5 Para estudiar el papel de miR-208, los inventores crearon ratones nulos para miR-208. FIG. 5. Aunque esto no interfirió con la transcripción o la traducción de α -MHC, el análisis de micromatrices de tejido cardíaco de ratones no manipulados genéticamente (WT) y ratones con miR-208 inactivado (KO) de dos meses de edad indicó que la eliminación de miR-208 da lugar a una fuerte inducción de los genes del músculo esquelético rápido. FIGS. 6A-B y FIG. 7.

10 Para examinar el efecto de la eliminación de miR-208 durante el estrés cardíaco, los inventores expusieron ambos tipos de animales, no manipulados genéticamente y miR-208 KO, a una constricción por ligadura de la aorta transversa (TAB). TAB es un potente inductor de la hipertrofia cardíaca y de la concomitante expresión génica hipertrófica. Mientras que los animales no manipulados genéticamente mostraron un fuerte incremento de la expresión de β -MHC, los animales KO no mostraron esta inducción. FIG. 8.

Tabla 3 - Animales KO frente a WT tres semanas después de TAB

Gen	Factor de cambio en comparación con los animales no manipulados genéticamente después de TAB
Troponina cardíaca I de músculo esquelético rápido	194,0X regulación por aumento
Troponina cardíaca T3 de músculo esquelético rápido	194,0X regulación por aumento
MLC de músculo esquelético rápido	3,7X regulación por aumento
α -actina de músculo esquelético	2,8X regulación por aumento
β -MHC	29,8S regulación por disminución

20 En conjunto, estos datos indican que la expresión del gen de α -MHC induce adicionalmente la expresión de un miARN que regula por disminución la expresión del programa génico del músculo esquelético rápido. miR-208 se encuentra comprendido en el gen de α -MHC, que se regula por señales del desarrollo y fisiológicas. La α -MHC es un determinante fundamental de la contractilidad del músculo rápido. miR-208

reprime los genes del músculo esquelético rápido en el corazón, de modo que su delección resulta en un aumento notable de la expresión génica del músculo esquelético rápido (FIG. 13). También se requiere miR-208 para la regulación por aumento de β -MHC en el corazón. Dado que los microARN actúan como represores, se ha postulado que miR-208 reprime un represor de la expresión de β -MHC, según se ilustra en la FIG. 9. Durante el estrés cardíaco, este miARN es responsable de la inducción de β -MHC, tanto al nivel de ARN como de proteína, mientras que en ausencia de miR-208, esta inducción está totalmente ausente y α -MHC es la única isoforma de la cadena pesada de la miosina. El análisis de la expresión de α -MHC en muestras de corazón humano con y sin insuficiencia cardíaca demostró que la expresión de α -MHC en un corazón con insuficiencia cardíaca se redujo en comparación con la expresión de α -MHC en un corazón sin insuficiencia cardíaca (FIG. 10). Estos datos demuestran que miR-208 es un regulador central de la función contráctil cardíaca y parece estar implicado en el inadecuado cambio de miosina durante la cardiopatía.

Mediante el uso del software miRanda (obtenible del Centro de Biología Computacional del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) y el algoritmo PicTar para la identificación de dianas de miARN (Krek y col., 2005), se identificó la proteína asociada a receptores de hormonas tiroideas 1 (THRAP1) como una diana prevista para miR-208. La FIG. 12 muestra el alineamiento de miR-208 con las secuencias 3'-UTR de THRAP1 humana, de chimpancé, ratón, rata, perro, pollo, fugu y pez cebra.

miR-208 regula la remodelación cardíaca patológica. Los ratones homocigotos para la delección de miR-208 fueron viables y no mostraron anomalías evidentes con respecto al tamaño, forma o estructura del corazón hasta las 20 semanas de edad. Para investigar mejor las funciones potenciales de miR-208, los inventores compararon la respuesta de ratones no manipulados genéticamente y ratones mutantes para miR-208 a la ligadura de la aorta torácica (TAB), que induce la hipertrofia cardíaca por un aumento de la postcarga en el corazón y está acompañada de una regulación por disminución de α -MHC y una regulación por aumento de β -MHC (Hill y col., 2000). La expresión del ARNm de α -MHC disminuyó según lo esperado después de la operación TAB (FIG. 14A), pero miR-208 todavía se expresaba abundantemente 21 días después de la operación TAB (FIG. 14B), lo que es consistente con su relativamente alta semivida.

En respuesta a la operación TAB, los ratones no manipulados genéticamente mostraron un aumento pronunciado de la masa cardíaca, acompañado de un crecimiento hipertrófico de los miocardiocitos y de fibrosis ventricular (FIG. 15A). En contraste, los animales mutantes para miR-208 no mostraron prácticamente ninguna hipertrofia de miocardiocitos o fibrosis en respuesta a la operación TAB (FIG. 15A). La

ecocardiografía confirmó que los animales miR-208^{-/-} mostraban una respuesta hipertrófica debilitada y una reducción de la contractilidad (FIG. 14C). Lo más notable fue la incapacidad de los animales mutantes para regular β -MHC por aumento. En lugar de ello, la expresión de la proteína α -MHC aumentó en los corazones de los mutantes para miR-208 en respuesta a la operación TAB, lo que puede reflejar un mecanismo compensatorio para mantener la expresión de MHC en ausencia de una regulación por aumento de β -MHC. Otros genes de respuesta a estrés, como los que codifican los péptidos natriuréticos ANF y BNP, mostraron una fuerte inducción en los animales mutantes para miR-208 (FIGS. 15B-C). El análisis de micromatrices de corazones de animales no manipulados genéticamente y de animales miR-208^{-/-} confirmó que la ausencia de miR-208 resulta en un bloqueo muy específico de la expresión de β -MHC (Tablas 4-5).

Tabla 4 - Análisis de micromatrices de tejido cardíaco de animales no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-}. Se muestran los principales 20 genes que se expresan de manera diferente en animales miR-208^{-/-} en comparación con los animales no manipulados genéticamente en cada categoría.

Genes con mayor expresión en los animales miR-208 KO en relación con los animales no manipulados genéticamente				
miR-208 KO	No manipulado genéticamente	Log	Factor de cambio	Gen
349,1	8,3	6,3	78,8	Respuesta temprana al crecimiento (Egr2)
7.920,4	128	6,2	73,5	Troponina I de <i>Mus musculus</i> de músculo esquelético rápido 2 (Tnni2), ARNm
731,3	9,1	5,6	48,5	Respuesta temprana al crecimiento (Egr2)
6.298,8	135,1	5,5	45,3	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (Hsp70-1)
4.546,4	91,9	5,3	39,4	Proteína de choque térmico de 70 kDa 3 (Hsp70-3)
695,3	17,6	5,2	36,8	Troponina de <i>Mus musculus</i> T3 de músculo esquelético rápido (Tnnt3), ARNm
6.580,9	170,5	5,1	34,3	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (Hsp70-1)
7.772,6	360,6	4,5	22,6	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (Hsp70-1)
4.665,2	341,7	3,9	14,9	Respuesta temprana al crecimiento 1 de <i>Mus musculus</i> (Egr1), ARNm
7.909,7	119,1	3,6	12,1	Troponina I de músculo esquelético rápido 2 (Tnni2)
3.490,1	339,8	3,5	11,3	Subfamilia 4 de receptores nucleares de <i>Mus musculus</i> , grupo A, miembro 1 (Nr4a1), ARNm
9.451	486,7	3,5	11,3	Cadena ligera de la miosina de <i>Mus musculus</i> , alcalina, músculo esquelético rápido (Mylf)

ES 2 397 439 T3

1.206,8	171,1	3	8,0	Oncogén del osteosarcoma FBJ (Fos)
1.277,2	219,9	2,8	7,0	Familia de transportadores de solutos 11, miembro 1 (proteína macrofágica asociada con la resistencia natural 1)
586,2	103,4	2,7	6,5	Factor activador de transcripción 3
695,4	110,1	2,6	6,1	Parvalbúmina de <i>Mus musculus</i> (Pva), ARNm
2.313,5	500,9	2,4	5,3	Homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 1
1.291,9	287,4	2,4	5,3	Proteína del gen transformador de tumores de pituitaria de <i>Mus musculus</i> (PTTG), ARNm, secuencia codificante completa
174,7	30	2,3	4,9	Hidrolasa carboxiterminal de la ubiquitina L1 (Uchl1)
170,4	32	2,2	4,6	Osteomodulina de <i>Mus musculus</i> (Omd), ARNm

Genes con menor expresión en los animales miR-208 KO en relación con los animales no manipulados genéticamente tres semanas después de la operación TAB

miR-208 KO	No manipulado genéticamente	Log	Factor de cambio	Gen
2,2	142,9	-6,3	-78,8	Transcrito específico de X (inactivado) localizado en el núcleo de ratón (Xist), ARNm
82,7	4.674,2	-5,1	-34,3	Transcrito específico de X Inactivado), no codificante
47,7	517,5	-3,5	-11,3	Citocromo P450 de <i>Mus musculus</i> , 2a5 (Cyp2a5), ARNm
315,6	2.607,7	-3,4	-10,6	Gen asociado a deficiencia de carnitina de <i>Mus musculus</i> expresado en el ventrículo 1 (Cdv1), ARNm
486,9	4827,9	-3,3	-9,8	Gen asociado a deficiencia de carnitina de <i>Mus musculus</i> expresado en el ventrículo 1 (Cdv1), ARNm
34,9	205,2	-3,3	-9,8	β GlcNAc, β -1,3-galactosiltransferasa,

				polipéptido 2 (b3Galt2)
8	70,5	-3,2	-9,2	Cadherina 1 de <i>Mus musculus</i> (cdH1), ARNm
23,8	129,3	-2,9	-7,5	β -globina de <i>Mus musculus</i> , ARNm, secuencia codificante parcial
32,4	196,2	-2,8	-7,0	Cristalina β 4 de <i>Mus musculus</i> (Cryba4), ARNm
8,3	49,3	-2,7	-6,5	Proteína del grupo de alta movilidad de <i>Mus musculus</i> (sox2), ARNm, secuencia codificante completa
2,1	21,5	-2,7	-6,5	β GlcNAc, β -1,3-galactosiltransferasa, polipéptido 2 (b3Galt2)
225,8	1.498,4	-2,7	-6,5	Citocromo P450 de <i>Mus musculus</i> , 2f2 (Cyp2f2), ARNm
1.294,9	8.588,1	-2,7	-6,5	ARNm de <i>Mus musculus</i> de la proteína de células clara de 10 kDa (CC10), (Scgb1a1)
421,7	4.127,3	-2,6	-6,1	ARNm de UGRP1A de <i>Mus musculus</i> , secuencia codificante completa, (Scgb3a2) /PROD=UGRP1A
90,5	434,8	-2,4	-5,3	Canal de potasio dependiente de voltaje, familia relacionada con Sha1, miembro 2, (Kcnd2)
7,8	48,2	-2,4	-5,3	Proteína de unión al elemento de respuesta a TNF de <i>Mus musculus</i> , ARNm, secuencia codificante completa, (Smarca3)
269,3	1.118,5	-2,3	-4,9	Canal de potasio dependiente de voltaje, familia relacionada con Sha1, miembro 2, (Kcnd2)
22,4	61,2	-2,2	-4,6	Proteína inactivada del glioma rica en leucina 1, (Lgi1)
85	469,8	-2,2	-4,6	Proteína de unión al nucleótido guanina α 12, (Gna12)
954,7	2.196,7	-2,2	-4,3	Proteína de choque térmico de 25 kDa de <i>Mus musculus</i> (cardiovascular) (Hsp25-2), ARNm

Tabla 5 - Análisis de micromatrices de tejido cardíaco de animales no manipulados genéticamente y miR-208^{-/-}, tres semanas después de la operación TAB. Se muestran los principales 20 genes que se expresan de manera diferente en animales miR-208^{-/-} en comparación con los animales no manipulados genéticamente tres semanas después de la operación TAB en cada categoría.

5

Genes con mayor expresión en los animales miR-208 KO en relación con los animales no manipulados genéticamente tres semanas después de la operación TAB				
miR-208 KO	No manipulado genéticamente	Log	Factor de cambio	Gen
7.259,6	38,8	7,6	194,0	Troponina I de músculo esquelético rápido de <i>Mus musculus</i> 2 (Tnni2), ARNm
2.455,4	11,8	7,6	194,0	Troponina T3 de músculo esquelético rápido de <i>Mus musculus</i> (Tnnt3), ARNm
249,6	1,3	7,6	194,0	Quitinasa 3 similar a 3 de <i>Mus musculus</i> (Chi3l3), ARNm
5.624,4	49,9	6,1	68,6	Transcrito específico de X (inactivado), no codificante (Tsix)
4.267,5	62,9	4,6	24,3	Troponina I de músculo esquelético rápido 2 (Tnni2)
427,9	31,8	3,7	13,0	Proteína amiloide sérica A 3 de <i>Mus musculus</i> (Saa3), ARNm
607,4	59,9	3,2	9,2	Proteína de unión a calcio S100 A8 de <i>Mus musculus</i> (calgranulina A) (S100a8), ARNm
631	68,3	3	8,0	Parvalbúmina de <i>Mus musculus</i> (Pva), ARNm
1.023,2	195,3	2,9	7,5	Integrina α 9 de <i>Mus musculus</i> (Itga9), ARNm
553,5	51,1	2,9	7,5	Proteína de unión a calcio S100 A9 de <i>Mus musculus</i> (calgranulina B) (S100a9), ARNm
1.476	205,1	2,8	7,0	Trombospondina 1 (Thbs1)
2.697,7	415,7	2,8	7,0	Calsecuestrina 1 de <i>Mus musculus</i> (Casq1), ARNm
1.172,3	173,1	2,7	6,5	Lisiloxidasa de <i>Mus musculus</i> (Lox), ARNm

ES 2 397 439 T3

327	67,6	2,6	6,1	Cromogranina B de <i>Mus musculus</i> (Chgb), ARNm
1.488,6	241,7	2,5	5,7	Procolágeno de tipo III, α 1 (Coll3a1)
1.729,8	308,2	2,4	5,3	Elastina (Eln)
771,2	128	2,4	5,3	α -sinucleína (Snca)
914,2	185,1	2,3	4,9	Proteína 2 de unión al factor de crecimiento transformante β latente (Ltbp2), ARNm
2.753,4	425,7	2,3	4,9	Inhibidor de proteasas de serina 2-2 de <i>Mus musculus</i> (Spi2-2), ARNm
1.509,5	256,9	2,3	4,9	Procolágeno de tipo V, α 2 (Col5a2)

Genes con menor expresión en los animales miR-208 KO en relación con los animales no manipulados genéticamente tres semanas después de la operación TAB

miR-208 KO	No manipulado genéticamente	Log	Factor de cambio	Gen
1,4	146,5	-5,9	-59,7	Proteína de motivo tripartito 12 (TRIM12)
2,7	128,1	-5,1	-34,3	Proteína con una región de unión a ARN (RNP1, RRM) 2 (Rnpc2)
485,2	9.966,2	-4,9	-29,9	Miosina de <i>Mus musculus</i> , polipéptido pesado 7, músculo cardíaco, β (Myh7), ARNm
9,8	101	-3,3	-9,8	Proteína jumonji de <i>Mus musculus</i> (jmi), ARNm
9,3	144,5	-3,2	-9,2	Citocina inducible pequeña A11 de <i>Mus musculus</i> (Scya11), ARNm
9,9	86,9	-3,1	-8,6	Canal de potasio dependiente

				de voltaje de <i>Mus musculus</i> , subfamilia relacionada con Isk, miembro 1 (Kcne1), ARNm
7,5	67,1	-3,1	-8,6	Proteína inactivada del glioma rica en leucina 1 (Lgi1)
128,5	974,2	-3,1	-8,6	Proteína del gen transformador de tumores de pituitaria de <i>Mus musculus</i> (PTTG), ARNm, secuencia codificante completa
300,9	2.502	-3,1	-8,6	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (Hsp70-1)
252,4	2.016,7	-3,1	-8,6	Proteína de choque térmico de 70 kDa 3 (Hsp70-3)
7,9	133,4	-3,0	-8,0	Receptor de prostaglandina F de <i>Mus musculus</i> (Ptgfr), ARNm
423,9	3.375,9	-3,0	-8,0	Proteína del gen transformador de tumores de pituitaria 1 (Pttg1)
29,5	211,8	-2,9	-7,5	Glicina-C-acetiltransferasa de <i>Mus musculus</i> (2-amino-3-cetobutirato-coenzimaA-ligasa) (Gcat)
388	3.048,8	-2,9	-7,5	Proteína de choque térmico de 70 kDa 1 (Hsp70-1)
557,2	3.734,4	-2,8	-7,0	Gen asociado a deficiencia de carnitina expresado en el ventrículo 1 de <i>Mus musculus</i> (Cdv1), ARNm
302,6	1.731,8	-2,6	-6,1	Gen asociado a deficiencia de carnitina expresado en el ventrículo 1 de <i>Mus musculus</i>

				(Cdv1), ARNm
49,3	211,2	-2,5	-5,7	Proteína renal regulada por andrógenos (Kap)
12,3	56,6	-2,5	-5,7	Serina-hidroximetiltransferasa de <i>Mus musculus</i> , ARNm, secuencia codificante completa
42	224,8	-2,5	-5,7	Proteína de activación de macrófagos 2 (Mpa2)
30,3	165,1	-2,4	-5,3	Coactivador 1 del receptor y activado por el factor proliferativo de peroxisomas (Ppargc1)

Los ratones miR-208^{-/-} fueron también resistentes a la fibrosis y a la hipertrofia de miocardiocitos en respuesta a la expresión transgénica de calcineurina activada (FIG. 15D), un poderoso estímulo de la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca. De manera similar, el ARNm y la proteína de β -MHC no se regularon por aumento en los corazones de los ratones miR-208^{-/-} ni en ratones CnA-Tg de seis semanas de edad, mientras que ANF y BNP experimentaron una intensa inducción (FIGS. 15E-F). Por lo tanto, miR-208 es necesario para la regulación por aumento de β -MHC y para la remodelación celular, pero no para la expresión de los otros marcadores de estrés cardíaco.

Para comprobar si miR-208 es suficiente para la regulación por aumento de la expresión de β -MHC, los inventores generaron ratones transgénicos que expresaban miR-208 en exceso bajo el control del promotor de α -MHC. Los ratones transgénicos con α -MHC-miR-208 fueron viables y expresaron miR-208 a un nivel aproximadamente tres veces el de los corazones no manipulados genéticamente (FIG. 14D). Los corazones de una línea transgénica que representaba la expresión en exceso media del transgén, no mostraron signos patentes de remodelación patológica a los dos meses de edad pero, notablemente, mostraron una intensa regulación por aumento de la expresión de β -MHC (FIG. 15G y FIG. 14E). Esta actividad de miR-208 fue específica, ya que la expresión transgénica en exceso de miR-214, que se induce durante la hipertrofia cardíaca, no tuvo efecto sobre la expresión de β -MHC. Dado que el nivel endógeno de miR-208 en el corazón de ratones adultos es insuficiente para regular por aumento la expresión de β -MHC, el resultado de que un aumento de tres

veces de la expresión de miR-208 en estos ratones transgénicos resulta en la regulación por aumento de la expresión de β -MHC sugiere que hay un umbral muy preciso para el control de la expresión de β -MHC por este microARN.

miR-208 regula la represión de β -MHC dependiente de T3. La señalización de T3 induce la transcripción de α -MHC por medio de un elemento de respuesta a T3 positivo (TRE), mientras que un TRE negativo en el promotor del gen de β -MHC da lugar a represión transcripcional (Ojamaa y col., 2000). Para comprobar si miR-208 se requiere para la regulación de β -MHC dependiente de T3, se alimentaron mutantes y animales no manipulados genéticamente de la misma camada con pienso que contenía PTU durante dos semanas para bloquear la señalización de T3. El análisis de transferencia de ARN verificó que miR-208 estaba presente abundantemente después de dos semanas de tratamiento con PTU (FIG. 16A). Según lo esperado, PTU indujo una disminución de la frecuencia cardíaca y la contractilidad y un aumento de la dilatación, sin diferencias notables entre los animales no manipulados genéticamente y los mutantes (FIG. 16B). Sin embargo, mientras que los animales no manipulados genéticamente mostraron la disminución de α -MHC y el aumento de β -MHC esperados en respuesta a PTU, los animales miR-208^{-/-}, de nuevo, parecieron ser resistentes a la regulación por aumento de β -MHC, aunque se detectaron vestigios de la expresión de β -MHC (FIGS. 17A-B). ANF y BNP fueron regulados por aumento por PTU en los animales miR-208^{-/-}, lo que confirma el papel específico de miR-208 en la expresión de β -MHC (FIG. 16C). Dado que PTU induce un cambio entre las isoformas α -MHC y β -MHC, por la sola interferencia con la señalización de los receptores de hormonas tiroideas (TR), estos resultados sugieren que miR-208 potencia la expresión de β -MHC a través de un mecanismo en el que intervienen los TR.

miR-208 reconoce como diana la proteína asociada a TR 1. Entre las relativamente pocas dianas previstas para miR-208, el ARNm que codifica la proteína asociada a recetores de hormonas tiroideas 1 (THRAP1), también conocida como THRAP240, resultó la diana prevista con mayor puntuación por el programa de predicción de dianas PicTar (Krek y col., 2005). THRAP1, un componente del complejo TRAP asociado a TR, modula la actividad de los TR, mediante la atracción de la ARN-polimerasa II y factores generales de iniciación (Ito y Roeder, 2001). El supuesto sitio de unión de miR-208 a la región 3'-UTR del ARNm de THRAP1 mostró gran complementariedad con el brazo 5' de miR-208, el determinante más crítico para el reconocimiento de dianas de los miARN, así como de su conservación evolutiva (FIG. 18A). Basado en la imperfecta complementariedad de miR-208 y la secuencia 3'-UTR de THRAP1, sería de esperar que miR-208 inhibiera la traducción de THRAP1.

Para comprobar si la supuesta secuencia diana de miR-208 en la región 3'-UTR de THRAP1 podría dar lugar a una represión traduccional, los inventores insertaron la región 3'-UTR completa del transcrito de THRAP1 en un plásmido de expresión de luciferasa, que se transfectó en células COS1. Cantidades crecientes de miR-208 expresadas a partir de CMV resultaron en una disminución de la actividad luciferasa dependiente de la dosis, mientras que cantidades comparables de miR-126, como control, no tuvieron ningún efecto (FIG. 18B). Además, CMV-miR-208 también eliminó, de manera dependiente de la dosis, la traducción de un casete de expresión de malonil-CoA Descarboxilasa marcada con HA, ligada a la secuencia de unión de la región 3'-UTR de THRAP1, pero no a una secuencia diana de miR-208 mutante (FIG. 18C). Adicionalmente, la expresión de la proteína THRAP1 resultó aumentada en los lisados de proteína cardíaca de los ratones miR-208^{-/-}, en comparación con animales de la misma camada no manipulados genéticamente (FIG. 18D), mientras que el ARNm de THRAP1 fue comparable en los corazones de los dos genotipos (FIG. 19), lo que es coherente con la conclusión de que miR-208 actúa como regulador negativo de la traducción de THRAP1 *in vivo*. En situaciones de estrés, la influencia negativa de miR-208 sobre la expresión de la proteína THRAP1 puede ser incluso mayor, a la vista de los recientes estudios que muestran que el estrés aumenta las acciones represivas de los miARN al estimular la asociación de los miARN con las proteínas Argonauta (Leung y col., 2006).

miR-208 se requiere para la expresión de miR-499. Para explorar mejor el mecanismo de acción de miR-208 en el corazón, los inventores definieron los patrones de expresión de microARN en corazones de ratones no manipulados genéticamente y mutantes nulos para miR-208 mediante análisis de micromatrices. Entre los diversos microARN que se regulaban por aumento y por disminución en los corazones de los mutantes, los inventores descubrieron que miR-499 era muy abundante en corazones normales, pero no se expresaba sobre el nivel de fondo en los mutantes para miR-208. Estos resultados se confirmaron por análisis de transferencia de ARN (FIG. 21).

El análisis de la localización genómica del gen de miR-499 mostró que está contenido en el 20.º intrón del gen Myh7b, un homólogo del gen de α -MHC (Myh7b) (FIG. 22). El gen Myh7b está conservado en vertebrados y se expresa solamente en el corazón y en el músculo esquelético lento (sóleo) (FIG. 23). Además, miR-499 se regula por disminución durante la hipertrofia cardíaca (FIG. 24).

MEF2 regula la expresión de miR-499 en los músculos cardíaco y esquelético. Los inventores identificaron dentro de la región flanqueante del extremo 5' del gen Myh7 una potencial secuencia consenso de MEF2 conservada entre especies. Esta secuencia se unió con intensidad a MEF2 en ensayos de cambio de movilidad en

gel y la mutación de esta secuencia abolió la expresión de un indicador lacZ en ratones transgénicos. El sitio MEF2 estaba contiguo a una secuencia de caja E conservada (CANNTG), que sirve como sitio de unión para miembros de la familia MyoD de las proteínas bHLH que producen expresión génica en el músculo esquelético con MEF2.

5 De hecho, MyoD se unió junto con la proteína bHLH ubicua, E12, a la caja E del promotor. La mutación de esta secuencia impidió la expresión del transgén lacZ en el músculo esquelético, pero no afectó a la expresión en el corazón.

Identificación de dianas. En conjunto, los datos expuestos en este documento indican que la expresión regulada por MEF2 del gen Myh7b induce adicionalmente la

10 expresión de un miARN específico del músculo lento y cardíaco que regula por disminución la expresión del programa génico del músculo esquelético rápido. Estos datos proporcionan evidencia de que miR-499 es un regulador central del tipo de fibra del músculo esquelético.

Existe gran homología entre miR-208 y miR-499 y, el hecho notable de que

15 ambos microARN estén codificados por intrones de genes Mhc, sugiere que tienen mecanismos reguladores comunes. Dado que los miARN influyen negativamente en la expresión génica de manera específica de la secuencia, el alto grado de homología predispone a miR-208 y miR-499 para ejercer funciones comparables debido al solapamiento en los genes diana. Los inventores han identificado reguladores

20 transcripcionales de la expresión de Mhc que parecen servir como dianas para miR-499. También han demostrado que la expresión de miR-499 está controlada por miR-208 en el corazón, de modo que la inactivación de miR-208 elimina la expresión de miR-499.

Dado que los datos previos de los inventores demostraron que la interrupción genética de miR-208 conducía a una fuerte inducción de genes específicos del músculo

25 esquelético rápido en el corazón, es probable que miR-499 tenga una función comparable en el músculo esquelético y podría actuar como un regulador dominante del tipo de fibra. En línea con esta hipótesis, el análisis del promotor de este transcrito indica que la expresión de miR-499 y del transcrito de su huésped están reguladas por el factor de transcripción miogénico MEF2, un regulador central del tipo de fibra del

30 músculo esquelético y de la expresión génica de la fibra lenta. Los inventores han demostrado que la actividad de MEF2 estimula la resistencia del músculo y evita la fatiga muscular después de un ejercicio prolongado. Por lo tanto, proponen que estas acciones de MEF2 dependen, al menos en parte, de la activación directa de la expresión de miR-499 (FIG. 25).

35 En conjunto, estos datos indican de la expresión regulada por MEF2 del gen Myh7b induce adicionalmente la expresión de un miARN específico del músculo lento y

cardíaco que regula por disminución la expresión del programa génico del músculo esquelético rápido. Los datos proporcionan evidencia de que miR-499 es un regulador central del tipo de fibra del músculo esquelético. El hecho notable de que miR-208 y miR-499 presenten gran homología y de que los dos estén codificados por intrones de genes Mhc, sugiere que tienen mecanismos reguladores comunes. Dado que los miARN influyen negativamente en la expresión génica de manera específica de la secuencia, el alto grado de homología predispone a miR-208 y miR-499 para ejercer funciones comparables debido al solapamiento en los genes diana. Los inventores han identificado reguladores transcripcionales de la expresión de Mhc que parecen servir como dianas para miR-499 y también han demostrado que la expresión de miR-499 está controlada por miR-208 en el corazón, de modo que la inactivación de miR-208 elimina la expresión de miR-499.

Regulación de la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca por miARN que responden a estrés. A la vista de su intervención en la modulación de los fenotipos celulares, hemos planteado la hipótesis de que los miARN pueden desempeñar un papel en la regulación de la respuesta del corazón al estrés cardíaco, lo que se sabe que resulta en cambios transcripcionales y traduccionales de la expresión génica. Para investigar la potencial intervención de los miARN en la hipertrofia cardíaca, los inventores llevaron a cabo un análisis de micromatrices yuxtapuestas de miARN en dos modelos establecidos de hipertrofia cardíaca de ratón, mediante una micromatriz que representaba 186 miARN diferentes (Babak y col., 2004). Se compararon ratones sometidos a una ligadura de la aorta torácica (TAB), que induce hipertrofia por un aumento de la postcarga en el corazón (Hill y col., 2000), con animales sometidos a operaciones simuladas. En un segundo modelo, se compararon ratones transgénicos que expresaban calcineurina activada en el corazón (CnA), lo que resulta en una grave y bien caracterizada forma de hipertrofia (Molkentin y col., 1998) con animales de la misma camada no manipulados genéticamente (FIG. 26A). El ARN aislado de los corazones de los ratones sometidos a la operación TAB mostraron un aumento de la expresión de 27 miARN en comparación con los controles sometidos a la operación simulada y los ratones CnA-Tg mostraron un aumento de la expresión de 33 miARN, en comparación con los controles de la misma camada no transgénicos, 21 de los cuales mostraron una regulación por aumento en los dos modelos. De manera similar, la hipertrofia inducida por TAB y CnA fue acompañada de una reducción de la expresión de 15 y 14 miARN, respectivamente, siete de los cuales mostraron una regulación por disminución en los dos modelos (FIG. 26B). El análisis de transferencia de ARN de estos miARN (nuestros datos sin publicar) y análisis de micromatrices previos (Barad y col., 2004; Sempere y col., 2004; Shingara y col., 2005; Liu y col.,

2004) indican que se expresan en una amplia gama de tejidos. Sobre la base de sus niveles de expresión relativos, la conservación de las secuencias humanas, de rata y de ratón y los niveles de expresión durante la hipertrofia, los inventores se centraron en 11 miARN regulados por aumento y 5 miARN regulados por disminución (FIG. 26C).

5 El análisis por transferencia de ARN del ARN cardíaco de animales no manipulados genéticamente (WT) y CnA-Tg confirmó un aumento de la expresión de miR-21, -23, -24, -125b, -195, -199a y -214 y una disminución de la expresión de miR-29c, -93, 150 y -181b (FIG. 26C y FIG. 27). Colectivamente, estos datos indican que durante la hipertrofia cardíaca se regulan distintos miARN, lo que sugiere la posibilidad
10 de que puedan funcionar como moduladores de este proceso.

La familia de miR-29 como dianas posteriores para regulación por miR-208.

Los inventores llevaron a cabo un análisis de micromatrices de miARN para corazones de ratones no manipulados genéticamente y mutantes nulos para miR-208, en un esfuerzo para identificar miARN posteriores que pudieran hacer de mediadores para las
15 acciones de miR-208 (FIG. 28). Descubrieron que múltiples miembros de la familia de miR-29 se regulaban por aumento en los ratones nulos para miR-208 (FIG. 29). La predicción de dianas indicó que los miembros de la familia de miR-29 reconocían como diana ARNm que codificaban múltiples colágenos y otros componentes de la matriz extracelular (FIG. 30). Por lo tanto, la regulación por aumento de los miembros de la
20 familia de miR-29 en los ratones nulos para miR-208 es probablemente responsable del bloqueo de la fibrosis observado en estos animales (FIG. 31).

Resumen. El descubrimiento de que miR-29 se regula por disminución en el corazón enfermo y de que reconoce como dianas ARNm que codifican colágenos y proteínas de la matriz extracelular sugiere que las estrategias dirigidas a estimular la
25 expresión de miR-29 o su asociación con los ARNm diana tendrán probablemente efectos beneficiosos en el corazón en los contextos de remodelación cardíaca patológica y fibrosis. Además, es probable que el aumento de la expresión o función de miR-29 prevenga la fibrosis asociada con muchas enfermedades en tejidos como el hígado, el pulmón, el riñón y otros. Adicionalmente, el descubrimiento de que miR-208
30 reprime la expresión de miR-29 y de que la pérdida de miR-208 regula por aumento la expresión de miR-29 indica que miR-29 es un mediador posterior de las acciones de miR-208 en el corazón.

Ejemplo 3 - Discusión

Estos resultados demuestran que miR-208, que está codificado por un intrón del
35 gen de α -MHC, regula de manera dependiente del estrés el crecimiento de miocardiocitos y la expresión génica. En ausencia de miR-208, la expresión de β -MHC

está seriamente debilitada en el corazón adulto en respuesta a sobrecarga de presión, calcineurina activada o hipotiroidismo, lo que sugiere que las rutas a través de las cuales estos estímulos inducen la transcripción de β -MHC tienen en común un componente sensible a miR-208 (FIG. 9). En contraste, la expresión de β -MHC no se alteró en los corazones de ratones miR-208^{-/-} neonatos, lo que demuestra que miR-208 participa específicamente en el mecanismo para la regulación dependiente del estrés de la expresión de β -MHC.

Un indicio del mecanismo de acción de miR-208 procede de la similitud de los corazones de mutantes miR-208^{-/-} con corazones hipertiroideos, ambos de los cuales muestran un bloqueo de la expresión de β -MHC, una regulación por aumento de genes de respuesta al estrés (Wei y col., 2005; Pantos y col., 2006) y protección contra hipertrofia patológica y fibrosis (Yao y Eghbali, 1992; Chen y col., 2000). La regulación por aumento de los genes del músculo esquelético rápido en los corazones de mutantes miR-208^{-/-} también mimetiza la inducción de las fibras del músculo esquelético rápido en el estado hipertiroideo (Vadaszova y col., 2004). La señalización de T3 reprime la expresión de β -MHC en el corazón postnatal y PTU, que causa hipotiroidismo, induce la expresión de β -MHC (Morkin, 2000; Schuyler y Yarbrough, 1990). La incapacidad de PTU para inducir la expresión de β -MHC en corazones de mutantes miR-208^{-/-} implica además a miR-208 en la ruta de señalización de T3.

Estos resultados sugieren que miR-208 actúa, al menos en parte, reprimiendo la expresión del corregulador de TR, THRAP1, que puede ejercer efectos positivos y negativos en la transcripción (Pavri y col., 2005; Park y col., 2005). El TR actúa a través de un TRE negativo para reprimir la expresión de β -MHC en el corazón adulto (Morkin, 2000). Por lo tanto, se podría predecir que el aumento de la expresión de THRAP1 en ausencia de miR-208 aumentaría la actividad represiva de los TR sobre la expresión de β -MHC, lo que es coherente con el bloqueo de la expresión de β -MHC en los corazones de mutantes miR-208^{-/-}. En contraste, la regulación de la expresión de α -MHC y β -MHC durante el desarrollo es independiente de la señalización de T3 (Morkin, 2000) y no es afectada por miR-208. Es notable que otros genes diana de TR, como fosfolambán (PLB) y la ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) 2a y el transportador de glucosa (GLUT) 4, se expresaran normalmente en los ratones miR-208^{-/-} (FIG. 20). Se ha propuesto que el gen de β -MHC puede responder a isoformas específicas de TR (Kinugawa y col., 2001; Mansen y col., 2001; Kinugawa y col., 2001). Quizá THRPA1 actúa sobre isoformas específicas de TR o selectivamente sobre un subconjunto de genes dependientes de TR por medio de interacciones con factores específicos de promotores. Dado que los miARN generalmente actúan a través de múltiples dianas ulteriores para ejercer sus efectos, es probable que dianas

adicionales también contribuyan a los efectos de miR-208 en el crecimiento cardíaco y la expresión génica cardíaca.

Cambios relativamente menores en la composición de β -MHC, como los que se producen durante la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca, pueden reducir la actividad de la ATPasa miofibrilar y la función sistólica (Abraham y col., 2002). Por lo tanto, la manipulación terapéutica de la expresión de miR-208 o de la interacción con sus dianas de ARNm potencialmente podría estimular la función cardíaca al suprimir la expresión de β -MHC. Sobre la base de la profunda influencia de miR-208 sobre la respuesta al estrés cardíaco y de la regulación de numerosos miARN en el corazón enfermo (van Rooij y col., 2006), los inventores anticipan que los miARN demostrarán ser unos reguladores clave de las funciones y respuestas a la enfermedad del corazón adulto y posiblemente de otros órganos.

Todas las composiciones y procedimientos desvelados y reivindicados en este documento pueden prepararse y ejecutarse sin una excesiva experimentación, a la luz de la presente descripción. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que estén química y fisiológicamente relacionados pueden sustituir a los agentes descritos en este documento, obteniendo los mismos o similares resultados.

XI. Referencias

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- 20 Patente de los EE.UU. 4.873.191
- Patente de los EE.UU. 5.604.251
- Patente de los EE.UU. 5.844.107
- Patente de los EE.UU. 5.877.302
- Patente de los EE.UU. 5.972.900
- 25 Patente de los EE.UU. 5.972.901
- Patente de los EE.UU. 6.008.336
- Patente de los EE.UU. 6.077.835
- Patente de los EE.UU. 6.200.801
- Publicación de los EE. UU. 20020150626
- 30 Publicación de los EE. UU. 20030032615

- Publicación de los EE. UU. 20030203865
- Publicación de los EE. UU. 20040048787
- Abraham y col., *Mol. Med.*, 8:750-760, 2002.
- Ambros, *Cell*, 113(6):673-676, 2003.
- 5 Angel y col., *Cell*, 49:729, 1987b.
- Angel y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256, 1987a.
- Atchison y Perry, *Cell*, 46:253, 1986.
- Atchison y Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Babak y col., *RNA* 10:1813-1819, 2004.
- 10 Baichwal y Sugden, En: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.
- Baldwin y Haddad, *J. Appl. Physiol.*, 90:345-357, 2001.
- Banerji y col., *Cell*, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji y col., *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
- 15 Barad y col., *Genome Res.* 14:2486-2494, 1997.
- Barnes y col., *J. Biol. Chem.*, 272(17):11510-11517, 1997.
- Benvenisty y Neshif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(24):9551-9555, 1986.
- Berkhout y col., *Cell*, 59:273-282, 1989.
- Bhavsar y col., *Genomics*, 35(1):11-23, 1996.
- 20 Blanar y col., *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Bodine y Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.
- Boshart y col., *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze y col., *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Braddock y col., *Cell*, 58:269, 1989.
- 25 Brennecke y col., *Cell*, 113:25-36, 2003.
- Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.

- Bristow, *Cardiology*, 92:3-6, 1999.
- Bulla y Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Calin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:15524-15529, 2002.
- Campbell y Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- 5 Campere y Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo y col., *Nature*, 303:77, 1983.
- Carrington y col., *Science*, 301(5631):336-338, 2003.
- Celander y Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander y col., *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- 10 Chandler y col., *Cell*, 33:489, 1983.
- Chang y Karin, *Nature*, 410(6824):37-40, 2001.
- Chang y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1092(2):153-160, 1991.
- Chang y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chang y col., *Nature*, 430(7001):785-789, 2004.
- 15 Chatterjee y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell. Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen y col., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 162:45-55, 2000.
- Chen y col., *Science*, 303(5654):83-86, 2004.
- Choi y col., *Cell*, 53:519, 1988.
- 20 Coffin, En: *Virology*, Fields y col. (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.
- Cohen y col., *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:81, 1988.
- Couch y col., *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.
- Coupar y col., *Gene*, 68:1-10, 1988.
- 25 Cripe y col., *EMBO J.*, 6:3745, 1987.
- Culotta y Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376, 1989.

- Dandolo y col., *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- De Villiers y col., *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- Deschamps y col., *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dubensky y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- 5 Durand y col., *Ann. Med.*, 27:311-317, 1995.
- Edbrooke y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edgerton y Roy, *J. Appl. Physiol.*, 89:1224-1231, 2000.
- Edlund y col., *Science*, 230:912-916, 1985.
- Eichhorn y Bristow, *Circulation*, 94:2285-2296, 1996.
- 10 EPO 0273085
- Fechheimer y col., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feng y Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Ferkol y col., *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak y Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- 15 Fitts y col., *J. Appl. Physiol.*, 89:823-839, 2000.
- Foecking y Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraley y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Franz y col., *Cardioscience*, 5(4):235-43, 1994.
- Friedman y col., *Genes Devel.*, 3:1314, 1989.
- 20 Fujita y col., *Cell*, 49:357, 1987.
- Ghosh y Bachhawat, En: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu y col. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Ghosh-Choudhury y col., *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gilles y col., *Cell*, 33:717, 1983.
- 25 Gloss y col., *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- Godbout y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.

- Gomez-Foix y col., *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Goodbourn y Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn y col., *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- 5 Gopal-Srivastava y col., *J. Mol. Cell. Biol.* 15(12):7081-7090, 1995.
- Graham y Prevec, En: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, N.J., 7:109-128, 1991.
- Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham y col., *J. Gen. Virol.*, 36(1):59-74, 1977.
- 10 Greene y col., *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Grishok y col., *Cell*, 106:23-34, 2001.
- Grosschedl y Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- 15 Haslinger y Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber y Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Hen y col., *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel y col., *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermonat y Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- 20 Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hersdorffer y col., *DNA Cell Biol.*, 9:713-723, 1990.
- Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- Hill y col., *Circulation*, 101:2863-2869, 2000.
- Hirochika y col., *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- 25 Hirsch y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook y col., *Virology*, 157:211, 1987.

- Horlick y Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Horwich y col., *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- Huang y col., *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065, 1988.
- 5 Hutvagner y col., *PLoS Biol.*, 2(4):E98, 2004.
- Hwang y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa y col., *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra y Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- 10 Imperiale y Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Ito y Roeder, *Trends Endocrinol. Metab.*, 12:127-134, 2001.
- Jakobovits y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988.
- Jameel y Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- 15 Johnson y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:3393, 1989.
- Jones y Shenk, *Cell*, 13:181-188, 1978.
- Kadesch y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaneda y col., *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- 20 Karlsson y col., *EMBO J*, 5:2377-2385, 1986.
- Katinka y col., *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka y col., *Nature*, 290:720, 1981.
- Kato y col., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988.
- 25 Kelly y col., *J. Cell Biol.*, 129(2):383-396, 1995.
- Kiledjian y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.

- Kimura y col., *Dev. Growth Differ.* 39(3):257-265, 1997.
- Kinugawa y col., *Circ. Res.*, 89:591-598, 2001.
- Kinugawa y col., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86:5089-5090, 2001.
- Kiriazis y Kranias, *Annu. Rev. Physiol.*, 62:321-351, 2000.
- 5 Klamut y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990.
- Klein y col., *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Koch y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Krek y col., *Nat. Genet.*, 37:495-500, 2005.
- Krek y col., *Nature Genetics*, 37:495-500, 2005.
- 10 Krenz y Robbins, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 44:2390-2397, 2004.
- Kriegler y Botchan, En: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler y Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983a.
- Kriegler y col., *Cell*, 38:483, 1984.
- 15 Kriegler y col., *Cell*, 53:45, 1988.
- Kriegler y col., En: *Gene Expression*, Alan Liss (Ed.), Hamer and Rosenberg, New York, 1983b.
- Krützfeldt y col., *Nature*, 438:685-689, 2005.
- Kuhl y col., *Cell*, 50:1057, 1987.
- 20 Kunz y col., *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Lagos-Quintana y col., *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- LaPointe y col., *Hypertension* 27(3 Pt 2):715-22, 1996.
- LaPointe y col., *J. Biol. Chem.*, 263(19):9075-8, 1988.
- Larsen y col., *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- 25 Laspia y col., *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lau y col., *Science*, 294(5543):858-862, 2001.

- Le Gal La Salle y col., *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee y Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- Lee y col., *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee y col., *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- 5 Leung y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:18125-18130, 2006.
- Levinson y col., *Nature*, 295:79, 1982.
- Leverero y col., *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lin y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Liu y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9740-9744, 2004.
- 10 Luria y col., *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky y Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky y col., *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Majors y Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- 15 Mann y col., *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Mansen y col., *Mol. Endocrinol.*, 15:2106-2114, 2001.
- Markowitz y col., *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- McNeall y col., *Gene*, 76:81, 1989.
- Meister y Tuschl, *Nature*, 431:343-9, 2004.
- 20 Miksicek y col., *Cell*, 46:203, 1986.
- Molkentin y col., *Cell* 93:215-228, 1998.
- Mordacq y Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau y col., *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Morkin, *Microsc. Res. Tech.*, 50:522-531, 2000.
- 25 Moss y col., *Biol. Chem.*, 271(49):31688-31694, 1996.
- Muesing y col., *Cell*, 48:691, 1987.

- Naya y col., *J Biol Chem*, 275(7):4545-4548, 2000.
- Ng y col., *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolas y Rubinstein, En: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt (Eds), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988.
- 5 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Ojamaa y col., *Endocrinology*, 141:2139-2144, 2000.
- Ondek y col., *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- Omitz y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987.
- 10 Palmiter y col., *Nature*, 300:611, 1982.
- Pantos y col., *Horm. Metab. Res.*, 38:308-313, 2006.
- Park y col., *Mol. Cell.*, 19:643-653, 2005.
- Paskind y col., *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Pasquinelli y Ruvkun, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18:495-513, 2002.
- 15 Pavri y col., *Mol. Cell.*, 18:83-96, 2005.
- Solicitud PCT WO 0071096
- Solicitud PCT WO 84/03564
- Solicitud PCT WO 98/33791
- Pech y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.
- 20 Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable y Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Physicians Desk Reference
- Picard y Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- 25 Pinkert y col., *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.

- Porton y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:1076, 1990.
- Potter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Queen y Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- 5 Racher y col., *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
- Ragot y col., *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Redondo y col., *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman y Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15.^a ed., páginas 1035-1038 y 1570-1580, Mack
 10 Publishing Company, Easton, Pa., 1980.
- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Resendez Jr. y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Rich y col., *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, En: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*,
 15 Rodriguez y col. (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Ripe y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe, y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling y col., *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- Rosen y col., *Cell*, 41:813, 1988.
- 20 Rosenfeld y col., *Science*, 252:431-434, 1991.
- Rosenfeld, y col., *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Roux y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sakai y col., *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a Ed., Cold Spring
 25 Harbor Laboratory Press, 2001.
- Satake y col., *J Virology*, 62:970, 1988.
- Schaffner y col., *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.

- Schuyler y Yarbrough, *Basic Res. Cardiol.*, 85:481-494, 1990.
- Searle y col., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sempere y col., *Genome Biol* 5:R13, 2004.
- Sharp y Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- 5 Shaul y Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Sherman y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shingara y col., *RNA* 11:1461-1470, 2005.
- Sleigh y Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Spalholz y col., *Cell*, 42:183, 1985.
- 10 Spandau y Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos y Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens y Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stratford-Perricaudet y Perricaudet, En: *Human Gene Transfer*, Eds, Cohen-Haguenauer y Boiron, John Libbey Eurotext, Francia, 51-61, 1991.
- 15 Stratford-Perricaudet y col., *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Stuart y col., *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan y Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Swartzendruber y Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takebe y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- 20 Tavernier y col., *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a.
- Taylor y Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor y col., *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Temin, En: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- 25 The Merck Index, undécima edición
- Thiesen y col., *J. Virology*, 62:614, 1988.

- Top y col., *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.
- Treisman, *Cell*, 46(4):567-174, 1986
- Tronche y col., *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Tronche y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9(11):4759-4766, 1989.
- 5 Trudel y Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987.
- Tsika y col., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283:C1761-C1775, 2002.
- Tur-Kaspa y col., *Mol. Cell. Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Tyndell y col., *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Vadaszova y col., *Physiol. Res.* 53(1):S57-61, 2004.
- 10 van Rooij y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(48):18255-18260, 2006.
- Vannice y Levinson, *J. Virology*, 62:1305, 1988.
- Varmus y col., *Cell*, 25:23-36, 1981.
- Vasseur y col., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- 15 Wang y Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Weber y col., *Cell*, 36:983, 1984.
- Wei y col., *J. Endocrinol. Invest.*, 28:8-11, 2005.
- Weinberger y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:988, 1984.
- Winoto y Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- 20 Wong y col., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu y Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Xu y col., *Curr. Biol.*, 13:790-795, 2003.
- 25 Yamauchi-Takahara y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(10):3504-3508, 1989.
- Yang y Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.

Yao y Eghbali, *Circ. Res.* 71:831-839, 1992.

Young y col., En: *Handbook of Applied Therapeutics*, 7.1-7.12 y 9.1-9.10, 1989.

Yutzey y col., *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.

Zelenin y col., *FEBS Lett.*, 287(1-2):118-120, 1991.

5 Zeng y col., *Cancer Res.*, 62(13):3630-3635, 2002.

Ziober y Kramer, *J. Bio. Chem.*, 271(37):22915-22, 1996

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de miR-208 para uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica, la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio, en que el inhibidor de miR-208 es un oligonucleótido no codificante con una
5 secuencia que es complementaria de una secuencia de miR-208.
2. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el inhibidor es un oligonucleótido monocatenario de poca longitud, manipulado químicamente y complementario de miR-208 que bloquea la función de miR-208.
3. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el
10 oligonucleótido no codificante tiene una secuencia complementaria de SEQ ID NO:5.
4. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el oligonucleótido no codificante contiene al menos un nucleótido modificado con 2'-O-metilo.
5. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el inhibidor se
15 administra a un sujeto que lo necesita por vía intravenosa, oral, transdérmica, por liberación mantenida, liberación controlada, liberación retardada, mediante supositorios, por vía subcutánea, intraperitoneal o sublingual o por inyección directa en el tejido cardíaco.
6. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que el inhibidor se
20 administra a un sujeto que lo necesita en combinación con un segundo tratamiento cardíaco.
7. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que dicho segundo
25 tratamiento se selecciona del grupo que consta de un betabloqueante, un inótrupo, un diurético, un inhibidor de ECA, un antagonista de A II, BNP, un bloqueante de Ca^{2+} , un antagonista de receptores de endotelina y un inhibidor de HDAC.
8. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en que la administración
30 del inhibidor mejora uno o más síntomas de la hipertrofia cardíaca patológica, la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio en un sujeto, en que dicha mejora de uno o más síntomas se selecciona del grupo que consta de un aumento de la capacidad de ejercicio, un aumento del volumen de eyección cardíaca, una disminución de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, una disminución de la presión de enclavamiento capilar pulmonar, un aumento del gasto cardíaco o del índice cardíaco, una reducción de las presiones de las arterias pulmonares, una disminución de las dimensiones sistólica y diastólica finales del ventrículo izquierdo, una disminución del

estrés de las paredes de los ventrículos izquierdo y derecho, una disminución de la tensión de la pared, un aumento de la calidad de vida y una disminución de la morbilidad o la mortalidad relacionadas con la enfermedad.

- 5 9. El uso de un inhibidor de miR-208 para la preparación de una composición farmacéutica para uso en un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la hipertrofia cardíaca patológica, la insuficiencia cardíaca o el infarto de miocardio, en que el inhibidor de miR-208 es un oligonucleótido no codificante con una secuencia que es complementaria de una secuencia de miR-208.

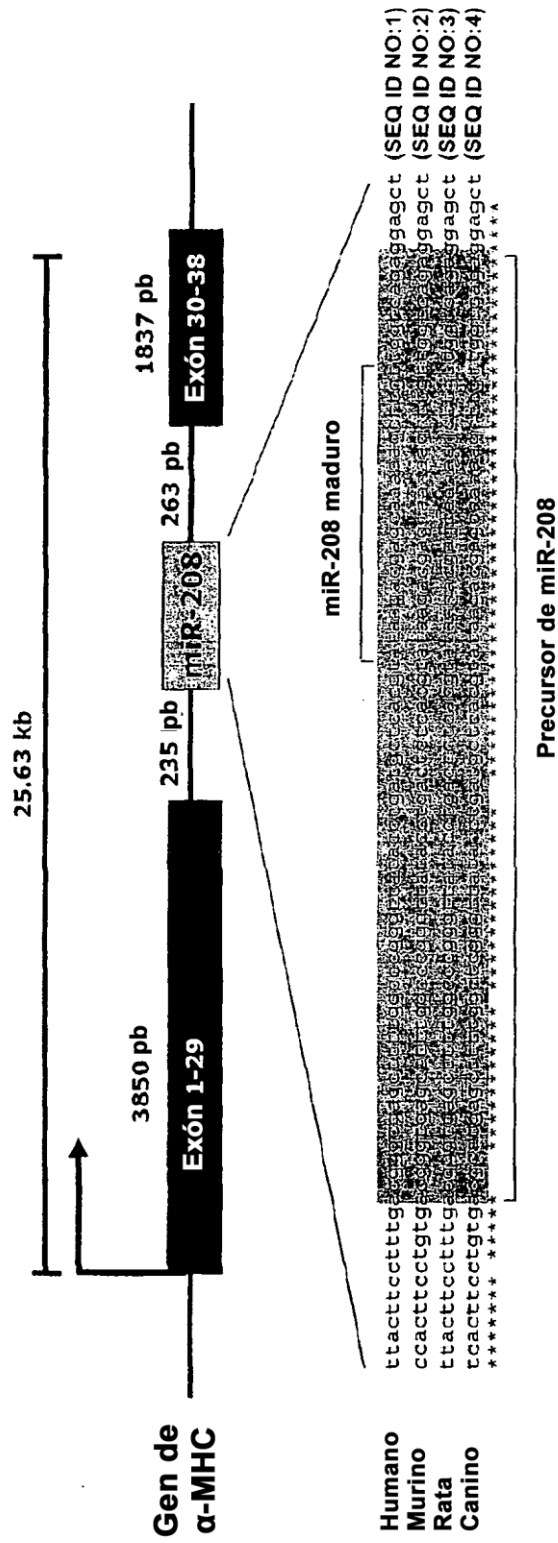


FIG. 1

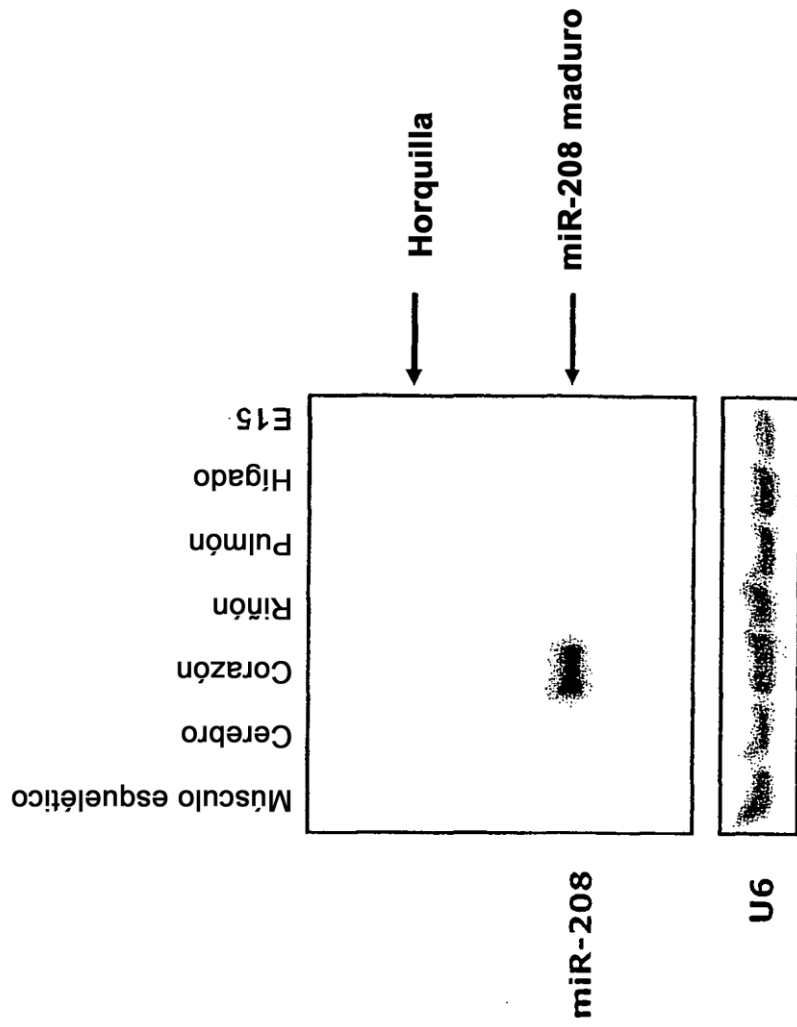


FIG. 2

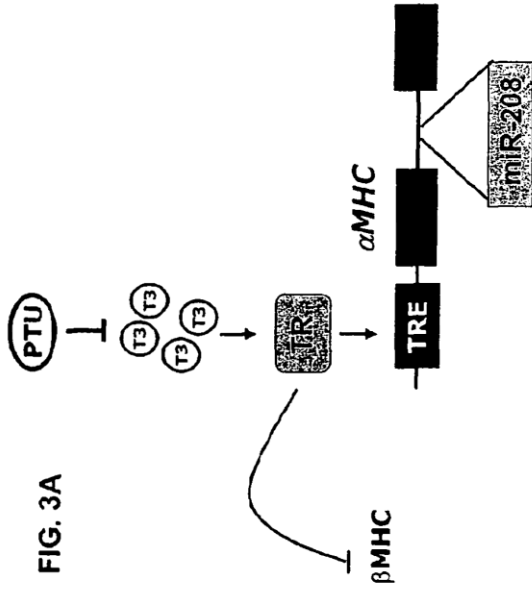


FIG. 3B

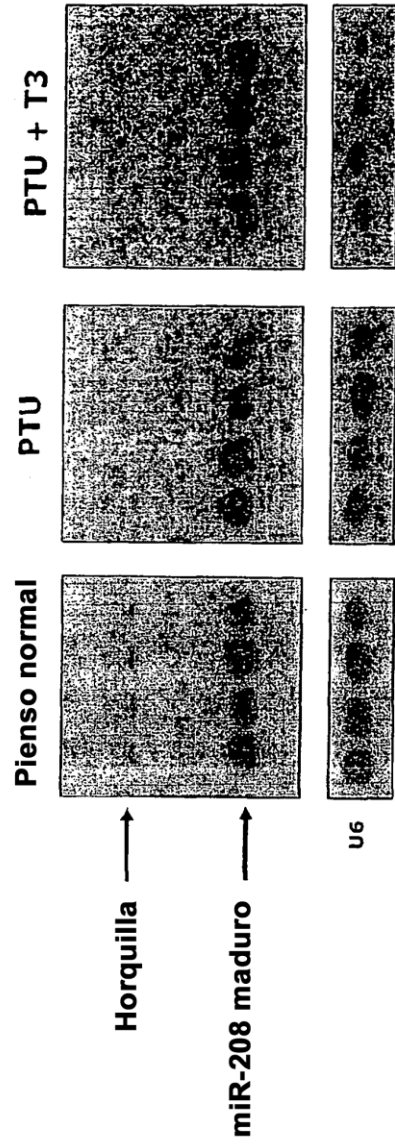
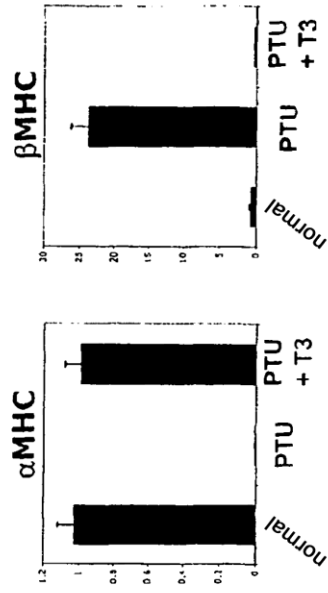


FIG. 4B

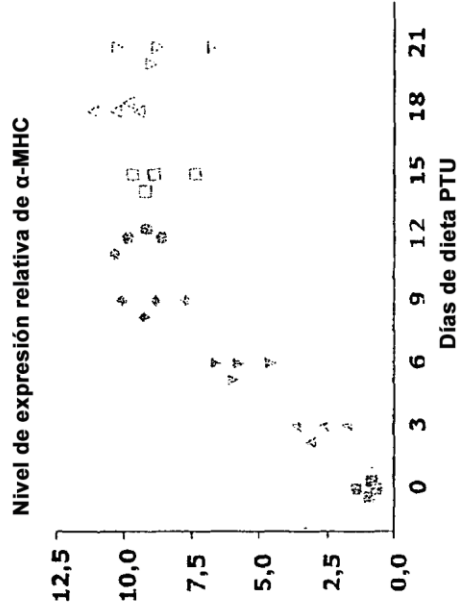


FIG. 4A

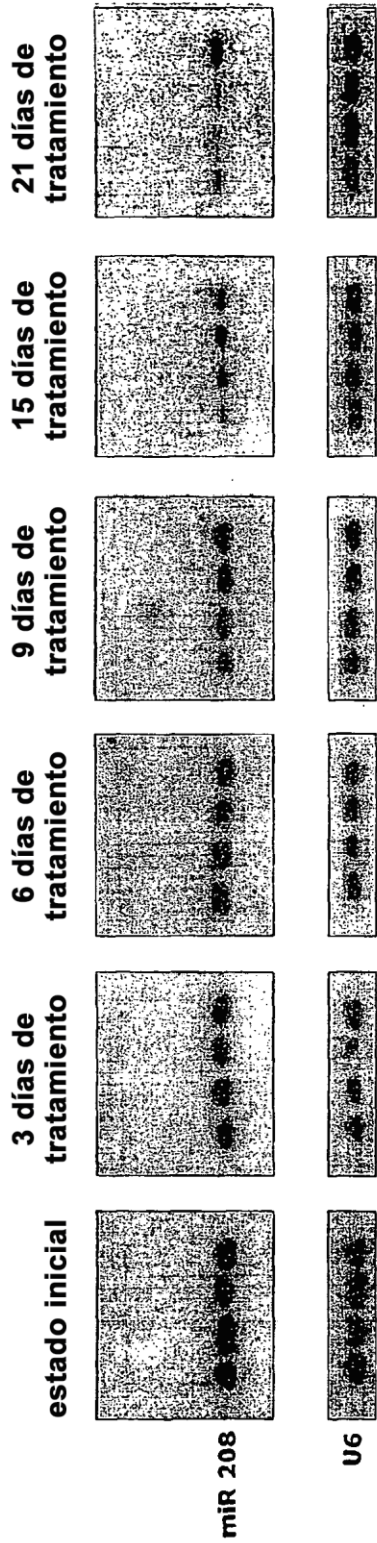
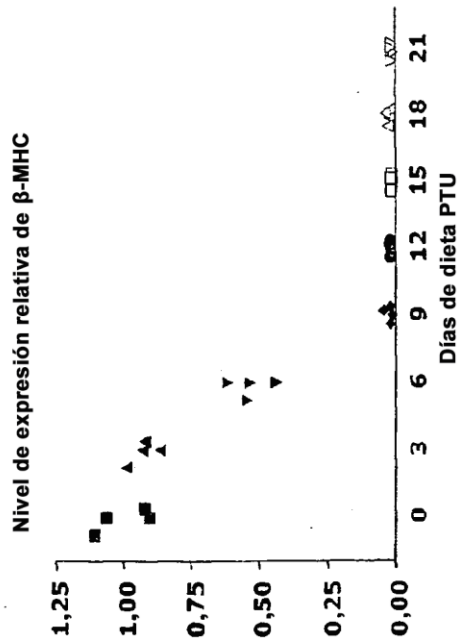
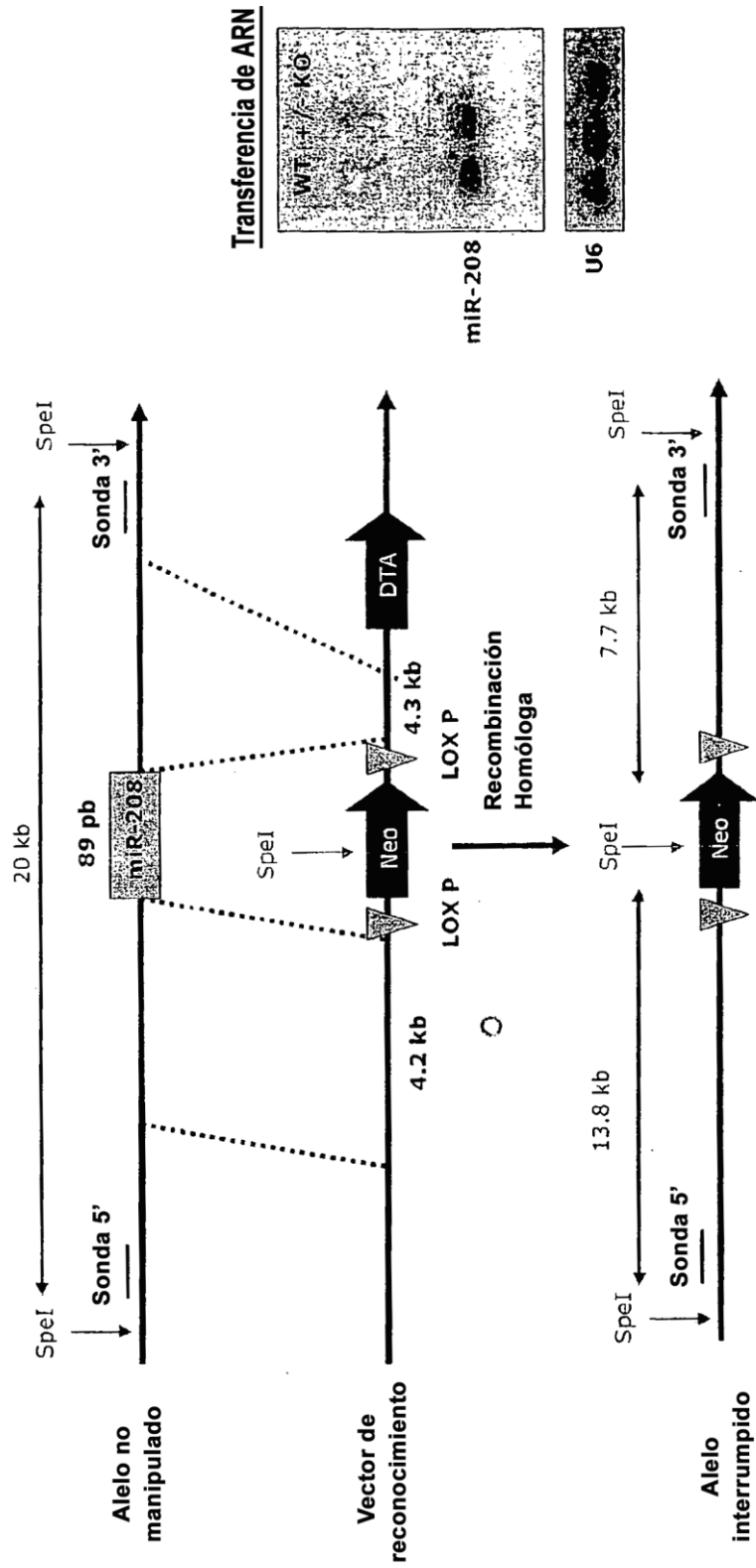


FIG. 4C

FIG. 5



RT-PCR para transcritos de α -MHC

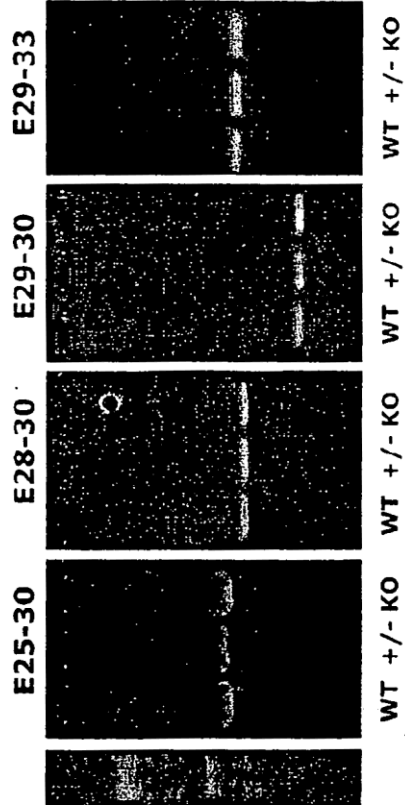


FIG. 6A

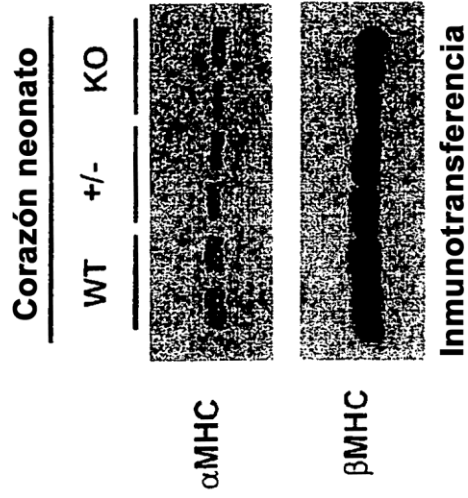


FIG. 6B

Análisis de micromatrices

Troponina cardíaca I, músculo esquelético rápido	73,5 veces
Troponina T3, músculo esquelético rápido	36,8 veces
MLC, músculo esquelético rápido	11,3 veces
α -actina del músculo esquelético	1,3 veces

FIG. 7

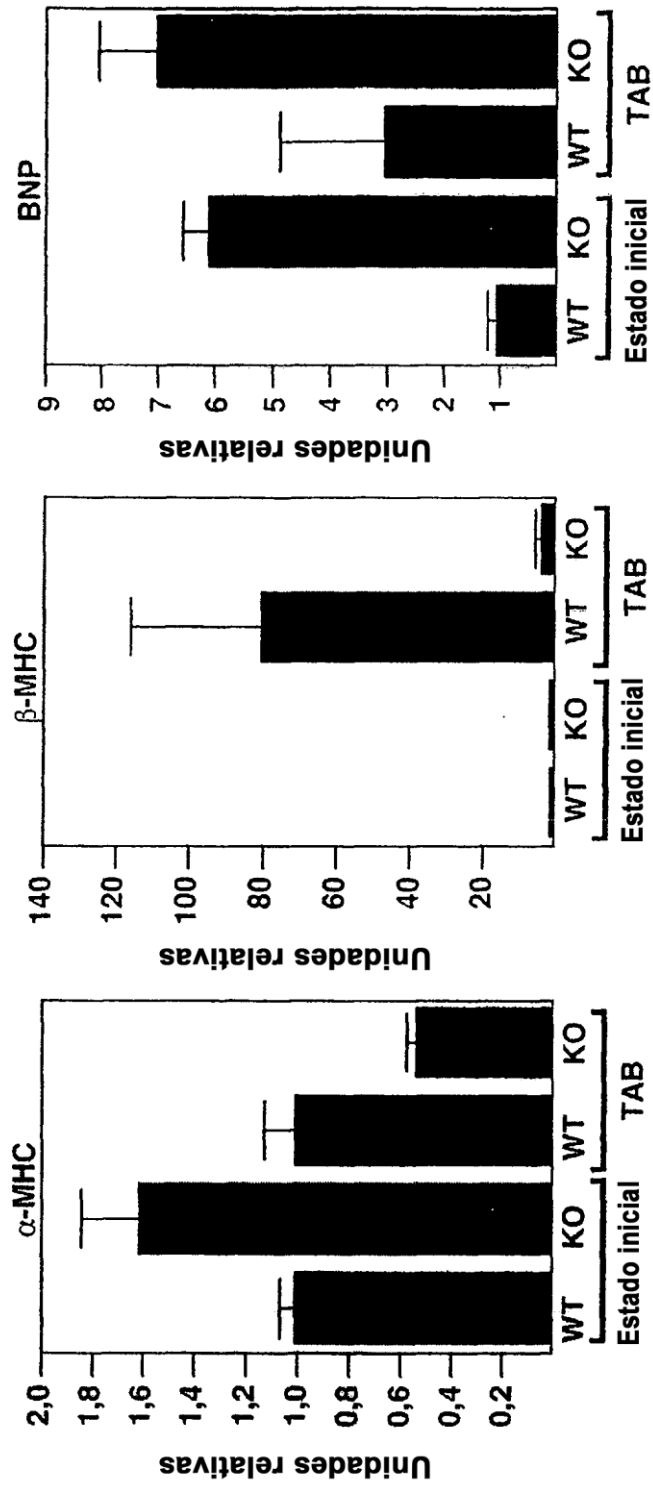


FIG. 8

FIG. 9

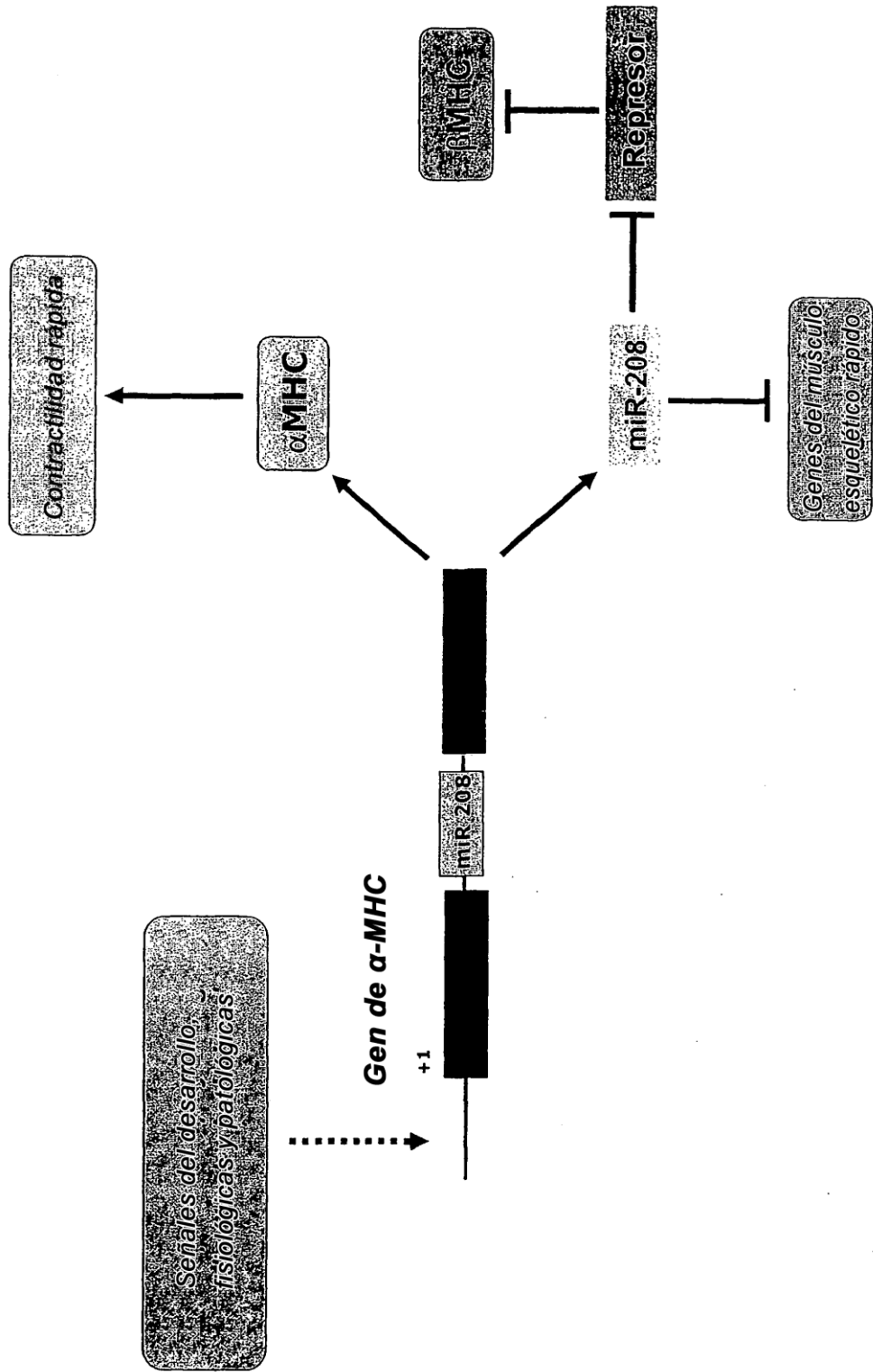
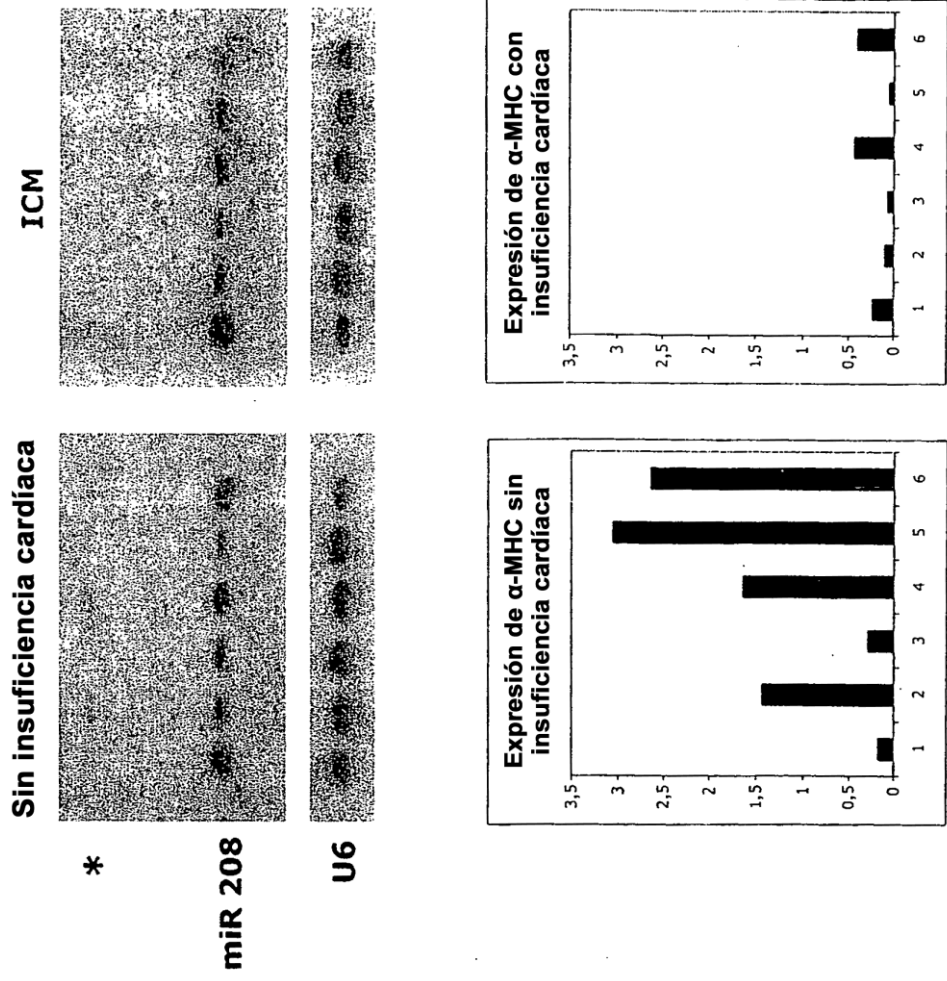


FIG. 10



Ensayo con 3'UTR de THRAP1 y luciferasa

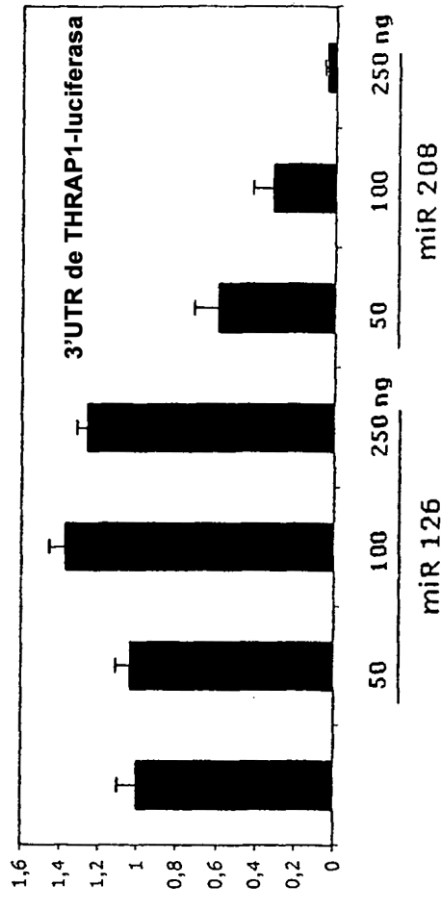


FIG. 12

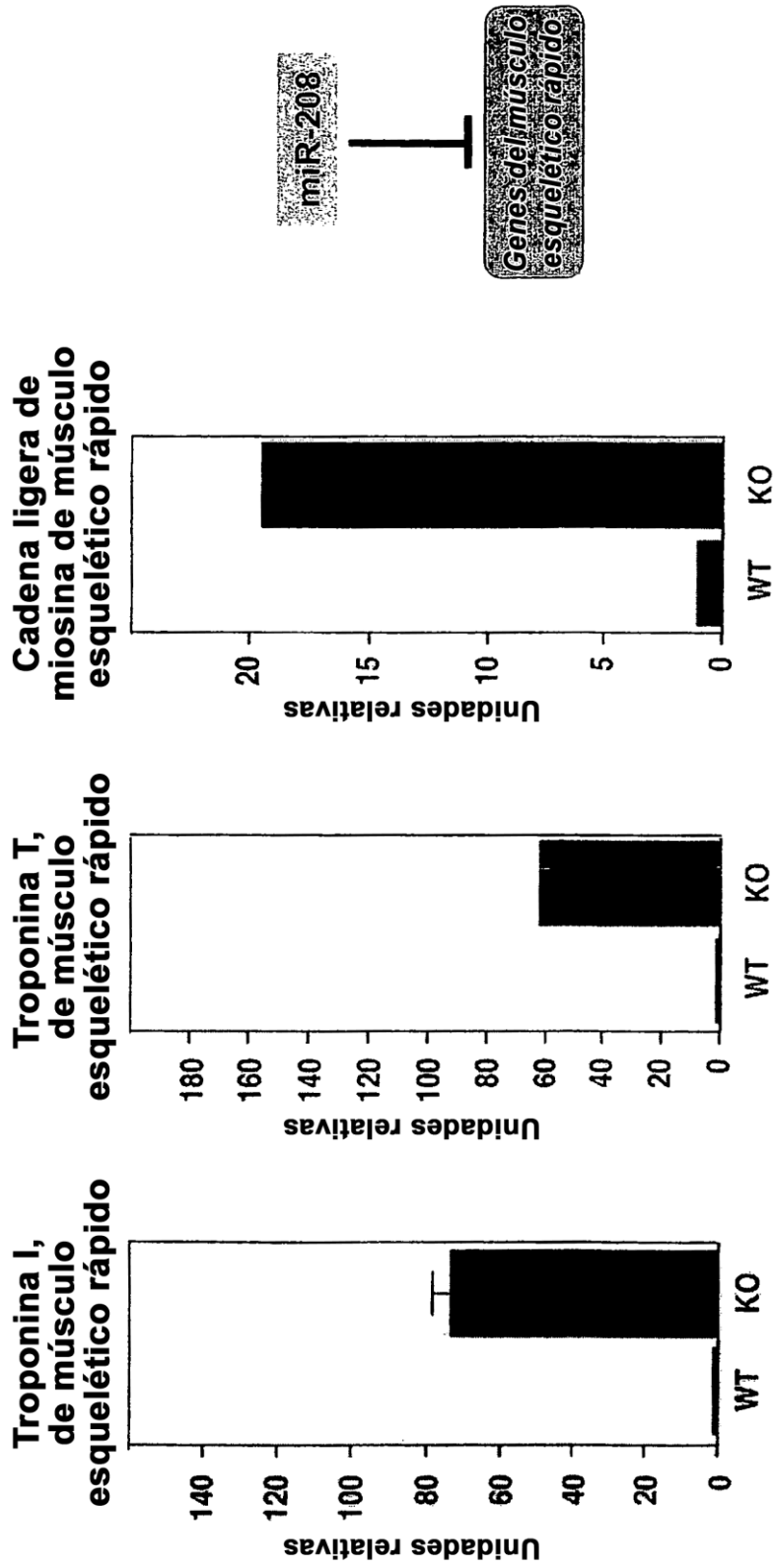


FIG. 13

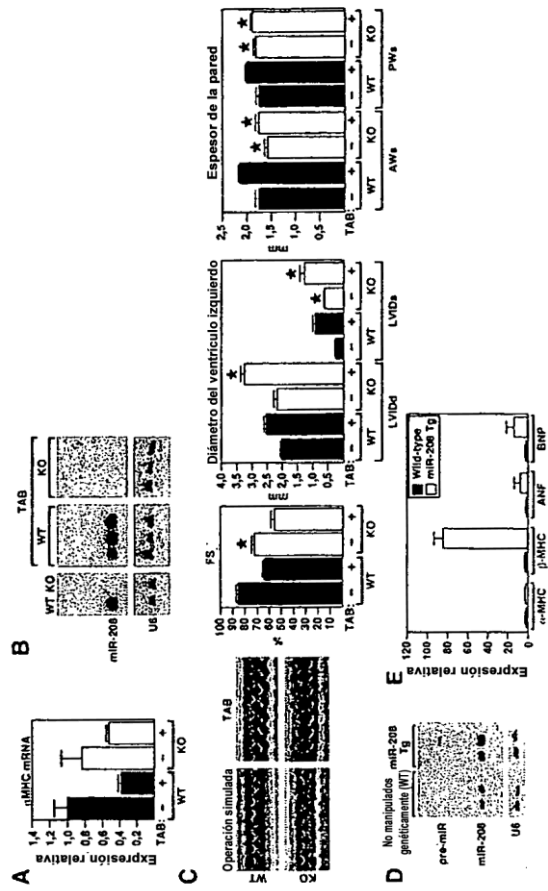


FIG. 14A-E

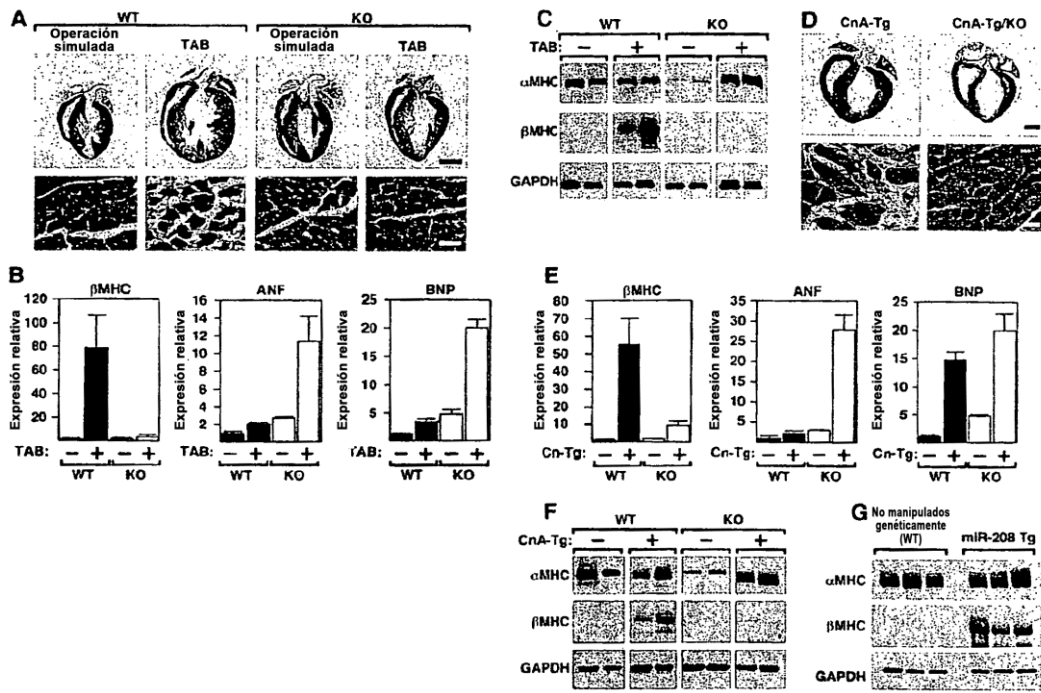


FIG. 15A-G

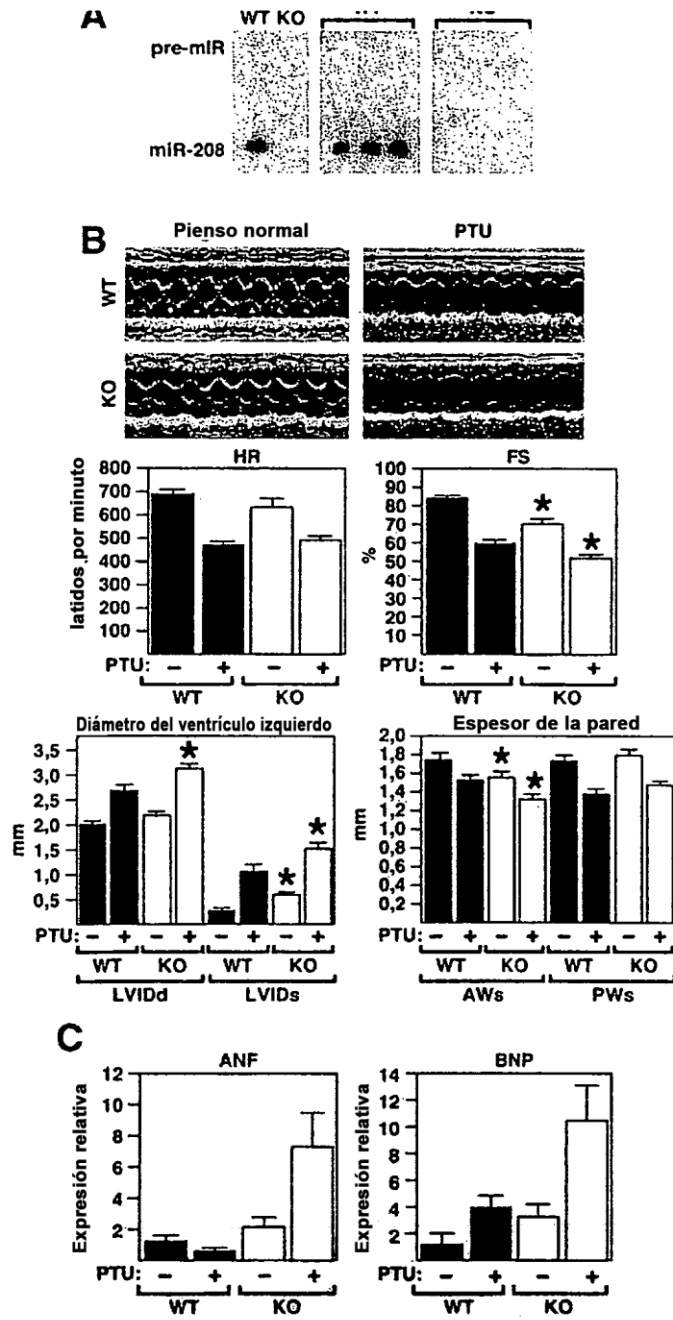


FIG. 16A-C

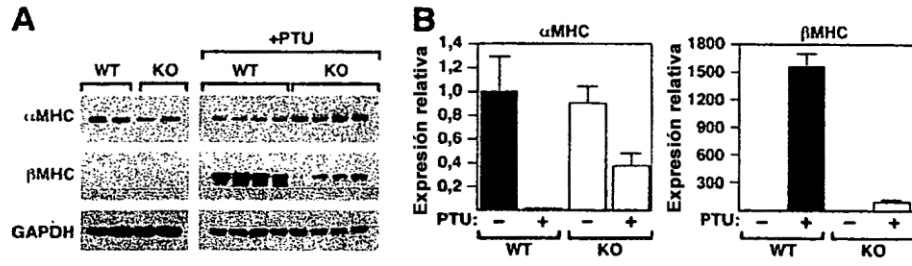


FIG. 17A-B

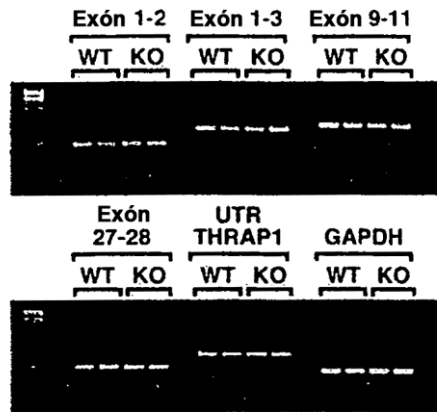


FIG. 19

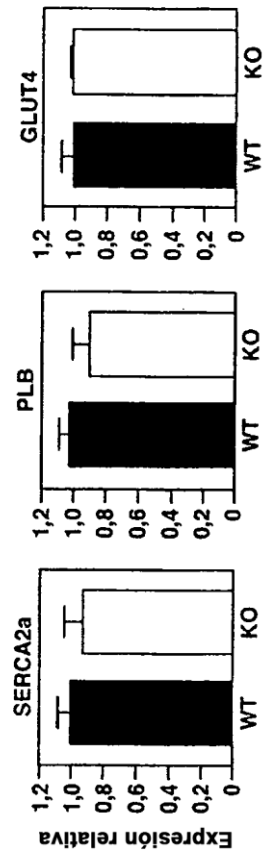


FIG. 20

La expresión de miR-499 está regulada por miR-208

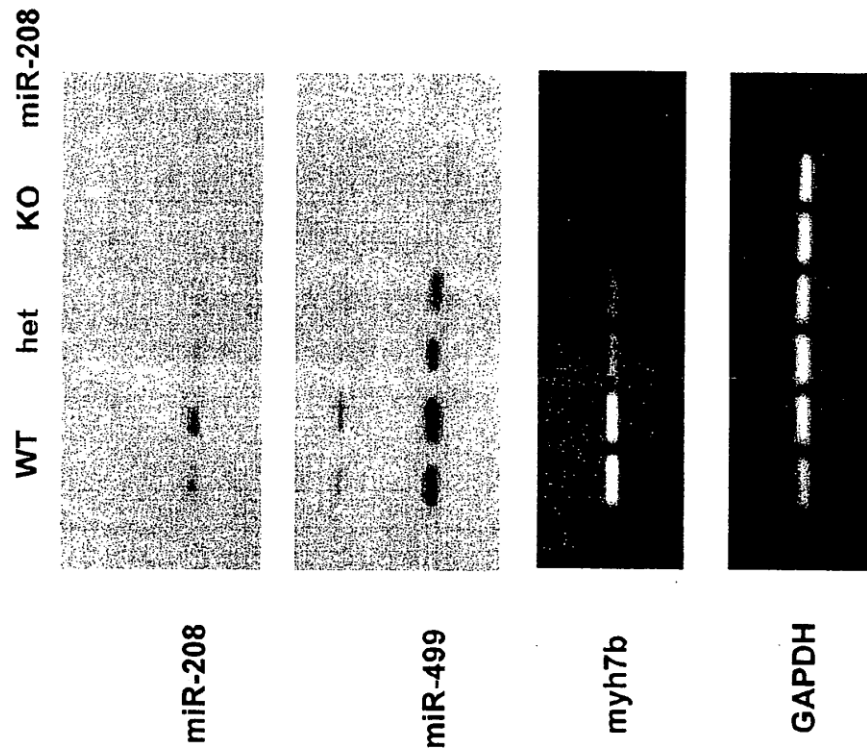


FIG. 21

miR-499 se expresa en tipos de músculos lentos

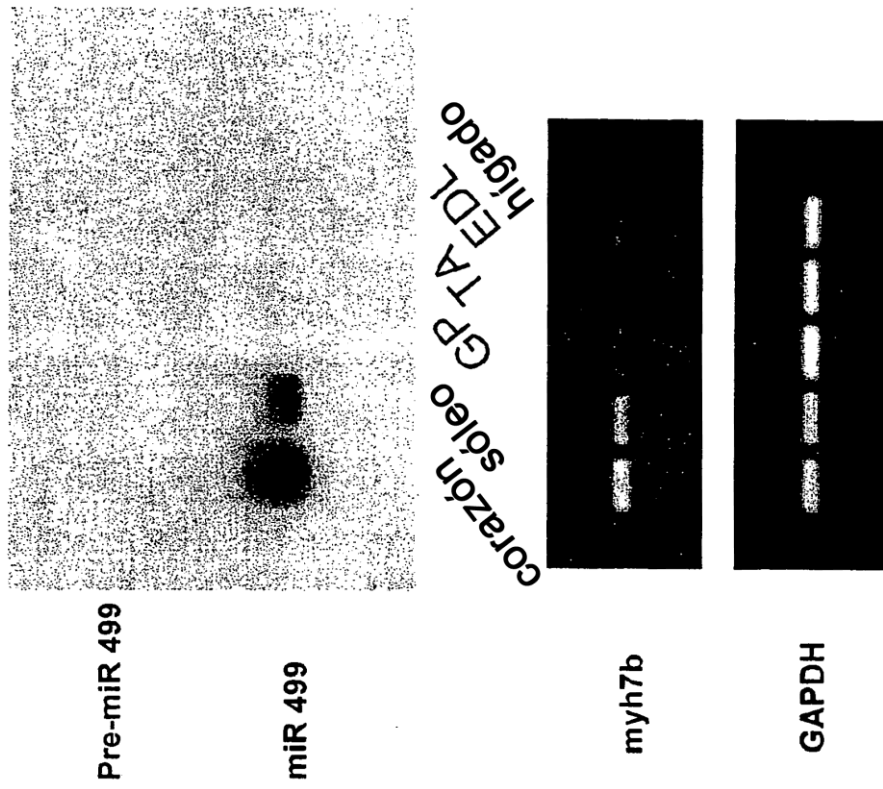


FIG. 23

miR-499 se regula por disminución durante la hipertrofia cardíaca

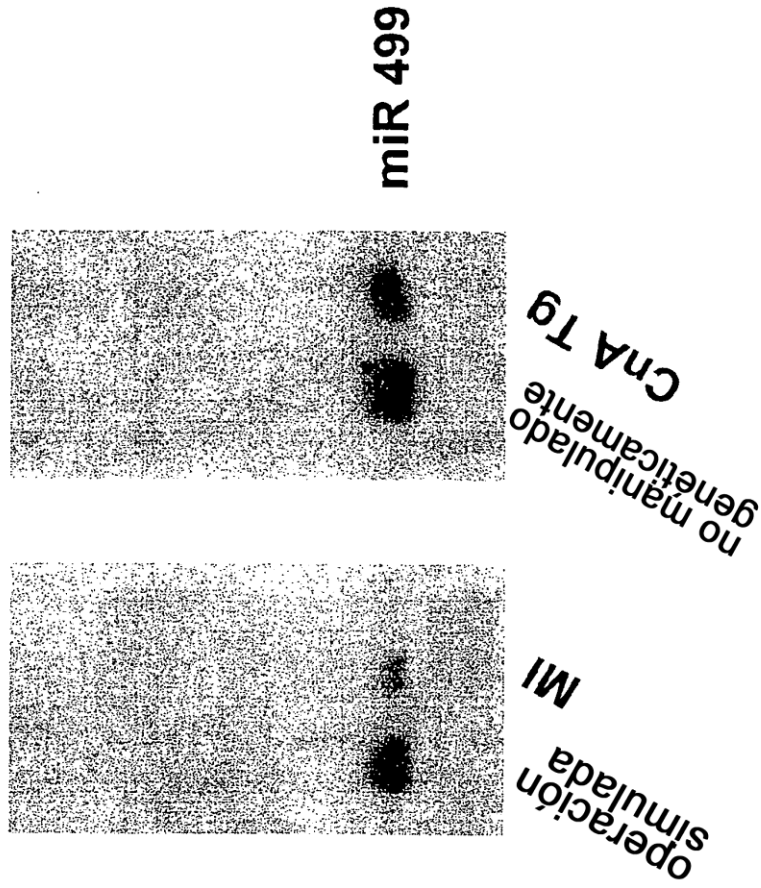


FIG. 24

Un patrón característico de microARN del corazón hipertrófico

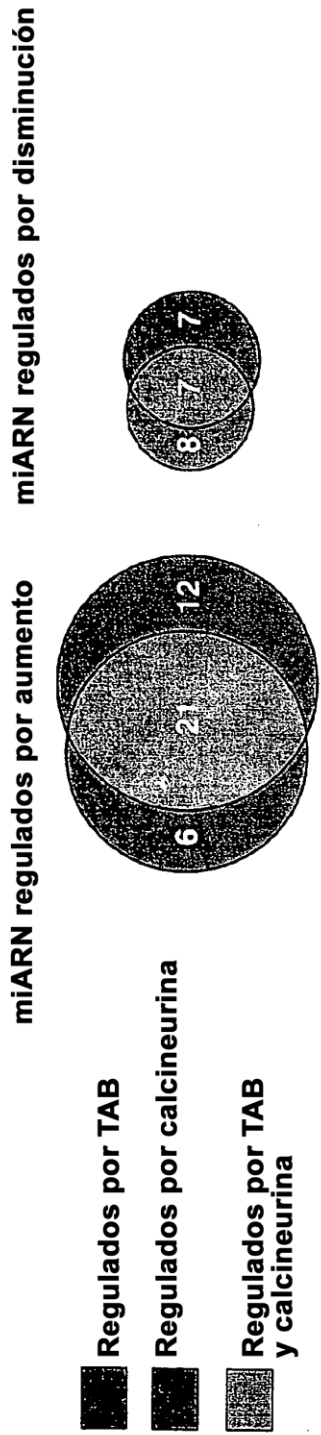
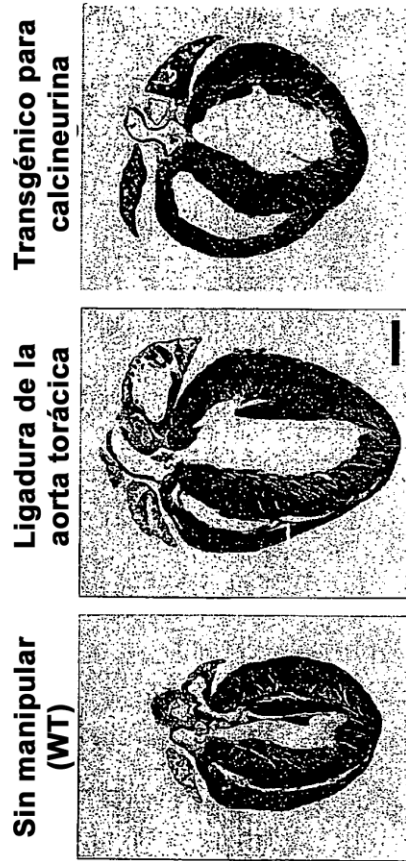


FIG. 26A-B

Un patrón característico de microARN del corazón hipertrófico

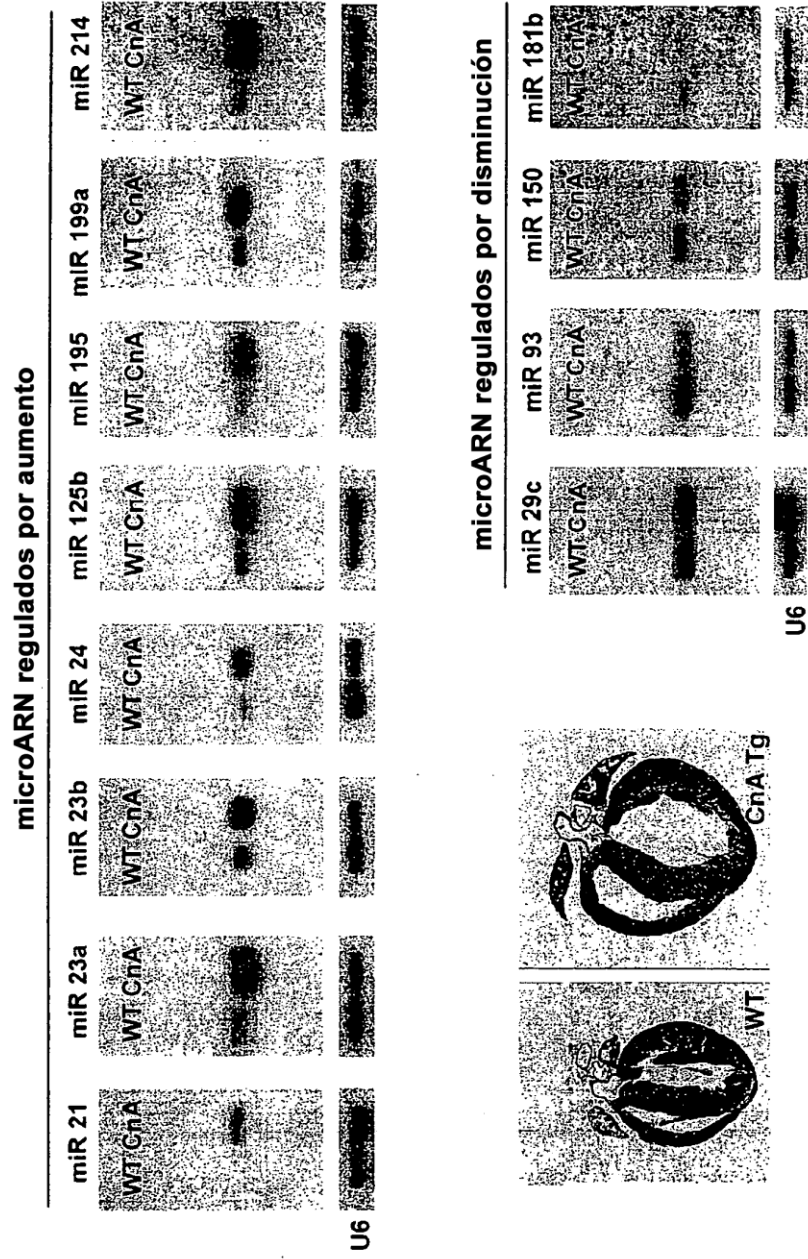
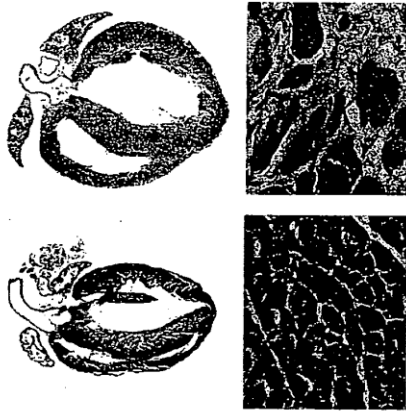


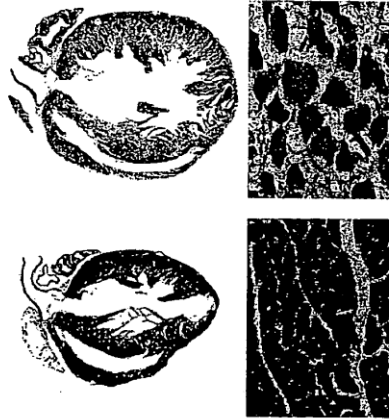
FIG. 26C

miR-29 se regula por disminución durante la hipertrofia cardíaca

No manipulado frente a CnA-Tg



Operación simulada frente a TAB



Expresión de miR-29

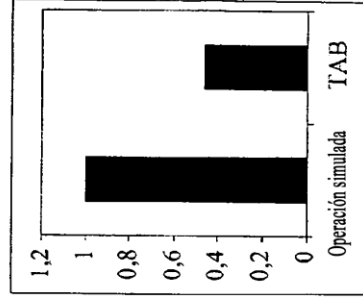
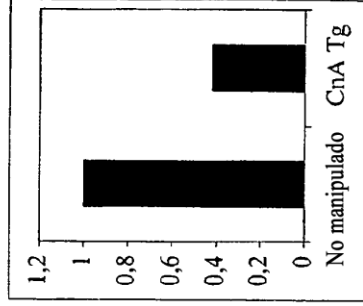


FIG. 27

miARN regulados por disminución en animales con miR-208 inactivado (KO) en comparación con animales no manipulados genéticamente (WT)

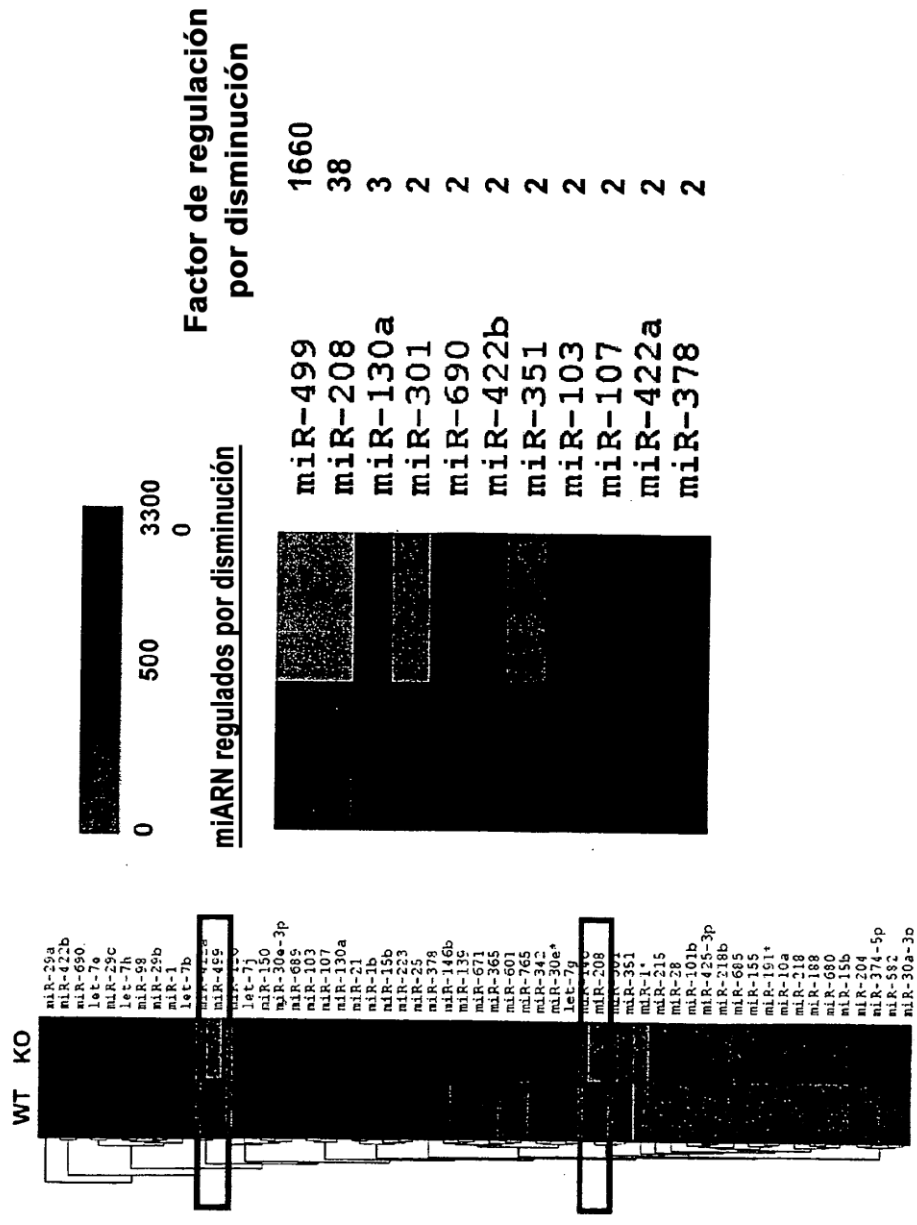


FIG. 28

miARN regulados por aumento en animales con miR-208 inactivado (KO) en comparación con animales no manipulados genéticamente (WT)

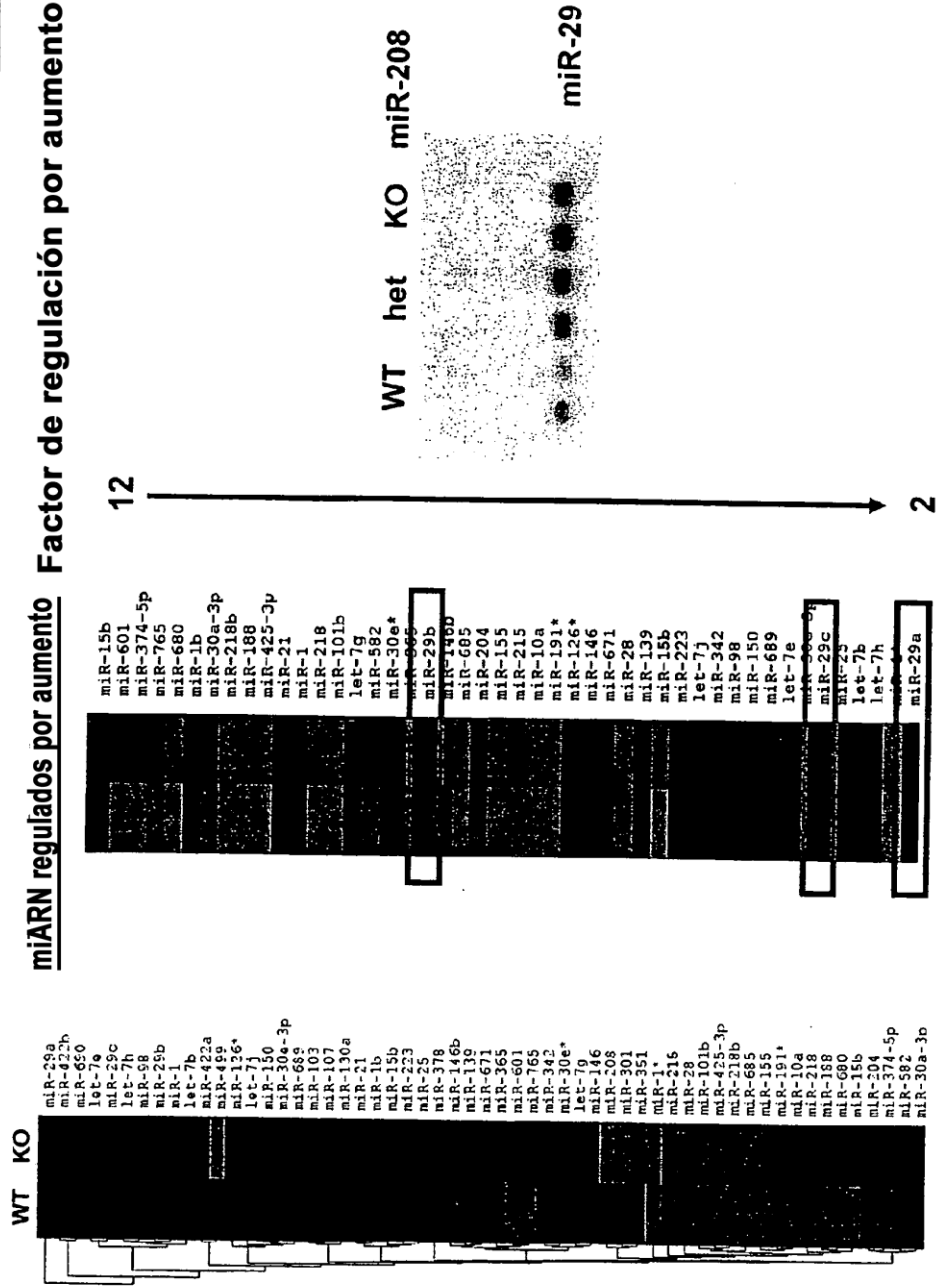
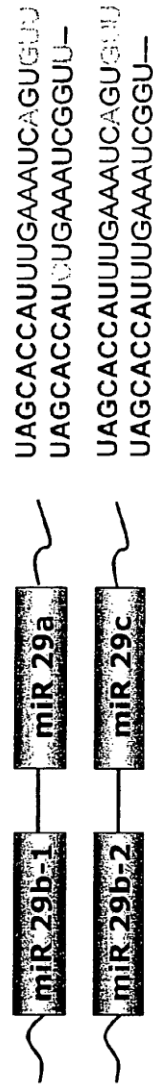


FIG. 29

La familia de miR-29 reconoce colágenos como diana



Genes diana de la familia de miR-29

- colágeno, tipo III, $\alpha 1$
- colágeno, tipo IV, $\alpha 4$
- fibrilina 1
- elastina
- colágeno, tipo V, $\alpha 3$
- colágeno, tipo XI, $\alpha 1$
- colágeno, tipo V, $\alpha 1$
- colágeno, tipo I, $\alpha 2$
- colágeno, tipo IV, $\alpha 5$

FIG. 30

miR-208 regula la fibrosis cardíaca a través de la familia de miR-29

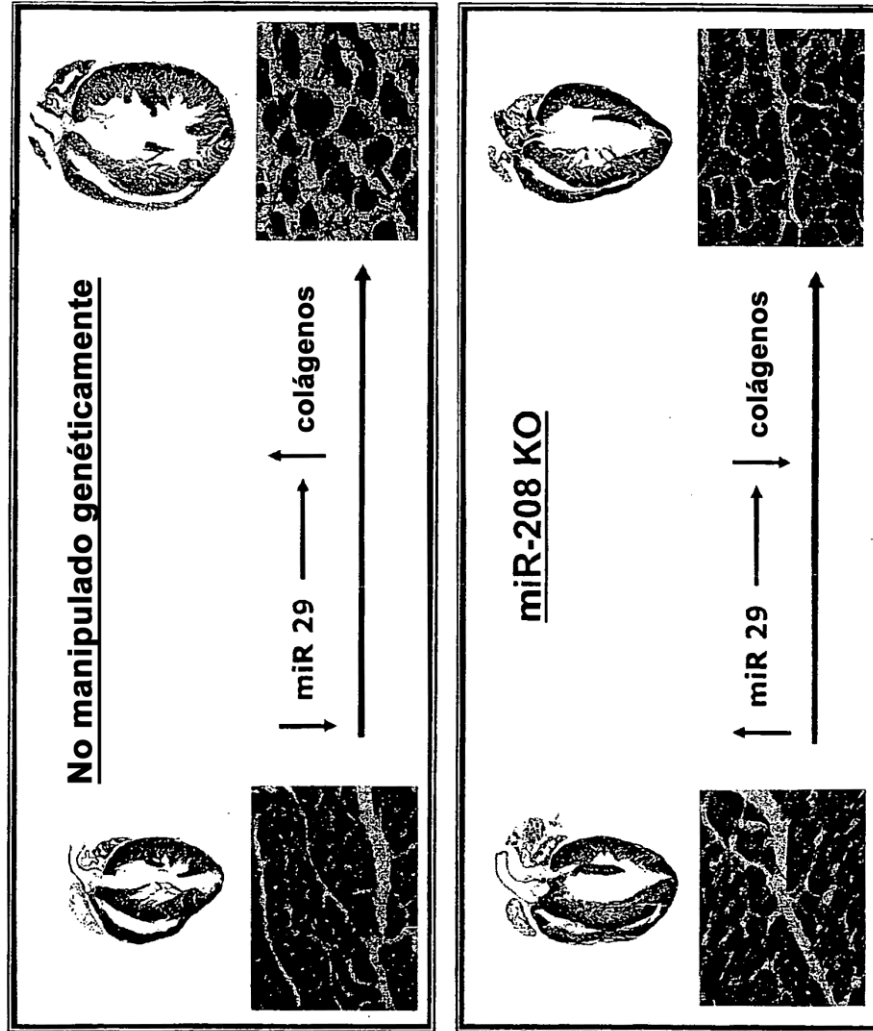


FIG. 31