

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 964**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2009 E 13158674 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2604691**

54 Título: **Medios y métodos para contrarrestar, demorar y/o prevenir cambios adversos del metabolismo energético en enfermedades del corazón**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)
Minderbroedersberg 4-6
6211 LK Maastricht, NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DE WINDT, LEON JOHANNES y
EL AZZOUZI, HAMID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 531 964 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios y métodos para contrarrestar, demorar y/o prevenir cambios adversos del metabolismo energético en enfermedades del corazón

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Quizás, la forma más común de enfermedad cardiovascular en el mundo occidental, que afecta aproximadamente a uno de cuatro americanos, es la hipertensión arterial (hipertensión) que significa que la sangre es bombeada con

una fuerza excesiva a través de los vasos sanguíneos. A pesar de que potencialmente constituye una amenaza para la vida, es uno de los tipos más prevenibles y tratables de enfermedades cardiovasculares. La hipertensión también provoca muchos otros tipos de enfermedades cardiovasculares tales como apoplejía e insuficiencia cardíaca.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 MicroARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN que codifican los genomas de plantas y animales. Estos ARNs ~ 21-meros, altamente conservados, regulan habitualmente la expresión de genes al unirse a las regiones 3'-no traducidas (3'-UTRs) de ARNs específicos. Se piensa que cada uno de los miARN regula múltiples genes y, dado que se presume que cientos de genes de miARN están presentes en eucariotas superiores, la potencial

5 circuitería reguladora proporcionada por miARN es enorme. Varios grupos de investigación han proporcionado evidencia de que los miARNs pueden actuar como reguladores clave de procesos tan diversos como un desarrollo temprano, proliferación celular y muerte de la célula, apoptosis y metabolismo de las grasas, y diferenciación celular. Estudios recientes de la expresión de miARN implican miARNs en el desarrollo del cerebro, leucemia

10 La expresión aberrante de miARN, ya sea por una sub- o supra-expresión, puede resultar en muchos tipos de trastornos. Recientemente, se identificaron muchos miARNs diferentes que se refieren a enfermedades específicas. Sin embargo, dado que muchos miARNs regulan varios cientos de genes, para la mayoría de las enfermedades relacionadas con el miARN se desconoce hasta la fecha qué gen es regulado por el miARN identificado y, en última instancia, es el responsable de la enfermedad. Por ejemplo, Sayed et al. (Circ Res 2007; 100: 416-424) han

15 identificado, entre otros, que varios miARNs muestran una expresión incrementada o disminuida durante la hipertrofia cardíaca. Los miARNs supra-regulados más destacados son miR-199a, miR-199a*, miR-21 y miR-214. Hasta la presente invención, sin embargo, no se sabía qué genes pueden ser desregulados por parte de la expresión aberrante de estos miARNs y si la supra-regulación o sub-regulación de cualquiera de estos miARNs provoca una enfermedad del corazón o, por ejemplo, son sólo el resultado de una enfermedad del corazón.

20 En van Rooij et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:18255-18260 se describen una serie de miARNs que fueron supra-regulados en tejido cardíaco de ratón como respuesta a una constricción aórtica transversa. Se sugiere que la desregulación de la expresión de miARN puede contribuir a una enfermedad cardíaca.

25 Cheng et al., Am. J. Pathol., (2007) 170: 1831-1840 describen que se supra-regularon 7 microARNs y se sub-regularon 12 microARNs tras un bandedo aórtico. Se sugiere que los microARNs pueden ser una nueva diana terapéutica para enfermedades cardiovasculares con hipertrofia cardíaca.

30 La presente descripción proporciona por primera vez el conocimiento de que la expresión incrementada de miR-214 provoca enfermedades del corazón y que la inhibición de dicho(s) microARN(s) inhibe la hipertrofia cardíaca. La presente descripción proporciona, además, el conocimiento de que la isoforma δ del receptor activador del proliferador del peroxisoma delta (PPAR δ) es una diana directa de miR-214. Por ejemplo, se demuestra que un aumento en la expresión de miR-214 provoca una sub-regulación de PPAR δ y que esta sub-regulación de PPAR δ provoca, entre otras cosas, un cambio en el metabolismo energético de las células del miocardio, lo cual es una

35 característica distintiva de la insuficiencia cardíaca.

Trabajos previos han demostrado que PPAR δ participa en el metabolismo de lípidos, en el implante del embrión y en la regulación de la proliferación celular. También se ha descrito que la actividad del receptor de prostaciclina PPAR δ participa en la adhesión célula-sustrato, la migración de queratinocitos y la curación de heridas. PPAR δ presenta actividad de heterodimerización de proteínas y actividad de unión al receptor retinoide X. La traducción automatizada en términos GO de las palabras clave de SwissProt que describen PPAR δ indica que normalmente está situado en el núcleo, presenta actividad de receptor y actividad de unión al ión zinc, y que posiblemente participa en la regulación de la transcripción, de un modo dependiente del ADN. Trabajos previos también indican que la insuficiencia cardíaca está asociada con un desplazamiento del metabolismo de ácidos grasos hacia una

40 oxidación de la glucosa más prominente para generar ATP. Dada la implicación de la familia de receptores de esteroides PPAR en la activación de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, se ha postulado que la actividad de PPAR se ve reducida en la insuficiencia cardíaca, pero los mecanismos exactos responsables de la sub-regulación de la expresión y/o actividad de PPAR y la sub-regulación de la oxidación de ácidos grasos en la insuficiencia cardíaca todavía no se han esclarecido hasta la presente descripción. Tampoco se conocía hasta la

45 presente descripción si la sub-regulación de PPAR δ es una causa o un resultado de la insuficiencia cardíaca. La presente descripción proporciona ahora el conocimiento de que un incremento de PPAR δ es capaz de incrementar o restablecer la oxidación de ácidos grasos, mejorar el metabolismo energético y prevenir, disminuir o demorar la insuficiencia cardíaca. El incremento de la expresión de PPAR δ se puede conseguir tanto directa como indirectamente. De acuerdo con la presente invención, PPAR δ se incrementa preferentemente mediante la

50 inhibición de miR-214.

Ahora que la descripción ha proporcionado el conocimiento de que la inhibición de PPAR δ conduce a un cambio adverso del metabolismo energético en las células del músculo cardíaco y que el incremento de la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ y/o la inhibición de un microARN capaz de inhibir PPAR δ es capaz de mejorar el

60 metabolismo energético de las células del músculo cardíaco, en la presente se describe un método para tratar,

disminuir, contrarrestar, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de un microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . Por lo tanto, un inhibidor de un microARN, siendo capaz dicho microARN de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ , es particularmente adecuado para uso como un medicamento. Por lo tanto, se proporciona además un inhibidor de un microARN para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de enfermedades del corazón, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . También se describe el uso de un inhibidor de este tipo para la preparación de un medicamento. Así, la descripción proporciona un uso de un inhibidor de un microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ , para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

Tal como se utiliza en esta memoria, un microARN capaz de inhibir o reducir la expresión de PPAR δ también se denomina "microARN anti-PPAR δ ".

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

La inhibición de un microARN se consigue a través de varios métodos. Por ejemplo, se utiliza una molécula de ácido nucleico que es complementaria a al menos una parte funcional de dicho microARN. Dicha parte funcional comprende al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos. Después de la administración a una célula, dicha molécula de ácido nucleico se une entonces a dicho microARN, contrarrestando, retardando y/o al menos inhibiendo en parte con ello la unión de dicho microARN al gen diana y, con ello, contrarrestando la función de dicho microARN, es decir, la regulación del gen. Una persona experta en la técnica es conocedora de diversos métodos de inhibir o inhibir parcialmente un microARN. Ejemplos no limitantes son, por ejemplo, el uso de un oligo ácido nucleico bloqueado (LNA – siglas en inglés) en el que está presente un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4', en que el puente "bloquea" la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Además, ejemplos no limitantes, comprenden un oligo morfolino, una molécula antisentido modificada que no degrada su molécula de ARN diana, y un oligo ARN 2'-O-metilo.

Además, en esta memoria se describen un inhibidor, un uso y/o un método, en donde dicho inhibidor comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos, que es complementaria a dicho microARN.

Tal como se utiliza en esta memoria, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico comprende preferiblemente una cadena de nucleótidos, más preferiblemente ADN y/o ARN. Más preferiblemente, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico comprende ARN bicatenario con el fin de utilizar interferencia por ARN para degradar ARN diana. En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico comprende otros tipos de estructuras de ácido nucleico tales como, por ejemplo, una hélice de ADN/ARN, un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un oligo ARN 2'-O-metilo, morfolino y/o una ribozima. Por lo tanto, la expresión "secuencia de ácido nucleico" también engloba una cadena que comprende nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques estructurales no nucleotídicos que exhiben la misma función que los nucleótidos naturales.

Otro método para inhibir microARN comprende, por ejemplo, una interferencia con la expresión de microARN. El locus del ADN que especifica un microARN es más largo que el microARN y esta región del ADN incluye la secuencia de microARN más una secuencia del complemento inverso aproximada. (Un complemento inverso es una región con bases complementarias en el orden inverso, que van desde 5' hacia 3' en la misma hebra de ADN). Cuando este locus de ADN se transcribe en una molécula de ARN monocatenario (ARNbc), la secuencia de microARN y su complemento inverso aparean sus bases para formar un bucle de horquilla de ARN bicatenario. Esto forma una estructura de microARN primario (pri-microARN), que representa el primer estadio de una serie de eventos que tienen lugar en las células mediante los cuales los microARNs afectan a las funciones celulares. En animales, la enzima nuclear Drosha escinde la base de la horquilla en el pri-microARN para formar pre-microARN. A continuación, la molécula de pre-microARN es transportada activamente hacia fuera del núcleo en el citoplasma por la Exportina 5, una proteína portadora. Posteriormente, la enzima Dicer corta 20-25 nucleótidos de la base de la horquilla para liberar el microARN maduro. Un ejemplo de un inhibidor que interfiere con la expresión de

microARN es la proteína Lin28, la cual inhibe la maduración del pre-microARN para obtener microARN maduro.

En esta memoria también se proporcionan un inhibidor, un uso y/o un método, donde dicho inhibidor comprende un compuesto, preferiblemente una proteína o una molécula de ácido nucleico, donde dicho compuesto inhibe la maduración de pre-microARN para obtener microARN. En una realización más preferida, dicho compuesto inhibe dicha maduración mediante la unión a dicho pre-microARN.

Los genes que codifican miARNs son mucho más largos que la molécula de miARN maduro procesado; en primer lugar, los miARNs se transcriben como transcritos primarios o pri-miARN con un casquete y una cola de poli-A y se procesan para obtener estructuras de tallo-bucle cortas de 70 nucleótidos, conocidas como pre-miARN, en el núcleo de la célula. A continuación, estos pre-miARNs se procesan para obtener miARNs maduros en el citoplasma mediante la interacción con la endonucleasa Dicer, la cual también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC)⁷. Este complejo es el responsable del silenciamiento génico observado debido a la expresión de miARN y la interferencia por ARN. Un inhibidor de microARN también engloba un inhibidor de pri-miARN, pre-miARN o RISC. De este modo, otro ejemplo de interferencia con expresión de microARN es, por ejemplo, la interferencia con traducción de pri-microARN, por ejemplo, la interferencia con la traducción de pri-microARN a partir de ADN. Esto se consigue, por ejemplo, proporcionando un compuesto, preferiblemente una proteína o un ácido nucleico, que se une a un promotor asociado funcionalmente con dicho pri-microARN, con lo cual se inhibe la expresión de dicho pri-microARN. En esta memoria también se proporcionan un inhibidor, un uso y/o un método, donde dicho inhibidor comprende un compuesto, preferiblemente una proteína o una molécula de ácido nucleico, donde dicho compuesto se une a un promotor asociado funcionalmente con un pri-microARN, con lo cual se inhibe la expresión de dicho pri-microARN.

Existen varios cientos de distintas moléculas de microARN y sus precursores están formando racimos juntos en base a su distancia relativa en el genoma: en general, los precursores se colocan en el mismo racimo si están separados uno de otro 50 kb o menos. Dado que la descripción proporciona el conocimiento de que PPAR δ es una diana directa de miR-214, la descripción se refiere de este modo a un inhibidor de un microARN 214 para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de enfermedades del corazón, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-214. Por lo tanto, también se proporciona un inhibidor, uso y/o método de acuerdo con la presente descripción, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-214.

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

Así, se proporciona un inhibidor, un uso y/o un método, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar, inhibir y/o disminuir la expresión, cantidad y/o actividad del microARN mir-214 en una célula, más preferiblemente en una célula del miocardio. Una célula del miocardio, también denominada una célula del músculo cardíaco o un cardiomiocito, es una célula similar a, que procede de o que se deriva de una célula muscular que en una situación natural está presente en el corazón de un organismo vertebrado. Dicha célula no necesita ser directamente obtenida del tejido del corazón, ya que también es posible cultivar y/o almacenar este tipo de células *in vitro*.

Métodos para introducir un inhibidor de un microARN en una célula son conocidos en la técnica. Métodos para introducir inhibidores, preferiblemente ácido nucleico antisentido, comprenden, por ejemplo, la transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación o transfección mediada por liposomas. Alternativamente, se emplea la inyección directa del inhibidor. Sin embargo, preferiblemente, un ácido nucleico que es un inhibidor y/o que codifica un inhibidor, se introduce en una célula mediante un vector, preferiblemente un vector viral. En la técnica se conocen diversos términos que se refieren a la introducción de ácido nucleico en una célula por parte de un vector. Ejemplos de términos de este tipo son "transducción", "transfección" y "transformación". Técnicas para generar un vector con una secuencia de ácidos nucleicos y para introducir dicho vector en una célula se conocen en la técnica. Genes marcadores tales como, por ejemplo, genes de resistencia o sensibilidad a antibióticos y/o

genes que codifican marcadores tales como antígenos de la superficie celular o proteínas fluorescentes tales como la proteína de fluorescencia verde se utilizan preferiblemente para identificar células que contengan el ácido nucleico introducido, tal como se conoce bien en la técnica.

5 Preferiblemente, se proporciona un inhibidor que es capaz de ser introducido en una célula de mamífero *in vivo*. Ejemplos no limitantes de métodos son el acoplamiento de dicho inhibidor a péptidos que penetran en las células, o el uso de liposomas que contienen dicho inhibidor. Preferiblemente, dicho inhibidor fija como objetivo células del

10 La inhibición de un microARN en una célula, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ , conduce a un aumento o restablecimiento de la expresión de PPAR δ en dicha célula. Según se describe en esta memoria, se proporciona un inhibidor, uso y/o método, en donde dicho inhibidor de microARN es capaz de aumentar y/o restablecer la expresión de PPAR δ en una célula. Con el fin de ser capaz de contrarrestar la

15 función de un microARN en una célula, dicho inhibidor es preferiblemente capaz de penetrar en el núcleo. Generalmente, se acepta que pequeñas moléculas de ácido nucleico, preferiblemente moléculas antisentido tales como los oligos LNA, morfolino o ARN 2'-O-metilo antes mencionados pueden moverse libremente entre el citosol y el núcleo. Sin embargo, en una realización, se modifica un inhibidor que no es capaz de moverse libremente entre el citosol y el núcleo, de modo que fije como objetivo y penetre en la membrana nuclear. Métodos para fijar

20 como objetivo el núcleo son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de un vector de fijación como objetivo nuclear tal como un vector de adenovirus.

En esta memoria también se proporciona un inhibidor de un microARN, un uso y/o un método, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido. Preferiblemente, se utiliza una molécula de ácido

25 nucleico antisentido contra un microARN capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . Dicha molécula antisentido comprende preferiblemente al menos 15 nucleótidos. Incluso más preferiblemente, dicha molécula antisentido comprende al menos 18 nucleótidos. Lo más preferiblemente, dicha molécula antisentido comprende al menos 20 nucleótidos.

30 Tal como se ha dicho antes, la presente descripción proporciona el conocimiento de que miR-214 disminuye la expresión de PPAR δ que está implicado en y/o potencia enfermedades del corazón. Por lo tanto, un inhibidor inhibe preferiblemente miR-214. Por lo tanto, también se proporcionan un inhibidor, uso y/o método, en donde dicho microARN es miR-214. Preferiblemente, dicho inhibidor de miR-214 comprende una secuencia de ácidos nucleicos capaz de unirse a miR-214 bajo condiciones fisiológicas. La Figura 5b comprende un ejemplo de una

35 secuencia que es capaz de unirse a miR-214. Habitualmente se piensa que con el fin de poder unirse e inhibir la función de microARN, se permite que un ácido nucleico antisentido tenga unos pocos errores de apareamiento (preferiblemente 1 ó 2). Así, por ejemplo en el caso de una secuencia según se representa en la Figura 5b, al menos 19 nucleótidos son preferiblemente idénticos a la secuencia complementaria de miR-214. Además de ello, se permite que un ácido nucleico antisentido sea algo más corto que su secuencia diana. Un antisentido contra

40 miR-214 es preferiblemente de al menos 17 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, la presente descripción proporciona un inhibidor, uso y/o método, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia con una longitud de al menos 17, preferiblemente al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos 17, preferiblemente al menos 19 nucleótidos del

45 complemento de miR-214. En esta memoria se describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% a al menos parte de una secuencia mostrada en la Figura 5b, teniendo dicha parte al menos 19 nucleótidos.

La presente descripción proporciona también un inhibidor, un uso y/o un método, en donde dicho inhibidor comprende:

50 - una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con el complemento de al menos parte de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU (hsa-miR-214), teniendo dicha parte al menos 19 nucleótidos. Por lo tanto, como resultado, dicha secuencia de ácidos nucleicos es particularmente adecuada para contrarrestar enfermedades del corazón y para la preparación de un medicamento para contrarrestar y/o

55 prevenir enfermedades del corazón.

La expresión “% de identidad de la secuencia” se define en esta memoria como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos que es idéntico con los nucleótidos en una secuencia de ácidos nucleicos de interés después de alinear las secuencias e introducir opcionalmente huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje

60 máximo de identidad de la secuencia. Métodos y programas de ordenador para las alineaciones son bien

conocidos en la técnica. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “secuencia de ácidos nucleicos” y “nucleótidos” abarca también moléculas no naturales basadas en y/o derivadas de secuencias de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos artificialmente modificadas, ácidos nucleicos peptídicos así como secuencias de ácidos nucleicos que comprenden al menos un nucleótido modificado y/o nucleótido no natural tal como, por ejemplo, inosina, LNA, morfolino y ARN 2'-O-metilo.

Un inhibidor tal como se describe antes es, así, especialmente adecuado para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente insuficiencia cardíaca. La presente descripción proporciona, un uso de un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente la insuficiencia cardíaca. En esta memoria también se proporciona un uso en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico que es complementaria a al menos 15 nucleótidos, preferiblemente a al menos 18 nucleótidos, lo más preferiblemente a al menos 20 nucleótidos de dicho microARN. Se proporciona, además, un uso, en donde dicho inhibidor es capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-214. Según se describe en esta memoria, dicho inhibidor es capaz de inhibir o disminuir la expresión de dicho microARN en una célula, aumentando o restableciendo con ello preferiblemente la expresión de PPAR δ en dicha célula. Dicha célula es preferiblemente una célula del miocardio. En esta memoria también se proporciona un uso, en donde dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido con una longitud de al menos 19 nucleótidos, preferiblemente con al menos una identidad de la secuencia del 90% con una secuencia mostrada en la Figura 5b o el complemento de la misma. Secuencias de ácidos nucleicos antisentido particularmente preferidas son secuencias con una longitud de al menos 19 nucleótidos, con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos parte del complemento de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU (hsa-miR-214), teniendo dicha parte al menos 19 nucleótidos. La presente descripción proporciona, por lo tanto, un uso de una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con el complemento de al menos parte de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU (hsa-miR-214), teniendo dicha parte al menos 19 nucleótidos, para la fabricación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, preferiblemente la insuficiencia cardíaca.

Con un uso según se describe en esta memoria es así posible tratar, disminuir, demorar o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón.

La presente descripción proporciona un método para tratar, disminuir, contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . A dicho individuo se le puede haber diagnosticado una enfermedad del corazón antes del tratamiento. Por lo tanto, también se proporciona un método que comprende determinar si un sujeto padece una enfermedad del corazón y, si al parecer dicho sujeto padece una enfermedad del corazón, tratar a dicha persona con un método como el que se describe en esta memoria. El hecho de que un sujeto padezca una enfermedad del corazón se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales métodos para diagnosticar una enfermedad del corazón incluyen cateterización cardíaca y angiografía, ecocardiograma, ecocardiografía transesofágica (TEE), electrocardiograma (ECG o EKG), uso de un monitor de Holter y registrador de eventos, escáner MUGA, evaluación del estrés, escáners de talio y sestamibi (cardiolito), MRI cardíaco y cribado no invasivo para determinar una enfermedad de las arterias coronarias (por ejemplo, escáner CT).

Se proporciona un método en el que dicho inhibidor comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 17, lo más preferiblemente al menos 19 nucleótidos que es al menos 90% complementaria a dicho microARN, secuencia de ácidos nucleicos que es preferiblemente capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-214. Dicha secuencia de ácidos nucleicos es preferiblemente al menos 90% complementaria a miR-214. En esta memoria también se proporciona un método, en el que dicho inhibidor es capaz de inhibir o disminuir la expresión de dicho microARN en una célula, incluso más preferiblemente en una célula del miocardio. En esta memoria también se proporciona un método, en el que dicho inhibidor comprende una molécula de ácido nucleico antisentido, preferiblemente con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con una secuencia mostrada en la Figura 5b o el complemento de la misma.

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

donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . Dicho vector comprende preferiblemente un vector retroviral, adenoviral, viral adeno-asociado o lentiviral. Tal como ya se ha descrito antes, se prefiere aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ con el fin de contrarrestar, demorar o al menos prevenir en parte enfermedades del corazón. Esto se puede conseguir de modo indirecto, por ejemplo disminuyendo la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214, o de manera directa, a través del aumento de la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ . La expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 se contrarrestan preferiblemente mediante una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 90% complementaria a al menos 17, preferiblemente a al menos 19 nucleótidos de miR-214. Por lo tanto, se proporciona, además, un vector, que comprende una molécula de ácido nucleico con una longitud de al menos 17 nucleótidos que es al menos 90% complementaria a al menos 17 nucleótidos del microARN miR-214. Dicho vector comprende preferiblemente:

- una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con al menos una parte del complemento de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU (hsa-miR-214), teniendo dicha parte al menos 19 nucleótidos.

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

La presente descripción proporciona un vector que comprende un promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero. Según se describe en esta memoria, dicho promotor está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico capaz de incrementar la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ . En otra realización, dicho promotor está operativamente enlazado a una molécula de ácido nucleico capaz de contrarrestar la expresión, cantidad y/o actividad del microARN miR-214. Un vector de este tipo es preferiblemente adecuado para la expresión en una célula del miocardio. En ese caso, dicho vector comprende preferiblemente un promotor adecuado para la expresión en una célula del miocardio. Un vector de este tipo comprende preferiblemente un promotor ubicuo o un promotor específico para el órgano, preferiblemente un promotor específico para células del miocardio. Un vector de este tipo es especialmente útil para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón. Por lo tanto, en esta memoria se describe un uso de un vector para la preparación de un medicamento para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón.

La descripción proporciona también una célula aislada y/o no humana que comprende un vector y/o un inhibidor. Dicha célula comprende preferiblemente una célula de mamífero tal como una célula del miocardio. En una realización, dicha célula es parte de un animal de ensayo no humano. En otra realización, sin embargo, se proporciona una célula aislada. Una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor como el que se describe en esta memoria es especialmente útil para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón. Por lo tanto, en una realización, se proporciona una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor para el uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.

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

La descripción proporciona una célula aislada en donde está presente una secuencia de ácidos nucleicos que comprende o codifica un inhibidor según se describe en esta memoria. Dicha secuencia de ácidos nucleicos está preferiblemente enlazada operativamente a un elemento regulador (exógeno) que es específico para células del miocardio. Dicho elemento regulador (exógeno) está, por ejemplo, operativamente enlazado a un ácido nucleico antisentido de miR-214, ácido nucleico antisentido que es preferiblemente al menos un 90% idéntico a al menos 17 nucleótidos, preferiblemente a al menos 19 nucleótidos del complemento de miR-214, con el fin de potenciar la expresión de dicho ácido nucleico antisentido en células del miocardio. Un uso de un elemento regulador exógeno que es específico para células del miocardio proporciona diversas ventajas. Por ejemplo, después de la transducción de células madre y/o células progenitoras, un inhibidor según se describe en esta memoria no será expresado en todos los tipos de células diferenciadas, sino principalmente en células del miocardio, de modo que dicho inhibidor ejerce su función inhibitoria principalmente en células del miocardio, reduciendo así posibles efectos secundarios en otros tipos de células. Una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor según se describe en esta memoria es también especialmente útil para la preparación de un medicamento,

preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón. Así, la descripción se refiere también a un uso de una célula aislada que comprende un vector y/o un inhibidor según se describe en esta memoria para la preparación de un medicamento, preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

5 Además de ello, se proporciona un método para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad farmacéuticamente eficaz de un vector y/o una célula según se describe en esta memoria. La descripción proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ , comprendiendo además dicha composición farmacéutica un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho inhibidor comprende preferiblemente un inhibidor de miR-214, preferiblemente una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 17, preferiblemente al menos 19 nucleótidos, que es al menos 90% idéntica a al menos 17, preferiblemente al menos 19 nucleótidos del complemento de miR-214. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector y/o una célula aislada según se describe en esta memoria, que comprende, además, un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Vehículos, diluyentes, excipientes y similares adecuados son comúnmente conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden encontrar fácilmente y aplicar por parte del experto, siendo referencias, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. 1985.

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

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

20 La presente descripción proporciona el conocimiento de que la inhibición de PPAR δ conduce a una enfermedad del corazón que puede ser contrarrestada, disminuida, demorada y/o prevenida aumentando la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ y/o la inhibición de un microARN capaz de inhibir PPAR δ . Por lo tanto, la descripción proporciona, además, un uso, un método, un vector, un inhibidor, una célula y/o una composición farmacéutica, en donde dicha enfermedad del corazón está asociada con la expresión de microARN y/o la expresión disminuida o inhibida de PPAR δ . Preferiblemente, dicho microARN es miR-214.

25 La disminución de la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214, y/o el incremento de la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ es particularmente útil para contrarrestar, disminuir, demorar o prevenir, al menos en parte, una enfermedad del corazón hipertrófica y/o insuficiencia cardíaca y/o una enfermedad del corazón que está relacionada con una afección después de isquemia del corazón, diabetes, hipertensión y/o al menos una mutación genética heredada que provoca cualquier forma de enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío.

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

35 La invención proporciona también un animal de ensayo no humano al que se le ha proporcionado un inhibidor de microARN, en donde dicho microARN es capaz de inhibir o disminuir la expresión de PPAR δ . Dicho inhibidor

comprende preferiblemente un inhibidor de miR-214. También se proporciona un animal de ensayo no humano al cual se le ha proporcionado un vector, una célula aislada y/o una composición farmacéutica según se describe en esta memoria. Un animal de ensayo no humano de este tipo es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de inhibir o disminuir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214. Un animal de ensayo no humano de este tipo también es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de aumentar y/o restaurar la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ . Por lo tanto, un animal de ensayo no humano según se describe en esta memoria es especialmente útil para el rastreo, detección y/o identificación de compuestos candidatos capaces de contrarrestar, disminuir, demorar o prevenir una enfermedad del corazón.

Métodos de rastreo para compuestos candidatos son especialmente útiles para identificar nuevos inhibidores y, por lo tanto, también se proporcionan con esta memoria. Un método de rastreo comprende, por ejemplo, poner en contacto un compuesto candidato con una célula aislada o un animal no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ . Dicha expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ se compara preferiblemente con la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ del mismo tipo de célula o animal sin dicho compuesto candidato. Una expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-214 y/o incrementada de PPAR δ en dicha célula o animal con dicho compuesto candidato con relación a dicha célula o animal sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir enfermedades del corazón. Se proporciona, además, así un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano, y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ en dicha célula y/o dicho animal, que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida con la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ en el mismo tipo de célula o animal sin dicho compuesto candidato, en donde la expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-214 y/o incrementada de PPAR δ con relación a dicha célula o animal sin compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón. Preferiblemente, dicho compuesto candidato se pone en contacto con una célula que muestra una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 y/o disminuida de PPAR δ en comparación con una célula o animal sano. Dicha expresión, cantidad o actividad incrementada en miR-214 y/o dicha expresión, cantidad y/o actividad disminuida en PPAR δ resulta preferiblemente en una hipertrofia en la célula. El contacto de dicha célula hipertrofica con un compuesto candidato y la medición de la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ y/o la medición de la forma y tamaño de dicha célula y la comparación con dichas mediciones con valores de referencia, por ejemplo de dicha célula antes de poner en contacto dicha célula con dicho compuesto candidato o, por ejemplo, una célula aislada y/o no humana que no se pone en contacto con dicho compuesto candidato, identifica compuestos que son capaces de inhibir miR-214 y aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ y/o disminuir o inhibir la hipertrofia de dicha célula.

La descripción proporciona un método de rastreo que comprende administrar un compuesto candidato a un animal de ensayo no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ y comparar dicha o dichas mediciones con un valor de referencia según se describe arriba. Preferiblemente, dicho animal de ensayo no humano exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 y/o disminuida de PPAR δ antes de poner en contacto dicho animal con dicho compuesto. La presente descripción proporciona el conocimiento de que un animal de ensayo no humano de este tipo se encuentra en un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad del corazón, en particular insuficiencia cardíaca. La puesta en contacto de dicho animal con un inhibidor según se describe en esta memoria contrarrestará, prevendrá, demorará o disminuirá dicha enfermedad del corazón. Un animal de este tipo es, así, especialmente útil para rastrear un compuesto candidato en cuanto a su capacidad para prevenir, tratar, demorar y/o disminuir una enfermedad del corazón. Adicional o alternativamente, se utiliza una célula según se describe en esta memoria. También se describe en esta memoria un método para rastrear un compuesto candidato, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano y medir la expresión, cantidad y/o actividad de miR-214 y/o PPAR δ en dicha célula y/o en dicho animal y comparar dicha medición con un valor de referencia obtenido, por ejemplo, de dicha célula o dicho animal antes de poner en contacto dicha célula o dicho animal con dicho compuesto candidato o, por ejemplo, de otra célula o animal que no ha sido puesto en contacto con dicho compuesto candidato. Dicha célula de referencia o animal de referencia es preferiblemente el mismo tipo de célula, o animal de la misma especie, que la célula de prueba o el animal de prueba con el fin de facilitar la comparación. Una disminución en miR-214 y/o un incremento en PPAR δ de la expresión, cantidad y/o actividad en dicha célula de ensayo o dicho animal de ensayo demuestra que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, en particular una insuficiencia cardíaca.

Según se describe en esta memoria, dicho compuesto candidato se pone en contacto con una célula o animal de ensayo no humano aislado que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 o disminuida de PPAR δ en comparación con una célula o animal normal y sano del mismo tipo. Una célula aislada y/o no humana que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 y/o disminuida de PPAR δ es especialmente útil, ya que cambia su forma y tamaño, es decir, la célula se vuelve hipertrófica. Contrarrestar dicho incremento de miR-214 y/o disminución de PPAR δ contrarresta dicho cambio en el metabolismo energético, la forma y tamaño. Una célula de este tipo es particularmente útil para fines de rastreo, dado que la lectura de dicho rastreo se realiza fácilmente, por ejemplo, con un microscopio o midiendo la función mitocondrial. Un animal de ensayo no humano que exhibe una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 y/o disminuida de PPAR δ es también particularmente útil para fines de rastreo, ya que un animal de este tipo está desarrollando una enfermedad del corazón o está en riesgo de desarrollar una enfermedad del corazón. Un compuesto candidato capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón es, así, fácilmente identificado en dicho animal. Por lo tanto, se proporciona además una célula aislada o animal no humano, en donde la expresión, cantidad y/o actividad de miR199a o miR214 se incrementa en comparación con una célula natural sana o un animal del mismo tipo. Se proporciona además una célula aislada o animal no humano, en donde la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ se reduce en comparación con una célula natural sana o un animal del mismo tipo.

Así, la descripción proporciona un método de rastreo, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con una célula o animal de ensayo no humano aislado, preferiblemente que muestra una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 o disminuida de PPAR δ , que comprende, además, evaluar la forma y/o tamaño de dicha célula aislada y/o la gravedad y/o el riesgo de una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardíaca, en dicho animal de ensayo no humano, y comparar dicho tamaño y/o forma de dicha célula y/o gravedad y/o riesgo de dicha enfermedad del corazón en dicho animal de ensayo no humano con un valor de referencia. Dicho valor de referencia se puede obtener de la misma célula o del mismo animal, por ejemplo antes de poner en contacto dicha célula o animal con dicho compuesto candidato. Dicho valor de referencia también se puede obtener de otra célula o animal, preferiblemente del mismo tipo o de la misma especie, que, por ejemplo, no se pone en contacto con dicho compuesto candidato. Un cambio en el valor, preferiblemente una disminución en el tamaño de la célula y/o una disminución en el riesgo y/o gravedad de la enfermedad del corazón indica si dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar una enfermedad del corazón.

La descripción proporciona, por lo tanto, un método para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano, en donde dicha célula aislada y/o dicho animal de ensayo no humano muestra preferiblemente una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de miR-214 o disminuida de PPAR δ , y en donde se mide la expresión, cantidad y/o actividad de miR-224 y/o PPAR δ , la forma y tamaño de dicha célula aislada y/o la gravedad y/o incidencia de desarrollar una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardíaca, en dicho animal de ensayo no humano, que comprende, además, comparar dicha expresión, cantidad y/o actividad medida, dicha forma y/o tamaño, y/o dicha incidencia y/o gravedad con los valores correspondientes del mismo tipo de célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato, en donde la expresión, cantidad y/o actividad disminuida de miR-214 y/o incrementada de PPAR δ , una disminución en el tamaño y/o una disminución en la incidencia y/o gravedad de una enfermedad del corazón con relación a dicha célula o animal no humano sin dicho compuesto candidato indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

Compuestos candidatos, identificados con un método según se describe en esta memoria, son especialmente útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con miR-214 y/o relacionadas con PPAR δ , por ejemplo a través de la inhibición de miR-214, incluido el tratamiento de una enfermedad del corazón, preferiblemente insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, también se proporcionan compuestos de este tipo, así como su uso contra una enfermedad del corazón, así como su uso para la preparación de un medicamento contra una enfermedad del corazón.

La presente descripción proporciona el conocimiento de que una enfermedad del corazón, por ejemplo insuficiencia cardíaca, está relacionada con una expresión disminuida de PPAR δ , y que miR-214 es capaz de lograr precisamente esto. Sin embargo, tal como se ha esbozado antes, existen cientos de microARNs ya conocidos y se ha presumido que existe en mamíferos un cierto número de varios miles de microARNs diferentes, y generalmente se piensa que cada uno de ellos regula cientos de genes. Así, junto a miR-214, existen otros microARNs que son capaces de regular la expresión de PPAR δ . Contrarrestar cualquiera de estos microARNs es útil para aumentar o restablecer la expresión de PPAR δ . También es posible inhibir o disminuir indirectamente la expresión de miR-214, p. ej. a través de la manipulación de factores de transcripción que regulan miR-214, aumentado con ello

indirectamente la expresión de PPAR δ . Los actuales criterios en la técnica sugieren que la expresión de un microARN es principalmente controlada al nivel de la transcripción.

5 En una realización, por lo tanto, la descripción proporciona, además, un método para tratar, disminuir, demorar o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende disminuir o inhibir la expresión de miR-214 y/o aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ en un sujeto que padece o está en riesgo de padecer dicha enfermedad del corazón.

10 Naturalmente, también es posible influir directamente sobre PPAR δ sin el uso de, por ejemplo, miR-214. Por ejemplo, es posible aumentar la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ endógeno o administrar PPAR δ exógeno y/o un ácido nucleico que codifica PPAR δ con el fin de aumentar la cantidad la cantidad y/o actividad (global) de PPAR δ .

15 La descripción proporciona, así, un compuesto capaz de aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ para uso como un medicamento. Un compuesto capaz de aumentar o restablecer la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ se utiliza preferiblemente para tratar, disminuir, demorar y/o prevenir enfermedades del corazón, o para la preparación de un medicamento contra enfermedades del corazón. Dicho compuesto puede comprender una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica PPAR δ o un equivalente funcional del mismo.

20

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La agrupación de miR-199a-2/miR-214 se conserva y se asocia con la sub-regulación de la expresión de PPAR δ .

25

(A) Representación de la localización genómica de la agrupación de miR-199a-2/miR-214 en una región intrónica en la dirección antisentido del gen dinamina 3 (*dnm3*). Los microARNs maduros para miR-199a-2 y miR-214 se conservan completamente en muchas especies. (B) Validación de PCR en tiempo real de la supra-regulación de miR-199a-2 y miR-214 en corazones humanos con insuficiencia en comparación con corazones humanos normales. (C) Representación de los sitios de unión del microARN y su conservación en diferentes especies en la región 3'UTR de PPAR δ . (D) Se dejaron células HEK293 sin tratar o se transfectaron con el precursor para los microARNs indicados, y se realizaron transferencias Western para PPAR δ y GAPDH (testigo de carga). (E) El análisis de transferencia Western para PPAR δ muestra la sub-regulación de PPAR δ endógeno en corazones de ratón con sobrecarga de presión (TAC) en comparación con corazones testigo de operación simulada, y la sub-regulación de PPAR δ en corazones humanos con insuficiencia en comparación con corazones testigo. Las transferencias Western también se cribaron para GAPDH para garantizar una carga equivalente. Las barras de error corresponden a la media \pm SEM de n=3.

30

35

Figura 2. PPAR δ es una diana directa para miR-199a-2 y miR-214.

40

(A) Creación de un informador de luciferasa (pMIR- PPAR δ) que mide la sensibilidad frente a miR-199a-2/miR-214 de 3'UTR de PPAR δ . (B) La expresión de pMIR- PPAR δ muestra sensibilidad frente a la cotransfección con precursores para miR-199a-2, miR-214, Twist1 o HIF-1 α . (C) La sensibilidad frente a HIF-1 α de pMIR-PPAR δ resultó ser dependiente de la expresión de Twist1, ya que la supresión mediada por ARNip anuló los efectos de HIF-1 α . Las barras de error corresponden a la media \pm SEM de n=3.

45

Figura 3. La delección de PPAR δ provoca una remodelación cardíaca espontánea.

(A) Morfología global representativa de corazones disecados de ratones de 8 semanas de edad de los genotipos indicados, que demuestra un agrandamiento cardíaco visible debido a la delección de *ppard* en el corazón del ratón adulto (barra de 5 mm). (B) Análisis de PCR en tiempo real de transcritos endógenos de *ppara*, *ppard* y *pparg* en los genotipos indicados, que indica la delección específica de transcritos de *ppard* endógenos en el corazón tras el tratamiento con tamoxifeno de ratones MHC-MCM-*ppard*^{ff}. (C) La proporción de peso del corazón frente al peso corporal en los genotipos indicados indica una remodelación hipertrófica en los ratones MHC-MCM-*ppard*^{ff} tras el tratamiento con tamoxifeno. (D) Imágenes histológicas representativas de corazones de ratones con los genotipos indicados (barra de 2 mm). La tinción con rojo Sirius indica una fibrosis intersticial y perivascular masiva en los corazones de ratones MHC-MCM-*ppard*^{ff} tras el tratamiento con tamoxifeno. (E) Imágenes representativas de modo M de ratones con los genotipos indicados. (F) La representación en diagrama de barras del acortamiento fraccional (FS, siglas en inglés) en los genotipos indicados indica la pérdida de contractilidad en los corazones de ratones MHC-MCM-*ppard*^{ff} tras el tratamiento con tamoxifeno (n=6 por grupo). (G) La representación en diagrama

60

de barras de la fracción de eyección (EF, siglas en inglés) en los genotipos indicados indica la pérdida de respuesta cardíaca en los corazones de ratones MHC-MCM-ppard^{ff} tras el tratamiento con tamoxifeno (n=6 por grupo).

5 **Figura 4. La delección dirigida de PPAR δ en el corazón adulto incrementa la expresión de genes fetales y glicolíticos, y reduce la expresión de genes de oxidación y transporte de ácidos grasos.**

10 Análisis de la expresión de transcritos para varios genes fetales indicativos de insuficiencia cardíaca (*nppa*, *nppb*, *myh7* y *acta 1*), *glut1* (indicativo de la tasa de glicólisis), *cd36* y *hadha* (indicativos de la oxidación y el transporte de ácidos grasos) mediante PCR cuantitativa en tiempo real en tejido ventricular de los genotipos indicados. Las barras de error corresponden a la media \pm SEM de n=3.

15 **Figura 5. Composición química de antagomios contra miR-199a-2 y miR-214.**

15 (A) Ejemplo no limitante de una secuencia de nucleótidos capaz de inhibir miR-199a-2 o (B) miR-214. Descripción del oligo (antagomir): 20-23 nt de longitud, todos con modificación 2'-Ome, 3'-colesterol de Tipo 1, enlaces 5-7 P, purificado por PAGE o HPLC.

20 Ejemplos

20 **MATERIALES Y MÉTODOS**

25 Ratones. Para los procedimientos de bandeo aórtico, empleamos B6CBA de tipo salvaje de 2 meses de edad. Se cruzaron ratones homocigóticos para alelos PPAR δ "floxed" (*ppard*^{F/F}) y ratones α MHC-MerCreMer (α MHC-MCM)¹ transgénicos para generar ratones transgénicos dobles (α MHC-MCM-*ppard*^{F/F}). A las 8 semanas de edad, los ratones (α MHC-MCM-*ppard*^{F/F} y *ppard*^{F/F} testigo) se trataron con vehículo o tamoxifeno (20 mg/kg/día) mediante inyecciones intraperitoneales diarias durante 5 días consecutivos. El tamoxifeno se diluyó en etanol/aceite 10/90% v/v hasta una concentración de 1 mg/100 μ l; para el grupo de vehículo, solo se inyectó solución de etanol/aceite. Todos los protocolos se realizaron de acuerdo con directrices institucionales y fueron aprobados por los Comités locales para el Cuidado y Uso de Animales.

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

40 **Análisis histológico y microscopía de inmunofluorescencia.** Para el análisis histológico, los corazones se detuvieron en diástole, se fijaron por perfusión con paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y se seccionaron en 5 μ m. Las secciones en parafina se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para un análisis histológico rutinario; rojo Sirius para la detección de colágeno fibrilar; aglutinina de germen de trigo (WGA) marcada con FITC para visualizar y cuantificar el área de sección transversal de los cardiomiocitos y CD31 (informador de la molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias 1, PECAM-1) para visualizar y cuantificar el número de capilares por miofibra. Los portaobjetos se visualizaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 o un Zeiss Axiovert 135 (inmunofluorescencia). Las áreas de las superficies celulares se determinaron utilizando un software de imágenes SPOT (Diagnostic Instruments).

50 **Ecocardiografía transtorácica.** Se realizaron mediciones ecocardiográficas en ratones anestesiados con isoflurano según se ha descrito anteriormente,² 1 semana después de iniciar el tratamiento con tamoxifeno.

55 **Aislamiento de ARN procedente de tejido humano y tejido de ratón.** Los autores de la invención aislaron ARN total a partir de tejidos humanos y de ratón o a partir de células de mamífero cultivadas. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia con isoflurano. Se retiraron los corazones enteros, se limpiaron en PBS, se colocaron en un tubo marcado que contenía 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen) e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido. Los tejidos se homogeneizaron varias veces a la velocidad máxima, cada vez durante aproximadamente 1 minuto (para prevenir un sobrecalentamiento) hasta la alteración completa. Las células, cultivadas en placas de 6 pocillos hasta un 100% de confluencia, se lavaron dos veces con PBS antes de añadir 1 ml de TRIzol por pocillo y se recogieron los lisados de células en tubos exentos de RNasa. Después de agitar los productos homogeneizados durante 10 minutos a 4°C (para permitir la disociación completa

de complejos de nucleoproteínas) se añadieron a cada una de las muestras 0,3 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol. La centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C resulta en la separación de ARN (fase acuosa superior) a partir de ADN y proteínas (fase orgánica inferior e intermedia). Las fases acuosas (60% del volumen de la muestra) se recogieron en nuevos tubos exentos de RNasa, y el ARN se precipitó con 0,5 ml de isopropanol mediante incubación a -20°C durante al menos 1 hora y centrifugación a 12.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sedimentos, que contenían el ARN, se lavaron dos veces con 1 ml de etanol al 70% a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. Después de la decantación del etanol y de la separación total mediante evaporación, las muestras se disolvieron en 20-30 µl de agua exenta de RNasa. La cantidad de ARN procedente de los tejidos individuales se midió con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Wilmington), y la calidad del ARN se vigiló utilizando un bioanalizador Agilent 2100.

Perfilado de Expresión de microARN y Análisis de los Datos. El análisis de expresión de 875 secuencias de miARN humano maduro (miRBase V12) se realizó mediante un servicio de perfilado de miARN (LC Sciences Inc., Houston). En síntesis, cinco µg de ARN total agrupado de 4 muestras testigo (4 corazones testigo humanos explantados) y 7 muestras de corazón humano enfermo (7 corazones con cardiomiopatía dilatada humanos explantados) se sometieron al servicio de perfilado de la expresión utilizando la tecnología µParaflo® y un diseño de sonda propietaria, que permite una detección directa muy sensible y específica de miARNs mediante marcaje con un solo color, hibridación, procesamiento de datos de imagen y análisis de datos. El análisis de datos incluyó una normalización multimatriz, prueba t, ANOVA, calculadora de Tasa de descubrimiento falso y análisis de agrupaciones.

Transferencia Northern. Tres microgramos de ARN total procedente de corazón u otros tejidos diferentes se fraccionaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% que contenía urea 8 M, se transfirieron a una membrana Nytran N (Schleicher & Schuell, Alemania) por el método capilar y se fijaron mediante reticulación UV de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas se hibridaron con sondas de detección de LNA marcadas con 5'-Dig-oxigenina (Dig) específicas (Exiqon) para hsa-miR214 o Rnub-2 (testigo de carga). La detección se realizó con un anticuerpo contra Dig (Roche).

Cultivos de cardiomiocitos de rata neonatales primarios y transfecciones de precursor de miARN/anti-miR.

Miocitos ventriculares de rata neonatales se obtuvieron mediante disociación enzimática de ventrículos neonatales de rata de 1-2 días de edad según se describe previamente en detalle⁵. Los ventrículos se almacenaron en DMEM tamponado con HEPES (pH 7,4) antes de realizar múltiples rondas de digestión enzimática en base de DMEM mezcla de nutrientes F-12 Ham (Sigma), suplementados con 0,7 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Invitrogen) y 1 mg/ml de pancreatina (Sigma). Las células se recogieron mediante centrifugación a 61 x g durante 10 min, se volvieron a suspender en suero de ternero neonatal (Invitrogen) y se almacenaron en una incubadora a 37°C. Todas las suspensiones celulares se agruparon, se centrifugaron a 61 x g durante 10 min y se volvieron a suspender en DMEM (Invitrogen) suplementado con suero de caballo al 10% (Invitrogen) y suero de ternero fetal al 5% (Invitrogen). Subsiguientemente, las células se extendieron diferencialmente durante 3 h en placas de cultivo celular no revestidas para eliminar no miocitos contaminantes. Los cardiomiocitos (que contenían menos de 5% de no miocitos) se extendieron luego en placas de cultivo de 6 pocillos con fibronectina (Sigma). Aproximadamente 24 horas después de la extensión en placas, el medio se reemplazó por medio DMEM:M199 (4:1) (medio exento de suero). Para la transfección, cardiomiocitos de ratas neonatales se extendieron en placas en DMEM suplementado con Nutridoma (Roche) en placas revestidas con gelatina de 6 pocillos con una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Al día siguiente, las células se transfectaron transitoriamente con precursor o moléculas anti-miR. El precursor de miR-199a, miR-214 o las moléculas anti-miR se obtuvieron de Ambion (precursor de miARN Pre-miR™ mmu-miR-214, pre-miR-199a/214; moléculas de miARN anti-miR™, anti-miR-199a/214). Se transfectó una concentración 30 nM de pre-miR-199a, pre-miR-214, anti-miR-199a, anti-miR-214 o los testigos revueltos respectivos, con reactivo oligofectamina (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se lavaron al día siguiente y se dejaron sin tratar, se estimularon con 10 µM de fenilefrina (PE) durante 24 horas antes de la fijación de las células o el aislamiento de ARN.

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

específicas de las células se determinaron utilizando el software de visualización de imágenes SPOT (Diagnostic Instruments) en 80-100 cardiomiocitos en 10 a 20 campos en tres experimentos independientes.

5 **Predicción de la diana, diseño del cebador y PCR en tiempo real.** Para encontrar los genes diana de un microARN específico, los autores de la invención hicieron uso de varios servidores de la web basados en algoritmos bio-informáticos predictivos (PicTar, miRanda, miRBase). Estos son interfaces intuitivas que incorporan algoritmos de procesamiento y potentes herramientas de búsqueda de dianas miARN para investigar las dianas miARN frente a las secuencia 3'UTR más conservadas procedentes de UCSC Genome Browser. Comparando las listas de genes diana que resultan de cada uno de los algoritmos, los autores de la invención acortaron las listas iniciales de cientos de genes diana potenciales a una lista de 10 genes comunes a todos los algoritmos utilizados. Los autores de la invención diseñaron cebadores dirigidos contra transcritos de los genes indicados y L7. Los cebadores eran específicos para secuencias de ratón (www.ensembl.org) y se seleccionaron utilizando el software Beacon Designer (Invitrogen) basado en los siguientes requisitos: i) temperatura de fusión del cebador de ~ 60°C, ii) contenido en GC de ~ 55%, iii) preferiblemente ninguna G en el extremo 5', iv) evitar operaciones de más de 3 nucleótidos idénticos y v) longitud del amplicón de ~ 100 nucleótidos. La especificidad se verificó con la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica - Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y el punto de fusión específico de los amplicones se analizó utilizando el software de curva de Disociación Biorad (iCycler, Biorad). Todos los conjuntos de cebadores se sometieron a ensayo en cuanto a la eficacia de la PCR, y se diseñaron cebadores alternativos en el caso de que cayeran por fuera del intervalo de eficacia del 5% ($3,14 \leq$ pendiente $\leq 3,47$). Tres μ g de ARN procedente de corazones indicados se transcribió inversamente utilizando transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La amplificación por PCR se realizó (por duplicado) en forma de una reacción en singleplex con cebadores directos e inversos 400 nM en 40 ng de ADNc en un volumen total de la reacción de 25 μ l. La PCR se cicló entre 95°C/30 s y 60°C/30s durante 40 ciclos, siguiendo una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min. Los resultados de la PCR en tiempo real se verificaron mediante electroforesis del material transcrito inversamente en geles de agarosa al 1,2% y se visualizó bajo iluminación UV después de tinción con bromuro de etidio. Se compararon las cantidades de transcrito con la cantidad de testigo endógeno (L7). Las secuencias de los cebadores están disponibles con previa solicitud.

30 **Análisis de Transferencia Western.** Se extrajeron proteínas de células cultivadas o muestras de corazón utilizando tampón de lisis celular (Tris 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche). Se realizaron una electroforesis SDS-PAGE y transferencia según se describe en detalle⁶. Los anticuerpos utilizados incluían el anticuerpo policlonal de conejo contra PPAR δ y el anticuerpo monoclonal de ratón contra GAPDH (ambos de Santa Cruz), seguido de correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO) y detección ECL.

40 **Validación de genes diana.** Secuencias reguladoras 3' UTR han demostrado ser importantes para la estabilidad, traducción y transporte de ARNm. Los autores de la invención diseñaron cebadores (5'-AGGCCGAGCCCAGGCCTCCCC-3' y 5'-CTGGGAATATGGCTCCCGGCC-3') específicos para secuencias de ratón que fijan como objetivo el sitio de unión específico de miR-214 en la 3' UTR de *ppard* de ratón (nucleótidos 1549-2128). Los autores de la invención clonaron parte de 3' UTR de *ppard* de ratón que contenía los sitios de unión de miR-199a y miR-214. Después de la amplificación por PCR de esta secuencia específica, se visualizó un producto de la PCR con el tamaño esperado (579 pb) y se aisló a partir de un gel de agarosa 1.2. Después de purificación, el fragmento 3'UTR se clonó en un vector informador de la expresión de miARN pMIR-REPORT™ (Ambion). Este vector contiene luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de mamíferos CMV, con una región de clonación diana de miARN situada más abajo de la secuencia de traducción de luciferasa. Este vector está optimizado para clonar dianas de miARN y para la evaluación de la regulación de miARN y, por lo tanto, se puede utilizar como una herramienta de rastreo para identificar dianas de miARN. Después del aislamiento y la secuenciación del plásmido, el plásmido se utilizó para transfectar células HEK293/ppard. Se cultivaron células en placas de 96 pocillos, se transfectaron con el plásmido de PPAR δ pmiR-informador-3'UTR o el vector vacío y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de 1 lavado con PBS, las células se dejaron sin tratar o se trataron con el precursor indicado o moléculas anti-miR o vectores de expresión para Twist1 y/o HIF-1 α durante 48 horas antes de medir la actividad de luciferasa.

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

60 **RESULTADOS**

Expresión diferencial de microARNs en insuficiencia cardíaca humana. Los autores de la invención perfilaron los niveles de expresión de microARNs en miocardio humano sano frente a una cardiomiopatía dilatada humana. Se aisló ARN de biopsias de paredes congeladas exentas del ventrículo izquierdo y los autores de la invención realizaron el perfilado de microARN en estas muestras. Los autores de la invención detectaron microARNs que se co-regulan con el desarrollo de una insuficiencia cardíaca humana y analizaron la localización genómica de dos microARNs específicos: hsa-miR-199a-2 y hsa-miR-214 (Fig. 1a; miR-199a-2/miR-214). Ambos microARNs se co-expresan en una agrupación con una región intrónica del gen *dnm3* y se expresan en un único transcrito denominado *dnmos3* en un modo antisentido con relación a la transcripción de *dnm3*. Los autores de la invención validaron sus resultados de perfilado de la expresión de micromatriz utilizando análisis de PCR en tiempo real (Fig. 1b) y pudieron confirmar una inducción muy similar de tanto miR-199a-2 como miR-214 en las biopsias humanas de cardiomiopatía dilatada en comparación con corazones humanos sanos.

Se predice que *Mir-199a-2/miR-214* fija como objetivo PPAR δ . A pesar del gran número de miARNs identificados en varias situaciones patológicas, sólo se han caracterizado funcionalmente un puñado de miARNs. Los complicados modelos de expresión y los grandes números de genes diana predichos excluyen un análisis directo de su función biológica precisa. Con el fin de comprender el papel de miR-199a-2/miR-214 en la insuficiencia cardíaca humana, los autores de la invención realizaron un análisis de expresión de las dianas de ARNm hsa-miR-199a-2/miR-214 previstas enumeradas en varios conjuntos de datos públicos que se desarrollaron basándose en varios estudios. Una diana constante de ambos microARNs en esta agrupación fue la isoforma delta del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR δ), que se expresa a partir del gen humano *ppard* en el cromosoma 13. Los autores de la invención identificaron los sitios de unión tanto para miR-199a como para miR-214 en la 3' UTR de PPAR δ y los sitios de unión se conservaron entre los de ratón y los humanos, especialmente el sitio de siembra de microARN (Fig. 1c), lo cual sugiere la funcionalidad de estos sitios de unión.

PPAR δ está sub-regulado por *mir-199a-2/miR-214*. Para evaluar más directamente si PPAR δ es un gen diana directo de miR-199a-2/miR-214, los autores de la invención transfectaron transitoriamente las moléculas precursoras respectivas de miR-199a-2 y miR-214 en células HEK293 y realizaron una transferencia Western para niveles de PPAR δ endógeno. Los datos muestran que tanto la expresión de miR-199a como la de miR-214 provocaron directamente la sub-regulación de PPAR δ . El nivel de sub-regulación fue similar entre la transfección del precursor de miR-199a y el precursor de miR-214, y no se observó ningún efecto aditivo cuando se co-transfectaron ambos precursores (Fig. 1d). Para evaluar si, en condiciones de supra-regulación de miR-199a/miR-214 *in vivo*, la expresión de PPAR δ también se veía sub-regulada, los autores de la invención realizaron una transferencia Western en corazones de ratón con sobrecarga de presión y muestras de corazón humano de pacientes con cardiomiopatía dilatada. En ambas situaciones, la expresión de PPAR δ ascendió a aproximadamente la mitad de la de las condiciones testigo (Fig. 1e). Considerados conjuntamente, estos datos muestran que la expresión de miR-199a-2/miR-214 se correlacionó inversamente con la expresión de PPAR δ en células cultivadas, corazones de ratón con sobrecarga de presión y en corazones humanos con insuficiencia.

PPAR δ es un gen diana directo de la agrupación miR-199a-2/miR-214. Para confirmar de forma más directa si PPAR δ es un gen diana directo de esta agrupación de microARN, los autores de la invención utilizaron un vector informador de la expresión de miARN (pMiR-informador, Ambion). Este vector contiene luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de mamífero de CMV. El vector contiene un sitio de clonación múltiple para la inserción de una 3' UTR de dianas de unión de miARN previstas u otras secuencias de nucleótidos. Al clonar la región 3' UTR de PPAR δ , a la cual se predice que se unirán miR-199a-2/miR-214 (Fig. 2a), en el vector pMiR-INFORMADOR, el informador de luciferasa se someterá a una regulación que imitará la regulación de la diana de microARN (en este caso, PPAR δ). Si la supra-expresión de miR-199a/miR-214 diera como resultado una reducción en la actividad luciferasa, esto proporcionaría una evidencia sólida de que la secuencia de 3' UTR de PPAR δ es una diana directa de estos microARNs. Con este fin, los autores de la invención clonaron una región que englobaba los nucleótidos 1598-2198 del ADNc de PPAR δ de murino en una posición posterior a la luciferasa. Tras la co-transfección del informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ con moléculas precursoras para miR-199a-2 o miR-214, la actividad luciferasa se inhibió significativamente en las células que supra-expresaban miR-199a-2 o miR-214, en comparación con las células que se dejaron sin tratar (Fig. 2b).

Ya que se describió que *dnm3os*, la hebra opuesta del gen *dnm3* que codifica la agrupación miR-199a-2/miR-214, era inducido por el factor de transcripción Twist1, los autores de la invención evaluaron si la co-transfección de Twist1 (y la inducción concomitante de esta agrupación de microARN) con el informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ sería suficiente para sub-regular el informador de luciferasa. En efecto, los autores de la invención observaron una sub-regulación muy similar del informador de luciferasa que la observada con moléculas precursoras para cualquiera de los microARNs por sí solos (Fig. 2b). Se describió que Twist1 era inducido en

condiciones hipóxicas por el factor-1 alfa inducible de hipoxia (HIF-1 α).⁴ Los autores de la invención evaluaron si el informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ era sensible para la inducción de HIF-1 α . Con este fin, el informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ se co-transfectó con un vector de expresión para HIF-1 α . Nuevamente, se observó una sub-regulación muy similar del informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ .

Para establecer si los efectos observados en HIF-1 α dependían directamente de la inducción de Twist1, los autores de la invención co-transfectaron a continuación el vector de expresión para HIF-1 α con el informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ en presencia o ausencia de un ARN interferente pequeño (ARNip) específico para Twist1. En el último caso, la sub-regulación del informador de luciferasa pMiR-3'UTR-PPAR δ dependiente de HIF-1 α se anuló completamente, lo cual demuestra el requisito absoluto de Twist1 para los efectos dependientes de HIF-1 α .

Considerados conjuntamente, estos datos muestran por primera vez que la agrupación miR-199a-2/miR-214 juega un papel importante en la regulación de la expresión de PPAR δ y que esta agrupación es inducida tras condiciones hipóxicas, dado que la eficacia de la traducción/estabilidad del ARNm de PPAR δ se vio afectada por una vía de señalización intracelular dependiente de HIF-1 α Twist1.

La delección de PPAR δ provoca una dilatación biventricular rápida y muerte prematura. Para investigar si la activación del gen PPAR δ es necesaria para una homeostasis normal del miocardio y para evitar la letalidad embrionaria temprana de ratones con supresión de PPAR δ , los autores de la invención provocaron en primer lugar la delección de un alelo de PPAR δ "floxed" (ppard^{ff}) utilizando una proteína recombinasa Cre inducible por tamoxifeno fusionada con dos dominios de unión al ligando de receptores de estrógenos mutados bajo el control del promotor de la cadena pesada de α -miosina específico para el corazón.

Los autores de la invención trataron ratones adultos α MHC-MCM/ppard^{ff} y ppard^{ff} con vehículo o tamoxifeno a las ocho semanas de edad. Los autores de la invención observaron que, en un período de 5 días desde el inicio del suministro de tamoxifeno, los ratones α MHC-MCM/ppard^{ff} presentaron una inactividad y afeción débil, en comparación con los ratones ppard^{ff} tratados con tamoxifeno o los ratones testigo α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con vehículo. Es más, hasta un 25% de los ratones α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con tamoxifeno fallecieron en un período de una semana después del inicio del tratamiento y este índice de mortalidad se incrementó hasta un 75% durante las siguientes dos semanas (no se muestran los datos).

Además, los corazones de los ratones α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con tamoxifeno presentaron una duplicación del peso del corazón en comparación con las crías de la misma camada testigo (Fig. 3a). Para determinar si los autores de la invención habían creado ratones con deficiencia para *ppard*, dichos autores realizaron RT-PCR en tiempo real para las tres isoformas endógenas de PPAR. Los datos muestran que la intervención genética de los autores de la invención no afectó a los transcritos de *ppara* o *pparg*, pero indujo específicamente una sub-regulación potente de los transcritos de *ppard* (Fig. 3b).

Se observó una histopatología grave evidente después de teñir secciones histológicas con H&E y rojo Sirius. El tejido cardíaco reveló un fenotipo complejo con miofibras hipertrofiadas, desorganización de miocitos, infiltración inflamatoria significativa y fibrosis intersticial (Fig. 3d), características típicas observadas en biopsias de insuficiencias cardíacas clínicas y experimentales. La tinción con rojo Sirius indicó una fibrosis perivascular e intersticial masiva en los corazones de ratones α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con tamoxifeno (Fig. 3d).

Además, las mediciones de las proporciones de peso del corazón frente al peso corporal (HW/BW) indicaron un incremento similar en la masa cardíaca para los ratones α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con tamoxifeno (7.5 \pm 1.2 mg/g) en comparación con los ratones ppard^{ff} tratados con tamoxifeno (6.2 \pm 0.9 mg/g) (Fig. 3c). Estos datos demuestran que la delección específica en el corazón de PPAR δ con inicio en la etapa adulta provoca una remodelación cardíaca rápida, una reducción de la supervivencia y múltiples signos de insuficiencia cardíaca terminal.

La delección dirigida de PPAR δ en el corazón adulto provoca una disfunción cardíaca grave y la inducción de genes fetales. Se evaluaron la función y la geometría cardíaca de forma no invasiva mediante ecocardiografía 2 semanas después del tratamiento con tamoxifeno (Fig. 3). Después de 2 semanas, los ratones ppard^{ff} y α MHC-MCM/ppard^{ff} tratados con vehículo presentaron una función y geometría cardíaca normal, según indicaron el acortamiento fraccional (FS) (Fig. 3e), las dimensiones internas del ventrículo izquierdo (LVID) y la masa del ventrículo izquierdo (Fig. 3e). Como era de esperar, los ratones ppard^{ff} tratados con tamoxifeno no presentaron alteraciones en FS ni otros parámetros. Por el contrario, en la semana 2, los animales α MHC-MCM/ppard^{ff} presentaron una reducción rápida y significativa de la función cardíaca, según indicó una reducción del 50% en FS (P<0.05; Fig. 3f). En este punto de evaluación tras el tratamiento con tamoxifeno, los ratones α MHC-MCM/ppard^{ff}

también presentaron un deterioro más pronunciado en la geometría cardíaca en comparación con los ratones α MHC-MCM/ppar δ^{ff} tratados con vehículo, según demuestra un incremento del 80-90% en los diámetros internos de LV (LVIDs; Fig. 3g), lo cual indica una dilatación rápida del ventrículo izquierdo. Estos datos demuestran que la reducción de PPAR δ provoca un deterioro geométrico y funcional progresivo que concuerda con un fenotipo de insuficiencia cardíaca.

La delección de PPAR δ en ratones adultos también indujo una re-activación potente de genes embrionicos tales como *acta1*, *nppb*, *myh7* y *nppa* en corazones de α MHC-MCM/ppar δ^{ff} de 8 semanas de edad (Fig. 4). No se observó ningún cambio sustancial en la expresión de ninguno de estos genes en los corazones de genotipos testigo tratados con tamoxifeno o vehículo. Además, los autores de la invención observaron una reducción sustancial en la abundancia del transcrito para *cd36* y *hadha*, y un incremento en *glut1* (Fig. 4). Estos datos indican una reducción en la oxidación y la capacidad de transporte de ácidos grasos, y un incremento concomitante en la glicólisis. Como conclusión, la delección de PPAR δ en el corazón adulto induce una disfunción cardíaca rápida y espontánea con una inducción significativa de genes informadores hipertróficos “fetales”.

Referencias

1. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, et al. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res.* 2001;89(1):20-25.
2. van Rooij E, Doevendans PA, Crijns HJ, et al. MCIP1 overexpression suppresses left ventricular remodeling and sustains cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;94(3):e18-26.
3. Lee YB, Bantounas I, Lee DY, et al. Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):123-128.
4. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):295-305.
5. Van Rooij E, Doevendans PA, De Theije CC, Babiker FA, Molkentin JD, De Windt LJ. Requirement of nuclear factor of activated T-cells in calcineurin-mediated cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 2002;277(17):48617-48626.
6. De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T, Molkentin JD. Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000;275(18):13571-13579.
7. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;409(6818): 363-366.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universiteit Maastricht Academisch ziekenhuis Maastricht
- <120> Medios y métodos para contrarrestar, demorar y/o prevenir cambios adversos del metabolismo energético en enfermedades del corazón
- 5 <130> 222 EP DIV
- <140> PCT/NL2009/050484
< 141> 2009-08-06
- <160> 13
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
< 211> 23
< 212> ARN
< 213> Artificial
- 15 <220>
< 223> hsa-miR-199a-5p
- <400> 1
cccaguguuc agacuaccug uuc 23
- <210> 2
20 < 211> 22
< 212> ARN
< 213> Artificial
- <220>
< 223> hsa-miR-199a-3p
- 25 <400> 2
acaguagucu gcacauuggu ua 22
- <210> 3
< 211> 22
< 212> ARN
30 < 213> Artificial
- <220>
< 223> hsa-miR-214
- <400> 3
acagcaggca cagacaggca gu 22
- 35 <210> 4
< 211> 22
< 212> ARN
< 213> Artificial
- <220>
40 < 223> hsa-miR-214*
- <400> 4
ugccugucua cacuugcugu gc 22

<210> 5
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

5 <220>
 < 223> cebador

<400> 5
 aggccgcagc ccaggcctcc cc 22

10 <210> 6
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> cebador

15 <400> 6
 ctgggaatat ggctcccgcc c 21

<210> 7
 < 211> 31
 < 212> ARN
 20 < 213> Artificial

<220>
 < 223> miR-199a-5p

<400> 7
 gccccagugu ucagacuacc uguucaggac a 31

25 <210> 8
 < 211> 32
 < 212> ARN
 < 213> Artificial

<220>
 30 < 223> miR-199a-3p

<400> 8
 augggguugu acaguagucu gcacauuggu ua 32

<210> 9
 < 211> 35
 35 < 212> ARN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> miR-214

<400> 9
 40 cgcucacugu acagcaggca cagacaggca gucac 35

<210> 10
 < 211> 35
 < 212> ARN
 < 213> Artificial

45 <220>

< 223> miR-214*

<400> 10
gugucugccu gucuacacuu gcugugcaga acauc 35

5 <210> 11
< 211> 10
< 212> ARN
< 213> Artificial

<220>
< 223> hsa-miR-199a-2 fragmento 3'

10 <400> 11
ucagacuacc 10

<210> 12
< 211> 23
< 212> ARN
15 < 213> Artificial

<220>
< 223> hsa-miR-199a-5p

<400> 12
cccaguguuc agacuaccug uuc 23

20 <210> 13
< 211> 22
< 212> ARN
< 213> Artificial

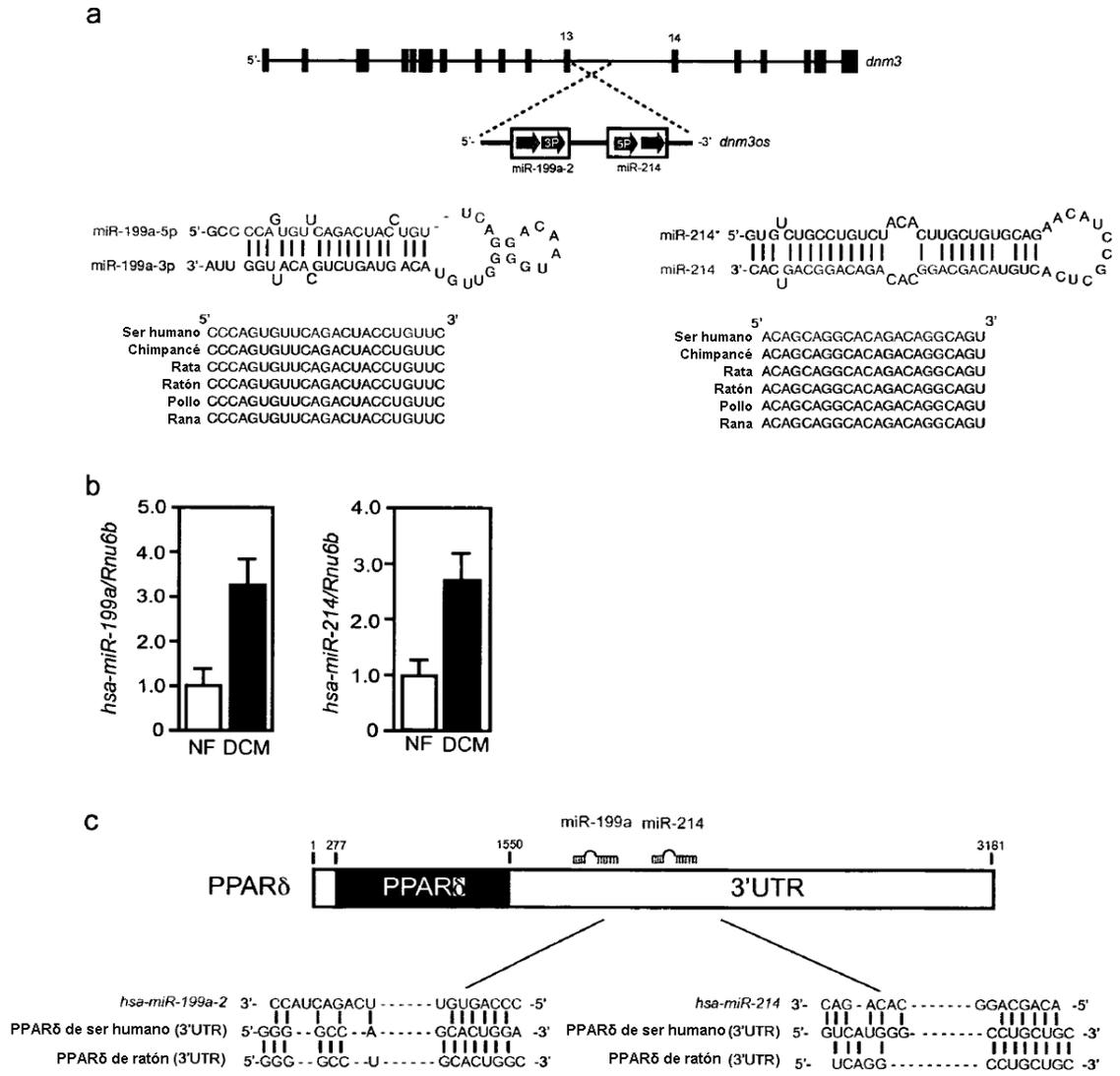
<220>
25 < 223> hsa-miR-214

<400> 13
acagcaggca cagacaggca gu 22

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con el complemento de un ácido nucleico que comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU, para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.
- 10 2.- Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con el complemento de un ácido nucleico que comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU, para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.
- 15 3.- Un vector para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el vector es un vector retroviral, adenoviral, viral adeno-asociado o lentiviral.
- 4.- Un vector para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en donde el vector comprende un promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, en donde el promotor está enlazado de modo operativo a una secuencia de ácidos nucleicos capaz de aumentar la expresión, cantidad o actividad de PPAR δ .
- 20 5.- Un vector para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula de mamífero es una célula del miocardio.
- 25 6.- Una célula aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 19 nucleótidos con una identidad de la secuencia de al menos el 90% con el complemento de un ácido nucleico que comprende al menos 19 nucleótidos consecutivos de la secuencia ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU, para uso en el tratamiento, disminución, demora y/o prevención de una enfermedad del corazón.
- 7.- Una célula aislada para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la célula es una célula de mamífero.
- 30 8.- Una célula aislada para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde la célula es una célula del miocardio.
- 35 9.- Un ácido nucleico para uso de acuerdo con la reivindicación 1, un vector para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 o una célula aislada para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde dicha enfermedad del corazón se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad cardíaca hipertrófica, insuficiencia cardíaca, una afección después de isquemia del corazón, diabetes, hipertensión y una enfermedad del corazón congénita de brote temprano o tardío.
- 40 10.- Un método *in vitro* para determinar si un compuesto candidato es capaz de contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón, que comprende los pasos de:
- poner en contacto dicho compuesto candidato con una célula aislada y/o un animal de ensayo no humano con una expresión incrementada de miR-214 (ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU),
 - medir un valor que refleje la expresión, cantidad y/o actividad de PPAR δ ,
 - comparar dicho valor con el valor correspondiente de una célula o animal de ensayo no humano no expuesto a
- 45 dicho compuesto candidato, en donde una expresión, cantidad y/o actividad incrementada de PPAR δ con relación a dicha célula o animal no humano no expuesto a dicho compuesto candidato, indica que dicho compuesto candidato es capaz de contrarrestar, demorar y/o prevenir una enfermedad del corazón.

Figura 1



**Figura 1,
continuación**

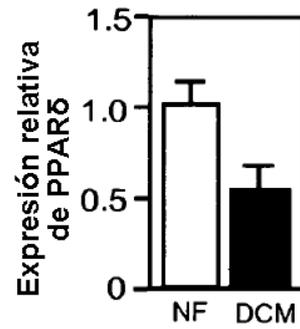
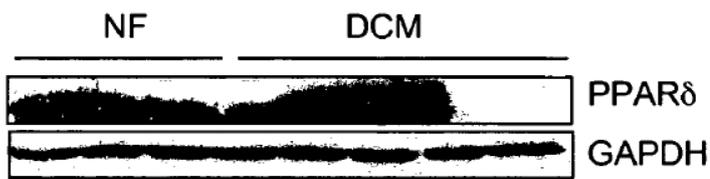
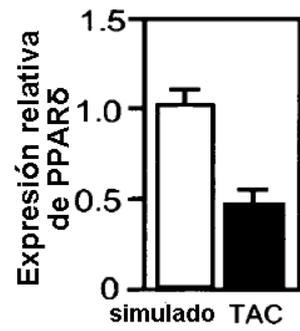
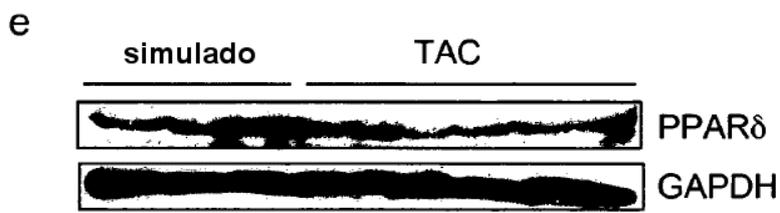
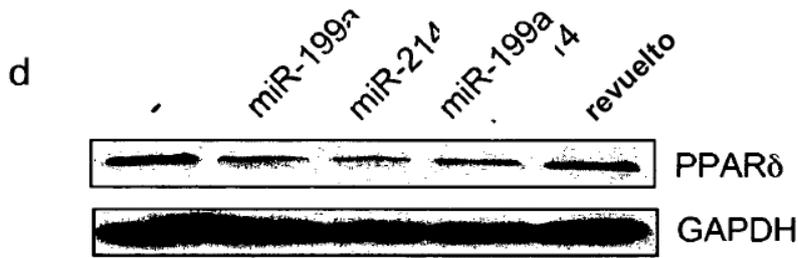


Figura 2

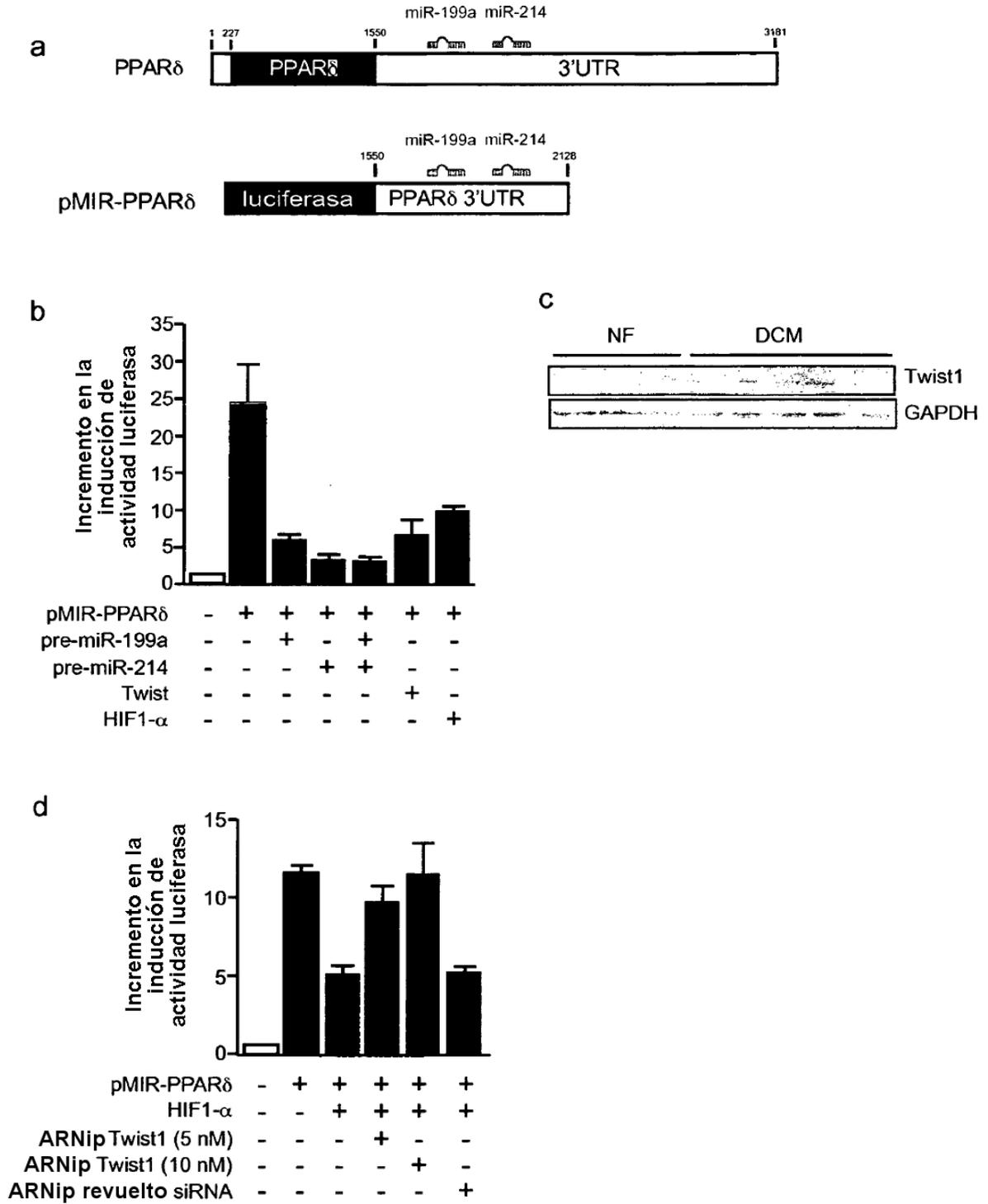


Figura 3

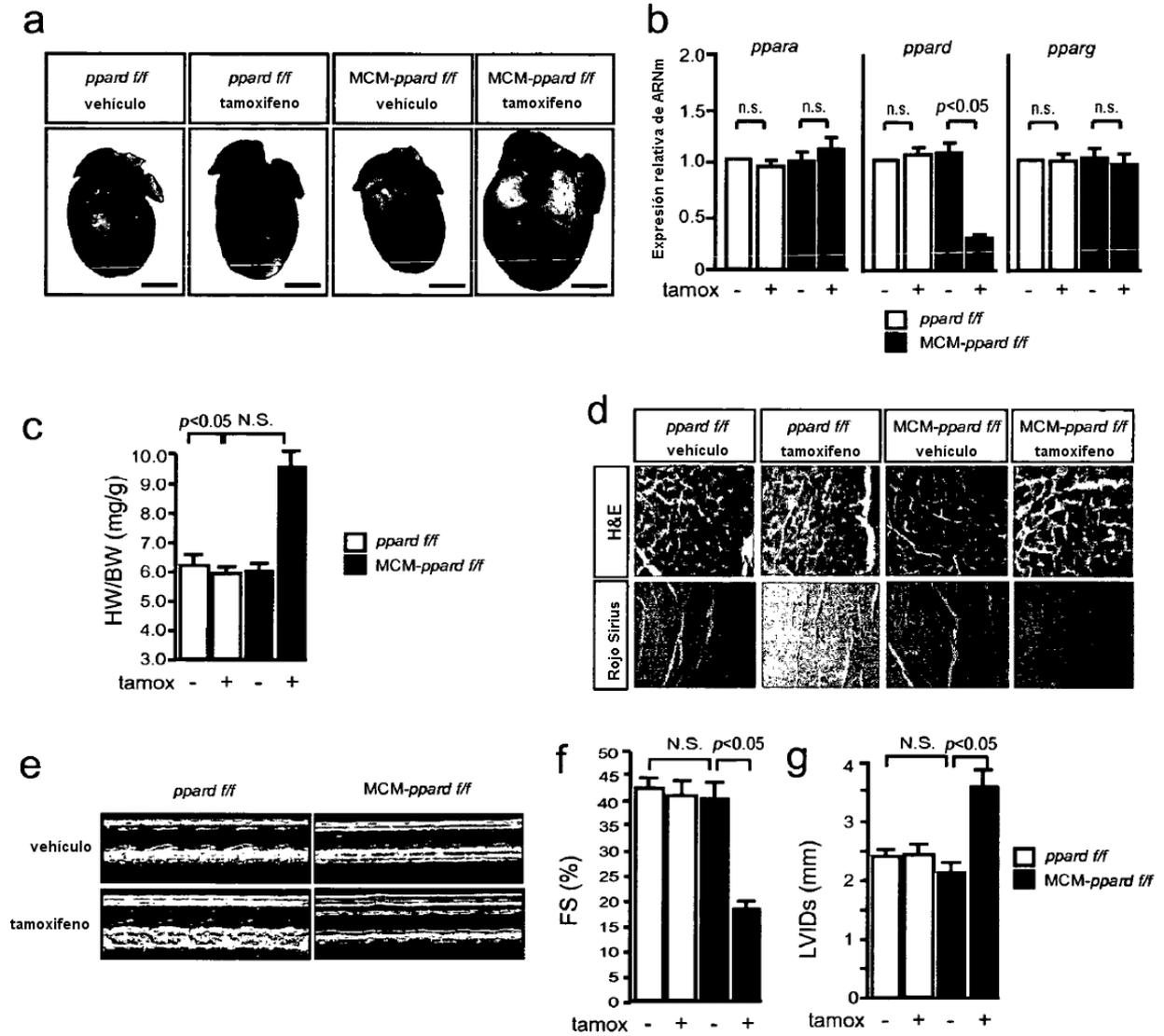


Figura 4

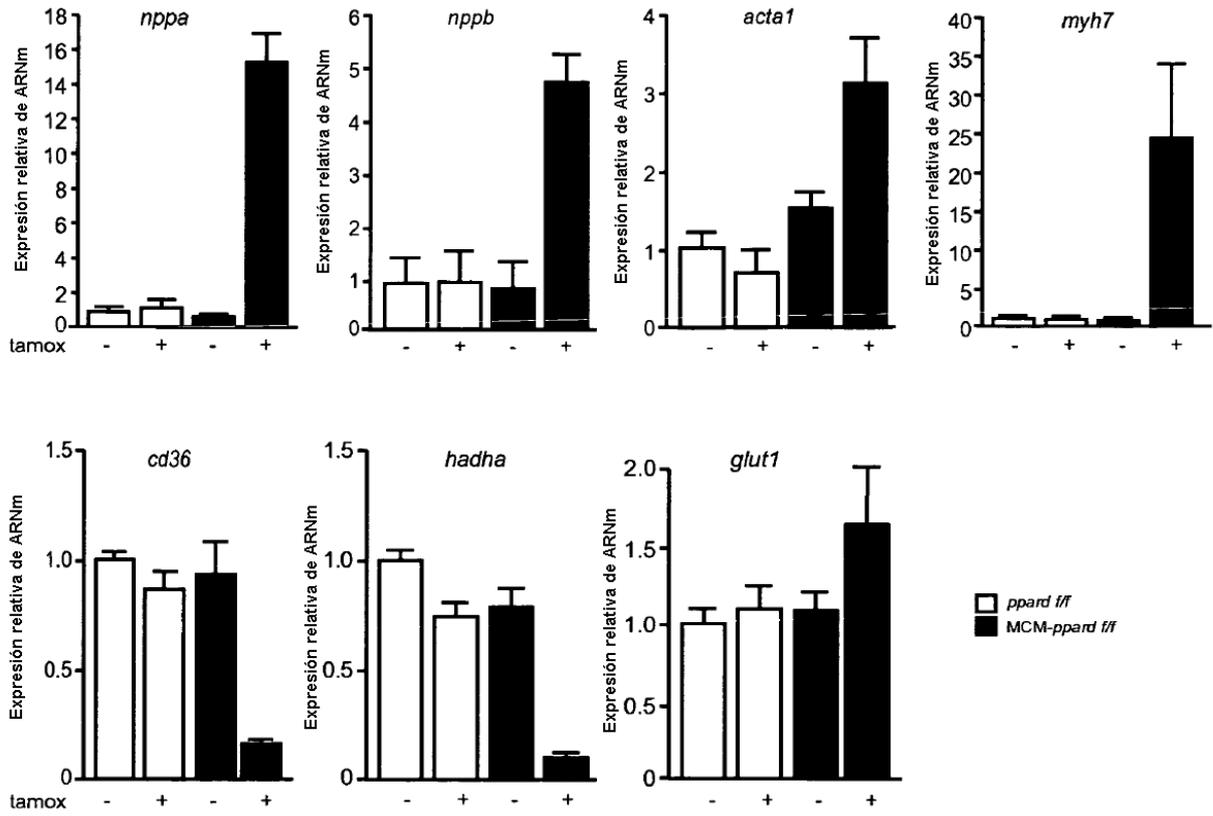


Figura 5

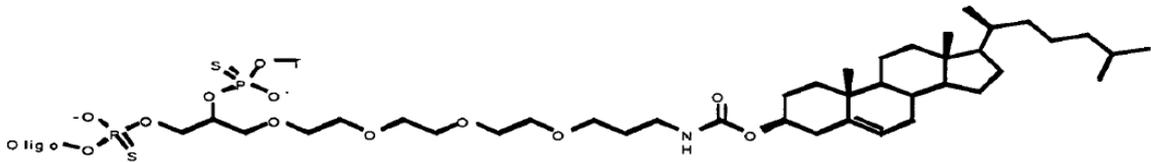
a

Secuencia de hsa-miR-199a-5p:

5'- CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC -3'

Antagomir capaz de bloquear hsa-miR-199a

5'- G*A*ACAGGUAGUCUGAACACU*G*G*G*Chol*T -3'



b

Secuencia de hsa-miR-214:

5'- ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU-3'

Antagomir capaz de bloquear hsa-miR-214

5'- A*C*UGCCUGUCUGUGCCUGC*U*G*U*Chol*T -3'

