

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 161**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61F 2/07 (2013.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2008 PCT/US2008/071839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2009 WO09018493**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2008 E 08797006 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2182969**

54 Título: **Familia de micro-ARN que modula la fibrosis y usos de la misma**

30 Prioridad:

31.07.2007 US 952917 P
16.10.2007 US 980303 P
22.04.2008 US 47014 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 621 161 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

Familia de micro-ARN que modula la fibrosis y usos de la misma

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la biología del desarrollo y la biología molecular. Más particularmente, se refiere a la regulación génica y la fisiología celular en fibroblastos por parte de la familia miR-29. Esta familia de miARN desempeña un papel importante en el depósito de colágeno, particularmente en el depósito de colágeno mediada por fibroblastos.

Antecedentes de la invención

15 La cardiopatía y sus manifestaciones, incluyendo la cardiopatía coronaria, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardiaca congestiva y la hipertrofia cardiaca, representan un riesgo sanitario evidente e importante en Estados Unidos hoy en día. El coste de diagnosticar, tratar y mantener a los pacientes que padecen estas enfermedades está en el rango de los miles de millones de dólares. Dos manifestaciones particularmente graves de la cardiopatía son el infarto de miocardio y la hipertrofia cardiaca. Con respecto al infarto de miocardio, normalmente se produce una oclusión coronaria trombocítica aguda en una arteria coronaria como resultado de la aterosclerosis y provoca la muerte de células miocárdicas. Dado que los cardiomiocitos, las células del músculo cardiaco, están diferenciados de manera terminal y generalmente no pueden experimentar división celular, se reemplazan generalmente por tejido cicatricial cuando mueren durante el transcurso de un infarto de miocardio agudo. El tejido cicatricial no es contráctil, no puede contribuir a la función cardiaca y, a menudo, desempeña un papel perjudicial en la función cardiaca al expandirse durante la contracción cardiaca, o al aumentar el tamaño y el radio eficaz del ventrículo, por ejemplo, volviéndose hipertrófico. Aunque se requiere un depósito de colágeno inicial para la curación del infarto y para prevenir la ruptura cardiaca, la producción continua de colágeno por fibroblastos induce fibrosis intersticial que rodea a los miocitos en la zona limítrofe del infarto y el miocardio remoto del corazón infartado. Esta fibrosis induce rigidez, disfunción diastólica e hipertrofia de cardiomiocitos debido al aumento del estrés y también puede conducir a arritmias.

35 La hipertrofia cardiaca es una respuesta adaptativa del corazón a prácticamente todas las formas de enfermedad cardiaca, incluyendo las que surgen de la hipertensión, la carga mecánica, el infarto de miocardio, las arritmias cardiacas, los trastornos endocrinos y las mutaciones genéticas en genes de proteínas contráctiles cardiacas. Aunque la respuesta hipertrófica es, inicialmente, un mecanismo compensatorio que aumenta el gasto cardiaco, la hipertrofia sostenida puede provocar cardiomiopatía dilatada (CPD), insuficiencia cardiaca y muerte súbita. En Estados Unidos, aproximadamente medio millón de individuos reciben un diagnóstico de insuficiencia cardiaca cada año, con una tasa de mortalidad que se aproxima al 50 %. Las causas y los efectos de la hipertrofia cardiaca se han documentado extensamente, pero el mecanismo molecular subyacente no se ha dilucidado. La comprensión de estos mecanismos es un problema importante en la prevención y el tratamiento de la enfermedad cardiaca y será crucial como modalidad terapéutica en el diseño de nuevos fármacos que tengan específicamente como diana la hipertrofia cardiaca y la insuficiencia cardiaca.

45 El tratamiento con agentes farmacológicos representa el mecanismo primario para reducir o eliminar las manifestaciones de la insuficiencia cardiaca. Los diuréticos constituyen la primera línea de tratamiento para insuficiencia cardiaca leve a moderada. Si los diuréticos no son eficaces, pueden usarse agentes vasodilatadores, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, enalapril y lisinopril) o terapia con agentes inotrópicos (es decir, un fármaco que mejora el gasto cardiaco aumentando la fuerza de contracción del músculo miocárdico). Desafortunadamente, muchas de estas terapias convencionales tienen numerosos efectos adversos y están contraindicadas en algunos pacientes. Por tanto, los agentes farmacológicos usados actualmente tienen deficiencias graves en poblaciones de pacientes particulares. La disponibilidad de nuevos agentes que sean seguros y eficaces beneficiaría sin duda a los pacientes que, o bien no pueden usar las modalidades farmacológicas actualmente disponibles, o bien no reciben un alivio adecuado con estas modalidades.

55 Los miocitos cardiacos están rodeados normalmente por una fina red de fibras de colágeno. En respuesta a estrés patológico, los fibroblastos cardiacos y las proteínas de la matriz extracelular se acumulan de manera desproporcionada y excesiva. La fibrosis miocárdica, una característica de todas las formas de hipertrofia patológica, conduce a rigidez mecánica, que contribuye a la disfunción contráctil (Abraham *et al.*, 2002). Otra característica distintiva de la hipertrofia patológica y de la insuficiencia cardiaca es la reactivación de un conjunto de genes cardiacos fetales, incluyendo los que codifican para el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético de tipo B (BNP) y las isoformas fetales de proteínas contráctiles, tales como la cadena pesada de miosina β (MHC) y actina α esqueléticas. Estos genes se reprimen normalmente tras el nacimiento y se reemplazan por la expresión de un conjunto de genes cardiacos adultos (McKinsey y Olson, 2005). Las consecuencias de la expresión génica fetal sobre la remodelación y función cardiaca (por ejemplo, fibrosis) no se entienden completamente. Sin embargo, la regulación por incremento de β -MHC, una ATPasa lenta, y la regulación por disminución de α -MHC, una ATPasa de

contracción rápida, en respuesta al estrés, se han implicado en la disminución de la función cardiaca (Bartel, 2004) y se sabe que el BNP desempeña un papel dominante en la fibrosis cardiaca.

Además de la fibrosis cardiaca, hay varios trastornos o estados que están asociados a la fibrosis de diversos tejidos. La fibrosis hepática congénita, una enfermedad autosómica recesiva, es una enfermedad genética poco común que afecta tanto al hígado como a los riñones. La enfermedad se caracteriza por anomalías hepáticas, tales como hepatomegalia, hipertensión portal y tejido conjuntivo de tipo fibroso que se extiende por todo el hígado (fibrosis hepática). La fibrosis pulmonar, o cicatrización del pulmón, resulta del reemplazo gradual de los sacos aéreos pulmonares normales por tejido fibrótico. Cuando se forma la cicatriz, el tejido se vuelve más grueso, provocando una pérdida irreversible de la capacidad del tejido para transferir oxígeno al torrente sanguíneo. La teoría más actual es que el proceso fibrótico que se produce en el tejido pulmonar es una reacción (predispuesta por la genética) a una lesión microscópica en el pulmón. Aunque la causa exacta sigue sin conocerse, se ha relacionado con contaminantes ocupacionales y ambientales inhalados, tabaquismo, enfermedades tales como esclerodermia, artritis reumatoide, lupus y sarcoidosis, determinados medicamentos y radioterapia.

La esclerodermia es una enfermedad crónica caracterizada por depósitos excesivos de colágeno en la piel u otros órganos. El tipo localizado de la enfermedad, aunque incapacitante, tiende a no ser mortal. El tipo sistémico o esclerosis sistémica, que es el tipo generalizado de la enfermedad, puede ser mortal como resultado de un daño cardiaco, renal, pulmonar o intestinal. La esclerodermia afecta a la piel y, en casos más graves, puede afectar a los vasos sanguíneos y a los órganos internos.

La fibrosis muscular esquelética es un fenómeno que se produce frecuentemente en músculo enfermo o dañado. Se caracteriza por el crecimiento excesivo del tejido fibroso que habitualmente resulta del intento del organismo de recuperarse de la lesión. La fibrosis altera la función muscular y provoca debilidad. El grado de pérdida de función muscular aumenta generalmente con la extensión de la fibrosis. Las víctimas de distrofias musculares, particularmente de la distrofia muscular de Becker (DMB) y de la manifestación alélica más gravemente penetrante, la distrofia muscular de Duchenne (DMD), padecen frecuentemente fibrosis muscular esquelética creciente a medida que avanza la enfermedad. Se sabe que otras afecciones tales como atrofia por denervación producen fibrosis muscular esquelética, así como enfermedades neuromusculares, tales como polineuritis aguda, poliomielitis, enfermedad de Werdnig/Hoffman, esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig) y enfermedad de atrofia bulbar progresiva.

Recientemente se ha implicado a los microARN en varios procesos biológicos, incluyendo la regulación del calendario de desarrollo, la apoptosis, el metabolismo de las grasas y la diferenciación de células hematopoyéticas, entre otros. Los microARN (miR) son ARN pequeños, que no codifican para proteínas de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud que se obtienen a partir de miARN individuales, de intrones de genes que codifican para proteínas o de transcritos policistrónicos que codifican a menudo para múltiples miARN estrechamente relacionados. Véase la revisión de Carrington *et al.* (2003). Los miR actúan como represores de ARNm diana promoviendo su degradación, cuando sus secuencias son perfectamente complementarias, o inhibiendo la traducción, cuando sus secuencias contienen apareamientos erróneos.

Los miARN se transcriben por la ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III; véase Qi *et al.* (2006) Cellular & Molecular Immunology vol. 3:411-419) y surgen de transcritos iniciales, denominados transcritos de miARN primarios (pri-miARN), que generalmente tienen varios miles de bases de longitud. Los pri-miARN se procesan en el núcleo por la ARNasa Drosha para dar precursores con forma de horquilla de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 nucleótidos (pre-miARN). Tras el transporte al citoplasma, el pre-miARN en horquilla se procesa adicionalmente por Dicer para producir un miARN bicatenario. La hebra de miARN madura se incorpora entonces al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en donde se asocia a sus ARNm diana mediante complementariedad de pares de bases. En los casos relativamente poco comunes en los que una base de miARN se aparea perfectamente con una diana de ARNm, promueve la degradación del ARNm. Más comúnmente, los miARN forman heterodúplex imperfectos con ARNm diana, afectando a la estabilidad del ARNm o inhibiendo la traducción del ARNm.

La parte del extremo 5' de un miARN que abarca las bases 2-8, denominada la región "simiente", es especialmente importante para el reconocimiento de la diana (Krenz y Robbins, 2004; Kiriazis y Krania, 2000). La secuencia de la simiente, junto con la conservación filogenética de la secuencia diana, constituyen la base de muchos modelos de predicción de dianas actuales. Aunque se dispone de enfoques computacionales cada vez más sofisticados para predecir los miARN y sus dianas, la predicción de dianas sigue siendo un desafío importante y requiere validación experimental. La atribución de las funciones de los miARN a la regulación de dianas de ARNm específicas se complica aún más por la capacidad de los miARN individuales de producir apareamiento de bases con cientos de posibles dianas de ARNm de alta y baja afinidad y por el direccionamiento de múltiples miARN a ARNm individuales.

El documento WO 2008/043521 se refiere a un micro-ARN para el diagnóstico y tratamiento de cardiopatías.

El documento WO 2008/016924 se refiere a la identificación de un micro-ARN que activa la expresión de cadena pesada de miosina beta.

El documento WO 2007/070483 se refiere a micro-ARN que regulan la proliferación y diferenciación de células musculares.

5 Mott JL *et al.* (Oncogene, vol. 26, n.º 42, 12 de abril de 2007, páginas 6133-6140) se refiere a la regulación por mir-29 de la apoptosis y expresión de proteína Mcl-1.

10 A. He *et al.* (Molecular Endocrinology, vol. 21, n.º 11, 24 de julio de 2007, páginas 2785-2794) se refiere a la sobreexpresión de micro-ácido ribonucleico 29, altamente regulado por incremento en ratas diabéticas, que provoca resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1.

El documento WO 2005/013901 se refiere a compuestos oligoméricos y composiciones para su uso en la modulación de ARN no codificantes pequeños.

15 La mejora de la comprensión de las funciones de los miARN revelará, sin duda, redes regulatorias que contribuyen al normal desarrollo, diferenciación, comunicación inter e intracelular, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, y muchos otros procesos celulares. Recientemente, los inventores informaron de un microARN específico cardiaco, miR-208, que está codificado por un intrón del gen de cadena pesada de miosina α (MHC) y que es necesario para
20 la regulación por incremento de la expresión de β -MHC en respuesta al estrés cardiaco y para la represión de genes de músculo esquelético rápido en el corazón (véase la solicitud WO2008/016924 en tramitación junto con la presente). La presente invención amplía la implicación de microARN en el corazón, así como en otros tejidos.

Sumario de la invención

25 La presente invención se define, entre otros, mediante los siguientes puntos:

1. Un agonista de miR-29a-c para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de fibrosis tisular en un sujeto que lo necesita, en el que el agonista de miR-29a-c es un polinucleótido que comprende un pri-miARN, pre-miARN o secuencia madura de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c.
30

2. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 para su uso según el punto 1, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

35 3. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 o 2 para su uso según el punto 1 o 2, en el que el polinucleótido se expresa a partir de un vector de expresión.

4. El agonista de miR-29a-c según el punto 3 para su uso según el punto 3, en el que el vector de expresión es un vector de expresión viral.

40 5. El agonista de miR-29a-c según el punto 4 para su uso según el punto 4, en el que el vector de expresión viral es un vector de expresión adenoviral.

45 6. El agonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 1-5 para su uso según uno cualquiera de los puntos 1-5, en el que el agonista se formula para administración parenteral, oral, transdérmica, intradérmica, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, de liberación sostenida, liberación controlada, liberación retardada, por supositorio, por inhalación, por catéter o sublingual o para inyección directa en el tejido cardiaco.

50 7. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 para su uso según el punto 1, en el que dicha fibrosis tisular es fibrosis cardiaca, esclerodermia, fibrosis muscular esquelética, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis diabética.

8. El agonista de miR-29a-c según el punto 3 para su uso según el punto 3, en el que el polinucleótido está unido operativamente a un promotor específico de fibroblastos.

55 9. El agonista de miR-29a-c según cualquiera de los puntos 1 a 3 para su uso según uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que el polinucleótido es bicatenario.

10. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 o 2 para su uso según el punto 1 o 2, en el que el polinucleótido está conjugado con colesterol.
60

11. El agonista de miR-29a-c según el punto 2 para su uso según el punto 2, en el que el polinucleótido tiene de 18 a 25 nucleótidos de longitud.

65 12. El agonista de miR-29a-c según el punto 2 para su uso según el punto 2, en el que el polinucleótido tiene de 70 a 200 nucleótidos de longitud.

13. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 o 2 para su uso según el punto 1 o 2, en el que el polinucleótido comprende una o más modificaciones químicas.
- 5 14. El agonista de miR-29a-c según el punto 13 para su uso según el punto 13, en el que las modificaciones químicas se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos bloqueados, modificaciones de azúcares y modificaciones de la estructura principal.
- 10 15. El agonista de miR-29a-c según el punto 1 o 2 para su uso según el punto 1 o 2, en el que el polinucleótido se formula en un vehículo de administración de nanopartículas.
- 15 16. Un antagonista de miR-29a-c para su uso en un método para tratar tejido que comprende una herida, daño químico, daño por calor o daño por frío, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.
- 20 17. El antagonista según el punto 16 para su uso según el punto 16, en el que el oligonucleótido antisentido se formula para inyección en el tejido, inyección en la vasculatura que alimenta al tejido o aplicación tópica.
- 25 18. El antagonista de miR-29a-c según el punto 17 para su uso según el punto 17, en el que la formulación tópica es una pomada, una crema, un gel, un ungüento o un bálsamo.
- 30 19. Un antagonista de miR-29a-c para su uso en la prevención de infarto de miocardio convirtiendo una o más placas blandas en tejido fibrótico, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.
- 35 20. El antagonista de miR-29a-c según el punto 19 para su uso según el punto 19, en el que dicho oligonucleótido antisentido se formula para administración por catéter o como recubrimiento para una endoprótesis o un balón.
- 40 21. El antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 20 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 20, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 45 22. El antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 20 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 20, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria al 100% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 50 23. El antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 20 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 20, en el que el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 95% a una secuencia de pre-miR-29a, pre-miR-29b o pre-miR-29c.
- 55 24. El antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 23 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 23, en el que dicho oligonucleótido antisentido tiene de 15 a 50 nucleótidos de longitud.
- 60 25. Un antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 23 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 23, en el que el oligonucleótido antisentido tiene de 19 a 25 nucleótidos de longitud.
- 65 26. El antagonista de miR-29a-c según uno cualquiera de los puntos 16 a 25 para su uso según uno cualquiera de los puntos 16 a 25, en el que el oligonucleótido antisentido comprende al menos una modificación de un azúcar y/o de la estructura principal.
27. El antagonista de miR-29a-c según el punto 26 para su uso según el punto 26, en el que dicha modificación de al menos un azúcar es una modificación 2'-O-alkilo o una modificación de un ácido nucleico bloqueado.
28. El antagonista de miR-29a-c según el punto 26 para su uso según el punto 26, en el que la modificación de la estructura principal es una unión fosforotioato.
29. Un dispositivo médico usado en cirugía vascular recubierto con al menos un antagonista de miR-29a-c, en el que dicho antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido o antagomir que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c, y en el que el recubrimiento comprende además un compuesto anti-reestenosis seleccionado de paclitaxel, rapamicina, tacrolimús, zotarolimús, everolimús, docetaxel y pimecrolimús.
30. El dispositivo médico del punto 29, en el que el dispositivo médico es una endoprótesis o un balón.
31. El dispositivo médico del punto 29 o 30, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido o antagomir

que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

5 32. El dispositivo médico del punto 29 o 30, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido o antagomir que comprende una secuencia que es complementaria al 100% a una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

10 33. El dispositivo médico de uno cualquiera de los puntos 29-32, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido que comprende al menos una modificación de un azúcar y/o de la estructura principal.

34. El dispositivo médico de uno cualquiera de los puntos 29-33, en el que el oligonucleótido antisentido o antagomir tiene de 19 a 25 nucleótidos de longitud.

15 35. Una formulación cosmética que comprende un antagonista de miR-29a-c, en la que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

20 36. Un uso cosmético de un antagonista de miR-29a-c en una formulación cosmética para aplicaciones cosméticas de fotoenvejecimiento debido a daño solar de la piel, arrugas o marcas de estiramiento, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

25 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la familia miR-29, que se regula por disminución en el corazón en respuesta al estrés, regula el depósito de colágeno y el desarrollo de fibrosis, incluyendo fibrosis cardiaca. La regulación por incremento de la expresión o función de miR-29a-c da como resultado la disminución de expresión de genes de colágeno y fibrina que conducen a fibrosis cardiaca reducida. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento de la fibrosis cardiaca, la hipertrofia cardiaca o la insuficiencia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende identificar un sujeto que tiene fibrosis cardiaca, hipertrofia cardiaca o insuficiencia cardiaca; y administrar a dicho sujeto un agonista de la expresión o función de miR-29a-c. En una realización según los puntos anteriores, el agonista de miR-29a-c es un polinucleótido que comprende la secuencia madura de miR-29a, miR-29b, miR-29c, o combinaciones de los mismos. El agonista de miR-29a-c puede administrarse mediante administración parenteral (por ejemplo, intravenosa o subcutánea), oral, transdérmica, de liberación sostenida, liberación controlada, liberación retardada, por supositorio, por catéter o sublingual. En otro caso, el método comprende además administrar al sujeto una segunda terapia. La segunda terapia se selecciona del grupo que consiste en un betabloqueante, un ionótropro, un diurético, ACE-I, un antagonista de AII, BNP, un bloqueante de Ca⁺⁺, un antagonista del receptor de endotelina y un inhibidor de HDAC.

40 La presente memoria descriptiva también proporciona un método de prevención de la hipertrofia patológica o la insuficiencia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende identificar un sujeto en riesgo de desarrollar hipertrofia cardiaca patológica o insuficiencia cardiaca; y promover la expresión o actividad de miR-29a-c en células cardiacas de dicho sujeto. En una realización, la promoción de la expresión o actividad de miR-29a-c comprende administrar a las células cardiacas de un agonista de miR-29a-c o un vector de expresión que codifica para miR-29a-c. En otra realización, el sujeto en riesgo presenta uno o más factores de riesgo seleccionados del grupo que consiste en hipertensión no controlada prolongada, enfermedad valvular no corregida, angina crónica, infarto de miocardio reciente, predisposición congénita a cardiopatía e hipertrofia patológica. En otra realización, al sujeto en riesgo se le ha diagnosticado una predisposición genética a hipertrofia cardiaca. En todavía otra realización, el sujeto en riesgo tiene antecedentes familiares de hipertrofia cardiaca

50 La presente memoria descriptiva también describe un mamífero transgénico, no humano, cuyas células no pueden expresar un miR-29a, miR29b y/o miR29c funcional. En otra realización, la invención proporciona un mamífero transgénico, no humano, cuyas células comprenden una región que codifica para miR-29a-c bajo el control de un promotor heterólogo activo en las células de dicho mamífero no humano. El mamífero transgénico puede ser un ratón.

55 En un caso, la presente memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento del infarto de miocardio en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o actividad de miR-29a-c en las células cardiacas de dicho sujeto. En otro caso, la presente memoria descriptiva proporciona un método de prevención de la hipertrofia cardiaca y la cardiomiopatía dilatada en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o actividad de miR-29a-c en las células cardiacas de dicho sujeto. En otro caso, la presente memoria descriptiva proporciona un método de inhibición de la progresión de la hipertrofia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o actividad de miR-29a-c en las células cardiacas de dicho sujeto.

65 La presente memoria descriptiva también contempla un método de tratamiento o prevención de una fibrosis tisular en un sujeto que comprende identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener fibrosis tisular; y aumentar la expresión y/o actividad de miR-29a-c en las células de fibroblastos o de músculo esquelético del sujeto. La fibrosis tisular puede ser fibrosis cardiaca, esclerodermia, fibrosis muscular esquelética, fibrosis hepática, fibrosis renal,

fibrosis pulmonar o fibrosis diabética. En algunos casos, aumentar la expresión y/o actividad de miR-29a-c comprende administrar un agonista de miR-29a-c al sujeto. Un agonista de miR-29a-c puede ser un polinucleótido que comprende la secuencia de una secuencia madura de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c. El agonista de miR-29a-c también puede ser un vector de expresión que codifica para miR-29a, miR-29b y/o miR-29c. En un caso, el método comprende además administrar una terapia antifibrótica distinta de miR-29a-c al sujeto.

La presente memoria descriptiva también proporciona un método para identificar un modulador de miR-29a-c que comprende poner en contacto una célula con un compuesto candidato; evaluar la actividad o expresión de miR-29a-c; y comparar la actividad o expresión en la etapa (b) con la actividad o expresión de miR-29a-c en ausencia del compuesto candidato, en el que una diferencia entre las actividades o expresiones medidas de miR-29a-c indica que el compuesto candidato es un modulador de miR-29. La célula puede ponerse en contacto con el compuesto candidato *in vitro* o *in vivo*. Los compuestos candidatos adecuados incluyen proteínas, péptidos, polipéptidos, polinucleótidos, oligonucleótidos o moléculas pequeñas.

La presente invención también abarca una composición farmacéutica que comprende un agonista o antagonista de miR-29a-c. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse para administración por inyección o tópica. La formulación para administración tópica puede ser un gel, una crema, una loción o una pomada.

La presente memoria descriptiva proporciona un método de inducción del depósito de colágeno en un tejido que comprende poner en contacto dicho tejido con un antagonista de miR-29a-c. El antagonista puede ser un antagonista de miR-29a, miR-29b o miR-29c. El antagonista puede ser un antagomir de miR-29a-c, un oligonucleótido antisentido que tiene como diana una secuencia de miR-29a-c madura o una molécula de ARN inhibidor, tal como un ARNip o ARNhp, que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de miR-29a-c madura, o un ribozima u otro ácido nucleico inhibidor. En un caso, el método comprende además poner en contacto dicho tejido con un segundo agente. El segundo agente puede ser vitamina A tópica, vitamina C tópica o vitamina E. En otro caso, el método comprende además someter dicho tejido a un segundo tratamiento, tal como una exfoliación química, tratamiento con láser, dermoaplanamiento o dermoabrasión. En otro caso, el tejido está en un sujeto que padece síndrome de Ehler-Danlos o deficiencia de vitamina C.

Breve descripción de los dibujos

La invención puede entenderse mejor mediante la referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Figuras 1A-B. miR-208 está codificado por el gen de α -MHC y se expresa específicamente en el corazón. (Figura 1A) miR-208 se codifica dentro de un intrón del gen de α -MHC. Los asteriscos indican conservación de la secuencia (SEQ ID NO: 1-5). (Figura 1B) Detección de transcritos de miR-208 mediante análisis de tipo Northern de tejidos de ratón adulto. ARNm U6 sirve como control de carga.

Figuras 2A-B. Regulación de α - y β -MHC. (Figura 2A) Regulación del cambio de clase por hormona tiroidea y TRE. (Figura 2B) Modelo para estrés/hipotiroidismo en el cambio de contractilidad de fibras musculares de rápida a lenta.

Figura 3. Detección de miR-208 en corazón humano. Se detectaron transcritos para α -MHC y miR-208 mediante transferencia de tipo Northern de tejido cardíaco de seis individuos normales y seis individuos con cardiomiopatía idiopática. Existe una estrecha correlación entre el nivel de expresión de α -MHC y pre-miR-208, mientras que se mantiene la expresión de miR-208 maduro tras haberse regulado por disminución este último.

Figuras 4A-B. Generación de ratones mutantes para miR-208. (Figura 4A) Estrategia para generar ratones mutantes para miR-208 mediante recombinación homóloga. Se reemplazó la secuencia de pre-miARN (ubicada dentro del intrón 29 del gen de α -MHC de ratón en la mayoría de los transcritos) por un casete de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP. Se eliminó el casete de neomicina en la línea germinal de ratón cruzando ratones heterocigotos con ratones transgénicos que albergan el transgén CAG-Cre. (Figura 4B) Detección de transcritos de miR-208 mediante análisis de tipo Northern de corazones de ratones de tipo natural y mutantes para miR-208.

Figura 5. Análisis de tipo Western de los niveles de proteína α -MHC y β -MHC en corazones de ratones neonatos de los genotipos indicados. Se analizaron dos ratones de cada genotipo. Se detectó GAPDH como control de carga.

Figura 6. Ratones MiR-208^{-/-} muestran hipertrofia cardíaca reducida en respuesta a sobrecarga de presión. Secciones histológicas de corazones de ratones de tipo natural y miR-208^{-/-} teñidas con tinción tricrómica de Masson. La ausencia de miR-208 disminuye la hipertrofia y la fibrosis observadas en ratones de tipo natural sometidos a bandeado aórtico torácico (TAB) durante 21 días. La barra de escala es igual a 2 mm para el panel superior y a 20 μ m para el panel inferior.

Figura 7. Ratones MiR-208^{-/-} muestran hipertrofia cardíaca reducida en respuesta a activación con calcineurina.

Secciones histológicas de corazones de ratones de 6 semanas de edad que expresan un transgén de calcineurina (CnA-Tg) y corazones de miR-208^{-/-}; CnA-Tg teñidas con tinción tricrómica de Masson. La ausencia de miR-208 disminuye la hipertrofia y la fibrosis observadas en ratones CnA-Tg. Barra de escala = 2 mm para el panel superior, 20 μm para el panel inferior.

5 Figura 8. Ratones Mir-208^{-/-} no pueden regular por incremento β-MHC en respuesta a TAB y activación con calcineurina.

10 Figura 9. Análisis de tipo Western de los niveles de proteína α- y β-MHC en animales adultos de tipo natural y transgénicos para miR-208. Se detectó GAPDH como control de carga.

Figura 10. Ratones miR-208^{-/-} no pueden regular por incremento β-MHC en respuesta a hipotiroidismo con tratamiento con PTU.

15 Figura 11. Diagrama esquemático del papel de miR-208 en el control de la expresión de β-MHC.

Figura 12. Diagrama esquemático del papel de miR-208 en la regulación de β-MHC y la expresión de genes de músculo esquelético rápido por medio de Thrap1.

20 Figura 13. Mecanismos de acción de microARN durante la hipertrofia cardiaca.

Figuras 14A-C. Expresión de miARN durante la remodelación e hipertrofia cardiaca. (Figura 14A) Secciones teñidas con H&E de corazones representativos de ratones tras simulación y TAB durante 21 días y de ratones con CnA Tg. La barra de escala es igual a 2 mm. (Figura 14B) Diagramas de Venn que muestran el número de microARN cuya expresión cambiaba para cada tipo de corazón. (Figura 14C) Transferencia de tipo Northern de microARN cuya expresión cambiaba durante la hipertrofia. Se detectó ARN U6 como control de carga.

25 Figura 15. La expresión de miR-29a-c se regula por disminución en respuesta al estrés cardiaco. A la izquierda se muestran corazones de ratones de tipo natural (WT) y ratones con hipertrofia y fibrosis inducida por un transgén de calcineurina (CnA) o TAB. El nivel relativo de expresión de miR-29a-c de cada tipo de corazón se muestra a la derecha.

30 Figura 16. Análisis de microarrays de corazones de ratones desactivados para miR-208 en comparación con ratones de tipo natural. Se realizó el análisis de microarrays sobre ARNm aislado de corazones de tipo natural y nulos para miR-208 a las 6 semanas de edad. El miARN que experimenta mayor regulación por disminución, después de miR-208, es miR-499.

Figura 17. La familia miR-29 experimenta una drástica regulación por incremento en corazones nulos para miR-208.

40 Figura 18. La familia miR-29 tiene como diana los ARNm que codifican para colágenos y otros componentes de la matriz extracelular implicados en la fibrosis. Basándose en su alta homología de secuencia, la familia miR-29 consiste en 4 miembros; miR-29a, miR29b-1 y -2 y miR-29c. Se muestran las secuencias de los miARN maduros (SEQ ID NO: 18-20). Las secuencias maduras de miR-29b-1 y miR-29b-2 son idénticas. De forma conjunta, esta familia se dirige contra muchos componentes de la matriz extracelular implicados en la fibrosis.

45 Figura 19. Modelo para el control de la fibrosis cardiaca mediante la familia miR-208 y miR-29. En un corazón normal, miR-208 inhibe la expresión de miR-29a-c. En ausencia de miR-208, la expresión de miR-29a-c está regulada por incremento, impidiendo la expresión de matriz extracelular y fibrosis en respuesta al estrés. Las funciones de miR-208, miR-499 y miR-29 están interconectadas. La pérdida de miR-208 puede ser cardioprotectora al impedir la expresión de miR-499 y regular por incremento la expresión de miR-29a-c, con el consecuente bloqueo de la fibrosis.

50 Figuras 20A-D. miR-29a-c regula la expresión de proteínas de la matriz extracelular. (Figura 20A) Posibles sitios de unión para miR-29a-c en regiones UTR 3' de genes fibróticos clave. (Figura 20B) El análisis por PCR en tiempo real de genes diana predichos tanto en la zona limítrofe como en el miocardio remoto 3 días después de un infarto de miocardio muestra una disminución en miR-29a-c que se correlaciona con un aumento en los colágenos (COL1A1, COL1A2 y COL3A1) y fibrilina (FBN1), mientras que no hubo ningún cambio significativo en la elastina (ELN1). (Figura 20C) El análisis de transferencia de tipo Northern sobre células COS transfectadas con cantidades crecientes del plásmido de expresión de CMV que codifica para el cluster miR-29b-1/miR-29a muestra sobreexpresión eficaz de miR-29a-b. La banda superior corresponde al pre-miARN, mientras que la banda inferior corresponde al miARN maduro. (Figura 20D) Experimentos con luciferasa usando las secuencias de UTR endógenas de los genes diana predichos, que muestran que miR-29a-c reprime la expresión de luciferasa en respuesta a cantidades crecientes de miR-29a-c, mientras que esta disminución estaba ausente cuando se usa un miR no relacionado, miR-206.

65

Figuras 21A-B. Expresión de miR-29a-c sensible a TGF β . (Figura 21A) El análisis por PCR en tiempo real indica que los tres miembros de la familia miR-29 experimentan regulación por disminución en fibroblastos en respuesta a TGF β . (Figura 21B) Análisis de tipo Northern que muestra que la expresión de miR-29a-c se regula por incremento en animales mutantes para miR-208, lo que coincide con un aumento en la expresión de BNP, tal como se determina mediante PCR en tiempo real.

Figuras 22A-G. La inhibición de miR-29a-c induce fibrosis *in vivo*. (Figura 22A) Estructura química de anti-miR-29a-c y miR-29a-c con apareamiento erróneo (mm). (Figura 22B) Análisis de transferencia de tipo Northern que muestra la inactivación específica de tejido tras 3 días en respuesta a la inyección intravenosa de 80 mg/kg de anti-miR-29a-c o de miR-29a-c mm o un volumen comparable de solución salina. (Figura 22C) El análisis por PCR en tiempo real de extractos hepáticos indica un aumento pronunciado en la expresión de colágeno en respuesta a la inactivación de miR-29a-c, mientras que este efecto estaba ausente tras la inyección de solución salina o de miR-29a-c mm. (Figura 22D) La recogida de tejido, tres semanas después de la inyección intravenosa con 80 mg/kg en dos días consecutivos de oligonucleótido anti-miR-29a-c o miR-29a-c mm o de un volumen comparable de solución salina, indica una inactivación severa de miR-29a-c en corazón, hígado y riñón, mientras que los niveles de miR-29a-c en pulmones parecen no verse afectados. (Figura 22E) El análisis por PCR en tiempo real de extractos de corazón indica un aumento en la expresión de colágeno cardiaco en respuesta a la inactivación de miR-29a-c. (Figura 22F) Análisis por PCR en tiempo real que indica un aumento en la expresión de miR-29b en fibroblastos dos días después del tratamiento que imita a miR-29b, mientras que los niveles de miR-29a no cambiaron y los niveles de miR-29c sólo aumentaron ligeramente. (Figura 22G) La sobreexpresión de miR-29b en fibroblastos reprime la expresión de genes de colágeno, tal como se determina mediante análisis por PCR en tiempo real.

Figura 23. Expresión de miembros de la familia miR-29 en diversos tejidos en respuesta a la inactivación de miR-29b. La inactivación de todos los miembros de miR-29 en los diferentes tejidos indica que miR-29b muestra una reducción de 50 % en el corazón en respuesta a anti-miR-29b, mientras que miR-29a y -c sólo muestran cambios marginales. Sin embargo, la inactivación de miR-29b en hígado y riñón en respuesta a anti-miR-29b es casi completa, mientras que miR-29a y -c también parecen reducirse en estos tejidos en respuesta a anti-miR-29b.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

Los músculos esquelético y cardiaco responden a una variedad de estímulos fisiopatológicos tales como carga de trabajo, señalización de hormonas tiroideas y lesiones modulando la expresión de isoformas de miosina, que regulan la eficiencia de la contracción. Recientemente, los inventores informaron de un microARN específico cardiaco, miR-208, que está codificado por un intrón del gen de cadena pesada de α -miosina (MHC) y que es necesario para la regulación por incremento de la expresión de β -MHC en respuesta al estrés cardiaco y para la represión de genes de músculo esquelético rápido en el corazón (véase la solicitud WO2008/016924 en tramitación junto con la presente).

En el presente documento, los inventores amplían su trabajo anterior y muestran que miR-208 también regula por disminución una familia de miARN relacionados, miR-29a-c. Dado que miR-29a-c se expresan de manera ubicua, y están implicados en la regulación del depósito de colágeno, las estrategias para regular por incremento la expresión de miR-29a-c tienen aplicaciones en la prevención de una variedad de fibrosis tisulares incluyendo fibrosis cardiaca, así como fibrosis del músculo esquelético, de hígado, pulmonar, diabética y renal. La regulación de miR-29a-c en células cardiacas, tales como fibroblastos cardiacos, puede usarse para tratar o prevenir la hipertrofia cardiaca o la insuficiencia cardiaca en un sujeto. Por tanto, un aspecto de la invención es el agonismo de la expresión o actividad de miR-29a-c, opcionalmente en combinación con la inhibición de miR-208. El agonismo puede implicar la introducción de miR-29a-c exógeno en el corazón u otros tejidos de interés, ya sea directamente usando ácido nucleico desnudo o mediante un vehículo de suministro tal como un lípido/liposoma/nanopartícula, o a través de expresión génica, por ejemplo usando vectores adenovirales u otros medios de expresión ectópica para reducir la fibrosis. También se contempla la activación de la función antifibrótica de miR-29a-c a través de "moléculas pequeñas" farmacéuticas, así como cribados para identificar tales compuestos.

El aumento de colágeno que resulta tras la represión de la expresión de miR-29a-c, por ejemplo, tras un infarto de miocardio (IM) y otras formas de estrés, puede indicar otro papel para miR-29a-c. Otro punto de interés del trabajo de los inventores es la fibrosis cardiaca, y un examen de un subconjunto de genes reguladores clave, concretamente colágeno I, III, elastina y fibrilina, mostró un aumento notable tanto en colágenos como en fibrilina en respuesta a la regulación por disminución de miR-29a-c, mientras que no se produjo aumento en elastina. Así, la represión terapéutica de miR-29a-c para aumentar el depósito de colágeno representa una opción única para tratar estados caracterizados por la pérdida de colágeno, tales como aplicaciones cosméticas como y cicatrización.

MicroARN 29 (miR-29) es una familia de microARN que consiste en 4 miembros conocidos, miR-29a, b1 y 2 (idénticos) y c. Mientras que miR 29b-1 y 29a provienen del mismo transcrito que se origina a partir del cromosoma 7 en humanos y del cromosoma 6 en ratones, el cluster de miARN que contiene miR29b-2 y miR29c se transcribe a partir del cromosoma 1 en ambas especies. Las secuencias de miARN maduras para cada uno de los miembros de la familia miR-29 humana se enumeran a continuación:

hsa-miR-29a	uagcaccaucugaaucgguua	(SEQ ID NO: 18)
hsa-miR-29b-1 y b-2	uagcaccuuugaaucaguguu	(SEQ ID NO: 19)
hsa-miR-29c	uagcaccuuugaaucgguua	(SEQ ID NO: 20)

Estos microARN forman una familia basada en su homología de secuencia (Yu *et al.*; 2006). Dado que sólo existen diferencias menores entre los miembros de la familia, y que los miembros tienen una región simiente conservada al 100% (que ayuda a definir la determinación de la diana), es probable que tengan las mismas dianas de ARNm (figura 18) y que reduzcan la expresión génica de estos genes diana específicos. La determinación de la diana para la familia miR-29 reveló que la familia miR-29 muestra una alta preferencia por genes implicados en la formación de colágeno, así como por otras proteínas de la matriz extracelular, tales como elastina (ELN), fibrilina 1 (FBN1), colágeno tipo I $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (COL1A1, COL1A2), colágeno tipo III $\alpha 1$ (COL3A1), metalopeptidasas e integrinas. En respuesta al estrés patológico, los fibroblastos cardíacos y las proteínas de la matriz extracelular se acumulan de manera desproporcionada y excesiva. La fibrosis miocárdica, una característica de todas las formas de hipertrofia patológica, conduce a rigidez mecánica, que contribuye a la disfunción contráctil (Berk *et al.*, 2007). Puesto que la familia miR-29 se regula por disminución durante este proceso de remodelación, es probable que esta familia desempeñe un papel activo en la modulación del depósito de colágeno y, de ese modo, regule la fibrosis cardíaca y la contractibilidad cardíaca, lo que secundariamente puede inducir hipertrofia y remodelación patológica.

Tal como se comentó anteriormente, miR-208 parece regular la expresión de miR-29, ya que miR-29 experimenta una regulación por incremento significativa en los corazones de ratones que carecen de ambas copias de miR-208 (véase el ejemplo 1). Por tanto, la modulación de miR-208 puede afectar a la expresión de miR-29, así como a la expresión de genes diana de miR-29. MiR-208 es un miARN intrónico que se ubica dentro de un intrón del gen de α -MHC. La ubicación precisa del intrón depende de la especie particular y del transcrito específico. Por ejemplo, en humanos, miR-208 se codifica dentro del intrón n.º 28 del gen de α -MHC, mientras que en ratones, se codifica dentro del intrón n.º 29. Las secuencias codificantes de pre-miARN para miR-208 en humano, ratón, rata y cánido se proporcionan en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, respectivamente. La secuencia de miR-208 madura se proporciona en SEQ ID NO: 5. Al igual que α -MHC, miR-208 se expresa únicamente en el corazón (figura 1).

Pre-miR-208 humano (SEQ ID NO: 14)

acgggcgagc tttggccc ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

Pre-miR-208 de ratón (SEQ ID NO: 15)

acgggtgagc tttggccc ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

Pre-miR-208 de rata (SEQ ID NO: 16)

acgggtgagc tttggccc ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

Pre-miR-208 de cánido (SEQ ID NO: 17)

acgcatgagc tttggctcg ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct tgttggtcag a

Usando el algoritmo de PicTar para la identificación de dianas de miARN (Krek *et al.*, 2005), los inventores identificaron la proteína 1 asociada a receptor de hormona tiroidea (THRAP1) como diana predicha para miR-208. Las secuencias de UTR 3' de THRAP1 de humano, chimpancé, ratón, rata, cánido, pollo, pez globo y pez cebra se proporcionan en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, respectivamente.

UTR 3' de THRAP1 humana (SEQ ID NO: 6)

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aaaguugcag uagggguugc

UTR 3' de THRAP1 de chimpancé (SEQ ID NO: 7)

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag uagggguugc

UTR 3' de THRAP1 de ratón (SEQ ID NO: 8)

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag uagggguugc

UTR 3' de THRAP1 de rata (SEQ ID NO: 9)

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag uagggguugc

5 UTR 3' de THRAP1 de cánido (SEQ ID NO: 10)

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag uagggguugc

UTR 3' de THRAP1 de pollo (SEQ ID NO: 11)

10

uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag uagggguugc

UTR 3' de THRAP1 de pez globo (SEQ ID NO: 12)

15

uuccugcuuu aagcaauugg uugaaaauau auguauguaa uggucuuau uaaaaaaca aacuaagaca aa

UTR 3' de THRAP1 de pez cebra (SEQ ID NO: 13)

20

uuccugcuuu aaagcaauug gucuaaaaua uauguaaucg ucuucauuac aaaaacgaac caucaaagc

La presente memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento de la fibrosis cardiaca, la hipertrofia cardiaca o la insuficiencia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende identificar un sujeto que tiene fibrosis cardiaca, hipertrofia cardiaca o insuficiencia cardiaca; y administrar al sujeto un agonista de la función o expresión de miR-29. El agonista de miR-29 puede ser un agonista de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c.

25

En una realización, los agonistas de miR-29a-c pueden ser polinucleótidos que comprenden la secuencia de miR-29a-c madura. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. En otra realización, el agonista de miR-29a-c puede ser un polinucleótido que comprende la secuencia de pri-miARN o pre-miARN para miR-29a, miR-29b y/o miR-29c. El polinucleótido que comprende la secuencia madura de miR-29a-c, pre-miR-29ac o pri-miR-29a-c puede ser monocatenario o bicatenario. Los polinucleótidos pueden contener una o más modificaciones químicas, tales como ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos peptídicos, modificaciones de azúcares, tales como 2'-O-alquilo (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo), modificaciones 2'-fluoro y 4'-tio, y modificaciones de la estructura principal, tales como una o más uniones fosforotioato, morfolino o fosfonocarboxilato. En una realización, el polinucleótido que comprende una secuencia de miR-29a-c está conjugado con colesterol. Fuera del alcance de la invención, el agonista de miR-29a-c puede ser un agente distinto de miR-29a-c que actúa aumentando, complementando o reemplazando la función de miR-29a-c.

30

35

40

En otra realización, el agonista de miR-29a-c puede expresarse *in vivo* a partir de un vector. Un "vector" es una composición de materia que puede usarse para suministrar un ácido nucleico de interés al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados a compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector" incluye un plásmido o un virus de replicación autónoma. Ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales y similares. Un constructo de expresión puede replicarse en una célula viva, o puede producirse de manera sintética. Para los fines de esta solicitud, los términos "constructo de expresión", "vector de expresión" y "vector" se usan de manera intercambiable para demostrar la aplicación de la invención en un sentido general e ilustrativo, y no pretenden limitar la invención.

45

50

En una realización, un vector de expresión para expresar miR-29a-c comprende un promotor "unido operativamente" a un polinucleótido que codifica para miR-29a, miR-29b, miR-29c, o combinaciones de los mismos. En otra realización, el polinucleótido puede codificar para el cluster miR-29b-1/miR-29a. En otra realización, el polinucleótido puede codificar para el cluster miR-29b-2/miR-29c. La frase "unido operativamente" o "bajo control transcripcional", tal como se usa en el presente documento, significa que el promotor se encuentra en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido. El polinucleótido que codifica para miR-29a-c puede codificar para la secuencia primaria de microARN-29a-c (pri-miR-29a-c), la secuencia precursora de microARN-29a-c (pre-miR-29a-c) o la secuencia de miR-29a-c madura. En otra realización, el vector de expresión comprende un polinucleótido unido operativamente a un promotor, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18. En otra realización, el vector de expresión comprende un polinucleótido unido operativamente a un promotor, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19. En todavía otra realización, el vector de expresión comprende un polinucleótido unido operativamente a un promotor, en el que dicho polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20. El polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 puede ser de aproximadamente 18 a aproximadamente 2000 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 70 a aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud o de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.

55

60

65

A lo largo de toda esta solicitud, el término “constructo de expresión” pretende incluir cualquier tipo de constructo genético que contenga un ácido nucleico que codifica para un producto génico en el que una parte de o toda la secuencia codificante de ácido nucleico puede transcribirse. Generalmente, el ácido nucleico que codifica para un producto génico está bajo el control transcripcional de un promotor. Un “promotor” se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o por la maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen.

El término promotor se usará en el presente documento para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que se agrupan alrededor del sitio de iniciación para una ARN polimerasa. Gran parte de los conocimientos sobre cómo se organizan los promotores procede de los análisis de varios promotores virales, incluyendo los de timidina cinasa (*tk*) de VHS y las unidades de transcripción temprana de SV40. Estos estudios, junto con el trabajo más reciente, han mostrado que los promotores se componen de módulos funcionales discretos, cada uno de los cuales consiste en aproximadamente 7-20 pb de ADN, y contienen uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras o represoras transcripcionales.

Al menos un módulo de cada promotor funciona situando el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA; no obstante, en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como el promotor para el gen de desoxinucleotidil transferasa terminal de mamíferos y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto superpuesto al propio sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación.

Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, éstos se localizan en la región situada a 30-110 pb en el sentido 5' del sitio de inicio, aunque también se ha demostrado recientemente que varios promotores contienen elementos funcionales en el sentido 3' del sitio de inicio. Frecuentemente, la separación entre elementos promotores es flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven unos en relación entre otros. En el promotor de *tk*, la separación entre elementos promotores puede aumentarse hasta una diferencia de 50 pb antes de que la actividad comience a descender. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de manera cooperativa o de manera independiente para activar la transcripción.

En otras realizaciones, el promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano de SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor de insulina de rata, el promotor de ARN pol III y el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se pueden usar para obtener una expresión de alto nivel del polinucleótido de interés. También se contempla el uso de otros promotores virales o celulares de mamíferos o de bacteriófagos que se conocen bien en la técnica para conseguir la expresión de un polinucleótido de interés, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un fin dado.

Empleando un promotor con propiedades bien conocidas, puede optimizarse el nivel y el patrón de la expresión del polinucleótido de interés tras la transfección o la transformación. Adicionalmente, la selección de un promotor que se regula en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible del producto génico. Las tablas 1 y 2 enumeran varios elementos reguladores que pueden emplearse, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión del gen de interés. Esta lista no pretende ser exhaustiva de todos los elementos posibles implicados en la promoción de la expresión génica sino servir, meramente, a modo de ejemplo de los mismos.

Los potenciadores son elementos genéticos que aumentan la transcripción de un promotor localizado en una posición distante de la misma molécula de ADN. Los potenciadores se organizan de manera similar a los promotores. Es decir, se componen de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une a una o más proteínas transcripcionales.

La distinción básica entre potenciadores y promotores es funcional. Una región potenciadora como un todo debe poder estimular la transcripción a una distancia; esto no necesita ser cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirijan la iniciación de la síntesis de ARN a un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y los potenciadores a menudo se superponen y son contiguos, pareciendo a menudo que tienen una organización modular muy similar.

A continuación se proporciona una lista de promotores virales, promotores/potenciadores celulares y promotores/potenciadores inducibles que podrían usarse en combinación con el ácido nucleico que codifica para un gen de interés en un constructo de expresión (tabla 1 y tabla 2). Además, también puede usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según la base de datos de promotores eucariotas EPDB) para dirigir la expresión del gen. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de determinados promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, bien como parte del complejo de suministro o bien como un constructo de expresión genética adicional. En una realización preferida, el polinucleótido que codifica para miR-29a-c o para el antagonista miR-29a-c está unido operativamente a un promotor específico de fibroblastos.

TABLA 1 Promotor y/o Potenciador	
Promotor/Potenciador	Referencias
Cadena pesada de inmunoglobulina	<i>Banerji et al.</i> , 1983; <i>Gilles et al.</i> , 1983; <i>Grosschedl et al.</i> , 1985; <i>Atchinson et al.</i> , 1986, 1987; <i>Imler et al.</i> , 1987; <i>Weinberger et al.</i> , 1984; <i>Kiledjian et al.</i> , 1988; <i>Porton et al.</i> ; 1990
Cadena ligera de inmunoglobulina	<i>Queen et al.</i> , 1983; <i>Picard et al.</i> , 1984
Receptor de células T	<i>Luria et al.</i> , 1987; <i>Winoto et al.</i> , 1989; <i>Redondo et al.</i> ; 1990
HLA DQ α y/o DQ β	<i>Sullivan et al.</i> , 1987
Interferón β	<i>Goodbourn et al.</i> , 1986; <i>Fujita et al.</i> , 1987; <i>Goodbourn et al.</i> , 1988
Interleucina-2	<i>Greene et al.</i> , 1989
Receptor de interleucina-2	<i>Greene et al.</i> , 1989; <i>Lin et al.</i> , 1990
MHC de clase II 5	<i>Koch et al.</i> , 1989
MHC de clase II HLA-DR α	<i>Sherman et al.</i> , 1989
β -Actina	<i>Kawamoto et al.</i> , 1988; <i>Ng et al.</i> ; 1989
Creatina cinasa de músculo (MCK)	<i>Jaynes et al.</i> , 1988; <i>Horlick et al.</i> , 1989; <i>Johnson et al.</i> , 1989
Prealbúmina (transtiretina)	<i>Costa et al.</i> , 1988
Elastasa I	<i>Ornitz et al.</i> , 1987
Metalotioneína (MTII)	<i>Karin et al.</i> , 1987; <i>Culotta et al.</i> , 1989
Colagenasa	<i>Pinkert et al.</i> , 1987; <i>Angel et al.</i> , 1987a
Albúmina	<i>Pinkert et al.</i> , 1987; <i>Tronche et al.</i> , 1989, 1990
α -Fetoproteína	<i>Godbout et al.</i> , 1988; <i>Campere et al.</i> , 1989
t-Globina	<i>Bodine et al.</i> , 1987; <i>Perez-Stable et al.</i> , 1990
β -Globina	<i>Trudel et al.</i> , 1987
c-fos	<i>Cohen et al.</i> , 1987
c-HA-ras	<i>Triesman</i> , 1986; <i>Deschamps et al.</i> , 1985
Insulina	<i>Edlund et al.</i> , 1985
Molécula de adhesión celular neuronal (NCAM)	<i>Hirsh et al.</i> , 1990
α_1 -Antitripsina	<i>Latimer et al.</i> , 1990
Histona H2B (TH2B)	<i>Hwang et al.</i> , 1990
Colágeno de ratón y/o tipo I	<i>Ripe et al.</i> , 1989
Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78)	<i>Chang et al.</i> , 1989
Hormona de crecimiento de rata	<i>Larsen et al.</i> , 1986
Amiloide A sérico (SAA) humano	<i>Edbrooke et al.</i> , 1989
Troponina I (TN I)	<i>Yutzey et al.</i> , 1989
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)	<i>Pech et al.</i> , 1989
Distrofia muscular de Duchenne	<i>Klamut et al.</i> , 1990
SV40	<i>Banerji et al.</i> , 1981; <i>Moreau et al.</i> , 1981; <i>Sleigh et al.</i> , 1985; <i>Firak et al.</i> , 1986; <i>Herr et al.</i> , 1986; <i>Imbra et al.</i> , 1986; <i>Kadesch et al.</i> , 1986; <i>Wang et al.</i> , 1986; <i>Ondek et al.</i> , 1987; <i>Kuhl et al.</i> , 1987; <i>Schaffner et al.</i> , 1988
Polioma	<i>Swartzendruber et al.</i> , 1975; <i>Vasseur et al.</i> , 1980; <i>Katinka et al.</i> , 1980, 1981; <i>Tyndell et al.</i> , 1981; <i>Dandolo et al.</i> , 1983; <i>de Villiers et al.</i> , 1984; <i>Hen et al.</i> , 1986; <i>Satake et al.</i> , 1988; <i>Campbell y/o Villarreal</i> , 1988
Retrovirus	<i>Kriegler et al.</i> , 1982, 1983; <i>Levinson et al.</i> , 1982; <i>Kriegler et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; <i>Bosze et al.</i> , 1986; <i>Miksicek et al.</i> , 1986; <i>Celander et al.</i> , 1987; <i>Thiesen et al.</i> , 1988; <i>Celander et al.</i> , 1988; <i>Choi et al.</i> , 1988; <i>Reisman et al.</i> , 1989
Virus del papiloma	<i>Campo et al.</i> , 1983; <i>Lusky et al.</i> , 1983; <i>Spandidos y/o Wilkie</i> , 1983; <i>Spalholz et al.</i> , 1985; <i>Lusky et al.</i> , 1986; <i>Cripe et al.</i> , 1987; <i>Gloss et al.</i> , 1987; <i>Hirochika et al.</i> , 1987; <i>Stefens et al.</i> , 1987
Virus de la hepatitis B	<i>Bulla et al.</i> , 1986; <i>Jameel et al.</i> , 1986; <i>Shaul et al.</i> , 1987; <i>Spandau et al.</i> , 1988; <i>Vannice et al.</i> , 1988
Virus de la inmunodeficiencia humana	<i>Muesing et al.</i> , 1987; <i>Hauber et al.</i> , 1988; <i>Jakobovits et al.</i> , 1988; <i>Feng et al.</i> , 1988; <i>Takebe et al.</i> , 1988; <i>Rosen et al.</i> , 1988; <i>Berkhout et al.</i> , 1989; <i>Laspia et al.</i> , 1989; <i>Sharp et al.</i> , 1989; <i>Braddock et al.</i> , 1989
Citomegalovirus (CMV)	<i>Weber et al.</i> , 1984; <i>Boshart et al.</i> , 1985; <i>Foecking et al.</i> , 1986
Virus de la leucemia del mono gibón	<i>Holbrook et al.</i> , 1987; <i>Quinn et al.</i> , 1989

TABLA 2 Elementos inducibles		
Elemento	Inductor	Referencias
MT II	Éster de forbol (TFA) Metales pesados	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeill <i>et al.</i> , 1989
VTMR (virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
Interferón β	poli(rl)x poli(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Colagenasa	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987 ^a
Estromelinsina	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	Éster de forbol (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Gen MX murino	Interferón, virus de la enfermedad de Newcastle	Hug <i>et al.</i> , 1988
Gen GRP78	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-Macroglobulina	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentina	Suero	Rittling <i>et al.</i> , 1989
Gen H-2 $\kappa\beta$ de MHC de clase I	Interferón	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, antígeno largo T de SV40	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferina	Éster de forbol-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Factor de necrosis tumoral	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Gen α de hormona estimulante del tiroides	Hormona tiroidea	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

5 Cuando se emplea un inserto de ADNc, normalmente se deseará incluir una señal de poliadenilación para efectuar una poliadenilación apropiada del transcrito génico. La naturaleza de la señal de poliadenilación no se cree que sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y puede emplearse cualquier secuencia de este tipo, tales como señales de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana y de SV40. También se contempla un terminador como elemento del cassette de expresión. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensaje y minimizar la lectura a través del cassette para dar otras secuencias.

10 En determinadas realizaciones de la invención, pueden identificarse células que contienen constructos de ácido nucleico de la presente invención *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el constructo de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula, permitiendo una fácil identificación de las células que contienen el constructo de expresión. Habitualmente, la inclusión de un marcador de selección de fármaco sirve de ayuda en la clonación y en la selección de transformantes; por ejemplo, genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles.

15 Alternativamente, pueden emplearse enzimas tales como cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) o timidina cinasa (*tk*) del virus del herpes simple. También pueden emplearse marcadores inmunológicos. El marcador seleccionable empleado no se cree que sea importante, siempre que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica para un producto génico. Un experto en la técnica conoce bien ejemplos adicionales de marcadores seleccionables.

20 Los vectores de expresión en las células pueden introducirse de diversas maneras. En determinadas realizaciones de la invención, el constructo de expresión comprende un virus o un constructo diseñado por ingeniería obtenido a partir de un genoma viral. La capacidad de determinados virus para introducirse en células por medio de endocitosis mediada por receptor, integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes virales de manera estable y eficiente ha hecho que sean candidatos atractivos para la transferencia de genes foráneos al interior de células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986).

30 Uno de los métodos preferidos para el suministro *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. "Vector de expresión de adenovirus" pretende incluir aquellos constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) soportar el empaquetamiento del constructo y (b) expresar un polinucleótido que se ha clonado en el mismo. El vector de expresión comprende una forma genéticamente modificada diseñada por ingeniería genética del adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN bicatenario, lineal y de 36 kB, permite la sustitución de grandes trozos de ADN adenoviral por secuencias foráneas de hasta 7 kB (Grunhaus y Horwitz, 1992). Al contrario que el retrovirus, la infección adenoviral de células huésped no da como resultado la integración cromosómica, ya que el ADN adenoviral puede replicarse de una manera episomal sin

genotoxicidad potencial. Además, los adenovirus son estables estructuralmente, y no se ha detectado transposición del genoma tras una amplificación extensa. El adenovirus puede infectar prácticamente a todas las células epiteliales, independientemente de su fase de ciclo celular.

5 El adenovirus es particularmente adecuado para su uso como vector de transferencia génica debido a su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplio intervalo de células diana y alta infectividad. Ambos extremos del genoma viral contienen 100-200 repeticiones invertidas (ITR) de pares de bases, que son elementos *cis* necesarios para la replicación y el empaquetamiento del ADN viral.

10 Aparte del requisito de que el vector de adenovirus sea de replicación defectuosa, o al menos condicionalmente defectuosa, no se cree que la naturaleza del vector de adenovirus sea crucial para la práctica exitosa de la invención. El adenovirus puede ser cualquiera de los 42 serotipos o subgrupos A-F diferentes conocidos. El adenovirus de tipo 5 de subgrupo C es el material de partida preferido para obtener el vector de adenovirus de replicación defectuosa condicional para su uso en la presente invención. Esto se debe a que el adenovirus de tipo 5
15 es un adenovirus humano sobre el que se tiene mucha información bioquímica y genética y a que, históricamente, se ha usado en la mayoría de las construcciones que emplean adenovirus como vector.

Tal como se mencionó anteriormente, el vector típico según la presente invención es de replicación defectuosa y no tendrá una región E1 de adenovirus. Por tanto, lo más conveniente será introducir el polinucleótido que codifica para el gen de interés en la posición de la que se han retirado las secuencias que codifican para E1. Sin embargo, la posición de inserción del constructo en las secuencias de adenovirus no es crítica para la invención. El polinucleótido que codifica para el gen de interés también puede insertarse en lugar de la región E3 delecionada en los vectores de reemplazo de E3, tal como describen Karlsson *et al.* (1986), o en la región E4 en la que una línea celular auxiliar o virus auxiliar complementa el defecto de E4.

25 Los vectores de adenovirus se han utilizado en la expresión génica eucariota (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) y en el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1991). Recientemente, los estudios en animales sugirieron que el adenovirus recombinante podría usarse para terapia génica (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Los estudios de administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación traqueal (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), inyección muscular (Ragot *et al.*, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

35 Los vectores retrovirales también son adecuados para expresar los polinucleótidos de la invención en células. Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenario caracterizados por su capacidad de convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas mediante un procedimiento de transcripción inversa (Coffin, 1990). El ADN resultante se integra entonces de manera estable en cromosomas celulares como provirus y dirige la síntesis de proteínas virales. La integración da como resultado la retención de las secuencias génicas virales en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes (*gag*, *pol* y *env*) que codifican para proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa y los componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia encontrada en el sentido 5' del gen *gag* contiene una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Están presentes dos secuencias de repeticiones terminales largas (RTL) en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Éstas contienen secuencias potenciadoras y promotoras fuertes y también son necesarias para la integración en el genoma de la célula huésped (Coffin, 1990).

45 Para construir un vector retroviral, un ácido nucleico que codifica para un gen de interés se inserta en el genoma viral en lugar de determinadas secuencias virales para producir un virus que es de replicación defectuosa. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*, pero sin la RTL y los componentes de empaquetamiento (Mann *et al.*, 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la RTL retroviral y secuencias de empaquetamiento se introducen en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato de calcio, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que después se secretan a los medios de cultivo (Nicolas y Rubinstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). A continuación, se recoge el medio que contiene los retrovirus recombinantes, opcionalmente se concentran y se usan para transferencia génica. Los vectores retrovirales pueden infectar una amplia variedad de tipos de células. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de células huésped (Paskind *et al.*, 1975).

60 En la presente invención pueden emplearse otros vectores virales como constructos de expresión. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus adenoasociado (VAA) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y virus del herpes. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

65 Para afectar a la expresión de constructos génicos sentido o antisentido, el constructo de expresión debe suministrarse a una célula. Este suministro puede lograrse *in vitro*, como en procedimientos de laboratorio para transformar líneas celulares, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de determinados estados patológicos. Un

mecanismo para el suministro es por medio de infección viral, en donde el constructo de expresión se encapsula en una partícula viral infecciosa.

La presente invención también contempla varios métodos no virales para la transferencia de constructos de expresión a células de mamíferos cultivadas. Éstos incluyen precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990), DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados con ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979) y complejos de lipofectamina-ADN, sonicación celular (Fechheimer *et al.*, 1987), bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang *et al.*, 1990) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de estas técnicas pueden adaptarse satisfactoriamente para su uso *in vivo* o *ex vivo*.

Una vez que el constructo de expresión se ha suministrado a la célula, el ácido nucleico que codifica para el gen de interés puede situarse y expresarse en sitios diferentes. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para el gen puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula. Esta integración puede realizarse en la orientación y ubicación análogas por medio de recombinación homóloga (reemplazo génico) o puede integrarse en una ubicación aleatoria, no específica (aumento génico). En aún otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico puede mantenerse de manera estable en la célula como un segmento episomal separado de ADN. Tales segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican para secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independientes de o sincronizadas con el ciclo de la célula huésped. Cómo se suministra el constructo de expresión a una célula y dónde permanece en la célula el ácido nucleico dependen del tipo de constructo de expresión empleado.

En aún otra realización de la invención, el constructo de expresión puede consistir simplemente en ADN recombinante desnudo o plásmidos. La transferencia del constructo puede realizarse mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente que permeabilizan física o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro*, pero puede aplicarse también al uso *in vivo*. Dubensky *et al.* (1984) inyectaron satisfactoriamente ADN poliomavirus en forma de precipitados de fosfato de calcio en el hígado y el bazo de ratones adultos y recién nacidos, demostrando la replicación viral activa y la infección aguda. Benvenisty y Neshif (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con fosfato de calcio da como resultado la expresión de los genes transfectados. Se prevé que el ADN que codifica para un gen de interés también pueda transferirse de manera similar *in vivo* y expresar el producto génico.

En todavía otra realización de la invención, la transferencia de un constructo de expresión de ADN desnudo a células puede implicar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos con ADN a una alta velocidad que les permita perforar las membranas celulares e introducirse en células sin destruirlas (Klein *et al.*, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo de este tipo se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang *et al.*, 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes, tales como perlas de tungsteno u oro.

Los órganos seleccionados, incluyendo el hígado, la piel y el tejido muscular de ratas y ratones, se han bombardeado *in vivo* (Yang *et al.*, 1990; Zelenin *et al.*, 1991). Esto puede requerir una exposición quirúrgica del tejido o las células, para eliminar cualquier tejido intermedio entre la pistola y el órgano diana, es decir, tratamiento *ex vivo*. De nuevo, el ADN que codifica para un gen particular puede suministrarse por medio de este método e incorporarse todavía en la presente invención.

En una realización adicional de la invención, el constructo de expresión puede atraparse en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio interno acuoso. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de disolución acuosa. Los componentes lipídicos sufren autotransposición antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan complejos de lipofectamina-ADN.

El suministro de ácido nucleico mediado por liposomas y la expresión de ADN foráneo *in vitro* han sido muy satisfactorios. Wong *et al.*, (1980) demostraron la viabilidad del suministro mediado por liposomas y la expresión de ADN foráneo en embriones de pollo, células HeLa y células de hepatoma cultivadas. Nicolau *et al.*, (1987) realizaron de manera satisfactoria la transferencia génica mediada por liposoma en ratas tras inyección intravenosa.

En determinadas realizaciones de la invención, el liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposomas (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). En aún realizaciones adicionales, el liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente tanto con HVJ como con HMG-1. Tales constructos de expresión se han empleado satisfactoriamente en la transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*, por lo que son aplicables para la presente invención. Cuando se emplea un promotor

bacteriano en el constructo de ADN, también será deseable incluir dentro del liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

5 Otros constructos de expresión que pueden emplearse para suministrar un ácido nucleico que codifica para un gen particular a las células son los vehículos de suministro mediado por receptor. Estos se aprovechan de la captación selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptor en casi todas las células eucariotas. Debido a la distribución específica de tipo celular de diversos receptores, el suministro puede ser altamente específico (Wu y Wu, 1993).

10 Generalmente, los vehículos de direccionamiento génico mediado por receptor consisten en dos componentes: un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ADN. Se han usado varios ligandos para la transferencia génica mediada por receptor. Los ligandos más extensamente caracterizados son asialo-orosomucoide (ASOR) (Wu y Wu, 1987) y transferrina (Wagner *et al.*, 1990). Recientemente, se ha usado una neoglicoproteína sintética, que reconoce el mismo receptor que ASOR, como vehículo de suministro de genes (Ferkol *et al.*, 1993; 15 Perales *et al.*, 1994) y también se ha usado el factor de crecimiento epidérmico (FCE) para suministrar genes a células de carcinoma escamoso (Myers, EPO 0273085).

En otras realizaciones, el vehículo de suministro puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, Nicolau *et al.* (1987) emplearon lactosil-ceramida, un asialgangliósido galactosa-terminal, incorporado en liposomas y 20 observaron un aumento en la captación del gen de la insulina por los hepatocitos. Por tanto, es viable que un ácido nucleico que codifica para un gen particular también pueda suministrarse específicamente a un tipo de célula por cualquiera de los numerosos sistemas de receptor-ligando con o sin liposomas. Por ejemplo, puede usarse el factor de crecimiento epidérmico (FCE) como receptor para el suministro mediado de un ácido nucleico a células que 25 presentan regulación por incremento del receptor de FCE. Puede usarse manosa como diana para el receptor de manosa sobre células hepáticas. Además, pueden usarse de manera similar anticuerpos frente a CD5 (leucemia linfocítica crónica), CD22 (linfoma), CD25 (leucemia de células T) y MAA (melanoma) como fracciones de direccionamiento.

En un ejemplo particular, el oligonucleótido puede administrarse en combinación con un lípido catiónico. Ejemplos de 30 lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, lipofectina, DOTMA, DOPE y DOTAP. La publicación del documento WO/0071096 describe diferentes formulaciones, tales como una formulación derivada de DOTAP:colesterol o colesterol que puede usarse eficazmente para terapia génica. Otras divulgaciones también analizan diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas, incluyendo nanopartículas y métodos de administración; éstas incluyen, pero 35 no se limitan a, las patentes estadounidenses con n.º de publicación 2003/0203865, 20020150626, 20030032615 y 20040048787, que se incorporan específicamente por referencia al alcance de las formulaciones y otros aspectos relacionados de la administración y el suministro de ácidos nucleicos que divulgan. También se divulgan métodos usados para formar partículas en las patentes estadounidenses n.º 5.844.107, 5.877.302, 6.008.336, 6.077.835, 5.972.901, 6.200.801 y 5.972.900, que se incorporan por referencia a esos aspectos.

40 En determinadas realizaciones, la transferencia génica puede realizarse más fácilmente en condiciones *ex vivo*. "Terapia génica *ex vivo*" se refiere al aislamiento de células de un animal, el suministro de un ácido nucleico a las células *in vitro* y, a continuación, al retorno de las células modificadas de nuevo al animal. Esto puede implicar la extirpación quirúrgica de tejidos/órganos de un animal o el cultivo primario de células y tejidos.

45 En algunas realizaciones de la invención, es deseable inhibir la expresión o actividad de miR-29a-c para aumentar el depósito de colágeno. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un método de inducción del depósito de colágeno en un tejido que comprende poner en contacto dicho tejido con un antagonista de miR-29a-c. El antagonista o inhibidor de la función de miR-29a-c puede dirigirse a miR-29a, miR-29b y/o a miR-29c.

50 La función de los miARN puede inhibirse mediante la administración de antagomires. Inicialmente descritos por Krützfeldt y colaboradores (Krützfeldt *et al.*, 2005), los "antagomires" son ribonucleótidos monocatenarios, modificados químicamente que son al menos parcialmente complementarios a la secuencia de miARN. Los antagomires pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, tales como modificaciones de 2'-O-metil- 55 azúcar. En algunas realizaciones, los antagomires comprenden sólo nucleótidos modificados. Los antagomires también pueden comprender una o más uniones de fosforotioato que dan como resultado una estructura principal de fosforotioato parcial o completa. Para facilitar el suministro *in vivo* y la estabilidad, el antagomir puede unirse a un resto de colesterol en su extremo 3'. Los antagomires adecuados para inhibir los miARN pueden ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 a 60 aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. "Parcialmente complementario" se refiere a una secuencia que es complementaria en al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de polinucleótido diana. Los antagomires pueden ser complementarios en al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de miARN madura. En algunas realizaciones, el antagomir puede ser sustancialmente complementario a una secuencia 65 de miARN madura, que es complementario en al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia diana de polinucleótido. En otras realizaciones, los antagomires son complementarios al 100% a la

secuencia de miARN madura.

En una realización, el antagonista de miR-29a-c es un antagomir. El antagomir puede comprender una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de miARN madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

5 En otra realización, el antagomir comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. En otra realización, el antagomir comprende una secuencia que es complementaria al 100% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

10 La inhibición de la función de microARN también puede conseguirse administrando oligonucleótidos antisentido que tienen como diana las secuencias maduras de miR-29a, miR-29b o miR-29c. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido tienen al menos una modificación química. Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender uno o más "ácidos nucleicos bloqueados". "Ácidos nucleicos bloqueados" (ANB) son ribonucleótidos modificados que contienen un puente extra entre los carbonos 2' y 4' del resto de azúcar ribosa que da como resultado una conformación "bloqueada" que confiere una mayor estabilidad térmica a los oligonucleótidos que contienen ANB. Alternativamente, los oligonucleótidos antisentido pueden comprender ácidos nucleicos peptídicos (ANP), que contienen una estructura principal basada en péptido en vez de una estructura principal de azúcar-fosfato. Otras modificaciones químicas que pueden contener los oligonucleótidos antisentido incluyen, pero no se limitan a, modificaciones de azúcares, tales como 2'-O-alquilo (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo), modificaciones 2'-fluoro y 4'-tio, y modificaciones de la estructura principal, tales como una o más uniones fosforotioato, morfolino o fosfonocarboxilato (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.693.187 y 7.067.641, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). En algunas realizaciones, oligonucleótidos antisentido adecuados son "gápmers" de 2'-O-metoxietilo que contienen ribonucleótidos con una modificación 2'-O-metoxietilo en los extremos 5' y 3' con al menos diez desoxirribonucleótidos en el centro. Estos "gápmers" son capaces de activar mecanismos de degradación dependientes de RNasa H de dianas de ARN. Se conocen en la técnica otras modificaciones de oligonucleótidos antisentido para potenciar la estabilidad y mejorar la eficacia, tales como las descritas en la patente estadounidense n.º 6.838.283 y son adecuadas para su uso en los métodos de la invención. Los oligonucleótidos antisentido preferibles que son útiles para inhibir la actividad de los microARN tienen de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de miARN madura, por ejemplo, complementaria en al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de miARN madura. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido puede ser sustancialmente complementario a una secuencia de miARN madura, que es complementaria en al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de polinucleótido diana. En una realización, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria al 100% a una secuencia de miARN madura.

40 En otra realización de la invención, el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido modificado químicamente. El oligonucleótido antisentido modificado químicamente puede comprender una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de miARN madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c. En aún otra realización, el oligonucleótido antisentido químicamente modificado comprende una secuencia que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. En otra realización, el oligonucleótido antisentido químicamente modificado comprende una secuencia que es complementaria al 100% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

45 Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia de miARN precursora (pre-miARN) para miR-29a-c. En algunas realizaciones, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una secuencia localizada fuera de la región en tallo-bucle de la secuencia de pre-miR-29a, pre-miR-29b o pre-miR-29c.

50 Otra estrategia para inhibir la función de miR-29a-c es administrar una molécula de ARN inhibidor que tiene identidad de secuencia al menos parcial con respecto a las secuencias maduras de miR-29a, miR-29b y miR-29c. La molécula de ARN inhibidor puede ser un ARN bicatenario de interferencia pequeño (ARNip) o una molécula de ARN de horquilla corta (ARNhp) que comprende una estructura en tallo-bucle. Las regiones bicatenarias de la molécula de ARN inhibidor pueden comprender una secuencia que es al menos parcialmente idéntica, por ejemplo, idéntica en aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99%, a la secuencia de miARN madura. En algunas realizaciones, las regiones bicatenarias del ARN inhibidor comprenden una secuencia que es al menos sustancialmente idéntica a la secuencia de miARN madura. "Sustancialmente idéntica" se refiere a una secuencia que es idéntica en aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de polinucleótido diana. En otras realizaciones, las regiones bicatenarias de la molécula de ARN inhibidor pueden ser idénticas al 100% a la secuencia de miARN diana.

65 En una realización, un antagonista de miR-29a-c es una molécula de ARN inhibidor que comprende una región bicatenaria, en la que la región bicatenaria comprende una secuencia que tiene una identidad del 100% con la secuencia madura de miR-29a (SEQ ID NO: 18), miR-29b (SEQ ID NO: 19) o miR-29c (SEQ ID NO: 20). En algunas realizaciones, antagonistas de miR-29a-c son moléculas de ARN inhibidor que comprenden una región bicatenaria, en la que dicha región bicatenaria comprende una secuencia con una identidad de al menos aproximadamente el

75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con la secuencia madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

5 En otra realización, una molécula de ARN inhibidor puede ser una ribozima. Una ribozima es un ARN catalítico que hidroliza enlaces fosfodiéster de moléculas de ARN. La ribozima puede diseñarse para que tengan como diana uno o más de miR-29a, miR-29b y miR-29c, dando como resultado su hidrólisis.

10 En determinadas realizaciones se emplean vectores de expresión para expresar un antagonista de miR-29a-c (por ejemplo, antagomires, oligonucleótidos antisentido y moléculas de ARN inhibidor). En una realización, un vector de expresión para expresar un antagonista de miR-29a-c comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un oligonucleótido antisentido, en el que la secuencia del oligonucleótido antisentido expresado es al menos parcialmente complementaria a la secuencia madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c. En aún otra realización, un vector de expresión para expresar un inhibidor de miR-29a-c comprende uno o más promotores unidos operativamente a un polinucleótido que codifica para un ARNhp o ARNip, en el que el ARNhp o ARNip expresado comprende una secuencia que es idéntica, parcialmente idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c. "Parcialmente idéntica" se refiere a una secuencia que es idéntica en al menos aproximadamente el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de polinucleótido diana. "Sustancialmente idéntica" se refiere a una secuencia que es idéntica en al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a una secuencia de polinucleótido diana.

20 La gestión médica actual de la hipertrofia cardiaca en el entorno de un trastorno cardiovascular incluye el uso de al menos dos tipos de fármacos: los inhibidores del sistema renina-angiotensina y agentes bloqueantes β -adrenérgicos (Bristow, 1999). Los agentes terapéuticos para tratar la hipertrofia patológica en el entorno de la insuficiencia cardiaca incluyen inhibidores de enzima convertidora de angiotensina II (ACE) y agentes bloqueantes de receptores β -adrenérgicos (Eichhorn y Bristow, 1996). Otros agentes farmacéuticos que se han divulgado para el tratamiento de la hipertrofia cardiaca incluyen antagonistas del receptor de angiotensina II (patente estadounidense n.º 5.604.251) y antagonistas de neuropéptido Y (WO 98/33791). A pesar de los compuestos farmacéuticos disponibles actualmente, la prevención y el tratamiento de la hipertrofia cardiaca, y posterior insuficiencia cardiaca, siguen siendo un desafío terapéutico.

30 El tratamiento no farmacológico se usa principalmente como complemento al tratamiento farmacológico. Un medio de tratamiento no farmacológico implica la reducción del sodio en la dieta. Además, el tratamiento no farmacológico también supone la eliminación de determinados fármacos precipitantes, incluyendo agentes inotrópicos negativos (por ejemplo, determinados bloqueantes de los canales de calcio y fármacos antiarrítmicos como disopiramida), cardiotoxinas (por ejemplo, anfetaminas) y expansores del volumen plasmático (por ejemplo, agentes antiinflamatorios no esteroideos y glucocorticoides).

40 La presente memoria descriptiva proporciona un método de tratamiento de la fibrosis cardiaca, la hipertrofia cardiaca o la insuficiencia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende identificar un sujeto que tiene fibrosis cardiaca, hipertrofia cardiaca o insuficiencia cardiaca; y administrar al sujeto un agonista de la función o expresión de miR-29. Preferiblemente, la administración de un agonista de miR-29 da como resultado la mejora de uno o más síntomas de fibrosis cardiaca patológica, hipertrofia o insuficiencia cardiaca en el sujeto, o el retraso en la transición de hipertrofia cardiaca a insuficiencia cardiaca. El uno o más síntomas mejorados pueden ser una mayor capacidad de ejercicio, un mayor volumen de eyección cardiaca, una menor presión diastólica final del ventrículo izquierdo, una menor presión de enclavamiento capilar pulmonar, un mayor rendimiento cardiaco, o índice cardiaco, menores presiones arteriales pulmonares, menores dimensiones sistólicas y diastólicas finales del ventrículo izquierdo, una menor fibrosis cardiaca, un menor depósito de colágeno en el músculo cardiaco, un menor estrés de la pared ventricular izquierda y derecha, una menor tensión de pared, una mayor calidad de vida y una menor morbilidad o mortalidad relacionada con la enfermedad. Además, el uso de agonistas de miR-29a-c puede prevenir la aparición de hipertrofia cardiaca y sus síntomas asociados, ya sea directamente o indirectamente.

50 En otro caso, se proporciona un método de prevención de la hipertrofia patológica o la insuficiencia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende identificar un sujeto en riesgo de desarrollar hipertrofia cardiaca patológica o insuficiencia cardiaca; y promover la expresión o actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto. Las células cardiacas incluyen miocitos cardiacos, fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales y cualquier otro tipo de célula encontrada normalmente en el tejido cardiaco. El agonista de miR-29a-c puede ser un agonista de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c. El sujeto en riesgo puede presentar uno o más de una lista de factores de riesgo que comprenden fibrosis cardiaca, baja expresión de miR-29, hipertensión no controlada prolongada, enfermedad valvular no corregida, angina de pecho crónica, infarto de miocardio reciente, predisposición congénita a cardiopatía y/o a hipertrofia patológica, y/o con un diagnóstico de predisposición genética a hipertrofia cardiaca, y/o que puede tener antecedentes familiares de hipertrofia cardiaca.

65 En otro caso, se proporciona un método de tratamiento del infarto de miocardio en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto. En otro caso, la invención proporciona un método de prevención de la hipertrofia cardiaca y la cardiomiopatía dilatada en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del

5 sujeto. En otro caso, la invención proporciona un método de inhibición de la progresión de la hipertrofia cardiaca en un sujeto que lo necesita que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto. Otro aspecto es un método de aumento de la tolerancia al ejercicio en un sujeto con insuficiencia cardiaca o hipertrofia cardiaca que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto. Otro aspecto es un método de reducción de la hospitalización en un sujeto con insuficiencia cardiaca o hipertrofia cardiaca que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto. En algunos aspectos, la memoria descriptiva proporciona métodos para mejorar la calidad de vida y disminuir la morbilidad o mortalidad en un sujeto con insuficiencia cardiaca o hipertrofia cardiaca que comprende promover la expresión o la actividad de miR-29a-c en las células cardiacas del sujeto.

10 Los regímenes de tratamiento variarían dependiendo de la situación clínica. Sin embargo, el mantenimiento a largo plazo podría parecer apropiado en la mayoría de las circunstancias. También puede ser deseable tratar la hipertrofia con agonistas de miR-29ac de forma intermitente, tal como en un breve periodo durante la progresión de la enfermedad.

15 Además, la familia miR-29 está implicada en la regulación de la fibrosis cardiaca. Puesto que esta familia miR está enriquecida con fibroblastos en comparación con miocitos, es probable que los miocitos secreten un factor, posiblemente BNP, que regule por incremento la familia miR-29 en células de fibroblastos y, por tanto, proteja frente al desarrollo de la fibrosis cardiaca. Este factor es muy alto en ratones KO para miR-208, lo que se correlaciona con la regulación por incremento miR-29a-c y la represión de la fibrosis. Los niveles de miR-29a-c son elevados en la cardiopatía normal, probablemente por un efecto protector que limita el depósito de colágeno. Por tanto, se contempla el uso particular de miR-29a-c y agonistas del mismo en la represión de la fibrosis cardiaca y el depósito de colágeno en los tejidos cardiacos. Un mecanismo comparable para la activación de la familia miR-29 puede ser aplicable también en la fibrosis muscular esquelética. El miR-29a-c regula la expresión de varios genes de la matriz extracelular, tales como fibrilina 1 (FBN1), colágeno tipo I $\alpha 1$ (COL1A1), colágeno tipo I $\alpha 2$ (COL1A2) y colágeno tipo III $\alpha 1$ (COL3A1) (véase el ejemplo 4). Por consiguiente, la presente memoria descriptiva también proporciona métodos de regulación de uno o más genes de la matriz extracelular en una célula.

20 En un caso, el método comprende poner en contacto la célula con un agonista de miR-29 a-c. En otro caso, el método comprende poner en contacto la célula con un antagonista de miR-29a-c. En todavía otro caso, el uno o más genes de la matriz extracelular incluyen fibrilina 1 (FBN1), colágeno tipo I $\alpha 1$ (COL1A1), colágeno tipo I $\alpha 2$ (COL1A2) y colágeno tipo III $\alpha 1$ (COL3A1). En algunos casos, el uno o más genes de la matriz extracelular se regulan por incremento tras el contacto de la célula con un antagonista de miR-29a-c. En otros casos, el uno o más genes de la matriz extracelular se regulan por disminución tras el contacto de la célula con un agonista de miR-29a-c.

25 Los inventores han demostrado que la expresión de miR-29a-c disminuyó en fibroblastos cardiacos expuestos a TGF β , lo que sugiere que la disminución de miR-29a-c tras el infarto de miocardio podría estar regulada por TGF β (ejemplo 5). De manera interesante, se ha demostrado que péptidos natriuréticos como el péptido natriurético de tipo B (BNP) inhiben la expresión génica regulada por TGF β relacionada con la fibrosis y la conversión de miofibroblastos (Kapoun *et al.*, 2004). A este respecto, los inventores informaron previamente que los ratones que carecían del miARN específico cardiaco, miR-208, eran resistentes a la fibrosis cardiaca y a la remodelación y presentaron expresión aumentada de BNP a nivel inicial (van Rooij *et al.*, 2007). Puesto que se sabe que BNP antagoniza los efectos de TGF β , los inventores sugieren que los niveles aumentados de BNP en estos ratones podrían potenciar la expresión de miR-29a-c. De hecho, se observó un aumento dependiente de la dosis de la expresión de miR-29a-c tras la eliminación de miR-208, que coincidía con un aumento del nivel de expresión de BNP (ejemplo 5). Estos datos indican que TGF β induce la expresión de genes relacionados con colágeno en fibroblastos al menos parcialmente a través de la disminución del nivel de miR-29a-c, que puede inhibirse por BNP secretado por cardiomiocitos. Por tanto, la presente invención proporciona un método de aumento de la expresión y/o la actividad de miR-29ac en un sujeto mediante la administración de al menos un inhibidor de TGF β . Los inhibidores de TGF β pueden incluir anticuerpos anti-TGF β , moléculas antisentido de TGF β y moléculas pequeñas que inhiben la actividad de TGF β tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.509.318, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los inhibidores de TGF β también pueden usarse conjuntamente con agonistas de miR-29a-c como terapia de combinación para tratar la fibrosis cardiaca, la hipertrofia cardiaca o la insuficiencia cardiaca en un sujeto. Los inhibidores de TGF β también pueden administrarse con agonistas de miR-29a-c para tratar o prevenir la fibrosis tisular en un sujeto.

30 Además de desempeñar un papel importante en el control de la fibrosis en el corazón, la expresión ubicua de la familia miR-29 sugiere que también puede desempeñar un papel en otras indicaciones fibróticas, tales como las que implican el riñón, el hígado y los pulmones. También se observa fibrosis secundaria a diabetes. Los pacientes diabéticos de tipo 1 y tipo 2 tienen un mayor riesgo de cardiomiopatía. La cardiomiopatía en la diabetes se asocia a un conjunto de características, incluyendo cumplimiento diastólico disminuido, fibrosis intersticial e hipertrofia de miocitos.

35 La presente memoria descriptiva también proporciona un método de tratamiento o prevención de la fibrosis tisular en un sujeto. En un caso, el método comprende identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener fibrosis tisular; y

aumentar la expresión y/o actividad de miR-29a-c en el músculo esquelético o las células de fibroblastos del sujeto. En una realización, la fibrosis tisular es fibrosis cardiaca, esclerodermia (localizada o sistémica), fibrosis muscular esquelética, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis diabética. En algunas realizaciones, aumentar la expresión y/o actividad de miR-29a-c comprende administrar un agonista de miR-29a-c al sujeto. En otras realizaciones, aumentar la expresión y/o actividad de miR-29a-c comprende administrar al sujeto un vector de expresión que codifica para miR-29a-c. En otra realización, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto una terapia fibrótica distinta de miR-29a-c.

La presente memoria descriptiva abarca métodos de tratamiento de la fibrosis tisular asociada a uno o más estados o trastornos en un sujeto que lo necesita. En un caso, el método comprende administrar al sujeto un agonista de miR-29a-c. En otro caso, el método comprende administrar al sujeto un vector de expresión que codifica para miR-29a-c. El uno o más estados o trastornos asociados a la fibrosis tisular pueden incluir, pero no se limitan a, fibrosis hepática congénita (FHC); fibrosis tubulointersticial renal; fibrosis pulmonar asociada a un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, lupus y sarcoidosis); fibrosis intersticial asociada a cardiomiopatía diabética; fibrosis muscular esquelética asociada a distrofias musculares (por ejemplo, distrofia muscular de Becker y distrofia muscular de Duchenne), atrofias de denervación y enfermedades neuromusculares (por ejemplo, polineuritis aguda, poliometilitis, enfermedad de Werdnig/Hoffman, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de atrofia bulbar progresiva).

La presente memoria descriptiva también contempla métodos de tratamiento de patologías/deficiencias que se caracterizan por la pérdida, la carencia o la infraproducción de colágeno. El uso de un antagonista de miR-29a-c permite aumentar la expresión de colágeno para reemplazar el colágeno que falta o complementar el colágeno existente cuando se necesite. Por tanto, la presente memoria descriptiva proporciona un método de inducción del depósito de colágeno en un tejido que comprende poner en contacto dicho tejido con un antagonista de miR-29a-c. El antagonista puede dirigirse a miR-29a, miR-29b y/o a miR-29c. En un caso, el antagonista comprende una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO: 18. En otro caso, el antagonista comprende una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO: 19. En otro caso, el antagonista comprende una secuencia que es complementaria a SEQ ID NO: 20. El antagonista puede ser un antagomir de miR-29a-c, un oligonucleótido antisentido que tiene como diana una secuencia de miR-29a-c madura, o una molécula de ARN inhibidor, tal como un ARNip o un ARNhp, que comprende una secuencia idéntica a una secuencia de miR-29a-c madura, una ribozima o cualquier otro ácido nucleico inhibidor. El antagonista puede unirse o conjugarse a agentes que facilitan la introducción del antagonista en células o tejidos. Los diversos estados y trastornos en los que sería beneficioso un aumento en el depósito de colágeno y que pueden tratarse administrando un antagonista de miR-29a-c incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Ehlers-Danlos (SED); deficiencia de vitamina C (también conocido como escorbuto); envejecimiento de la piel (por ejemplo, envejecimiento natural y fotoenvejecimiento debido a daño solar); y marcas de estiramiento (estrías).

El síndrome de Ehlers-Danlos (SED) es un grupo de trastornos genéticos poco comunes que afectan a humanos y animales domésticos provocados por un defecto en la síntesis de colágeno. Dependiendo de la mutación individual, la gravedad de la enfermedad puede variar desde leve hasta potencialmente mortal. Las mutaciones en los genes ADAMTS2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, PLOD1 y TNXB provocan SED. Las mutaciones en estos genes alteran habitualmente la estructura, la producción o el procesamiento del colágeno o de las proteínas que interactúan con colágeno. Un defecto en el colágeno puede debilitar el tejido conjuntivo en la piel, los huesos, vasos sanguíneos y órganos, dando como resultado las características del trastorno. Por tanto, el depósito de colágeno inducido por los antagonistas de miR-29a-c de la invención actuaría reponiendo el nivel de colágeno normal en pacientes con SED y aliviando los síntomas de la enfermedad. De forma similar, la administración de un antagonista de miR-29a-c beneficiaría a los sujetos que padecen deficiencia de vitamina C o escorbuto. La deficiencia de vitamina C es una enfermedad que resulta de la ingesta insuficiente de vitamina C, que es necesaria para la síntesis normal de colágeno en humanos.

El depósito de colágeno en los tejidos que resulta de la administración de un antagonista de miR-29a-c también podría ser útil en diversas aplicaciones cosméticas. Los efectos del envejecimiento de la piel producidos por los procesos de envejecimiento natural o el fotodaño que resulta de la sobreexposición al sol podrían reducirse administrando un antagonista de miR-29a-c a un sujeto que lo necesita. La administración de antagonistas de miR-29a-c también puede facilitar la desaparición de marcas de estiramiento. Las marcas de estiramiento son una forma de cicatrización cutánea que están provocadas por el desgarramiento de la dermis. Las marcas de estiramiento son el resultado del estiramiento rápido de la piel asociado a un crecimiento rápido (común en la pubertad) o a un aumento de peso (por ejemplo, embarazo).

El tejido al que pueden aplicarse los métodos de la invención incluye tejido facial, tal como tejido de la frente, labio, mejilla, barbilla, ceja, párpado, bajo el ojo o cerca de la boca, tejido de la mano, tejido del cuello, tejido del brazo, tejido de la pierna, tejido de la barriga o tejido del pecho. En algunas realizaciones, el tejido puede comprender una herida, un injerto de piel, tejido cicatricial, arrugas, piel laxa, daño solar, daño químico, daño por calor, daño por frío y/o marcas de estiramiento.

En el aspecto cosmético de la invención, la puesta en contacto del tejido con el antagonista de miR-29a-c comprende la inyección en dicho tejido, la inyección en la vasculatura que alimenta a dicho tejido o la aplicación

tópica. La aplicación tópica puede ser una pomada, una crema, un gel, un ungüento o un bálsamo. En otra realización de este aspecto, el método comprende adicionalmente el uso de un apósito o banda de presión. El antagonista de miR-29a-c puede ponerse en contacto con dicho tejido más de una vez. En algunas realizaciones, el antagonista se pone en contacto con dicho tejido 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces. En otras realizaciones, el antagonista se pone en contacto con dicho tejido durante 2, 3, 4, 5 o 6 días, durante 1, 2, 3 o 4 semanas, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 meses o durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 años.

En todavía otra realización de este aspecto, el método comprende adicionalmente poner en contacto dicho tejido con un segundo agente. El segundo agente puede incluir, pero no se limita a, vitamina A tópica, vitamina C tópica o vitamina E. En otra realización de este aspecto, el método comprende adicionalmente someter dicho tejido a un segundo tratamiento. El segundo tratamiento puede comprender una exfoliación química, tratamiento con láser, dermoaplanamiento o dermoabrasión. En otra realización de este aspecto, el tejido está en un sujeto que padece síndrome de Ehler-Danlos o deficiencia de vitamina C.

La presente memoria descriptiva también contempla el uso de antagonistas de miR-29a-c como agentes profibróticos para convertir las placas blandas de la vasculatura en tejido fibrótico para prevenir el infarto de miocardio. Las placas blandas son una acumulación de lípidos que contienen predominantemente colesterol que se encuentran bajo el revestimiento endotelial de la pared arterial. Recientemente se reconoció que estas placas blandas son propensas a la ruptura dando como resultado la formación de un coagulo sanguíneo, que puede bloquear potencialmente el flujo de sangre a través de la arteria y provocar un ataque al corazón (es decir, infarto de miocardio). A menudo, estas placas blandas son responsables de provocar que un sujeto sano sin síntomas padezca un ataque al corazón aparentemente inesperado. Tras la ruptura de una placa blanda, la pared del vaso cicatriza y la placa blanda se convierte en una placa dura, que raras veces provoca problemas adicionales. Por tanto, las estrategias para convertir las placas blandas en tejido fibrótico evitarían la ruptura de las placas blandas y posiblemente la inducción de un infarto de miocardio.

Tal como se describió en detalle anteriormente, la inhibición de miR-29a-c conduce a un aumento en el depósito de colágeno y la formación de tejido fibrótico. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva proporciona un método para aumentar la formación de tejido fibrótico en la pared de un vaso que comprende suministrar un antagonista de miR-29a-c a uno o más sitios de placas blandas en la pared del vaso, en donde la placa blanda se convierte en tejido fibrótico tras el suministro del antagonista de miR-29a-c. Las placas blandas pueden identificarse por métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ultrasonidos intravasculares y tomografía computarizada (Sahara *et al.* (2004) *European Heart Journal*, Vol. 25: 2026-2033; Budhoff (2006) *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48: 319-321; Hausleiter *et al.* (2006) *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48: 312-318). Cualquiera de los antagonistas de miR-29a-c descritos en el presente documento es adecuado para su uso en el método.

El antagonista de miR-29a-c puede suministrarse al uno o más sitios de placas blandas mediante inyección directa o usando un catéter o un dispositivo que aísla la circulación coronaria. En una realización, el antagonista de miR-29a-c se suministra al uno o más sitios de placas blandas mediante un dispositivo médico usado en cirugía vascular, tal como una endoprótesis o un balón. El antagonista de miR-29 puede recubrirse sobre una endoprótesis de metal para formar una endoprótesis que eluye fármacos. Una endoprótesis que eluye fármacos es un armazón que mantiene abiertas arterias enfermas o estrechadas y libera un compuesto para prevenir la proliferación y/o la inflamación celular. Los antagonistas de miR-29ac pueden aplicarse a una endoprótesis de metal incrustada en un polímero fino para la liberación del miR-29a-c a lo largo del tiempo. Se conocen en la técnica métodos de recubrimiento de endoprótesis con compuestos terapéuticos. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.144.422; la patente estadounidense n.º 7.055.237; y el documento WO 2004/004602. En algunas realizaciones, el miR-29a-c puede usarse en combinación con otros compuestos contra la reestenosis para producir una formulación para su incorporación en balones y endoprótesis que eluyen fármacos. Los compuestos adecuados para su uso en combinación con los antagonistas de miR-29a-c incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, rapamicina (sirolimús), tacrolimús, zotarolimús, everolimús, docetaxel, pimecrolimús y derivados de los mismos.

La presente memoria descriptiva también contempla métodos para recuperar o eliminar un agonista de miR-29a-c tras el tratamiento. En una realización, el método comprende la sobreexpresión de las regiones de sitios de unión para miR-29a-c en fibroblastos usando un promotor específico de fibroblastos. Las regiones de sitios de unión contienen preferiblemente una secuencia de la región simiente para miR-29a-c. En algunos casos, el sitio de unión puede contener una secuencia de la UTR 3' de una o más dianas de miR-29ac, tales como COL1A1, COL1A2, COL1A3 y/o FBN1. En otro caso, un antagonista de miR-29a-c puede administrarse tras un agonista de miR-29a-c para atenuar o detener la función del microARN. En otro caso, la presente memoria descriptiva proporciona un método para recuperar o eliminar los antagonistas de miR-29a-c tras el tratamiento. El método puede comprender la sobreexpresión de sitios de unión para los antagonistas de miR-29a-c en fibroblastos u otro tejido en el que se administró un antagonista de miR-29a-c.

Terapia combinada

En otro caso, se prevé el uso de un agonista de miR-29a-c en combinación con otras modalidades terapéuticas para

tratar la hipertrofia cardiaca, la insuficiencia cardiaca y el infarto de miocardio. Por tanto, también se proporcionan al sujeto otras terapias cardiacas farmacéuticas “convencionales” en combinación con el agonista de miR-29a-c. Ejemplos de otras terapias incluyen, sin limitación, los denominados “betabloqueantes”, antihipertensivos, cardiotónicos, antitrombóticos, vasodilatores, antagonistas de hormonas, inotrópicos, diuréticos, antagonistas de receptores de endotelina, bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de ACE, antagonistas de angiotensina tipo 2 y bloqueantes/inhibidores de citocina e inhibidores de HDAC.

Pueden conseguirse combinaciones poniendo en contacto las células cardiacas con una única composición o formulación farmacológica que incluye un agonista de miR-29a-c y un agente farmacéutico convencional, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en la que una composición incluye un agonista de miR-29a-c y la otra incluye el agente farmacéutico convencional. Alternativamente, la terapia que usa un agonista de miR-29a-c puede preceder o seguir a la administración del(de los) otro(s) agente(s) en intervalos que oscilan desde minutos hasta semanas. En los casos en los que el agente farmacéutico convencional y el agonista de miR-29a-c se aplican por separado a la célula, se garantizaría generalmente que no transcurra un periodo de tiempo significativo entre el momento de suministro de cada uno de ellos, de manera que el agente farmacéutico y el agonista de miR-29a-c puedan seguir ejerciendo un efecto combinado ventajoso sobre la célula. En tales casos, se contempla que la célula se pondría normalmente en contacto con ambas modalidades en un plazo de aproximadamente 12-24 horas entre sí y, más preferiblemente, en un plazo de aproximadamente 6-12 horas entre sí, siendo lo más preferido que el tiempo de retraso sea de tan sólo aproximadamente 12 horas. Sin embargo, en algunas situaciones, puede ser deseable prolongar significativamente el periodo de tiempo para el tratamiento, con intervalos de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

También puede concebirse que sean deseables más de una administración del agonista de miR-29a-c o del otro agente farmacéutico. A este respecto, pueden emplearse diversas combinaciones. A modo de ilustración, donde el agonista de miR-29a-c es “A” y el otro agente es “B”, las siguientes permutaciones basadas en 3 y 4 administraciones totales se incluyen a modo de ejemplo:

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

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

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

Asimismo, se contemplan otras combinaciones.

Los expertos en la técnica conocen bien los agentes terapéuticos farmacológicos y los métodos de administración, las dosificaciones, etc. (véanse, por ejemplo, “Physicians Desk Reference”, “The Pharmacological Basis of Therapeutics” de Klaassen, “Remington’s Pharmaceutical Sciences” y “The Merck Index, Eleventh Edition”, incorporados en el presente documento por referencia en las partes relevantes), y pueden combinarse con la invención a la vista de las divulgaciones del presente documento. Puede ser necesaria alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que está sometiéndose a tratamiento. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual, y tales determinaciones individuales están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

Ejemplos no limitativos de un agente terapéutico farmacológico que puede usarse en la presente invención incluyen un agente antihiperlipoproteínico, un agente antiarteriosclerótico, un agente antitrombótico/fibrinolítico, un coagulante sanguíneo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensivo, un vasopresor, un agente de tratamiento para insuficiencia cardiaca congestiva, un agente antianginoso, un agente antibacteriano o una combinación de los mismos.

Además, debe indicarse que cualquiera de los siguientes puede usarse para desarrollar nuevos conjuntos de genes diana de terapia cardiaca de forma similar a como se usan β -bloqueantes en los presentes ejemplos (véase a continuación). Aunque se espera que muchos de estos genes puedan solaparse, es probable que puedan desarrollarse nuevas dianas génicas.

En determinadas realizaciones, la administración de un agente que disminuye la concentración de uno o más lipoproteínas y/o lípidos sanguíneos, conocido en el presente documento como “antihiperlipoproteínico”, puede combinarse con una terapia cardiovascular según la presente invención, particularmente en el tratamiento de la aterosclerosis y los engrosamientos o bloqueos de tejidos vasculares. En determinadas realizaciones, un agente antihiperlipoproteínico puede comprender un derivado de ácido ariloxialcanoico/fíbrico, una resina / secuestrante de ácidos biliares, un inhibidor de HMG CoA reductasa, un derivado de ácido nicotínico, una hormona tiroidea o análogo de hormona tiroidea, un agente misceláneo o una combinación de los mismos.

Ejemplos no limitativos de derivados de ácido ariloxialcanoico/fíbrico incluyen beclobrato, enzafibrato, binifibrato, ciprofibrato, clinofibrato, clofibrato (atromida-S), ácido clofíbrico, etofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo (Lopid),

nicofibrato, pirifibrato, ronifibrato, simfibrato y teofibrato.

Ejemplos no limitativos de resinas / secuestrantes de ácidos biliares incluyen colestiramina (Cholybar, Questran), colestipol (Colestid) y polidexida.

5 Ejemplos no limitativos de inhibidores de HMG CoA reductasa incluyen lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravochol) o simvastatina (Zocor).

10 Ejemplos no limitativos de derivados de ácido nicotínico incluyen nicotinato, acepimox, niceritrol, nicoclonato, nicomol y ácido oxiniácico.

Ejemplos no limitativos de hormonas tiroideas y análogos de las mismas incluyen etoroxato, ácido tiroprópico y tiroxina.

15 Ejemplos no limitativos de antihiperlipoproteinémicos misceláneos incluyen acifran, azacosterol, benfluorex, β -benzalbutiramida, carnitina, sulfato de condroitina, clomestrona, detaxtrán, sulfato de dextrano sólido, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, eritadenina, furazabol, meglutol, melinamida, mitatrienodiol, ornitina, γ -orizanol, pantetina, tetraacetato de pentaeritritol, α -fenilbutiramida, pirozadil, probucol (Lorelco), β -sitosterol, sal de piperazina de ácido sultosílico, tiadenol, triparanol y xenbucina. Ejemplos no limitativos de un antiarteriosclerótico incluyen carbamato de piridinol.

25 En determinados casos, la administración de un agente que ayuda en la eliminación o prevención de los coágulos sanguíneos puede combinarse con la administración de un modulador, particularmente en el tratamiento de la aterosclerosis y los bloqueos de la vasculatura (por ejemplo, arterial). Ejemplos no limitativos de agentes antitrombóticos y/o fibrinolíticos incluyen anticoagulantes, antagonistas de anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes trombolíticos, antagonistas de agentes trombolíticos o combinaciones de los mismos.

30 En determinados casos, son preferibles los agentes antitrombóticos que pueden administrarse por vía oral, tales como, por ejemplo, aspirina y wafarina (Coumadin).

35 Ejemplos no limitativos de anticoagulantes incluyen acenocoumarol, ancrod, anisindiona, bromindiona, clorindiona, coumetarol, ciclocoumarol, sulfato de dextrano sódico, dicoumarol, difenadiona, biscoumacetato de etilo, etilidencoumarol, fluindiona, heparina, hirudina, liapolato sódico, oxazidiona, polisulfato de pentosano, fenindiona, fenprocoumon, fosvitina, picotamida, tiocloamarol y warfarina.

Ejemplos no limitativos de agentes antiplaquetarios incluyen aspirina, un dextrano, dipiridamol (Persantin), heparina, sulfipiranona (Anturane) y ticlopidina (Ticlid).

40 Ejemplos no limitativos de agentes trombolíticos incluyen activador de plasminógeno tisular (Activase), plasmina, prourocinasa, urocinasa (Abbokinase), estreptocinasa (Streptase), anistreplasa/APSAC (Eminase).

45 En determinadas realizaciones en las que un sujeto está padeciendo hemorragia o un aumento de la probabilidad de padecer hemorragia, puede usarse un agente que puede potenciar la coagulación sanguínea. Ejemplos no limitativos de agentes que promueven la coagulación sanguínea incluyen antagonistas de agentes trombolíticos y antagonistas de anticoagulantes.

Ejemplos no limitativos de antagonistas de anticoagulantes incluyen protamina y vitamina K1.

50 Ejemplos no limitativos de antagonistas de agentes trombolíticos incluyen ácido amiocaproico (Amicar) y ácido tranexámico (Amstat). Ejemplos no limitativos de antitrombóticos incluyen anagrelida, argatrobán, cilstazol, daltrobán, defibrotida, enoxaparina, fraxiparina, indobufeno, lamoparán, ozagrel, picotamida, plafibrida, tedelparina, ticlopidina y triflusal.

55 Ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos incluyen agentes antiarrítmicos de clase I (bloqueantes de los canales de sodio), agentes antiarrítmicos de clase II (bloqueantes beta-adrenérgicos), agentes antiarrítmicos de clase III (fármacos que prolongan la repolarización), agentes antiarrítmicos de clase IV (bloqueantes de los canales de calcio) y agentes antiarrítmicos misceláneos.

60 Ejemplos no limitativos de bloqueantes de los canales de sodio incluyen agentes antiarrítmicos de clase IA, clase IB y clase IC. Ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IA incluyen disopiramida (Norpace), procainamida (Pronestyl) y quinidina (Quinidex). Ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IB incluyen lidocaína (xilocaína), tocainida (Tonocard) y mexiletina (Mexitil). Ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos de clase IC incluyen encainida (Enkaid) y flecainida (Tambocor).

65 Ejemplos no limitativos de un β -bloqueante, también conocido como bloqueante β -adrenérgico, antagonista β -adrenérgico o agente antiarrítmico de clase II, incluyen acebutolol (Sectral), alprenolol, amosulalol, arotinolol,

atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, bupranolol, clorhidrato de butidrina, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, esmolol (Brevibloc), indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nadoxolol, nifenalol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propanolol (Inderal), sotalol (Betapace), sulfinalol, talinolol, tertatolol, timolol, toliprolol y xibinolol. En determinadas realizaciones, el beta-bloqueante comprende un derivado de ariloxipropanolamina. Ejemplos no limitativos de derivados de ariloxipropanolamina incluyen acebutolol, alprenolol, arotinolol, atenolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bunitrolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, epanolol, indenolol, mepindolol, metipranolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nipradilol, oxprenolol, penbutolol, pindolol, propanolol, talinolol, tertatolol, timolol y toliprolol.

Ejemplos no limitativos de un agente que prolonga la repolarización, también conocido como agente antiarrítmico de clase III, incluyen amiodarona (Cordarone) y sotalol (Betapace).

Ejemplos no limitativos de un bloqueante de los canales de calcio, también conocido como agente antiarrítmico de clase IV, incluyen una arilalquilamina (por ejemplo, bepridilo, diltiazem, fendilina, galopamilol, prenilamina, terodilina, verapamilol), un derivado de dihidropiridina (felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina), un derivado de piperazina (por ejemplo, cinnarizina, flunarizina, lidoflazina) o un bloqueante de canales de calcio misceláneo tal como benciclano, etafenona, magnesio, mibefradil o perhexilina. En determinadas realizaciones, un bloqueante de los canales de calcio comprende un antagonista de calcio de dihidropiridina de acción prolongada (de tipo nifedipina).

Ejemplos no limitativos de agentes antiarrítmicos misceláneos incluyen adenosina (Adenocard), digoxina (Lanoxin), acecainida, ajmalina, amoproxano, aprindina, tosilato de bretilio, bunaftina, butobendina, ácido capobénico, cifenlina, disopiranida, hidroquinidina, indecainida, bromuro de ipatropio, lidocaína, lorajmina, lorcainida, meobentina, moricizina, pirmenol, prajmalina, propafenona, pirinolina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina y viquidil.

Ejemplos no limitativos de agentes antihipertensivos incluyen agentes simpatoalíticos, alfa/beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes, agentes anti-angiotensina II, beta-bloqueantes, bloqueantes de los canales de calcio, vasodilatadores y antihipertensivos misceláneos.

Ejemplos no limitativos de un α -bloqueante, también conocido como bloqueante α -adrenérgico o antagonista α -adrenérgico, incluyen amosulalol, arotinolol, dapiprazol, doxazosin, mesilatos de ergoloide, fenspirida, indoramina, labetalol, nicergolina, prazosina, terazosina, tolazolina, trimazosina y yohimbina. En determinadas realizaciones, un alfa-bloqueante puede comprender un derivado de quinazolina. Ejemplos no limitativos de derivados de quinazolina incluyen alfuzosina, bunazosina, doxazosina, prazosina, terazosina y trimazosina.

En determinadas realizaciones, un agente antihipertensivo es un antagonista tanto α - como β -adrenérgico. Ejemplos no limitativos de un alfa/beta-bloqueante comprenden labetalol (Normodyne, Trandate).

Ejemplos no limitativos de agentes anti-angiotensina II incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de receptores de angiotensina II. Ejemplos no limitativos de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de ACE) incluyen alacepril, enalapril (Vasotec), captopril, cilazapril, delapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltopril, perindopril, quinapril y ramipril. Ejemplos no limitativos de un bloqueante de receptores de angiotensina II, también conocido como antagonista de receptores de angiotensina II, bloqueante de receptor de ANG o bloqueante de receptor de ANG-II de tipo 1 (ARBS), incluyen angiocandesartán, eprosartán, irbesartán, losartán y valsartán.

Ejemplos no limitativos de un simpatoalítico incluyen un simpatoalítico que actúa centralmente o un simpatoalítico que actúa periféricamente. Ejemplos no limitativos de un simpatoalítico que actúa centralmente, también conocido como simpatoalítico del sistema nervioso central (SNC), incluyen clonidina (Catapres), guanabenz (Wytensin), guanfacina (Tenex) y metildopa (Aldomet). Ejemplos no limitativos de un simpatoalítico que actúa periféricamente incluyen un agente bloqueante de ganglios, un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas, un agente bloqueante β -adrenérgico o un agente bloqueante alfa1-adrenérgico. Ejemplos no limitativos de un agente bloqueante de ganglios incluyen mecamilamina (Inversine) y trimetafán (Arfonad). Ejemplos no limitativos de un agente bloqueante de neuronas adrenérgicas incluyen guanetidina (Ismelin) y reserpina (Serpasil). Ejemplos no limitativos de un bloqueante β -adrenérgico incluyen acenitolol (Sectral), atenolol (Tenormin), betaxolol (Kerlone), carteolol (Cartrol), labetalol (Normodyne, Trandate), metoprolol (Lopressor), nadanolol (Corgard), penbutolol (Levatol), pindolol (Visken), propanolol (Inderal) y timolol (Blocadren). Ejemplos no limitativos de un bloqueante alfa1-adrenérgico incluyen prazosina (Minipress), doxazosina (Cardura) y terazosina (Hytrin).

En determinadas realizaciones, un agente terapéutico cardiovascular puede comprender un vasodilatador (por ejemplo, un vasodilatador cerebral, un vasodilatador coronario o un vasodilatador periférico). En determinadas realizaciones preferidas, un vasodilatador comprende un vasodilatador coronario. Ejemplos no limitativos de un vasodilatador coronario incluyen amotrifeno, bendazol, hemisuccinato de benfurodilo, benciodarona, cloracizina,

cromonar, clobenfurol, clonitrato, dilazep, dipiridamol, droprenilamina, efloxato, tetranitrano de ertritol, etafenona, fendilino, floredil, ganglefeno, herestrol bis(β -dietilaminoetil éter), hexobendina, tosilato de itramina, kelina, lidoflanina, hexanitrano de manitol, medibazina, nicorglicerina, tetranitrato de pentaeritrol, pentritinol, perhexilina, pimefilina, trapidil, tricromilo, trimetazidina, fosfato de trolnitrato y visnadina.

5 En determinadas realizaciones, un vasodilatador puede comprender un vasodilatador para terapia crónica o un vasodilatador de emergencia hipertensiva. Ejemplos no limitativos de un vasodilatador para terapia crónica incluyen hidralazina (Apresoline) y minoxidil (Loniten). Ejemplos no limitativos de un vasodilatador de emergencia hipertensiva incluyen nitroprusiato (Nipride), dióxido (Hiperstat IV), hidralazina (Apresoline), minoxidil (Loniten) y verapamilo.

10 Ejemplos no limitativos de antihipertensivos misceláneos incluyen ajmalina, ácido γ -aminobutírico, bufeniolo, cicletainina, ciclosidomina, un tannato de criptenamina, fenoldopam, flosequinán, ketanserina, mebutamato, mecamilamina, metildopa, tiosemicarbazona de metil-4-piridilcetona, muzolimina, pargilina, pempidina, pinacidil, piperóxan, primaperona, una protoveratrina, raubasina, rescimetol, rilmenideno, saralazina, nitroprusiato de sodio, ticrinafeno, camsilato de trimetafán, tirosinasa y urapidilo.

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

20 Ejemplos no limitativos de derivados de ariletanolamina incluyen amosulalol, bufuralol, dilevalol, labetalol, pronetalol, sotalol y sulfinalol.

25 Ejemplos no limitativos de derivados de benzotiadiazina incluyen altizida, bendroflumetiazida, benztiiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, ciclotiazida, dióxido, epitiazida, etiiazida, fenquizona, hidrocortotiazida, hidroflumetizida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclormetiazida y triclorometiazida.

30 Ejemplos no limitativos de derivados de *N*-carboxialquil(péptido/lactama) incluyen alacepril, captopril, cilazapril, delapril, enalapril, enalaprilat, fosinopril, lisinopril, moveltipril, perindopril, quinapril y ramipril.

35 Ejemplos no limitativos de derivados de dihidropiridina incluyen amlodipino, felodipino, isradipino, nicardipino, nifedipino, nilvadipino, nisoldipino y nitrendipino.

Ejemplos no limitativos de derivados de guanidina incluyen betanidina, debrisoquina, guanabenz, guanacina, guanadrel, guanazodina, guanetidina, guanfacina, guanoclor, guanoxabenz y guanoxano.

40 Ejemplos no limitativos de hidrazinas/ftalazinas incluyen budralazina, cadralazina, dihidralazina, endralazina, hidracarbazina, hidralazina, feniprazina, píldralazina y todralazina.

Ejemplos no limitativos de derivados de imidazol incluyen clonidina, lofexidina, fentolamina, tiamenidina y tolonidina.

45 Ejemplos no limitativos de compuestos de amonio cuaternario incluyen bromuro de azametonio, cloruro de clorisondamina, hexametonio, bis(metilsulfato) de pentacinio, bromuro de pentametonio, tartrato de pentolinio, cloruro de fenactropinio y metosulfato de trimetidinio.

50 Ejemplos no limitativos de derivados de reserpina incluyen bietaserpina, deserpidina, rescinnamina, reserpina y sirosingopina.

Ejemplos no limitativos de derivados de sulfonamida incluyen ambusida, clopamida, furosemida, indapamida, quinetazona, tripamida y xipamida.

55 Los vasopresores se usan generalmente para aumentar la tensión arterial durante el choque, que puede producirse durante un procedimiento quirúrgico. Ejemplos no limitativos de un vasopresor, también conocido como antihipotensivo, incluyen metilsulfato de amezinio, amida de angiotensina, dimetofrina, dopamina, etifelmina, etilefrina, gepefrina, metaraminol, midodrina, norepinefrina, foledrina y sinefrina.

60 Ejemplos no limitativos de agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva incluyen agentes anti-angiotensina II, tratamiento de reducción de poscarga-precarga, diuréticos y agentes inotrópicos.

65 En determinadas realizaciones, un sujeto animal que no puede tolerar un antagonista de angiotensina puede tratarse con una terapia de combinación. Dicha terapia puede combinar la administración de hidralazina (Apresoline) y dinitrato de isosorbida (Isordil, Sorbitrate).

Ejemplos no limitativos de un diurético incluyen una tiazida o derivado de benzotiadiazina (por ejemplo, altiazida, bendroflumetazida, benzotiazida, bencilhidroclorotiazida, butiazida, clorotiazida, clorotiazida, clortalidona, ciclopentiazida, epitiazida, etiazida, etiazida, fenquizona, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, meticlotiazida, meticrano, metolazona, paraflutizida, politizida, tetraclorometiazida, triclorometiazida), un organomercurial (por ejemplo, clormerodrína, meralurida, mercamfamida, mercaptomerina sódica, ácido mercumalílico, mercumatilina sódica, cloruro mercurioso, mersalil), una pteridina (por ejemplo, furtereno, triamtereno), purinas (por ejemplo, acefilina, 7-morfolinometilteofilina, pamobrom, proteobromina, teobromina), esteroides incluyendo antagonistas de aldosterona (por ejemplo, canrenona, oleandrina, espirolactona), un derivado de sulfonamida (por ejemplo, acetazolamida, ambusida, azosemida, bumetanida, butazolamida, cloraminofenamida, clofenamida, clopamida, clorexolona, difenilmetano-4,4'-disulfonamida, disulfamida, etoxzolamida, furosemida, indapamida, mefrusida, metazolamida, piretanida, quinetazona, torasemida, tripamida, xipamida), un uracilo (por ejemplo, aminometradina, amisometradina), un antagonista moderado de potasio (por ejemplo, amilorida, triamtereno) o un diurético misceláneo tal como aminozina, arbutina, clorazaniolo, ácido etacrínico, etozolina, hidracarbazina, isosorbida, manitol, metochalcona, muzolimina, perhexilina, ticnafeno y urea.

Ejemplos no limitativos de un agente inotrópico positivo, también conocido como cardiotónico, incluyen acefilina, una acetildigitoxina, 2-amino-4-picolina, amrinona, hemisuccinato de benfurodilo, bucladesina, cerberosina, camfotamida, convalatoxina, cimarina, denopamina, deslanósido, digitalina, digitalis, digitoxina, digoxina, dobutamina, dopamina, dopexamina, enoximona, eritrofleína, fenalcomina, gitalina, gitoxina, glicociamina, heptaminol, hidrastinina, ibopamina, un lanatósido, metamivam, milrinona, nerifolina, oleandrina, ouabaina, oxifedrina, prenalterol, proscillaridina, resibufogenina, escilareno, escilarenina, estrofantina, sulmazol, teobromina y xamoterol.

En realizaciones particulares, un agente inotrópico es un glicósido cardíaco, un agonista beta-adrenérgico o un inhibidor de fosfodiesterasa. Ejemplos no limitativos de un glicósido cardíaco incluyen digoxina (Lanoxin) y digitoxina (Crystodigin). Ejemplos no limitativos de un agonista β -adrenérgico incluyen albuterol, bambuterol, bitolterol, carbuterol, clenbuterol, clorprenalina, denopamina, dioxetdrina, dobutamina (Dobutrex), dopamina (Intropin), dopexamina, efedrina, etafedrina, etilnorepinefrina, fenoterol, formoterol, hexoprenalina, ibopamina, isoetarina, isoproterenol, mabuterol, metaproterenol, metoxifenamina, oxifedrina, pirbuterol, procaterol, protokilol, reproterol, rimiterol, ritodrina, soterenol, terbutalina, tretoquinol, tulobuterol y xamoterol. Ejemplos no limitativos de un inhibidor de fosfodiesterasa incluyen amrinona (Inocor).

Los agentes antianginosos pueden comprender organonitratos, bloqueantes de canales de calcio, beta-bloqueantes y combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de organonitratos, también conocidos como nitrovasodilatadores, incluyen nitroglicerina (Nitro-bid, Nitrostat), dinitrato de isosorbida (Isordil, Sorbitrate) y nitrato de amilo (Aspirol, Vaporole).

La endotelina (ET) es un péptido de 21 aminoácidos que tiene efectos fisiológicos y fisiopatológicos potentes que parecen estar implicados en el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Los efectos de la ET están mediados por la interacción con dos clases de receptores de superficie celular. El receptor de tipo A (ET-A) está asociado a vasoconstricción y crecimiento celular, mientras que el receptor de tipo B (ET-B) está asociado a vasodilatación mediada por células endoteliales y a la liberación de otras neurohormonas, tales como aldosterona. Se conocen en la técnica agentes farmacológicos que pueden inhibir la producción de ET su capacidad para estimular células relevantes. La inhibición de la producción de ET implica el uso de agentes que bloquean una enzima denominada enzima convertidora de endotelina que está implicada en el procesamiento del péptido activo a partir de su precursor. La inhibición de la capacidad de la ET para estimular células implica el uso de agentes que bloquean la interacción de ET con sus receptores. Ejemplos no limitativos de antagonistas de receptores de endotelina (ARE) incluyen bosentano, enrasentano, ambrisentano, darusentano, tezosentano, atrasentano, avosentano, clazosentano, edonentano, sitaxsentano, TBC 3711, BQ 123 y BQ 788.

En determinadas realizaciones, el agente terapéutico secundario puede comprender una cirugía de algún tipo, que incluye, por ejemplo, cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía, y en particular una cirugía curativa, puede usarse conjuntamente con otras terapias, tales como la presente invención y uno o más de otros agentes.

Tales agentes terapéuticos quirúrgicos para enfermedades y trastornos vasculares y cardiovasculares son conocidos por los expertos en la técnica, y pueden comprender, pero no se limitan a, realizar cirugía en un organismo, proporcionar una prótesis mecánica cardiovascular, angioplastia, reperfusión de arterias coronarias, ablación de catéter, proporcionar un desfibrilador cardioversor implantable al sujeto, soporte circulatorio mecánico o una combinación de los mismos. Ejemplos no limitativos de un soporte circulatorio mecánico que puede usarse en la presente invención comprenden una contrapulsación con balón intraaórtico, un dispositivo de asistencia ventricular izquierda o una combinación de los mismos.

Formulaciones farmacéuticas y vías para la administración a sujetos

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista o antagonista

de miR-29a-c. El agonista puede ser un vector de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica para miR-29a-c, o un polinucleótido que comprende una secuencia de miR-29a-c madura o una porción eficaz de la misma. El agonista puede estar comprendido en un vehículo de suministro lipídico. El antagonista puede ser un polinucleótido que se hibrida a miR-29a-c o una diana del mismo.

5 Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, se prepararán composiciones farmacéuticas de una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto supondrá preparar composiciones que están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser nocivas para humanos o animales.

10 Pueden usarse sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas, como vehículos de suministro para los inhibidores de oligonucleótido (por ejemplo, antagonistas) de la función de microARN o constructos que expresan microARN particulares. Las emulsiones de grasas disponibles comercialmente que son adecuadas para suministrar los ácidos nucleicos de la invención a tejidos de músculo esquelético y cardíaco incluyen Intralipid®, Liposyn®, Liposyn® II, Liposyn® III, Nutrilipid, y otras emulsiones de lípidos similares. Un sistema coloidal preferido para su uso como vehículo de suministro *in vivo* es un liposoma (es decir, una vesícula de membrana artificial). La preparación y el uso de tales sistemas se conocen bien en la técnica. También se divulgan formulaciones a modo de ejemplo en los documentos US 5.981.505, US 6.217.900, US 6.383.512, US 5.783.565, US 7.202.227, US 6.379.965, US 6.127.170, US 5.837.533, US 6.747.014 y WO03/093449.

25 Generalmente, se deseará emplear sales y tampones apropiados para hacer que los vehículos de suministro sean estables y permitan su captación por las células diana. También se emplearán tampones para introducir células recombinantes en un sujeto. Las composiciones acuosas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz del vehículo de suministro que comprende los polinucleótidos inhibidores o secuencias de polinucleótido de miARN (por ejemplo, liposomas u otros complejos o vectores de expresión) o células, disueltos o dispersados en un medio acuoso o portador farmacéuticamente aceptable. Las frases “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras no deseadas cuando se administran a un animal o un humano. Tal como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” incluye disolventes, tampones, disoluciones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares aceptables para su uso en la formulación de productos farmacéuticos, tales como productos farmacéuticos adecuados para su administración a humanos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los principios activos de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones, siempre que no inactiven los vectores o las células de las composiciones.

40 Las composiciones activas de la presente invención pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones según la presente invención puede realizarse por medio de cualquier vía común siempre que el tejido diana esté disponible por medio de esa vía. Esto incluye oral, nasal o bucal. Alternativamente, la administración puede realizarse mediante inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, o mediante inyección directa en el tejido cardíaco. También pueden administrarse composiciones farmacéuticas que comprenden antagonistas de miARN o constructos de expresión que comprenden secuencias de miARN mediante sistemas de catéter o sistemas que aíslan la circulación coronaria para la administración de agentes terapéuticos al corazón. Se conocen en la técnica diversos sistemas de catéter para administrar agentes terapéuticos al corazón y a la vasculatura coronaria. Algunos ejemplos no limitativos de métodos de administración basados en catéter o métodos de aislamiento coronario adecuados para su uso en la presente invención se divulgan en la patente estadounidense n.º 6.416.510, la patente estadounidense n.º 6.716.196, la patente estadounidense n.º 6.953.466, el documento WO 2005/082440, el documento WO 2006/089340, la patente estadounidense con n.º de publicación 2007/0203445, la patente estadounidense con n.º de publicación 2006/0148742 y la patente estadounidense con n.º de publicación 2007/0060907. Tales composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, tal como se describió anteriormente.

55 Los compuestos activos también pueden administrarse por vía parenteral o por vía intraperitoneal. A modo de ilustración, pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o como sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen generalmente un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

65 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable o administración por catéter incluyen, por ejemplo, dispersiones o disoluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o disoluciones inyectables. Generalmente, estas preparaciones son estériles y fluidas hasta el grado de que exista una fácil inyectabilidad. Las preparaciones deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y

deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Los medios de dispersión o disolventes apropiados pueden contener, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede fomentarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede fomentarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en una cantidad apropiada en un disolvente, junto con cualquier otro ingrediente (por ejemplo, tal como se enumeró anteriormente) según se desee, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes deseados, por ejemplo, tal como se enumeró anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos incluyen técnicas de secado a vacío y secado por congelación que producen un polvo del(de los) principio(s) activo(s) más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

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

Tras la formulación, las disoluciones se administran preferiblemente de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones pueden administrarse fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución generalmente se tampona adecuadamente y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico, por ejemplo, con suficiente solución salina o glucosa. Tales disoluciones acuosas pueden usarse, por ejemplo, para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Preferiblemente, se emplean medios acuosos estériles tal como conocen los expertos en la técnica, particularmente en vista de la presente divulgación. A modo de ilustración, una dosis única puede disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente una cierta variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que está recibiendo el tratamiento. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración a humanos, las preparaciones deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiera la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Las formulaciones cosméticas para aumentar el depósito de colágeno en tejidos pueden comprender al menos un antagonista de miR-29a-c. El antagonista puede ser un antagonista de miR-29a, miR-29b, miR-29c, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el antagonista de miR-29a-c es un antagomir. El antagonista puede estar unido o conjugado a agentes que facilitan la entrada del antagonista en la célula o tejidos. Tales agentes pueden incluir transportadores de internalización celular, tales como antennapedia, TAT, Buforin II, Transportan, péptido anfipático modelo, K-FGF, Ku70, Prion, pVEC, Pep-1, SynB1, SynB3, SynB5, Pep-7, HN-1, bis-guanidinio-espermidina-colesterol, bis-guanidinio-tren-colesterol y poliarginina. El agente puede unirse al antagonista de miR-29a-c en su extremo amino o carboxilo terminal. En una realización, el agente se une al antagonista mediante una secuencia que se escinde tras la entrada en la célula. Tales secuencias comprenden normalmente secuencias consenso para proteasas, tal como se conocen en la técnica.

Las composiciones cosméticas pueden formularse en todos los tipos de vehículos. Ejemplos no limitativos de vehículos adecuados incluyen emulsiones (por ejemplo, emulsiones de agua en aceite, agua en aceite en agua, aceite en agua, aceite en agua en aceite, aceite en agua en silicona), cremas, lociones, disoluciones (tanto acuosas como hidroalcohólicas), bases anhidras (tales como barras de labios y polvos), geles y pomadas o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como conocería un experto habitual en la técnica (Remington's, 1990). Las variaciones y otros vehículos apropiados resultarán evidentes para el experto en la técnica y son apropiados para su uso en la presente invención. En determinadas realizaciones, las concentraciones y combinaciones de los ingredientes se seleccionan de un modo tal que las combinaciones sean químicamente compatibles y no formen complejos que precipiten en el producto terminado.

Se contempla también que principios activos cutáneos aromáticos e ingredientes adicionales identificados a lo largo

de toda esta memoria descriptiva puedan encapsularse para su administración a una zona diana tal como la piel. Ejemplos no limitativos de técnicas de encapsulación incluyen el uso de liposomas, vesículas y/o nanopartículas (por ejemplo, partículas coloidales biodegradables y no biodegradables que comprenden materiales poliméricos en los que el ingrediente está atrapado, encapsulado y/o absorbido, los ejemplos incluyen nanoesferas y nanocápsulas) que pueden usarse para como vehículos de suministro para suministrar tales ingredientes a la piel (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.387.398, la patente estadounidense n.º 6.203.802, la patente estadounidense n.º 5.411.744 y Kreuter 1998).

También se contemplan composiciones farmacéuticamente aceptables o farmacológicamente aceptables. La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" incluye composiciones que no producen una reacción alérgica o reacción adversa similar cuando se administra a un humano. Normalmente, tales composiciones se preparan como composiciones tópicas, disoluciones o suspensiones líquidas, aunque también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución en, o suspensión en, líquido antes de su uso. Las vías de administración pueden variar con la ubicación y naturaleza del estado que va a tratarse, e incluyen, por ejemplo, formulación y administración tópica, por inhalación, intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, por perfusión, lavado, inyección directa y oral.

Las composiciones de la presente invención pueden incorporarse en productos. Ejemplos no limitativos de productos incluyen productos cosméticos, productos alimenticios, productos farmacéuticos, etc. Únicamente a modo de ejemplo, productos cosméticos no limitativos incluyen productos solares, productos de bronceado sin sol, productos capilares, productos para las uñas, cremas hidratantes, cremas y lociones de tratamiento de la piel, suavizantes, lociones de día, geles, pomadas, bases de maquillaje, cremas de noche, barras de labios, máscaras, sombras de ojos, delineadores, coloretes, limpiadores, tónicos, mascarillas u otros productos o aplicaciones cosméticos conocidos. Adicionalmente, los productos cosméticos pueden formularse como productos con aclarado o sin aclarado.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir ingredientes adicionales. Ejemplos no limitativos de ingredientes adicionales incluyen ingredientes cosméticos (tanto activos como no activos) e ingredientes farmacéuticos (tanto activos como no activos). El CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook (2004) describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos no limitativos que pueden usarse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: fragancias (artificiales y naturales), tintes e ingredientes de color (por ejemplo, azul 1, azul 1 lago, rojo 40, dióxido de titanio, D&C azul n.º 4, D&C verde n.º 5, D&C naranja n.º 4, D&C rojo n.º 17, D&C rojo n.º 33, D&C violeta n.º 2, D&C amarillo n.º 10 y D&C amarillo n.º 11), adsorbentes, emulsionantes, estabilizadores, lubricantes, disolventes, hidratantes (incluyendo, por ejemplo, emolientes, humectantes, formadores de película, agentes oclusivos y agentes que afectan a los mecanismos de hidratación natural de la piel), repelentes del agua, absorbentes de UV (absorbentes físicos y químicos tales como ácido paraaminobenzoico ("PABA") y derivados de PABA correspondientes, dióxido de titanio, óxido de zinc, etc.), aceites esenciales, vitaminas (por ejemplo, A, B, C, D, E y K), metales traza (por ejemplo, zinc, calcio y selenio), anti-irritantes (por ejemplo, antiinflamatorios esteroides y no esteroideos), extractos botánicos (por ejemplo, aloe vera, camomila, extracto de pepino, ginkgo biloba, ginseng y romero), agentes antimicrobianos, antioxidantes (por ejemplo, BHT y tocoferol), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA de sodio y EDTA de tetrasodio), conservantes (por ejemplo, metilparabeno y propilparabeno), agentes de ajuste del pH (por ejemplo, hidróxido de sodio y ácido cítrico), absorbentes (por ejemplo, octenilsuccinato de aluminio y almidón, caolín, almidón de maíz, almidón de avena, ciclodextrina, talco y zeolita), agentes de aclaramiento y blanqueamiento de la piel (por ejemplo, hidroquinona y lactato de niacinamida), humectantes (por ejemplo, glicerina, propilenglicol, butilenglicol, pentilenglicol, sorbitol, urea y manitol), exfoliantes (por ejemplo, alfa-hidroxiácidos y beta-hidroxiácidos tales como ácido láctico, ácido glicólico y ácido salicílico; y sales de los mismos), agentes impermeabilizantes (por ejemplo, estearato de magnesio/hidróxido de aluminio), agentes de acondicionamiento de la piel (por ejemplo, extractos de aloe, alantoína, bisabolol, ceramidas, dimeticona, ácido hialurónico y glicirizato de dipotasio), agentes espesantes (por ejemplo, sustancias que pueden aumentar la viscosidad de una composición tales como polímeros de ácido carboxílico, polímeros de poliácido reticulados, polímeros de poliácido amida, polisacáridos y gomas), y compuestos de recubrimiento de silicona (por ejemplo, aceites de silicona y poliorganosiloxanos).

También se contemplan ingredientes farmacéuticos como útiles en las composiciones en emulsión de la presente invención. Ejemplos no limitativos de ingredientes farmacéuticos incluyen agentes anti-acné, agentes usados para tratar la rosácea, analgésicos, anestésicos, anoréctales, antihistamínicos, agentes antiinflamatorios incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, antifúngicos, antivirales, antimicrobianos, compuestos activos anticancerígenos, escabicidas, pediculicidas, antineoplásicos, antitranspirantes, antipruríticos, agentes antipsoriásicos, agentes antiseborreicos, proteínas y péptidos biológicamente activos, agentes de tratamiento de quemaduras, agentes cauterizantes, agentes de despigmentación, depilatorios, agentes de tratamiento del sarpullido del pañal, enzimas, estimulantes del crecimiento del cabello, retardantes del crecimiento del cabello incluyendo DFMO y sus sales y análogos, hemostáticos, queratolíticos, agentes de tratamiento de aftas, agentes de tratamiento de úlceras bucales, agentes de tratamiento dental y periodontal, agentes activos fotosensibilizadores, agentes de barrera/protectores de la piel, esteroides incluyendo hormonas y corticosteroides, agentes de tratamiento de quemaduras solares, protectores solares, agentes activos transdérmicos, agentes activos nasales, agentes activos

vaginales, agentes de tratamiento de verrugas, agentes de tratamiento de heridas, agentes de cicatrización, etc.

5 Cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitativo, se incluye un miARN individual en un kit. El kit puede incluir además agua y tampón de hibridación para facilitar la hibridación de las dos hebras de los miARN. En algunas realizaciones, el kit puede incluir uno o más oligonucleótidos para inhibir la función de un miARN diana. El kit puede incluir también uno o más reactivos de transfección para facilitar el suministro del miARN o antagonistas de miARN a células.

10 Los componentes de los kits pueden envasarse o bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada. Los medios contenedores de los kits incluirán generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que puede colocarse un componente, y preferiblemente, alicuotarse adecuadamente. Cuando hay más de un componente en el kit (el reactivo de etiquetado y la etiqueta pueden envasarse juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro contenedor adicional en el que los componentes adicionales pueden colocarse por separado. Sin embargo, en un vial pueden estar comprendidas diversas combinaciones de componentes. Los kits de la presente invención también incluirán normalmente un medio para contener los ácidos nucleicos, y cualquier otro contenedor de reactivos confinados en un espacio reducido para su venta comercial. Tales recipientes pueden incluir contenedores de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se retienen los viales deseados.

20 Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más disoluciones líquidas, la disolución líquida es una disolución acuosa, siendo particularmente preferida una disolución acuosa estéril.

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

30 El medio contenedor incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otro medio contenedor, en el que se colocan las formulaciones de ácidos nucleicos, preferiblemente, ubicadas adecuadamente. Los kits también pueden comprender un segundo medio contenedor para contener un tampón estéril, farmacéuticamente aceptable y/u otro diluyente.

35 Los kits de la presente memoria descriptiva también incluirán normalmente un medio para contener los viales en confinados en un espacio reducido para su venta comercial, tal como, por ejemplo, contenedores de plástico moldeados por inyección y/o por soplado en los que se retienen los viales deseados.

40 Tales kits pueden incluir también componentes que conservan o mantienen el miARN u oligonucleótidos inhibidores de miARN o que los protegen frente a su degradación. Tales componentes pueden estar libres de ARNasa o protegerse frente a ARNasas. Tales kits comprenderán generalmente, en medios adecuados, distintos contenedores para cada reactivo o disolución individual.

45 Un kit incluirá también instrucciones sobre el uso de los componentes del kit, así como sobre el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que pueden implementarse. Un kit también puede incluir utensilios o dispositivos para administrar el agonista o antagonista de miARN mediante diversas vías de administración, tales como administración parenteral o por catéter.

Se contempla que tales reactivos puedan formar parte de los kits de la memoria descriptiva. Sin embargo, tales kits no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o caracterización de miARN.

50 **Métodos para identificar moduladores**

55 La presente memoria descriptiva comprende además métodos para identificar agonistas de miR-29a-c que son útiles en la prevención o el tratamiento o la reversión de la fibrosis cardíaca, la hipertrofia cardíaca o la insuficiencia cardíaca. Estos ensayos pueden comprender el cribado al azar de grandes bibliotecas de compuestos candidatos; alternativamente, los ensayos pueden usarse para centrarse en clases particulares de compuestos seleccionados con miras a atributos estructurales que se cree que aumentan la probabilidad de que promuevan la expresión y/o función de miR-29a-c.

60 Para identificar un modulador de miR-29a-c, se determinará generalmente la función de un miR-29a-c en presencia y ausencia del compuesto candidato. Por ejemplo, un método comprende generalmente:

(a) proporcionar un compuesto candidato;

65 (b) mezclar el compuesto candidato con un miR-29;

(c) medir la actividad de miR-29a-c; y

(d) comparar la actividad en la etapa (c) con la actividad de miR-29a-c en ausencia del compuesto candidato,

en el que una diferencia entre las actividades medidas de miR-29a-c indica que el compuesto candidato es, de hecho, un modulador de miR-29a-c.

También pueden realizarse ensayos en células aisladas, órganos o en organismos vivos.

Por supuesto, se entenderá que todos los métodos de cribado de la presente memoria descriptiva son útiles por sí mismos a pesar del hecho de que puedan no encontrarse candidatos eficaces. La memoria descriptiva proporciona métodos para el cribado de tales candidatos, no solamente métodos para encontrarlos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “compuesto candidato” se refiere a cualquier molécula que pueda modular potencialmente aspectos que regulan la fibrosis o el colágeno de miR-29a-c. Se adquirirán normalmente, de diversas fuentes comerciales, bibliotecas moleculares que se cree que cumplen los criterios básicos para fármacos útiles en un esfuerzo por “usar la fuerza bruta” en la identificación de compuestos útiles. El cribado de tales bibliotecas, incluyendo bibliotecas generadas de manera combinatoria (por ejemplo, bibliotecas de antagomires), es un modo rápido y eficaz de cribar un gran número de compuestos relacionados (y no relacionados) para determinar su actividad. Los enfoques combinatorios se prestan por sí mismos a una rápida evolución de posibles fármacos mediante la creación de compuestos de segunda, tercera y cuarta generación modelizados a partir de compuestos activos, pero por lo demás no deseados.

Un ensayo rápido, barato y fácil de ejecutar es un ensayo *in vitro*. Tales ensayos usan generalmente moléculas aisladas, pueden ejecutarse rápidamente y en grandes cantidades, aumentando de ese modo la cantidad de información que puede obtenerse en un corto periodo de tiempo. Puede usarse una variedad de recipientes para ejecutar los ensayos, incluyendo tubos de ensayo, placas, platos y otras superficies tales como varillas o perlas.

En el documento WO 84/03564 se describe una técnica para el cribado de alto rendimiento de compuestos. Puede sintetizarse una gran cantidad de compuestos de antagomires pequeños sobre un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Tales moléculas pueden cribarse rápidamente para determinar su capacidad para inhibir miR-29a-c.

La presente memoria descriptiva también contempla el cribado de compuestos para determinar su capacidad para modular la actividad de miR-29a-c y expresión en células. Para tales ensayos de cribado pueden utilizarse diversas líneas celulares, incluyendo las derivadas de células de músculo esquelético, incluyendo células modificadas por ingeniería genética específicamente para este fin. También pueden usarse células cardíacas primarias, como la línea celular H9C2.

Los ensayos *in vivo* implican el uso de diversos modelos animales de cardiopatía, enfermedad de músculo esquelético, fibrosis o pérdida de colágeno incluyendo animales transgénicos, que se han modificado por ingeniería genética para tener defectos específicos, o para portar marcadores que pueden usarse para medir la capacidad de una sustancia candidata para alcanzar y afectar a diferentes células dentro del organismo. Debido a su tamaño, facilidad de manipulación e información sobre su fisiología y constitución genética, los ratones son una realización preferida, especialmente para experimentos transgénicos. No obstante, otros animales son también adecuados, incluyendo ratas, conejos, hámsteres, cobayas, jerbos, marmotas, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos y monos (incluyendo chimpancés, gibones y babuinos). Pueden realizarse ensayos para detectar inhibidores usando un modelo animal derivado de cualquiera de estas especies.

El tratamiento de animales con compuestos de prueba implicará la administración del compuesto, en una forma apropiada, al animal. La administración se realizará mediante cualquier vía que pueda utilizarse para fines clínicos. La determinación de la eficacia de un compuesto *in vivo* puede implicar una variedad de diferentes criterios, incluyendo pero sin limitarse a la alteración de las rutas de señalización hipertróficas y de síntomas físicos de hipertrofia. Además, la medición de la toxicidad y de las respuestas a la dosis puede realizarse en animales de un modo más significativo que en ensayos *in vitro* o *in cyto*.

Animales transgénicos

Un caso particular de la presente memoria descriptiva proporciona animales transgénicos que carecen de uno o ambos alelos funcionales de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c. Además, animales transgénicos que expresan miR-29a-c bajo el control de un promotor inducible, constitutivo o selectivo de tejido, líneas celulares recombinantes derivadas de tales animales y embriones transgénicos pueden ser útiles en la determinación del papel exacto que desempeña miR-29a-c en el control de la fibrosis y en el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica e insuficiencia cardíaca. Además, estos animales transgénicos pueden proporcionar conocimientos sobre el desarrollo del corazón. El uso de un miR-29a-c inducible o reprimible que codifica para ácido nucleico proporciona un modelo para la expresión no regulada o regulada en exceso. Además, se contemplan animales transgénicos “desactivados” para miR-29a-c, en uno o ambos alelos. Además, se contemplan animales transgénicos “desactivados” para miR-29a-c, en uno o ambos alelos para uno o ambos clusters.

En un caso general, un animal transgénico se produce mediante la integración de un transgén dado en el genoma de una manera que permite la expresión del transgén. Métodos para producir animales transgénicos se describen generalmente por Wagner y Hoppe (patente estadounidense n.º 4.873.191), y Brinster *et al.* (1985).

Normalmente, un gen flanqueado por secuencias genómicas se transfiere mediante microinyección en un ovocito fertilizado. Los ovocitos microinyectados se implantan en un huésped hembra, y se examina la progenie para detectar la expresión del transgén. Pueden producirse animales transgénicos a partir de los ovocitos fertilizados de varios animales incluyendo, pero sin limitarse a, reptiles, anfibios, aves, mamíferos y peces.

Pueden prepararse clones de ADN para microinyección mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, clones de ADN para microinyección pueden escindirse con enzimas apropiadas para eliminar las secuencias de plásmido bacteriano, y los fragmentos de ADN pueden someterse a electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TBE, usando técnicas convencionales. Las bandas de ADN se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio, y la banda que contiene las secuencias de expresión se escinde. La banda escindida se coloca entonces en bolsas de diálisis que contienen acetato de sodio 0,3 M a pH 7,0. El ADN se somete a electroelución dentro de las bolsas de diálisis, se extrae con una disolución fenol:cloroformo 1:1 y se precipita mediante dos volúmenes de etanol. El ADN vuelve a disolverse en 1 ml de tampón de baja concentración de sal (NaCl 0,2 M, Tris 20 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM) y se purifica en una columna Elutip-D™. La columna se ceba en primer lugar con 3 ml de tampón de alta concentración de sal (NaCl 1 M, Tris 20 mM, pH 7,4 y EDTA 1 mM) seguido por lavado con 5 ml de tampón de baja concentración de sal. Se hacen pasar las disoluciones de ADN a través de la columna tres veces para unir el ADN a la matriz de la columna. Tras un lavado con 3 ml de tampón de baja concentración de sal, el ADN se eluye con 0,4 ml de tampón de alta concentración de sal y se precipita mediante dos volúmenes de etanol. Las concentraciones de ADN se miden mediante absorción a 260 nm en un espectrofotómetro UV. Para la microinyección, las concentraciones de ADN se ajustan a 3 µg/ml en Tris 5 mM, pH 7,4 y EDTA 0,1 mM. Otros métodos para la purificación de ADN para microinyección se describen en Palmiter *et al.* (1982); y en Sambrook *et al.* (2001).

En un procedimiento de microinyección a modo de ejemplo, se inducen ratones hembra de seis semanas de edad a que superovulen con una inyección de 5 UI (0,1 cc, por vía i.p.) de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG; Sigma), seguido 48 horas después de una inyección de 5 UI (0,1 cc, por vía i.p.) de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma). Las hembras se colocan con los machos inmediatamente después de la inyección de hCG. Veintiuna horas después de la inyección de hCG, las hembras apareadas se sacrifican mediante asfixia con CO₂ o dislocación cervical y los embriones se recuperan de los oviductos extirpados y se colocan en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco con albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA; Sigma). Se eliminan las células del cúmulo circundantes con hialuronidasa (1 mg/ml). A continuación, los embriones pronucleares se lavan y se colocan en disolución salina equilibrada de Earle que contiene BSA al 0,5% (EBSS) en una incubadora a 37,5 °C con una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂ y 95 % de aire hasta el momento de la inyección. Los embriones pueden implantarse en la fase de dos células.

Los ratones hembra adultos se aparean en ciclos al azar con machos sometidos a vasectomía. Pueden usarse para este fin ratones C57BL/6 o Swiss u otras cepas comparables. Las hembras receptoras se aparean al mismo tiempo que las hembras donantes. En el momento de la transferencia de embriones, las hembras receptoras se anestesian con una inyección intraperitoneal de 0,015 ml de avertina al 2,5% por gramo de peso corporal. Se exponen los oviductos mediante una única incisión dorsal en la línea media. Entonces, se hace una incisión a través de la pared corporal directamente sobre el oviducto. A continuación, se rasga la bolsa ovárica con pinzas de relojero. Los embriones que van a transferirse se colocan en DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) y en la punta de una pipeta de transferencia (aproximadamente de 10 a 12 embriones). Se inserta la punta de la pipeta en el infundíbulo y se transfieren los embriones. Tras la transferencia, se cierra la incisión mediante dos suturas.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término “insuficiencia cardíaca” se usa ampliamente para referirse a cualquier estado que reduzca la capacidad del corazón para bombear sangre. Como resultado, se desarrollan congestión y edema en los tejidos. Lo más frecuentemente, la insuficiencia cardíaca es provocada por una reducida contractilidad del miocardio, que resulta de un flujo de sangre coronario reducido; sin embargo, muchos otros factores pueden dar como resultado una insuficiencia cardíaca, incluyendo daño en las válvulas del corazón, deficiencia de vitaminas y enfermedad primaria del músculo cardíaco. Aunque los mecanismos fisiológicos precisos de la insuficiencia cardíaca no se comprenden totalmente, se cree generalmente que la insuficiencia cardíaca implica trastornos en varias propiedades autónomas cardíacas, incluyendo respuestas simpática, parasimpática y barorreceptora. La frase “manifestaciones de insuficiencia cardíaca” se usa ampliamente para abarcar todas las secuelas asociadas a la insuficiencia cardíaca, tales como dificultad para respirar, edema con fóvea, un hígado sensible y agrandado, venas del cuello ingurgitadas, estertores pulmonares y similares, incluyendo hallazgos de laboratorio asociados a insuficiencia cardíaca.

El término “tratamiento” o equivalentes gramaticales abarca la mejora y/o reversión de los síntomas de insuficiencia

cardiaca (es decir, la capacidad del corazón para bombear sangre). La “mejora en la función fisiológica” del corazón puede evaluarse usando cualquiera de las mediciones descritas en el presente documento (por ejemplo, medición de la fracción de eyección, acortamiento fraccional, dimensión interna del ventrículo izquierdo, frecuencia cardiaca, etc.), así como cualquier efecto sobre la supervivencia del animal. En el uso de modelos animales, se compara la respuesta de animales transgénicos tratados y animales transgénicos no tratados usando cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento (además, pueden incluirse animales no transgénicos tratados y no tratados como controles). Un compuesto que provoca una mejora en cualquier parámetro asociado a insuficiencia cardiaca usado en los métodos de cribado de la presente invención puede identificarse de ese modo como un compuesto terapéutico.

El término “cardiomiopatía dilatada” se refiere a un tipo de insuficiencia cardiaca caracterizada por la presencia de ventrículo izquierdo dilatado simétricamente con mala función contráctil sistólica y, además, implica frecuentemente al ventrículo derecho.

El término “compuesto” se refiere a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco, y similares que puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad, afección, dolencia o trastorno de la función corporal. Los compuestos comprenden compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Puede determinarse que un compuesto es terapéutico mediante cribado usando los métodos de cribado de la presente invención. Un “compuesto terapéutico conocido” se refiere a un compuesto terapéutico que ha demostrado (por ejemplo, a través de ensayos en animales o experiencia previa con administración a humanos) que es eficaz en tal tratamiento. En otras palabras, un compuesto terapéutico conocido no se limita a un compuesto eficaz en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca.

Tal como se usa en el presente documento, el término “hipertrofia cardiaca” se refiere al proceso en el que los miocitos cardiacos adultos responden al estrés a través de un crecimiento hipertrófico. Tal crecimiento se caracteriza por aumentos del tamaño celular sin división celular, ensamblaje de sarcómeros adicionales dentro de la célula para maximizar la generación de fuerza, y una activación de un programa génico cardiaco fetal. La hipertrofia cardiaca se asocia a menudo a un aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad y, por tanto, estudios dirigidos a comprender los mecanismos moleculares de la hipertrofia cardiaca podrían tener un impacto significativo sobre la salud humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término “modular” se refiere a un cambio o una alteración en una actividad biológica. La modulación puede ser un aumento o una disminución en la actividad de proteínas, un cambio en una actividad cinasa, un cambio en las características de unión o cualquier otro cambio en las propiedades biológicas, funcionales o inmunológicas asociadas a la actividad de una proteína u otra estructura de interés. El término “modulador” se refiere a cualquier molécula o compuesto que es capaz de cambiar o alterar la actividad biológica tal como se describió anteriormente.

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

Los términos “inhibidor de enzima convertidora de angiotensina” o “inhibidor de ACE” se refieren a un compuesto químico o entidad que es capaz de inhibir, parcialmente o completamente, la enzima implicada en la conversión de la angiotensina I relativamente inactiva en la angiotensina II activa en el sistema de renina-angiotensina. Además, los inhibidores de ACE inhiben simultáneamente la degradación de bradicinina, que probablemente potencia significativamente el efecto antihipertensivo de los inhibidores de ACE. Ejemplos de inhibidores de ACE incluyen, pero no se limitan a, benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, quiapril y ramipril. El uso de derivados de inhibidores de ACE conocidos está comprendido en los métodos de la presente invención. De hecho cualquier compuesto que se comporte funcionalmente como un inhibidor de ACE está comprendido en los métodos de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “genotipos” se refiere a la conformación genética real de un organismo, mientras que “fenotipo” se refiere a los rasgos físicos que presenta un individuo. Además, el “fenotipo” es el resultado de la expresión selectiva del genoma (es decir, es una expresión de la historia celular y de su respuesta al entorno extracelular). De hecho, se estima que el genoma humano contiene 30.000-35.000 genes. En cada tipo celular, sólo se expresa una pequeña fracción (es decir, el 10-15 %) de estos genes.

El uso de la palabra “uno” o “una” cuando se usa conjuntamente con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno”, pero también es consecuente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”.

Se contempla que cualquier realización analizada en el presente documento pueda implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones y kits de la invención pueden usarse para lograr los métodos de la invención.

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

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para expresar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere a las alternativas únicas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere a alternativas únicas e “y/o.”

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en la(s) reivindicación(es), las palabras “que comprende” (y cualquier forma de “que comprende”, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de “que tiene”, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de “que incluye”, tal como “incluye” e “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma de “que contiene”, tal como “contiene” y “contienen”) son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales no mencionados.

Aunque se han insertado encabezamientos de sección en esta solicitud para facilitar la revisión, tales encabezamientos no deben interpretarse como una división de las realizaciones.

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar adicionalmente diversos aspectos de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas y/o composiciones descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y que, por tanto, pueden considerarse modos preferidos para su puesta en práctica.

Ejemplos

Codificado dentro de un intrón del gen de α -MHC se encuentra miR-208 (figura 1A). Al igual que α -MHC, miR-208 se expresa específicamente en el corazón con expresión residual en el pulmón (figura 1B). miR-208 se procesa fuera del pre-ARNm de α -MHC en vez de transcribirse como transcrito separado. Sin embargo, sorprendentemente, miR-208 presenta una semivida notablemente larga de al menos 14 días, y de ese modo puede ejercer funciones aun cuando la expresión de ARNm de α -MHC se haya regulado por disminución. Aunque la delección genética de miR-208 en ratones no pudo inducir un fenotipo manifiesto, el análisis de microarrays en corazones de animales de tipo natural y miR-208^{-/-} a los 2 meses de edad reveló que la eliminación de miR-208 da como resultado una expresión pronunciada de numerosos genes de proteínas contráctiles de músculo esquelético rápido, que normalmente no se expresan en el corazón. Por tanto, estos resultados sugieren que, en condiciones normales, miR-208 se coexpresa con el único gen de MHC específico cardiaco para mantener la identidad de cardiomiocitos reprimiendo la expresión de genes de músculo esquelético en el corazón.

La función más notable de miR-208 se reveló por la respuesta aberrante de ratones nulos para miR-208 al estrés cardiaco (van Rooij *et al.*, 2007). En respuesta a la sobrecarga de presión por constricción aórtica torácica o señalización mediante calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio/calmodulina que dirige la remodelación patológica del corazón, los ratones nulos para miR-208 prácticamente no mostraron hipertrofia de cardiomiocitos o fibrosis y no podían regular por incremento la expresión de β -MHC (figuras 6-8). En cambio, otros genes sensibles al estrés, tales como los que codifican para ANF y BNP, se indujeron fuertemente en animales mutantes para miR-208, demostrando que miR-208 está dedicado específicamente al control de la expresión de β -MHC, que puede desacoplarse de otras facetas de la respuesta a estrés cardiaco.

La expresión de β -MHC se reprime mediante señalización por hormona tiroidea y está regulada por incremento en el estado hipertiroideo (Leung *et al.*, 2006). Los animales miR-208^{-/-} eran también resistentes a la regulación por incremento de la expresión de β -MHC tras el tratamiento con el inhibidor de T3 propiltiouracilo (PTU), que induce hipotiroidismo. Sin embargo, sorprendentemente, la expresión de β -MHC antes del nacimiento era normal en ratones mutantes para miR-208, indicando que miR-208 está dedicada específicamente a la regulación posnatal de la expresión de β -MHC, lo que coincide con la adquisición de sensibilidad a la hormona tiroidea del gen de β -MHC (figura 5).

Una clave del mecanismo de acción de miR-208 procede de la semejanza de los corazones miR-208^{-/-} con corazones hipertiroideos, ambos de los cuales presentan un bloqueo a la expresión de β -MHC, regulación por incremento de genes de respuesta al estrés y protección contra hipertrofia patológica y fibrosis (figuras 6-10). La regulación por incremento de genes de músculo esquelético rápido en corazones miR-208^{-/-} también imita la

inducción de fibras de músculo esquelético rápido en el estado hipertiroideo (Wei *et al.*, 2005).

Estos hallazgos sugieren que miR-208 actúa, al menos en parte, reprimiendo la expresión de un componente común de las rutas de señalización de respuesta al estrés y de la hormona tiroidea en el corazón. Entre las dianas predichas más fuertes de miR-208 está el corregulador del receptor de hormona tiroidea (RT) THRAP1, que puede ejercer efectos positivos y negativos sobre la transcripción (Pantos *et al.*, 2006; Yao y Eghbali, 1992; figura 12). El RT actúa a través de un elemento de respuesta a hormona tiroidea negativo (ERT) para reprimir la expresión de β -MHC en el corazón adulto (Zhao *et al.*, 2005). Por tanto, cabría predecir que el aumento en la expresión de THRAP1 en ausencia de miR-208 potenciará la actividad represiva del RT hacia la expresión de β -MHC, consecuente con el bloqueo de la expresión de β -MHC en corazones miR-208^{-/-}. Sin embargo, aunque THRAP1 parece ser una diana fiable para miR-208, estos datos no excluyen la potencial implicación de dianas adicionales en la regulación de la expresión de β -MHC.

Puesto que, incluso un sutil cambio hacia β -MHC reduce el rendimiento mecánico y la eficacia del corazón adulto, sería de valor terapéutico aprovechar la regulación de miR-208 para prevenir un aumento en la expresión de β -MHC durante la cardiopatía. La especificidad y dedicación cardíacas de miR-208 a la respuesta al estrés cardíaco, pero no al desarrollo cardíaco normal, hacen que miR-208 (y sus efectores posteriores) sea una diana terapéutica atractiva para manipular los niveles de β -MHC (figura 13).

20 Materiales y métodos

Análisis de transferencia de tipo Northern. Se obtuvieron muestras de tejido cardíaco de ventrículos izquierdos de humanos anónimos a los que se les diagnosticó que tenían corazones defectuosos o no defectuosos de Gilead Colorado (Westminster, CO). Se obtuvieron muestras de tejido cardíaco de regiones de zona límite de humanos anónimos a los que se les diagnosticó que habían padecido un infarto de miocardio. Se aisló el ARN total de las células, muestras de tejido cardíaco de ratón, rata y humano o miocitos aislados usando el reactivo Trizol (Gibco/BRL). Se confirmó una igual carga tiñendo los geles de Northern con bromuro de etidio. Se realizaron transferencias de tipo Northern para detectar microARN tal como se describió previamente (van Rooij *et al.*, 2006). Una sonda U6 sirvió como control de carga. Para detectar la expresión de α -MHC, se utilizó con sonda una transferencia de tipo Northern que contenía 10 μ g de ARN de tejido cardíaco de animales adultos tanto de tipo natural como mutantes para miR-208 con un fragmento de ADNc de α -MHC que cubre una parte de la región UTR 5' y el primer exón.

Tratamiento con PTU. Se indujo deficiencia en la hormona tiroidea alimentando a los animales durante las duraciones indicadas con pienso libre de yodo complementado con PTU al 0,15% adquirido de Harlan Teklad Co. (TD 97061) (Madison, WI).

Análisis de microarrays y PCR en tiempo real. Se aisló ARN total de tejido cardíaco usando Trizol (Invitrogen). Se realizó el análisis de microarrays usando el array Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix). Para detectar el nivel de miARN, se realizó RT-PCR usando el kit de transcriptasa inversa de MicroARN Taqman (Applied Biosystems, ABI) según las recomendaciones del fabricante. Se usaron 5 ng de ARN para generar ADNc con un cebador específico para miARN, tras lo cual se utilizó una sonda Taqman específica para miARN para detectar el nivel de expresión del miARN de interés. Tras la RT-PCR con cebadores de hexámeros al azar (Invitrogen) sobre muestras de ARN, se analizó la expresión de un subconjunto de genes mediante PCR o mediante PCR en tiempo real cuantitativa usando sondas Taqman adquiridas de ABI.

Generación de ratones mutantes para miR-208. Para generar el vector de direccionamiento de miR-208, se digirió un fragmento de 0,4 kb (brazo 5') que se extiende en sentido 5' de la región que codifica para miR-208 con SacII y NotI y se ligó en el plásmido de direccionamiento pGKneoF2L2dta en sentido 5' de los sitios loxP y el casete de neomicina flanqueado por Frt. Se digirió un fragmento de 3,3 kb (brazo 3') con Sall y HindIII y se ligó en el vector entre los casetes de resistencia a neomicina y de selección negativa de Dta. Las células ES como dianas que portan el alelo alterado se identificaron mediante análisis de transferencia de tipo Southern con sondas en 5' y 3'. Se identificaron tres clones de ES dirigidos a miR-208 y se usaron para la inyección en blastocistos. Los ratones quiméricos resultantes se cruzaron con C57BL/6 para obtener transmisión a la línea germinal del alelo mutante.

Generación de ratones transgénicos. Se subclonó un fragmento genómico de ratón que flanquea al miARN de interés en un plásmido de expresión específico de tejido cardíaco que contenía la señal de poli(A)+ de GH humana y α -MHC (Kiriazis y Kranias, 2000). Se aisló el ADN genómico de biopsias de cola de ratón y se analizó mediante PCR usando cebadores específicos para la señal de poli(A)+ de GH humana.

Inmunotransferencia de tipo Western. Se extrajo miosina de tejido cardíaco tal como se describió (Morkin, 2000). Se separaron las isoformas de MHC mediante SDS PAGE y se realizó inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo monoclonal de ratón frente a α -MHC (BA-G5) (ATCC, Rockville, MD) y anticuerpo monoclonal de ratón antimiosina (M8421 esquelético, lento) (Sigma, MO), que es altamente específico para β -MHC. Para detectar toda la miosina estriada, se usó un anticuerpo panespecífico (3-48 monoclonal de ratón; Accurate Chemical & Scientific

Corporation, NY). Se detectó THRAP1 mediante inmunoprecipitación a partir de 400 µg de lisado de proteína cardiaca. Tras el aclaramiento previo de las muestras durante 1 hora a 4 °C, el sobrenadante se incubó durante la noche a 4 °C con 1 µl de anticuerpo policlonal de conejo anti-THRAP1 (un regalo de R. Roeder, Rockefeller University) y 15 µl de perlas de proteína A. Las perlas se lavaron tres veces con tampón de lisis y se sometieron a ebullición en tampón de muestra de SDS. La proteína THRAP1 inmunoprecipitada se resolvió mediante SDS-PAGE y se analizó usando anticuerpo policlonal de conejo anti-THRAP1 a una dilución 1:3000 y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa del rábano a una dilución 1:5000 con detección mediante reactivo Luminol (Santa Cruz).

Análisis histológico e hibridación *in situ* de ARN. Los tejidos usados para la histología se incubaron en disolución de Krebs-Henselheit, se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se cortaron en secciones y se procesaron para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómica de Masson o hibridación *in situ* mediante técnicas convencionales (Krenz y Robbins, 2004). Se generaron sondas de ARN marcado con ³⁵S usando el kit Maxiscript (Amersham). Se pseudocolorearon las señales en rojo usando Adobe Photoshop.

Ecocardiografía transtorácica. La función cardiaca y las dimensiones del corazón se evaluaron mediante ecocardiografía bidimensional en ratones conscientes usando un sistema de Vingmed (GE Vingmed Ultrasound, Horten, Noruega) y un transductor de matriz lineal de 11,5 MHz. Se usaron registros gráficos en modo M para medir los grosores de pared anterior y posterior en la diástole final y en la sístole final. El diámetro interno del ventrículo izquierdo (VI) (DIVI) se midió como diámetro anteroposterior máximo en diástole (DIVId) o en sístole (DIVIs). Un único observador enmascarado para el genotipo de ratón analizó los datos. Se calculó el acortamiento fraccional (AF) del VI según la siguiente fórmula: AF (%) = [(DIVId - DIVIs)/DIVId] x 100.

Plásmidos y ensayos de transfección. Un fragmento genómico de 305 pb que abarcaba la región que codifica para miR-208 se amplificó mediante PCR y se ligó en pCMV6. Un fragmento de 1 kb que abarcaba toda la THRAP1-UTR murina se amplificó mediante PCR y se ligó en un constructo de expresión de pCMV6 etiquetado con HA y el constructo indicador de luciferasa de luciérnaga (*f-luc*) (pMIR-REPORT™, Ambion). Se construyó una mutación de la secuencia de unión a simiente de miR-208 UCGUCUUA mediante mutagénesis basada en PCR.

Cultivo celular, transfección y ensayos de luciferasa. Un fragmento genómico de 1793 pb que abarcaba la región que codifica para miR-29b-1 y miR-29a se amplificó mediante PCR y se ligó en pCMV6. Fragmentos genómicos de la UTR 3' murina que abarcaban el(los) sitio(s) de unión a miR-29a-c se amplificaron mediante PCR y se ligaron en el constructo indicador de luciferasa de luciérnaga (*f-luc*) (pMIR-REPORT™, Ambion). Se transfectaron células COS con Fugene 6 (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. La cantidad total de ADN por pocillo se mantuvo constante añadiendo la cantidad correspondiente de vector de expresión sin un inserto de ADNc. 48 horas después de la transfección, se sometieron a ensayo extractos celulares para detectar la expresión de luciferasa usando el kit de ensayo de luciferasa (Promega). Las actividades promotoras relativas se expresan como unidades relativas de luminiscencia normalizadas para la expresión de β-galactosidasa en los extractos celulares.

Se aislaron fibroblastos cardiacos (FC) tal como se describió previamente (Simpson y Savion, 1982). En resumen, se extirparon los corazones de ratas Sprague-Dawley neonatas de 1-2 días de edad anestesiadas (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, EN), se trituraron y se digirieron con pancreatina al 0,1 %. Las células se sembraron sobre placas Primaria durante 2 h, y se retiró el medio que contenía la fracción de cardiomiocitos del tejido digerido. Los fibroblastos cardiacos se unieron y proliferaron mucho más rápidamente que los miocitos cardiacos; esto produjo cultivos de fibroblastos prácticamente puros tras el primer paso, que se confirmó mediante siembra en placa diferencial repetida y evaluación microscópica. Las células se desprendieron con tripsina al 0,05 % para la realización de pases, y se realizaron estudios de cultivo en los pases 2 a 4. Las células se hicieron crecer en medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) con alta concentración de glucosa (4,5 gm/l) que contenía FBS inactivado con calor al 10 % y antibióticos (penicilina y estreptomycin). Se indujo diferenciación de miofibroblastos cambiando el medio a baja concentración de suero (FBS al 2 %) con ácido L-ascórbico (10 µg/µl) y administración de TGFβ1 10 ng/ml durante 48 horas.

Silenciamiento de miR-29b *in vivo* mediante tratamiento con anti-miR. Se usaron oligonucleótidos antisentido modificados químicamente que comprendían una secuencia complementaria a miR-29b (anti-miR-29b) para inhibir la expresión de miR-29b. Todas las bases estaban modificadas con 2'-OMe, en donde las dos primeras y las cuatro últimas bases contenían un enlace internucleosídico fosforotioato y el extremo 3' de los oligonucleótidos estaba conjugado con colesterol. Ratones macho C57BL/6 de ocho semanas de edad recibieron anti-miR-29b (AsAsCACUGAUUCAAUGGUsGsCsUsAs-Colesterol) o miR-29b con apareamiento erróneo (AsAsAACUGAUGUCACAUGGUsGsAsUsAs-Colesterol) a una dosis de 80 mg/kg de peso corporal o un volumen comparable de solución salina mediante inyección en la vena de la cola. Se recogieron los tejidos tras 3 días o tras 3 semanas de tratamiento.

Ejemplo 1. Regulación de la hipertrofia cardiaca y la insuficiencia cardiaca mediante miARN sensibles al estrés.

En vista de su implicación en la modulación de fenotipos celulares, los inventores plantearon la hipótesis de que los

miARN pueden desempeñar un papel en la regulación de la respuesta del corazón al estrés cardiaco, que se sabe que da como resultado cambios transcripcionales y traduccionales en la expresión génica. Para investigar la posible implicación de los miARN en la hipertrofia cardiaca, realizaron un análisis de microarrays de miARN lado a lado en 2 modelos de ratón establecidos de hipertrofia cardiaca, usando un microarrays que representaba 186 miARN diferentes (Babak *et al.*, 2004). Los ratones se sometieron a bandeado aórtico torácico (BAT), que induce hipertrofia mediante poscarga aumentada sobre el corazón (Hill *et al.*, 2000), y se compararon con animales operados de manera simulada. En un segundo modelo, ratones transgénicos que expresan calcineurina activada (CnA) en el corazón, que da como resultado una forma grave y bien caracterizada de hipertrofia (Molkentin *et al.*, 1998), se compararon con compañeros de camada de tipo natural (figura 14A). El ARN aislado de corazones de ratones sometidos a BAT mostraba expresión aumentada de 27 miARN en comparación con los controles operados de manera simulada, y los ratones CnA Tg mostraron expresión aumentada de 33 miARN en comparación con controles de compañeros de camada no transgénicos, de los cuales 21 estaban regulados por incremento en ambos modelos. De manera similar, la hipertrofia inducida por BAT y CnA estaba acompañada por una expresión reducida de 15 y 14 miARN, respectivamente, de los cuales 7 miARN estaban regulados por disminución en común (figura 14B). El análisis de tipo Northern de estos miARN (datos no publicados) y los análisis de microarrays previos (Barad *et al.*, 2004; Sempere *et al.*, 2004; Shingara *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004) indican que se expresan en una amplia gama de tejidos. Basándose en sus niveles de expresión relativa, la conservación de secuencias de humano, rata y ratón, y los niveles de expresión durante la hipertrofia, los inventores se centraron en 11 miARN regulados por incremento y 5 regulados por disminución (figura 14C).

El análisis de transferencia de tipo Northern de ARN cardiaco de animales WT y CnA-Tg confirmó un aumento de la expresión de los miR -21, -23, -24, -125b, -195, -199a y -214, y una disminución de la expresión de los miR -29, -93, -150 y -181b (figura 14C y figura 15). Colectivamente, estos datos indican que distintos miARN se regulan durante la hipertrofia cardiaca, lo que sugiere la posibilidad de que funcionen como moduladores de este proceso.

Ejemplo 2. Descubrimiento de la familia miR-29 como dianas posteriores para la regulación por miR-208.

Los inventores realizaron un microarray de miARN en corazones de ratones de tipo natural y nulos para miR-208 en un esfuerzo por identificar miARN posteriores que podrían mediar en las acciones de miR-208 (figura 16). Descubrieron que múltiples miembros de la familia miR-29 estaban regulados por incremento en ratones nulos para miR-208 (figura 17). La predicción de dianas indicó que los miembros de la familia miR-29 tienen como diana ARNm que codifican para múltiples colágenos y otros componentes de la matriz extracelular (figura 18). Por tanto, es probable que la regulación por incremento de miembros de la familia miR-29 en ratones nulos para miR-208 explique el bloqueo de la fibrosis observada en estos animales (figura 19).

El descubrimiento de que miR-29a-c está regulado por disminución en el corazón enfermo y tiene como diana ARNm que codifican para colágenos y proteínas de la matriz extracelular sugiere que las estrategias para potenciar la expresión de miR-29a-c o su asociación con ARNm diana pueden tener efectos beneficiosos sobre el corazón en los entornos de fibrosis y remodelación cardiaca patológica. Además, la elevación de la expresión o función de miR-29a-c puede prevenir la fibrosis asociada a muchas enfermedades en tejidos tales como músculo esquelético, hígado, pulmón, riñones y otros. Además, el descubrimiento de que miR-208 reprime la expresión de miR-29a-c, y que la pérdida de miR-208 regula por incremento la expresión de miR-29a-c, indica que miR-29a-c es un mediador posterior de las acciones de miR-208 sobre el corazón.

Ejemplo 3. MiR-29a-c regula la expresión de genes fibróticos.

Para comenzar a definir las posibles funciones de miR-29a-c en el corazón tras un IM, los inventores hicieron uso de predicciones informáticas para identificar posibles dianas de miR-29a-c. El sitio web de predicción Targetscan indicó un número inesperadamente alto de ARNm relacionados con fibrosis que codifican para colágenos, metalopeptidasas e integrinas como posibles dianas para miR-29a-c (página web en targetscan.org). Para determinar si la regulación por disminución de miR-29a-c podría regular la fibrosis cardiaca, los inventores se centraron en dianas predichas implicadas en la producción de ECM en el corazón. La elastina (ELN), la fibrilina 1 (FBN1), el colágeno tipo I $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (COL1A1, COL1A2) y el colágeno tipo III $\alpha 1$ (COL3A1) contienen todos una o más potenciales secuencias simiente conservadas para miR-29a-c (figura 20A).

Dado que los miARN regulan por disminución los niveles en estado estacionario, así como la traducción, de sus ARNm diana, los inventores analizaron la expresión de dianas de ARNm de miR-29a-c predichas. El análisis por RT-PCR en tiempo real de estos genes reguladores clave para fibrosis cardiaca en muestras cardiacas 3 días después de un infarto de miocardio indicó que la regulación por disminución específica de miR-29a-c en la región infartada se correlaciona con el aumento en la expresión de COL1A1, COL1A2, COL3A1 y FBN1. En cambio, la ELN aparecía sin cambios en la zona limítrofe, e incluso mostró un aumento en el miocardio remoto (figura 20B).

Usando un plásmido de expresión dirigido por CMV, los inventores sobreexpresaron miR-29b-1 y miR-29a en células COS (figura 20C) con plásmidos de expresión de luciferasa que contenían las UTR 3' de las dianas de miR-29a-c predichas. Cantidades crecientes de miR-29b-1/miR-29a dirigido por CMV dieron como resultado una disminución dependiente de la dosis en la actividad luciferasa, mientras que cantidades comparables de miR-206, como control,

no tuvieron ningún efecto (figuras 20C-D), confirmando a estos ARNm como dianas para la represión por miR-29a-c.

Ejemplo 4. Regulación de miR-29a-c en fibroblastos cardiacos

5 La fibrosis cardiaca es un aspecto importante del proceso de remodelación observado normalmente en el corazón dañado. La proliferación de fibroblastos y el aumento del depósito de componentes de la ECM dan como lugar a rigidez miocárdica y disfunción diastólica. Se ha mostrado que el factor de crecimiento transformante β (TGF β) desempeña un papel dominante en la producción y el depósito de colágenos en el corazón e induce una transformación de fibroblastos en miofibroblastos (Border y Noble, 1994). El análisis por PCR en tiempo real de
10 fibroblastos cardiacos expuestos a TGF β reveló una disminución en la expresión de miR-29a-c, lo que sugiere que la disminución en miR-29a-c tras un IM podría estar regulada por TGF β (figura 21A). De manera interesante, se ha mostrado que péptidos natriuréticos como el péptido natriurético de tipo B (BNP) inhiben la expresión génica regulada por TGF β relacionada con la fibrosis y la conversión de miofibroblastos (Kapoun *et al.*, 2004). En este sentido, los inventores informaron previamente de que ratones que carecen del miARN específico de tejido cardiaco
15 miR-208 eran resistentes a la fibrosis cardiaca y a la remodelación y presentaban una expresión aumentada de BNP a nivel inicial (van Rooij *et al.*, 2007). Puesto que se sabe que el BNP antagoniza los efectos de TGF β , los inventores especularon que los niveles aumentados de BNP en estos ratones podrían potenciar la expresión de miR-29a-c. De hecho, el análisis de tipo Northern mostró un aumento dependiente de la dosis en la expresión de miR-29a-c tras la eliminación de miR-208, que coincidía con un nivel de expresión creciente de BNP (figura 21B). Estos datos indican
20 que TGF β induce la expresión de genes relacionados con colágeno en fibroblastos al menos parcialmente a través de la disminución del nivel de miR-29a-c, que puede inhibirse por el BNP secretado por los cardiomiocitos.

Ejemplo 5. La inactivación *in vivo* de miR-29a-c induce fibrosis y expresión de genes de colágeno

25 Para explorar adicionalmente el posible papel de miR-29a-c como regulador negativo de la expresión de colágeno, los inventores inactivaron miR-29b *in vivo* usando oligonucleótidos modificados con colesterol complementarios a la secuencia de miARN madura de miR-29b (anti-miR-29b) y o bien solución salina o bien un oligonucleótido que contenía un apareamiento erróneo de cuatro bases (miR-29b mm) como control negativo (figura 22A). Tres días después de una única inyección de anti-miR-29b (80 mg/kg) en la vena de la cola, los inventores observaron una
30 disminución drástica de la expresión de miR-29b en todos los tejidos examinados (figura 22B). En cambio, una dosis comparable del oligonucleótido antisentido miR-29b mm no tuvo ningún efecto sobre el nivel de expresión de miR-29b en comparación con el control de solución salina. La inactivación por anti-miR-29b parecía ser específica para el miARN maduro, puesto que el nivel de pre-miARN permanecía comparable entre animales tratados con anti-miR y mm. Aunque la inactivación en el hígado y el riñón parecía ser completa, un bajo nivel de miR-29b permanecía detectable en el corazón y el pulmón (figura 22B).

Puesto que los otros miembros de miR-29 comparten una alta homología de secuencia con miR-29b, también se examinó la expresión de miR-29a y -c en respuesta a anti-miR-29b. Aunque se detectó una inactivación significativa en hígado y riñón (especialmente para miR-29c), la expresión cardiaca no parecía cambiar (figura 23). El análisis por
40 PCR en tiempo real indicó que la inactivación de miR-29b era suficiente para inducir la expresión de genes de colágeno en el hígado específicamente, mientras que este efecto estaba ausente en los controles con apareamiento erróneo (figura 22C).

Para potenciar la inactivación cardiaca de miR-29b, los inventores inyectaron 80 mg/kg de oligonucleótido por vía intravenosa en dos días consecutivos y recogieron material 3 semanas después. El análisis de tipo Northern indicó una inactivación completa de miR-29b en riñón e hígado en respuesta a anti-miR-29b en comparación con el nivel de expresión observado tras la inyección de miR-29b mm. Los niveles cardiacos de miR-29b también se redujeron drásticamente, mientras que la expresión de miR-29b en el pulmón parecía no verse afectada por anti-miR-29b (figura 22D). La expresión de colágeno en el corazón aumentó en respuesta a la inhibición de miR-29b (figura 22E).
50 Considerados conjuntamente, estos datos indican que miR-29b funciona como regulador negativo de la expresión de genes de colágeno *in vivo* y, de ese modo, influye en el depósito de colágeno y la fibrosis en el corazón y el hígado.

Ejemplo 6. Regulación por disminución de la expresión de colágeno con un mimético de miR-29a-c

55 Para determinar si la sobreexpresión de miR-29a-c podía reducir la expresión de colágeno, los inventores expusieron fibroblastos a un mimético de miR-29b. El nivel de expresión de miR-29b en cultivos de fibroblastos aumentó en hasta 400 veces tras 3 días de exposición al mimético de miR-29b (figura 22F). La expresión de miR-29a no se vio afectada y la expresión de miR-29c aumentó sólo ligeramente tras la exposición al mimético de miR-29b (figura 22F). El análisis por PCR en tiempo real indicó que la expresión de genes de colágeno disminuía en
60 respuesta al mimético de miR-29b (figura 22G). Sin embargo, la magnitud de la disminución de la expresión de colágeno era modesta en comparación con el aumento de la expresión de miR-29b, lo que indica que los niveles de miR-29a-c no son el único determinante de los niveles de colágeno.

Todas las composiciones y procedimientos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación excesiva en vista de la presente divulgación.
65

Bibliografía

- 5 Patente estadounidense n.º 4.873.191
- Patente estadounidense n.º 5.604.251
- Patente estadounidense n.º 5.844.107
- 10 Patente estadounidense n.º 5.877.302
- Patente estadounidense n.º 5.972.900
- Patente estadounidense n.º 5.972.901
- 15 Patente estadounidense n.º 6.008.336
- Patente estadounidense n.º 6.077.835
- 20 Patente estadounidense n.º 6.200.801
- Publicación estadounidense n.º 20020150626
- Publicación estadounidense n.º 20030032615
- 25 Publicación estadounidense n.º 20030203865
- Publicación estadounidense n.º 20040048787
- 30 Abraham *et al.*, Mol. Med., 8:750-760, 2002.
- Ambros, Cell, 113(6):673-676, 2003.
- Angel *et al.*, Cell, 49:729, 1987b.
- 35 Angel *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:2256, 1987a.
- Atchison y Perry, Cell, 46:253, 1986.
- 40 Atchison y Perry, Cell, 48:121, 1987.
- Babak *et al.*, RNA 10:1813-1819, 2004.
- Baichwal y Sugden, en: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.
- 45 Banerji *et al.*, Cell, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji *et al.*, Cell, 33(3):729-740, 1983.
- 50 Barad *et al.*, Genome Res. 14:2486-2494, 1997.
- Barnes *et al.*, J. Biol. Chem., 272(17):11510-11517, 1997.
- Bartel, Cell, 116:281-297,2004.
- 55 Benvenisty y Neshif, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83(24):9551-9555, 1986.
- Berk *et al.*, J. Clin. Invest. 117:568-575, 2007.
- 60 Berkhout *et al.*, Cell, 59:273-282, 1989.
- Bhavsar *et al.*, Genomics, 35(1):11-23, 1996.
- Blanar *et al.*, EMBO J., 8:1139, 1989.
- 65 Bodine y Ley, EMBO J., 6:2997, 1987.

- Border y Noble, N. Engl. J. Med., 331:1286-1292, 1994.
- 5 Boshart *et al.*, Cell, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, EMBO J., 5(7):1615-1623, 1986.
- Braddock *et al.*, Cell, 58:269, 1989.
- 10 Brennecke *et al.*, Cell, 113:25-36, 2003.
- Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82(13):4438-4442, 1985.
- Bristow, Cardiology, 92:3-6, 1999.
- 15 Bulla y Siddiqui, J. Virol., 62:1437, 1986.
- Calin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:15524-15529, 2002.
- 20 Campbell y Villarreal, Mol. Cell. Biol., 8:1993, 1988.
- Campere y Tilghman, Genes and Dev., 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, Nature, 303:77, 1983.
- 25 Care *et al.*, Nat. Med. 13:613-618, 2007.
- Carrington *et al.* Science, 301(5631):336-338, 2003.
- 30 Celandier y Haseltine, J. Virology, 61:269, 1987.
- Celandier *et al.*, J. Virology, 62:1314, 1988.
- Chandler *et al.*, Cell, 33:489, 1983.
- 35 Chang y Karin, Nature, 410(6824):37-40, 2001.
- Chang *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1092(2):153-160, 1991.
- 40 Chang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:2153, 1989.
- Chang *et al.*, Nature, 430(7001):785-789, 2004.
- 45 Chatterjee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9114, 1989.
- Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen *et al.*, Science, 303(5654):83-86, 2004.
- 50 Choi *et al.*, Cell, 53:519, 1988.
- Coffin, en: Virology, Fields *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.
- 55 Cohen *et al.*, J. Cell. Physiol., 5:75, 1987.
- Costa *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:81, 1988.
- Couch *et al.*, Am. Rev. Resp. Dis., 88:394-403, 1963.
- 60 Coupar *et al.*, Gene, 68:1-10, 1988.
- Cripe *et al.*, EMBO J., 6:3745, 1987.
- 65 Culotta y Hamer, Mol. Cell. Biol., 9:1376, 1989.
- Dandolo *et al.*, J. Virology, 47:55-64, 1983.

- De Villiers *et al.*, *Nature*, 312(5991):242-246, 1984.
- 5 Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dubensky *et al.*, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.
- Durand *et al.*, *Ann. Med.*, 27:311-317, 1995.
- 10 Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908, 1989.
- Edgerton y Roy, *J. Appl. Physiol.*, 89:1224-1231, 2000.
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- 15 Eichhorn y Bristow, *Circulation*, 94:2285-2296, 1996.
- Documento EPO 0273085
- 20 Fatkin *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 106(11):1351-1359, 2000.
- Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feng y Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- 25 Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Firak y Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- 30 Foecking y Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Franz *et al.*, *Cardioscience*, 5(4):235-43, 1994.
- 35 Frey *et al.*, *Circulation* 109:1580-1589, 2004.
- Friedman *et al.*, *Genes Devel.*, 3:1314, 1989.
- 40 Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
- Ghosh y Bachhawat, en: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- 45 Ghosh-Choudhury *et al.*, *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.
- Gilles *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.
- 50 Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- 55 Goodbourn y Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1447, 1988.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- 60 Gopal-Srivastava *et al.*, *J. Mol. Cell. Biol.* 15(12):7081-7090, 1995.
- Graham y Prevec, en: *Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol*, Murray (Ed.), Humana Press, Clifton, NJ, 7:109-128, 1991.
- 65 Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.

- Graham *et al.*, J. Gen. Virol., 36(1):59-74, 1977.
- Greene *et al.*, Immunology Today, 10:272, 1989.
- 5 Grishok *et al.*, Cell, 106:23-34,2001.
- Grosschedl y Baltimore, Cell, 41:885, 1985.
- 10 Grunhaus y Horwitz, Seminar in Virology, 3:237-252, 1992.
- Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101(3):1094-1099, 1985.
- Haslinger y Karin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:8572, 1985.
- 15 Hauber y Cullen, J. Virology, 62:673, 1988.
- Heineke y Molkenstin, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7:589-600, 2006.
- 20 Hen *et al.*, Nature, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, Lymphokine Res., 8:347, 1989.
- Hermonat y Muzycska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6466-6470, 1984.
- 25 Herr y Clarke, Cell, 45:461, 1986.
- Hersdorffer *et al.*, DNA Cell Biol., 9:713-723, 1990.
- 30 Herz y Gerard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2812-2816, 1993.
- Hill *et al.*, Circulation, 101:2863-2869, 2000.
- Hirochika *et al.*, J. Virol., 61:2599, 1987.
- 35 Hirsch *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:1959, 1990.
- Holbrook *et al.*, Virology, 157:211, 1987.
- 40 Horlick y Benfield, Mol. Cell. Biol., 9:2396, 1989.
- Horwich *et al.* J. Virol., 64:642-650, 1990.
- 45 Huang *et al.*, Cell, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:3065, 1988.
- Hutvagner *et al.*, PLoS Biol., 2(4):E98, 2004.
- 50 Hwang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:585, 1990.
- Imagawa *et al.*, Cell, 51:251, 1987.
- Imbra y Karin, Nature, 323:555, 1986.
- 55 Imler *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:2558, 1987.
- Imperiale y Nevins, Mol. Cell. Biol., 4:875, 1984.
- 60 Ito y Roeder, Trends Endocrinol. Metab., 12:127-134, 2001.
- Jakobovits *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2555, 1988.
- Jameel y Siddiqui, Mol. Cell. Biol., 6:710, 1986.
- 65 Jaynes *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:62, 1988.

- Johnson *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:3393, 1989.
- 5 Jones y Shenk, Cell, 13:181-188, 1978.
- Kadesch y Berg, Mol. Cell. Biol., 6:2593, 1986.
- Kaneda *et al.*, Science, 243:375-378, 1989.
- 10 Kapoun *et al.*, Circ. Res., 94:453-461, 2004.
- Karin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.
- Karin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.
- 15 Karlsson *et al.*, EMBO J., 5:2377-2385, 1986.
- Katinka *et al.*, Cell, 20:393, 1980.
- 20 Katinka *et al.*, Nature, 290:720, 1981.
- Kato *et al.*, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:267, 1988.
- 25 Kelly *et al.*, J. Cell Biol., 129(2):383-396, 1995.
- Kiledjian *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:145, 1988.
- 30 Kimura *et al.*, Dev. Growth Differ. 39(3):257-265, 1997.
- Kinugawa *et al.*, Circ. Res., 89:591-598, 2001.
- Kinugawa *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab., 86:5089-5090, 2001.
- 35 Kiriazis y Kranias, Annu. Rev. Physiol., 62:321-351, 2000.
- The Pharmacological Basis of Therapeutics de Klaassen
- 40 Klamut *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:193, 1990.
- Klein *et al.*, Nature, 327:70-73, 1987.
- Koch *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:303, 1989.
- 45 Krek *et al.*, Nature Genetics, 37:495-500, 2005.
- Krenz y Robbins, J. Am. Coll. Cardiol., 44:2390-2397, 2004.
- 50 Kriegler y Botchan, en: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Kriegler y Botchan, Mol. Cell. Biol., 3:325, 1983a.
- 55 Kriegler *et al.*, Cell, 38:483, 1984.
- Kriegler *et al.*, Cell, 53:45, 1988.
- Kriegler *et al.*, en: Gene Expression, Alan Liss (Ed.), Hamer and Rosenberg, Nueva York, 1983b.
- 60 Krützfeldt *et al.*, Nature, 438:685-689, 2005.
- Kuhl *et al.*, Cell, 50:1057, 1987.
- 65 Kunz *et al.*, Nucl. Acids Res., 17:1121, 1989.

- Lagos-Quintana *et al.*, *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- LaPointe *et al.*, *Hypertension* 27(3 Pt 2):715-22, 1996.
- 5 LaPointe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263(19):9075-8, 1988.
- Larsen *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83:8283, 1986.
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- 10 Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lau *et al.*, *Science*, 294(5543):858-862, 2001.
- 15 Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Lee y Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- 20 Leung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:18125-18130, 2006.
- Levinson *et al.*, *Nature*, 295:79, 1982.
- 25 Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Liu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9740-9744, 2004.
- 30 Lowes *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100(9):2315-2324, 1997.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- 35 Lusky y Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- 40 Majors y Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- 45 Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.
- McKinsey y Olson, *J. Clin. Invest.*, 115(3):538-546, 2005.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- 50 Meister t Tuschl, *Nature*, 431:343-9, 2004.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- 55 Miyata *et al.*, *Circ. Res.*, 86(4):386-390, 2000.
- Molkentin *et al.*, *Cell* 93:215-228, 1998.
- Mordacq y Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- 60 Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981.
- Morkin, *Microsc. Res. Tech.*, 50:522-531, 2000.
- 65 Moss *et al.*, *Biol. Chem.*, 271(49):31688-31694, 1996.

- Muesing *et al.*, Cell, 48:691, 1987.
- Nakao *et al.*, Clin. Invest., 100(9):2362-2370, 1997.
- 5 Ng *et al.*, Nuc. Acids Res., 17:601, 1989.
- Nicolas y Rubinstein, en: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and Denhardt (Eds), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988.
- 10 Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- Ondek *et al.*, EMBO J., 6:1017, 1987.
- 15 Ornitz *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:3466, 1987.
- Palmiter *et al.*, Nature, 300:611, 1982.
- 20 Pantos *et al.*, Horm. Metab. Res., 38:308-313, 2006.
- Paskind *et al.*, Virology, 67:242-248, 1975.
- Pasquinelli y Ruvkun, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 18:495-513, 2002.
- 25 Solicitud PCT WO 0071096
- Solicitud PCT WO 84/03564
- 30 Solicitud PCT WO 98/33791
- Pech *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:396, 1989.
- Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
- 35 Perales *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable y Constantini, Mol. Cell. Biol., 10:1116, 1990.
- 40 Physicians Desk Reference
- Picard y Schaffner, Nature, 307:83, 1984.
- Pinkert *et al.*, Genes and Dev., 1:268, 1987.
- 45 Ponta *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1020, 1985.
- Porton *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:1076, 1990.
- 50 Potter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.
- Queen y Baltimore, Cell, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:4713, 1989.
- 55 Racher *et al.*, Biotechnology Techniques, 9:169-174, 1995.
- Ragot *et al.*, Nature, 361:647-650, 1993.
- 60 Redondo *et al.*, Science, 247:1225, 1990.
- Reisman y Rotter, Mol. Cell. Biol., 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed., páginas 1035-1038 y 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- 65

- Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- 5 Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, en: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.* (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- 10 Ripe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2224, 1989.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:1619, 1989.
- 15 Rosen *et al.*, *Cell*, 41:813, 1988.
- Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- 20 Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
- Sakai *et al.*, *Genes and Dev.*, 2:1144, 1988.
- 25 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Satake *et al.*, *J. Virology*, 62:970, 1988.
- 30 Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985.
- Sempere *et al.*, *Genome Biol* 5:R13, 2004.
- 35 Sharp y Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul y Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- 40 Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.
- Shingara *et al.*, *RNA* 11:1461-1470, 2005.
- Simpson y Savion, *Circ. Res.*, 50:101-116, 1982.
- 45 Sleigh y Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- 50 Spandau y Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos y Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens y Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- 55 Stratford-Perricaudet y Perricaudet, en: *Human Gene Transfer*, Eds, Cohen-Haguenauer and Boiron, John Libbey Eurotext, Francia, 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- 60 Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985.
- Sullivan y Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- 65 Swartzendruber y Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.

- Takebe *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, Nature, 301:634, 1983.
- 5 Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:165, 1990a.
- Taylor y Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, J. Biol. Chem., 264:15160, 1989.
- 10 Temin, en: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- The Merck Index, decimoprimer edición
- 15 Thiesen *et al.*, J. Virology, 62:614, 1988.
- Top *et al.*, J. Infect. Dis., 124:155-160, 1971.
- Treisman, Cell, 46(4):567-174, 1986.
- 20 Tronche *et al.*, Mol. Biol. Med., 7:173, 1990.
- Tronche *et al.*, Mol. Cell Biol., 9(11):4759-4766, 1989.
- 25 Trudel y Constantini, Genes and Dev., 6:954, 1987.
- Tur-Kaspa *et al.*, Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.
- Tyndell *et al.*, Nuc. Acids. Res., 9:6231, 1981.
- 30 van Rooij *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103(48):18255-18260, 2006.
- van Rooij *et al.*, Science 316(5824):575-579. 2007.
- 35 Vannice y Levinson, J. Virology, 62:1305, 1988.
- Varmus *et al.*, Cell, 25:23-36, 1981.
- Vasseur *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 77:1068, 1980.
- 40 Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(9):3410-3414, 1990
- Wang y Calame, Cell, 47:241, 1986.
- 45 Weber *et al.*, Cell, 36:983, 1984.
- Wei *et al.*, J. Endocrinol. Invest., 28:8-11, 2005.
- Weinberger *et al.* Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
- 50 Winoto y Baltimore, Cell, 59:649, 1989.
- Wong *et al.*, Gene, 10:87-94, 1980.
- 55 Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993.
- Wu y Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
- Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987.
- 60 Xu *et al.*, Curr. Biol., 13:790-795, 2003.
- Yamauchi-Takahara *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(10):3504-3508, 1989.
- 65 Yang y Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-4148, 1990.

Yang *et al.*, Nat. Med. 13:486-491, 2007.

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

5 Young *et al.*, en: Handbook of Applied Therapeutics, 7.1-7.12 y 9.1-9.10, 1989.

Yu *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 349(1):59-68. pub. elec. 11 de agosto de 2006.

Yutzey *et al.* Mol. Cell. Biol., 9:1397, 1989.

10

Zelenin *et al.*, FEBSLett., 287(1-2):118-120, 1991.

Zeng *et al.*, Mol Cell., 9(6):1327-33, 2002.

15 Zhao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(13):4890-4895, 2005.

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

Lista de secuencias

	<110> The Board of Regents of the University of Texas System	
5	<120> FAMILIA DE MICRO-ARN QUE MODULA LA FIBROSIS Y USOS DE LA MISMA	
	<130> UTFD:2021WO	
	<150> Documento US 60/952.917	
10	<151> 31-07-2007	
	<150> Documento US 60/980.303	
15	<151> 16-10-2007	
	<150> Documento US 61/047.014	
	<151> 22-04-2008	
20	<160> 22	
	<170> PatentIn versión 3.5	
25	<210> 1	
	<211> 71	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 1	
	tgacgggcga gcttttggcc cgggttatac ctgatgctca cgtataagac gagcaaaaag	60
	cttgttggtc a	71
	<210> 2	
	<211> 71	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus sp.</i>	
	<400> 2	
	tgacgggtga gcttttggcc cgggttatac ctgactctca cgtataagac gagcaaaaag	60
	cttgttggtc a	71
40	<210> 3	
	<211> 71	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rattus sp.</i>	
45	<400> 3	
	tgacgggtga gcttttggcc cgggttatac ctgactctca cgtataagac gagcaaaaag	60
	cttgttggtc a	71
	<210> 4	
50	<211> 71	
	<212> ADN	
	<213> <i>Canis sp.</i>	
	<400> 4	
55	tgacgcatga gcttttggct cgggttatac ctgatgctca cgtataagac gagcaaaaag	60
	cttgttggtc a	71

ES 2 621 161 T3

	<210> 5	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Desconocida	
5	<220>	
	<223> Secuencia de miR-208	
	<400> 5	
10	auaagacgag caaaaagcuu gu	22
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> ARN	
15	<213> <i>Homo Sapiens</i>	
	<400> 6	
	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuaaauuaa aaaguugcag	60
	uagggguugc	69
20	<210> 7	
	<211> 69	
	<212> ARN	
	<213> <i>Pan sp.</i>	
25	<400> 7	
	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuaaauuaa aacguugcag	60
	uagggguugc	69
	<210> 8	
	<211> 69	
30	<212> ARN	
	<213> <i>Mus sp.</i>	
	<400> 8	
	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuaaauuaa aacguugcag	60
	uagggguugc	69
35	<210> 9	
	<211> 69	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus sp.</i>	
40	<400> 9	
	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuaaauuaa aacguugcag	60
	uagggguugc	69
	<210> 10	
45	<211> 69	
	<212> ARN	
	<213> <i>Canis sp.</i>	
	<400> 10	
	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuaaauuaa aacguugcag	60
50	uagggguugc	69
	<210> 11	

ES 2 621 161 T3

	<211> 69		
	<212> ARN		
	<213> <i>Gallus sp.</i>		
5	<400> 11	uucuugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuuaauuaa aacguugcag	60
		uagggguugc	69
	<210> 12		
	<211> 72		
10	<212> ARN		
	<213> <i>Takifugu</i>		
	<400> 12	uuccugcuuu aagcaauugg uugaaaauau auguauguaa uggucuuauu uaaaaaaca	60
		aacuaagaca aa	72
15	<210> 13		
	<211> 69		
	<212> ARN		
	<213> <i>Danio sp.</i>		
20	<400> 13	uuccugcuuu aaagcaauug gucuaaaaaua uauguaaucg ucuucauuac aaaaacgaac	60
		caucaaacg	69
	<210> 14		
25	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 14	acgggcgagc ttttggcccg ggttatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct	60
30		tggtggtcag a	71
	<210> 15		
	<211> 71		
	<212> ADN		
35	<213> <i>Mus sp.</i>		
	<400> 15	acgggtgagc ttttggcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct	60
		tggtggtcag a	71
40	<210> 16		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> <i>Rattus sp.</i>		
45	<400> 16	acgggtgagc ttttggcccg ggttatacct gactctcacg tataagacga gcaaaaagct	60
		tggtggtcag a	71
	<210> 17		
	<211> 71		

ES 2 621 161 T3

	<212> ADN		
	<213> <i>Canis sp.</i>		
	<400> 17		
	acgcatgagc ttttggctcg gggtatacct gatgctcacg tataagacga gcaaaaagct		60
5	tgttggtcag a		71
	<210> 18		
	<211> 22		
	<212> ARN		
10	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 18		
	uagcaccauc ugaaucggu ua		22
15	<210> 19		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
20	<400> 19		
	uagcaccauu ugaaucagu guu		23
	<210> 20		
	<211> 22		
25	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 20		
30	uagcaccauu ugaaucggu ua		22
	<210> 21		
	<211> 71		
	<212> ARN		
35	<213> Desconocida		
	<220>		
	<223> Secuencia de pre miR-208		
40	<400> 21		
	ugacggggcga gcuuuuggcc cggguauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag		60
	cuuguugguc a		71
	<210> 22		
	<211> 27		
45	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 22		
50	uagcaccauu ugaaagaaau caguguu		27

REIVINDICACIONES

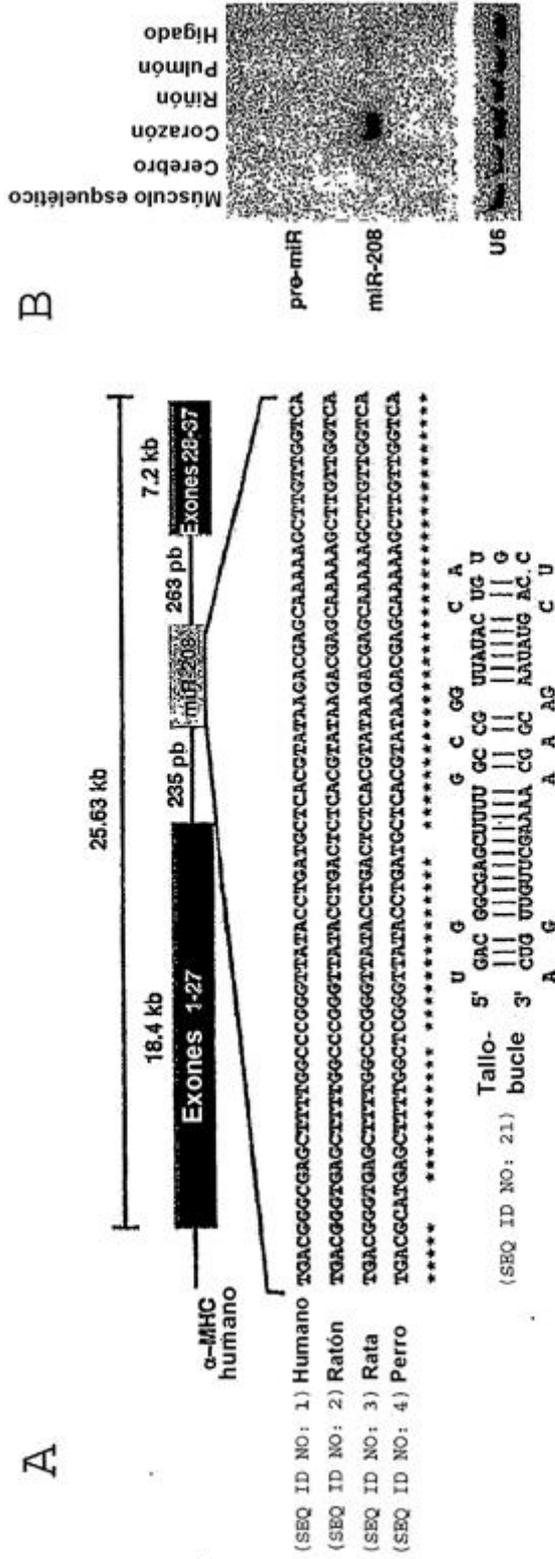
1. Un agonista de miR-29a-c para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de fibrosis tisular en un sujeto que lo necesita, en el que el agonista de miR-29a-c es un polinucleótido que comprende un pri-miARN, pre-miARN, o secuencia madura de miR-29a, miR-29b y/o miR-29c.
2. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido comprende una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
3. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 o 2 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido se expresa a partir de un vector de expresión.
4. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 3 para su uso según la reivindicación 3, en el que el vector de expresión es un vector de expresión viral.
5. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 4 para su uso según la reivindicación 4, en el que el vector de expresión viral es un vector de expresión adenoviral.
6. El agonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agonista se formula para administración parenteral, oral, transdérmica, intradérmica, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, de liberación sostenida, liberación controlada, liberación retardada, por supositorio, por inhalación, por catéter o sublingual o para inyección directa en el tejido cardíaco.
7. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha fibrosis tisular es fibrosis cardíaca, esclerodermia, fibrosis muscular esquelética, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar o fibrosis diabética.
8. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 3 para su uso según la reivindicación 3, en el que el polinucleótido está unido operativamente a un promotor específico de fibroblastos.
9. El agonista de miR-29a-c según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polinucleótido es bicatenario.
10. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 o 2 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido está conjugado con colesterol.
11. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 2 para su uso según la reivindicación 2, en el que el polinucleótido tiene de 18 a 25 nucleótidos de longitud.
12. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 2 para su uso según la reivindicación 2, en el que el polinucleótido tiene de 70 a 200 nucleótidos de longitud.
13. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 o 2 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido comprende una o más modificaciones químicas.
14. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 13 para su uso según la reivindicación 13, en el que las modificaciones químicas se seleccionan del grupo que consiste en ácidos nucleicos bloqueados, modificaciones de azúcares y modificaciones de la estructura principal.
15. El agonista de miR-29a-c según la reivindicación 1 o 2 para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el polinucleótido se formula en un vehículo de administración de nanopartículas.
16. Un antagonista de miR-29a-c para su uso en un método para tratar tejido que comprende una herida, daño químico, daño por calor o daño por frío, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.
17. El antagonista según la reivindicación 16 para su uso según la reivindicación 16, en el que el oligonucleótido antisentido se formula para inyección en el tejido, inyección en la vasculatura que alimenta al tejido o aplicación tópica.
18. El antagonista de miR-29a-c según la reivindicación 17 para su uso según la reivindicación 17, en el que la formulación tópica es una pomada, una crema, un gel, un ungüento o un bálsamo.
19. Un antagonista de miR-29a-c para su uso en la prevención del infarto de miocardio convirtiendo una o más

placas blandas en tejido fibrótico, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

- 5 20. El antagonista de miR-29a-c según la reivindicación 19 para su uso según la reivindicación 19, en el que dicho oligonucleótido antisentido se formula para administración por catéter o como recubrimiento para una endoprótesis o un balón.
- 10 21. El antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 15 22. El antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria al 100% a SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 20 23. El antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 95% a una secuencia de pre-miR-29a, pre-miR-29b o pre-miR-29c.
- 25 24. El antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicho oligonucleótido antisentido tiene de 15 a 50 nucleótidos de longitud.
- 30 25. Un antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el oligonucleótido antisentido tiene de 19 a 25 nucleótidos de longitud.
- 35 26. El antagonista de miR-29a-c según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en el que el oligonucleótido antisentido comprende al menos una modificación de un azúcar y/o de la estructura principal.
- 40 27. El antagonista de miR-29a-c según la reivindicación 26 para su uso según la reivindicación 26, en el que dicha una modificación de al menos un azúcar es una modificación 2'-O-alquilo o una modificación de un ácido nucleico bloqueado.
- 45 28. El antagonista de miR-29a-c según la reivindicación 26 para su uso según la reivindicación 26, en el que la modificación de la estructura principal es una unión fosforotioato.
- 50 29. Un dispositivo médico usado en cirugía vascular recubierto con al menos un antagonista de miR-29a-c, en el que dicho antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido o antagomir que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia madura de miR-29a, miR-29b o miR-29c, y en el que el recubrimiento comprende además un compuesto anti-reestenosis seleccionado de paclitaxel, rapamicina, tacrolímús, zotarolímús, everolímús, docetaxel y pimecrolímús.
- 55 30. El dispositivo médico según la reivindicación 29, en el que el dispositivo médico es una endoprótesis o un balón.
- 60 31. El dispositivo médico según la reivindicación 29 o 30, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido o antagomir que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
- 65 32. El dispositivo médico según la reivindicación 29 o 30, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido o antagomir que comprende una secuencia que es complementaria al 100% a una secuencia de SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.
33. El dispositivo médico según una cualquiera de las reivindicaciones 29-32, en el que el antagonista es un oligonucleótido antisentido que comprende al menos una modificación de un azúcar y/o de la estructura principal.
34. El dispositivo médico según una cualquiera de las reivindicaciones 29-33, en el que el oligonucleótido antisentido o antagomir tiene de 19 a 25 nucleótidos de longitud.
35. Una formulación cosmética que comprende un antagonista de miR-29a-c, en la que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos

el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.

- 5 36. Un uso cosmético de un antagonista de miR-29a-c en una formulación cosmética para aplicaciones cosméticas de fotoenvejecimiento debido a daño solar de la piel, arrugas o marcas de estiramiento, en el que el antagonista de miR-29a-c es un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria en al menos el 85% a una secuencia de miR-29a, miR-29b o miR-29c.



B

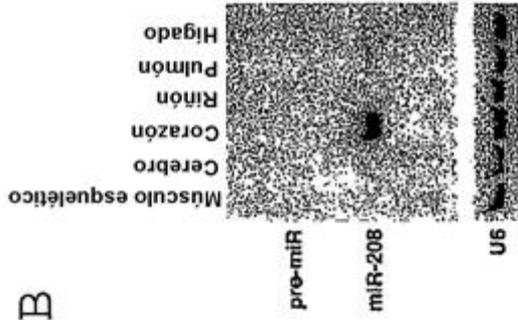


FIG. 1

Cambio de cadena pesada de miosina α/β

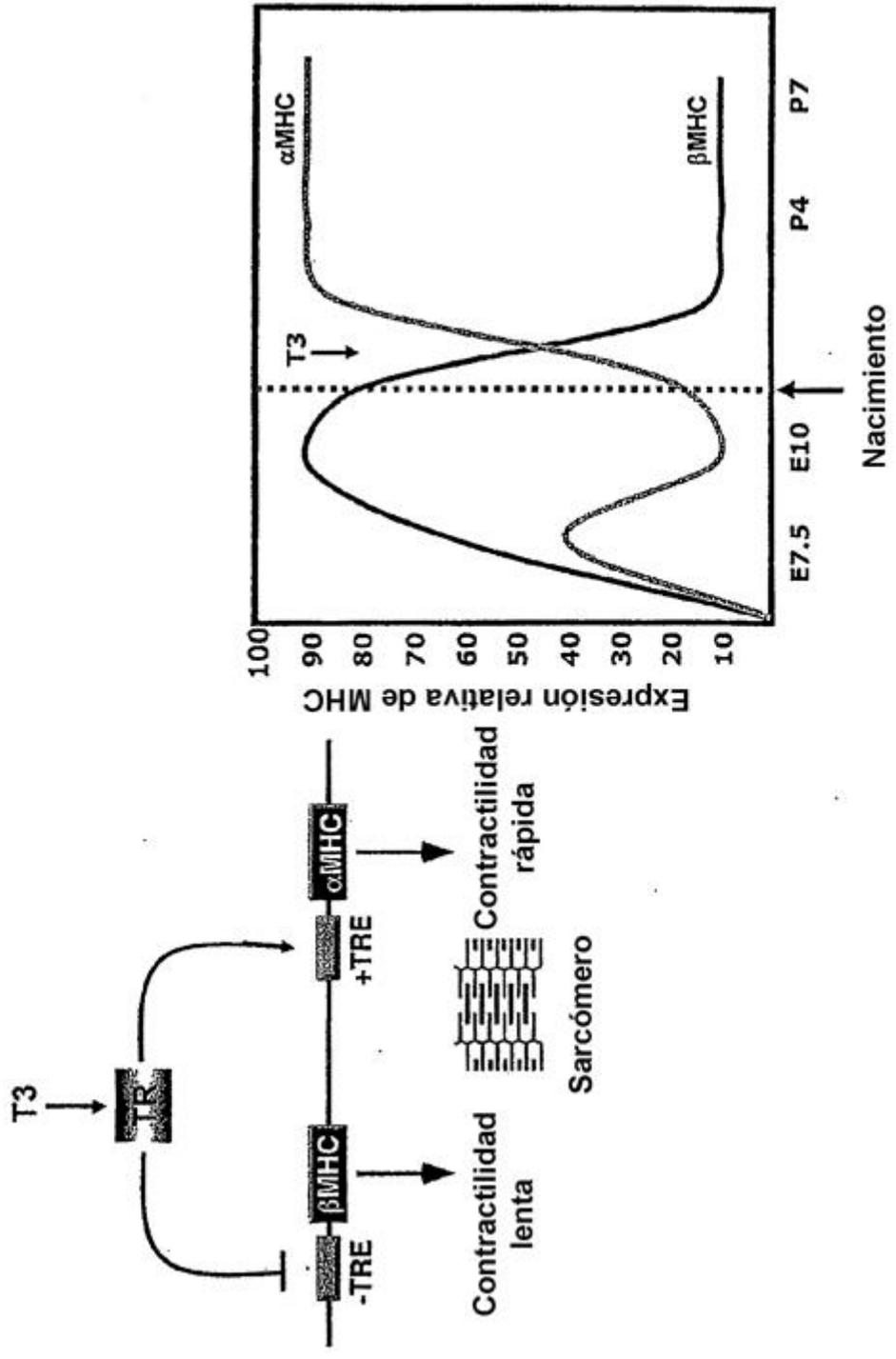
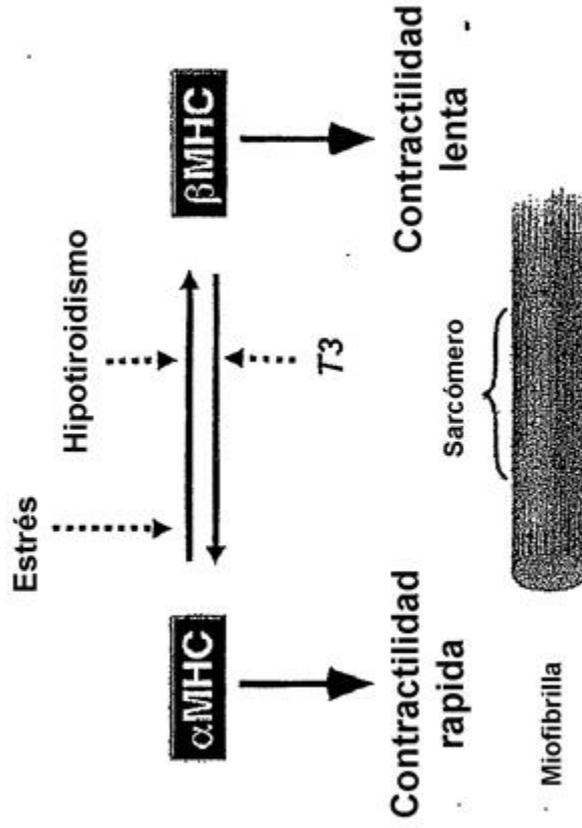


FIG. 2A

Cambio de cadena pesada de miosina α/β



alta actividad ATPasa
- regulación por disminución durante enfermedad cardíaca
- regulación por incremento por la hormona tiroidea

β MHC - baja actividad ATPasa
- regulación por incremento durante enfermedad cardíaca
- regulación por hipotiroidismo

FIG. 2B

miR-208 está presente abundantemente en corazones humanos

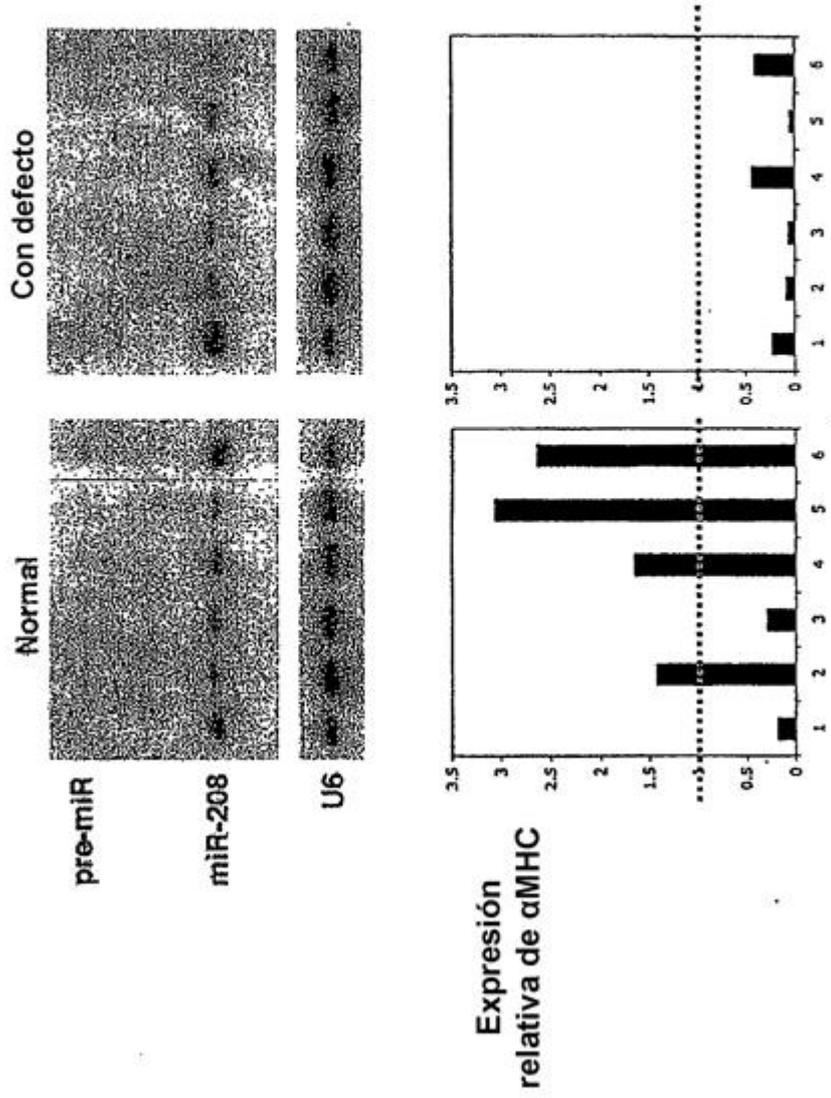


FIG. 3

Desactivación del gen de miR-208

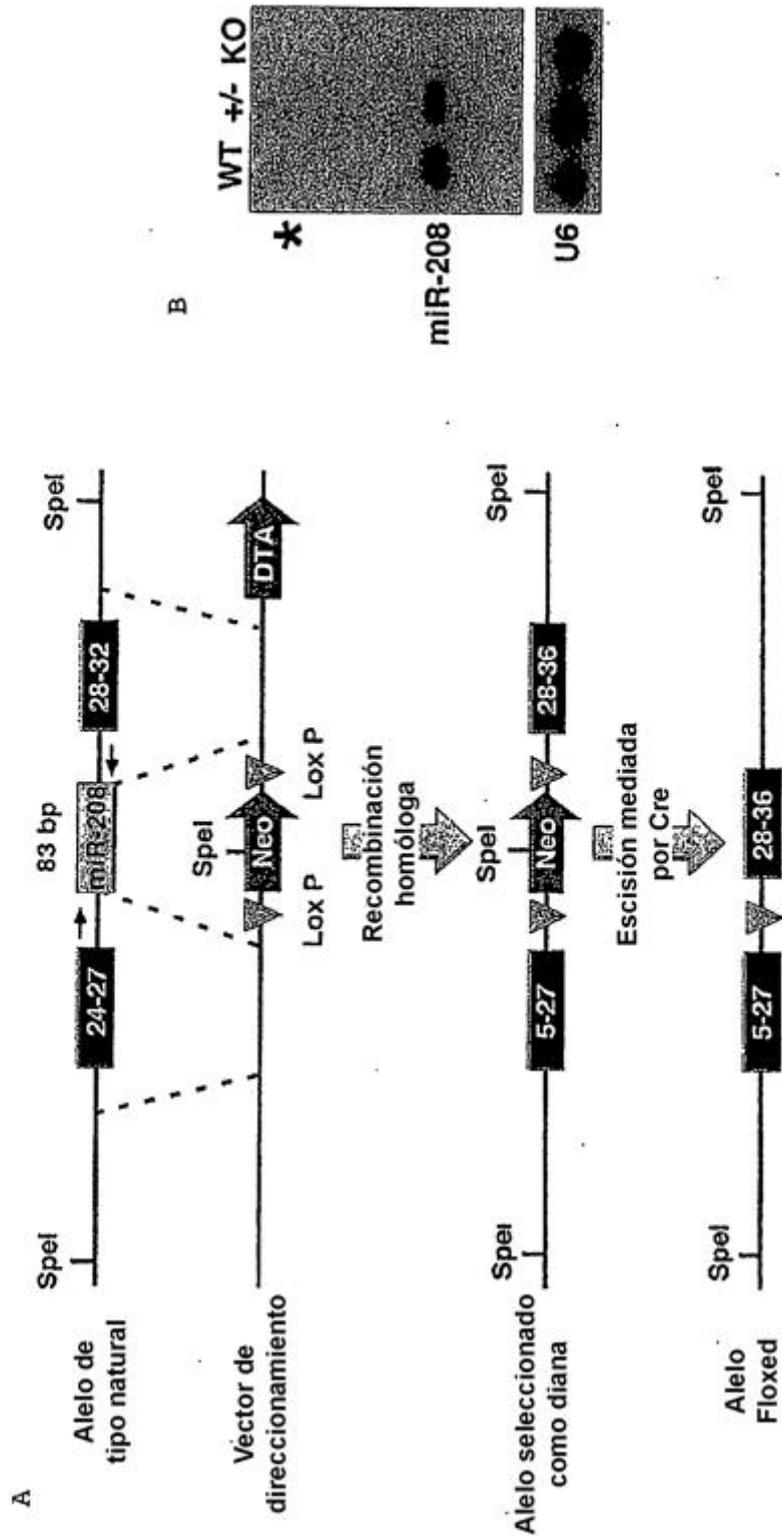


FIG. 4A-B

miR-208 KO no altera la expresión de α o β MHC en corazón neonatal

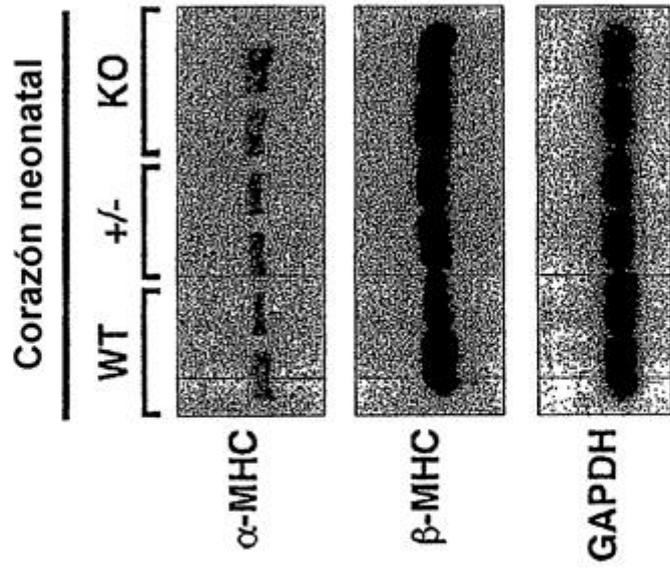


FIG. 5

Fibrosis e hipertrofia reducida en ratones miR-208 KO en respuesta a sobrecarga de presión

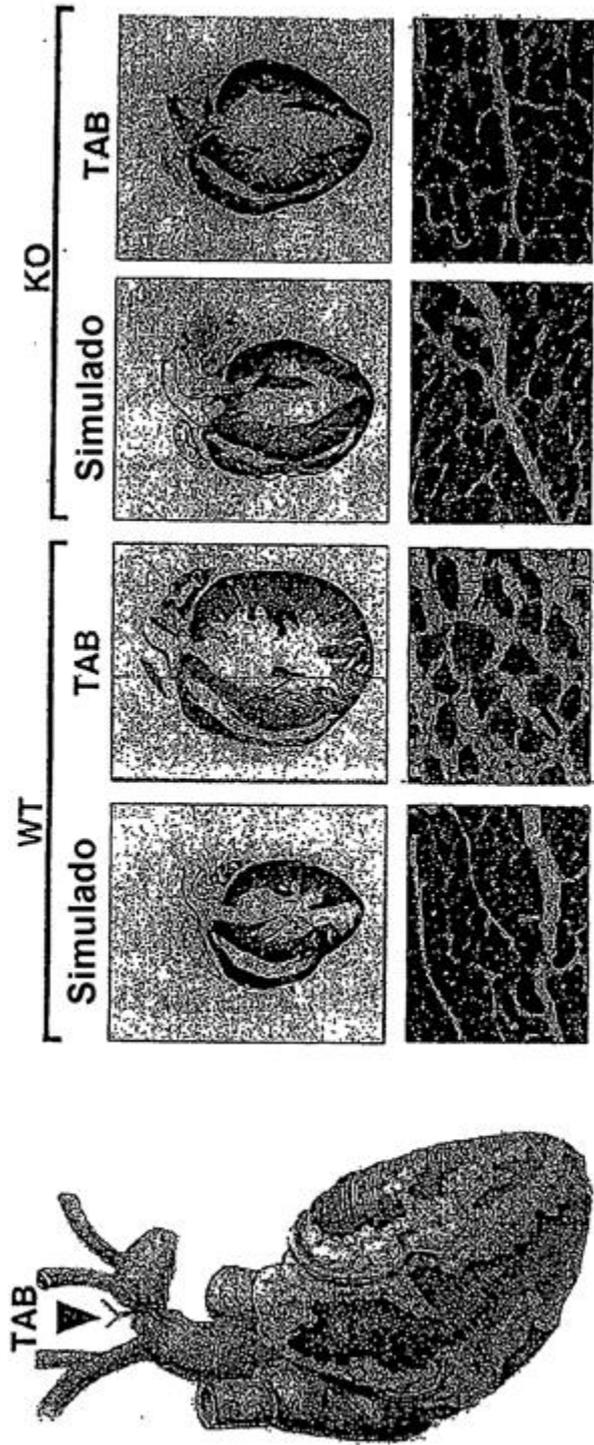


FIG. 6

**Fibrosis e hipertrofia reducida en ratones miR-208 KO
en respuesta a activación con calcineurina**

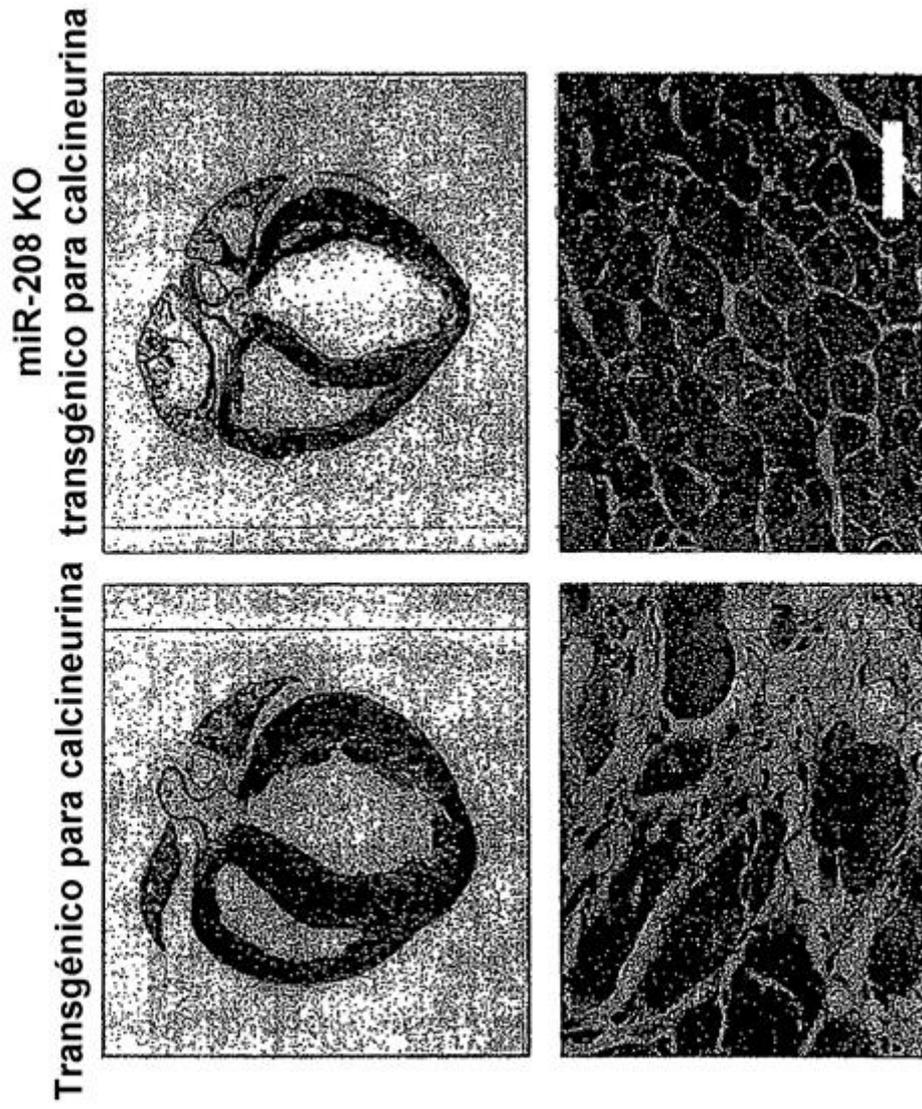


FIG. 7

Ratones miR-208 KO no pueden regular por incremento β -MHC en respuesta a estrés

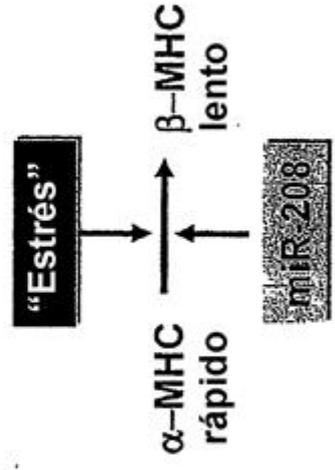
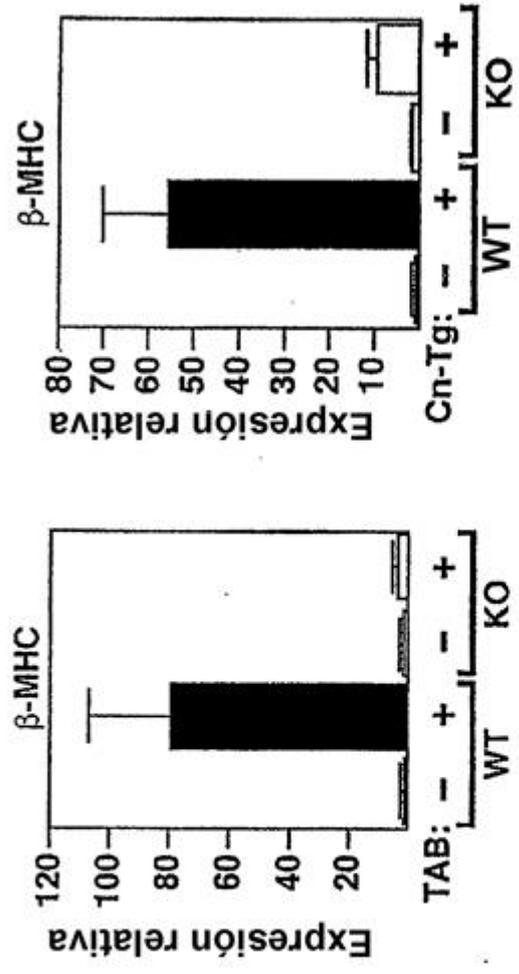
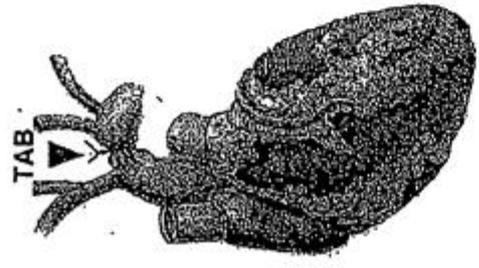


FIG. 8

Sobreexpresión de miR-208 es suficiente para inducir la expresión de β MHC

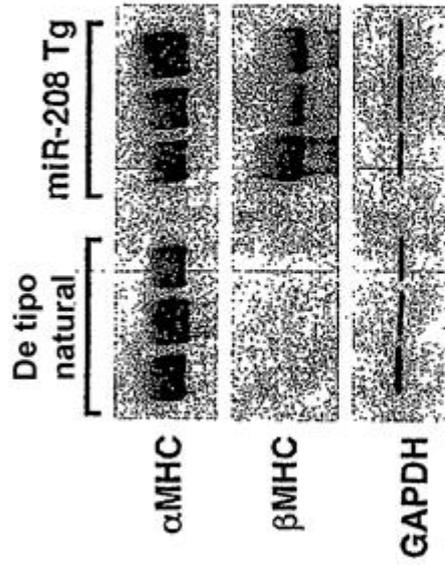
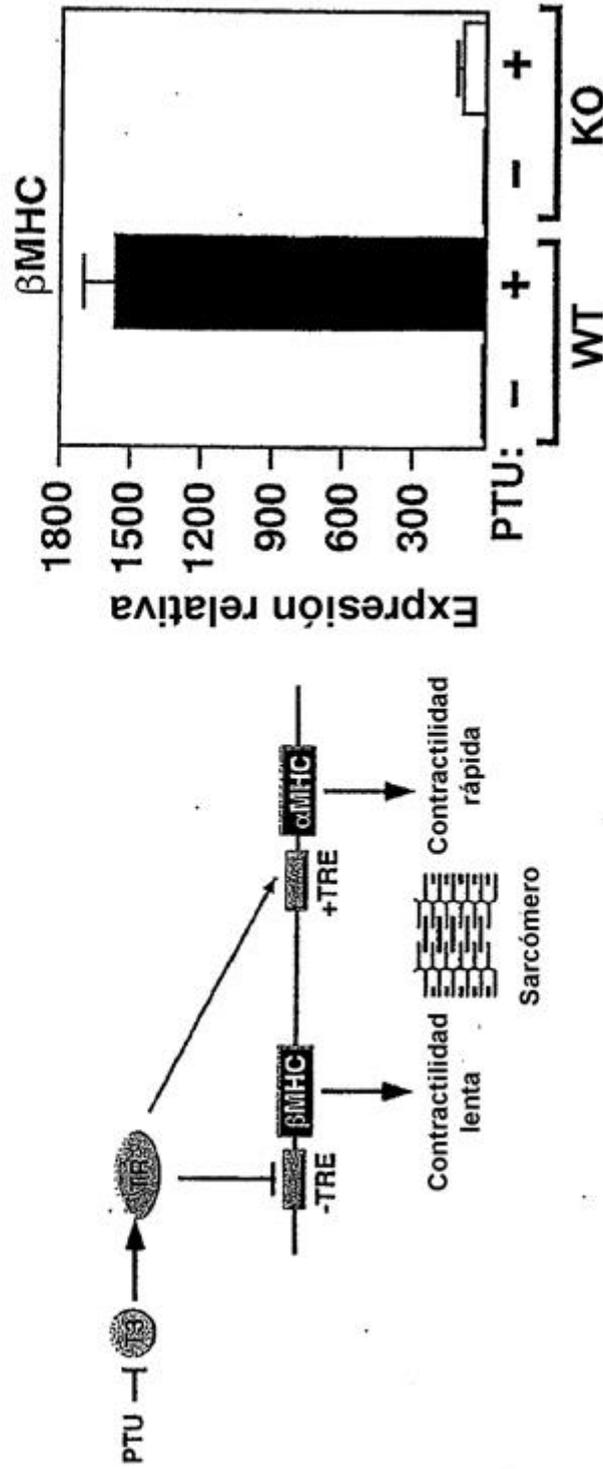


FIG. 9

Ratones miR-208 KO no pueden regular por incremento β -MHC en respuesta a hipotiroidismo



PTU alivia la represión de beta y evita la activación de alfa

FIG. 10

Control de la expresión de beta-MHC por miR-208

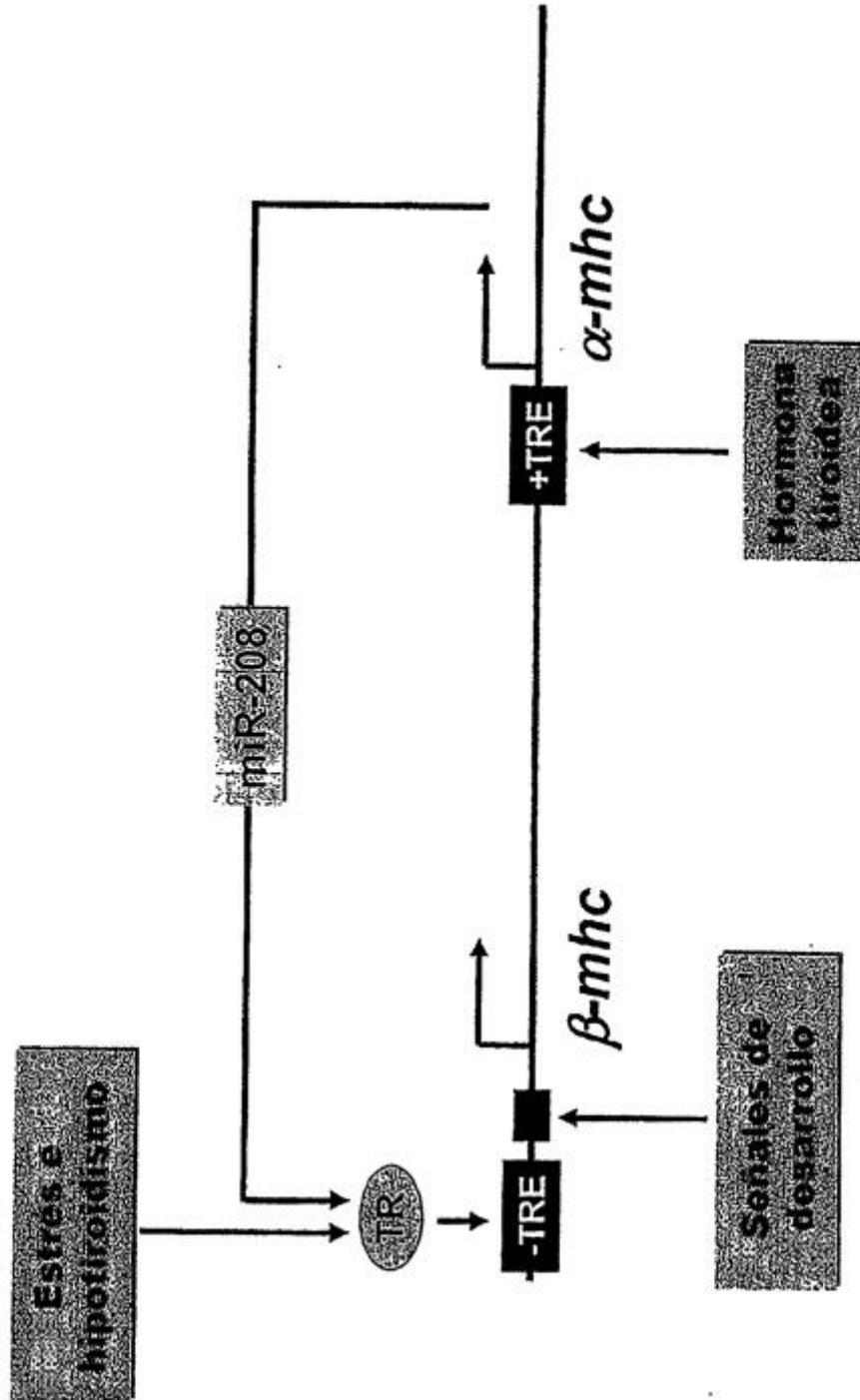


FIG. 11

miR-208: un regulador central de la contractilidad cardiaca y la capacidad de respuesta a estrés

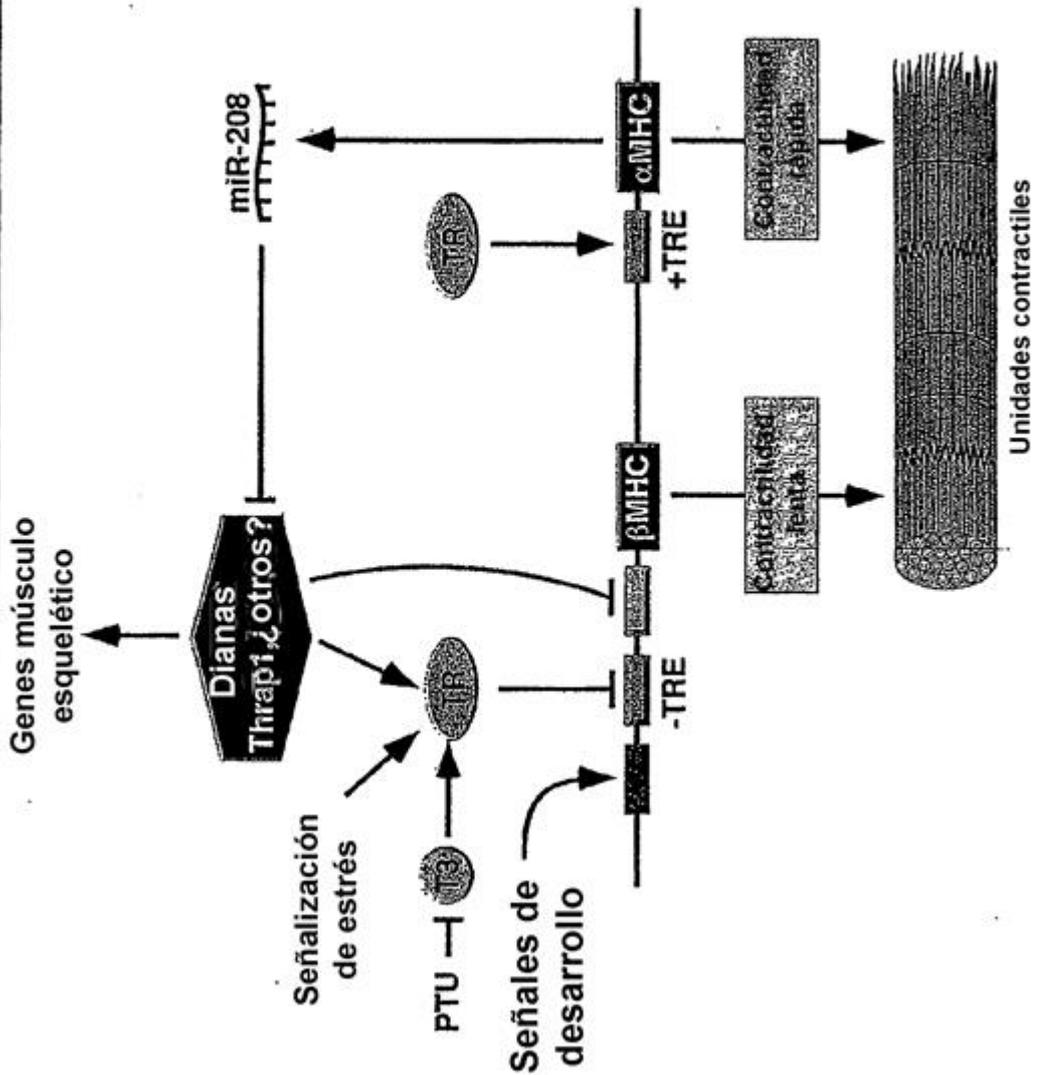


FIG. 12

Control mediante microARN del crecimiento cardiaco patológico

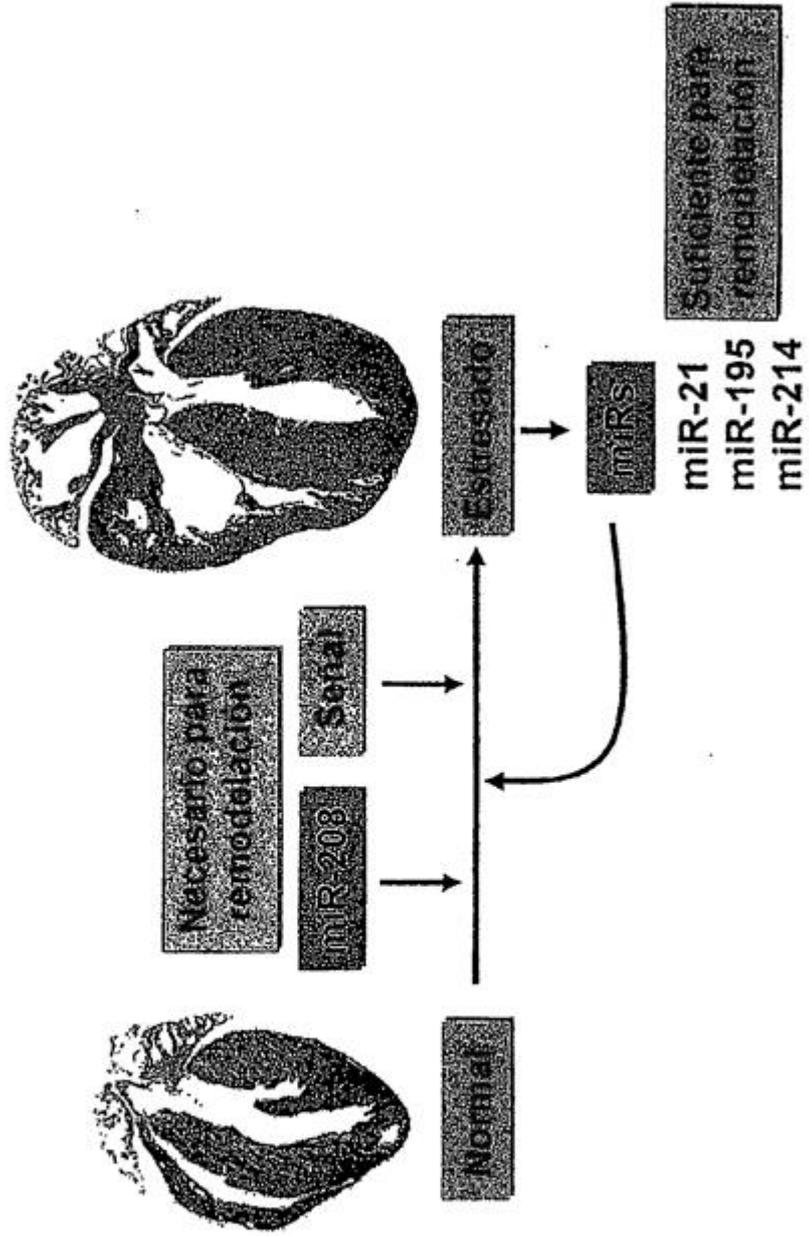


FIG. 13

Una firma de microARN del corazón hipertrófico

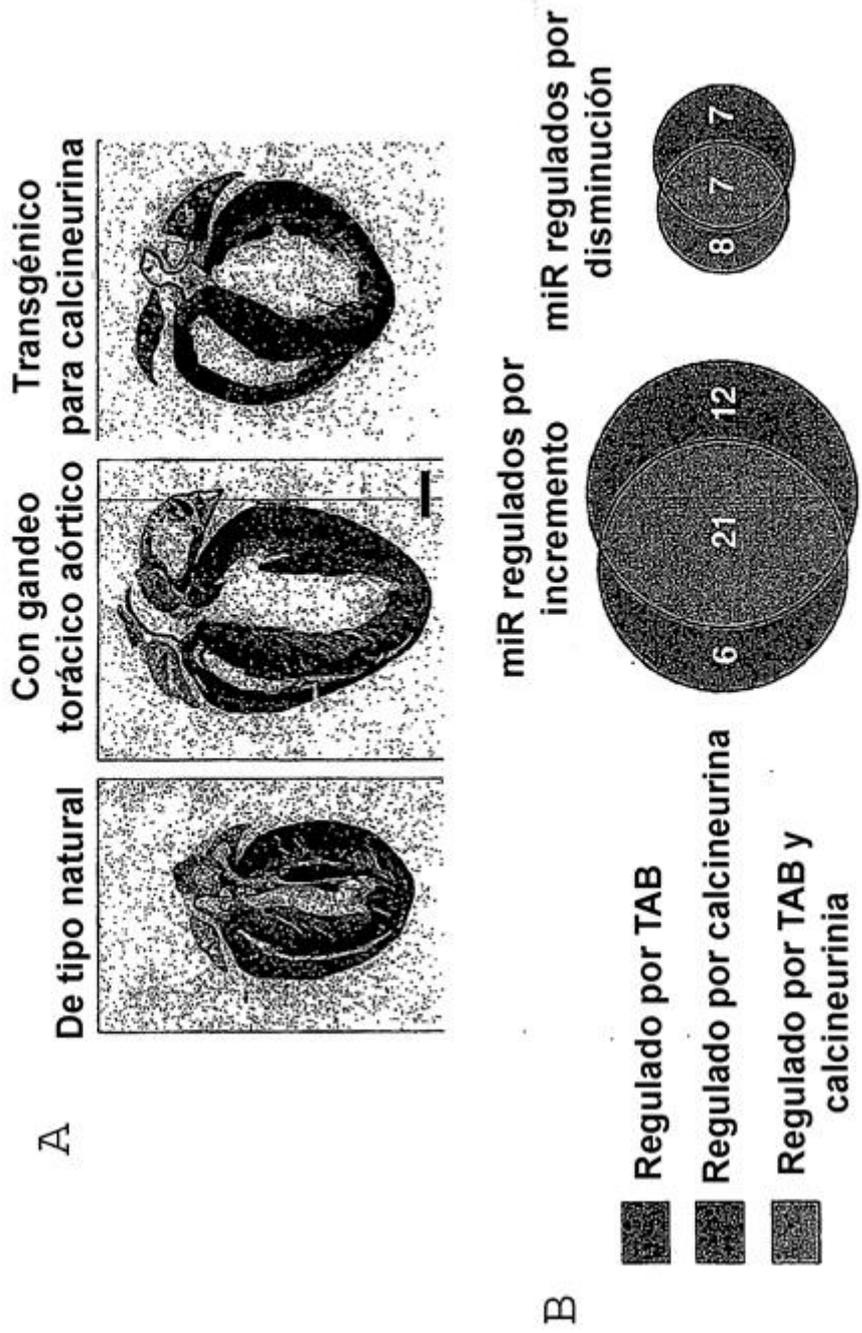


FIG. 14A-B

Una firma de micro ARN del corazón hipertrófico

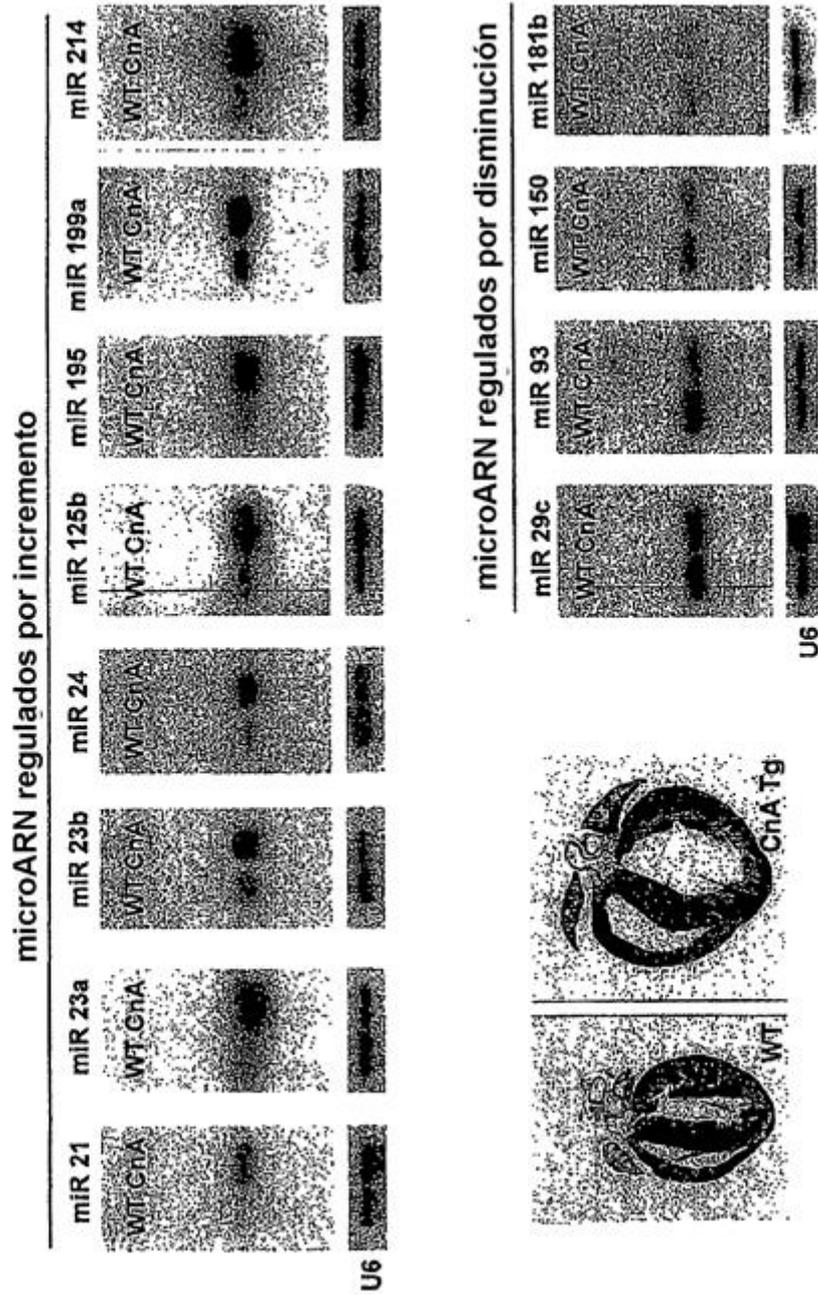
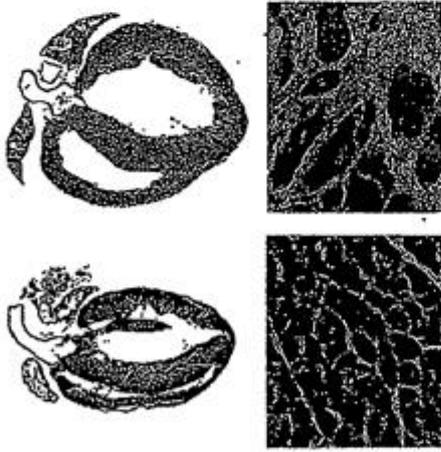


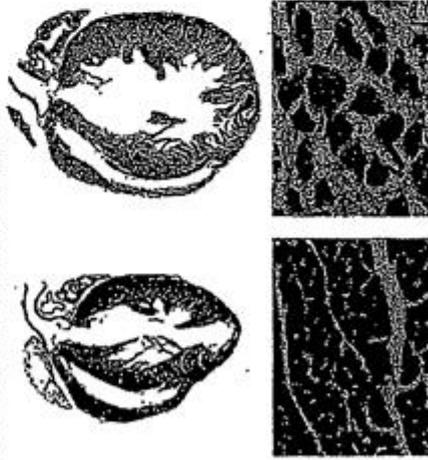
FIG. 14C

miR-29 se regula por disminución durante hipertrofia cardiaca

WT frente a CnA Tg



Simulado frente a TAB



Expresión de miR-29

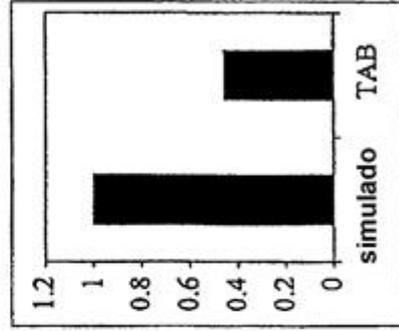
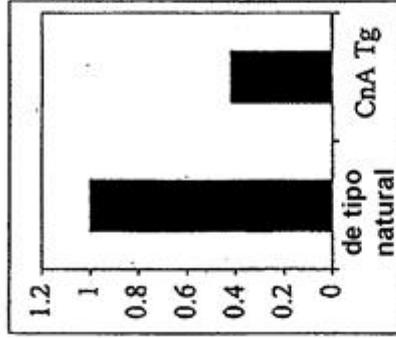


FIG. 15

miARN regulados por disminución en miR-208 KO frente a tipo natural

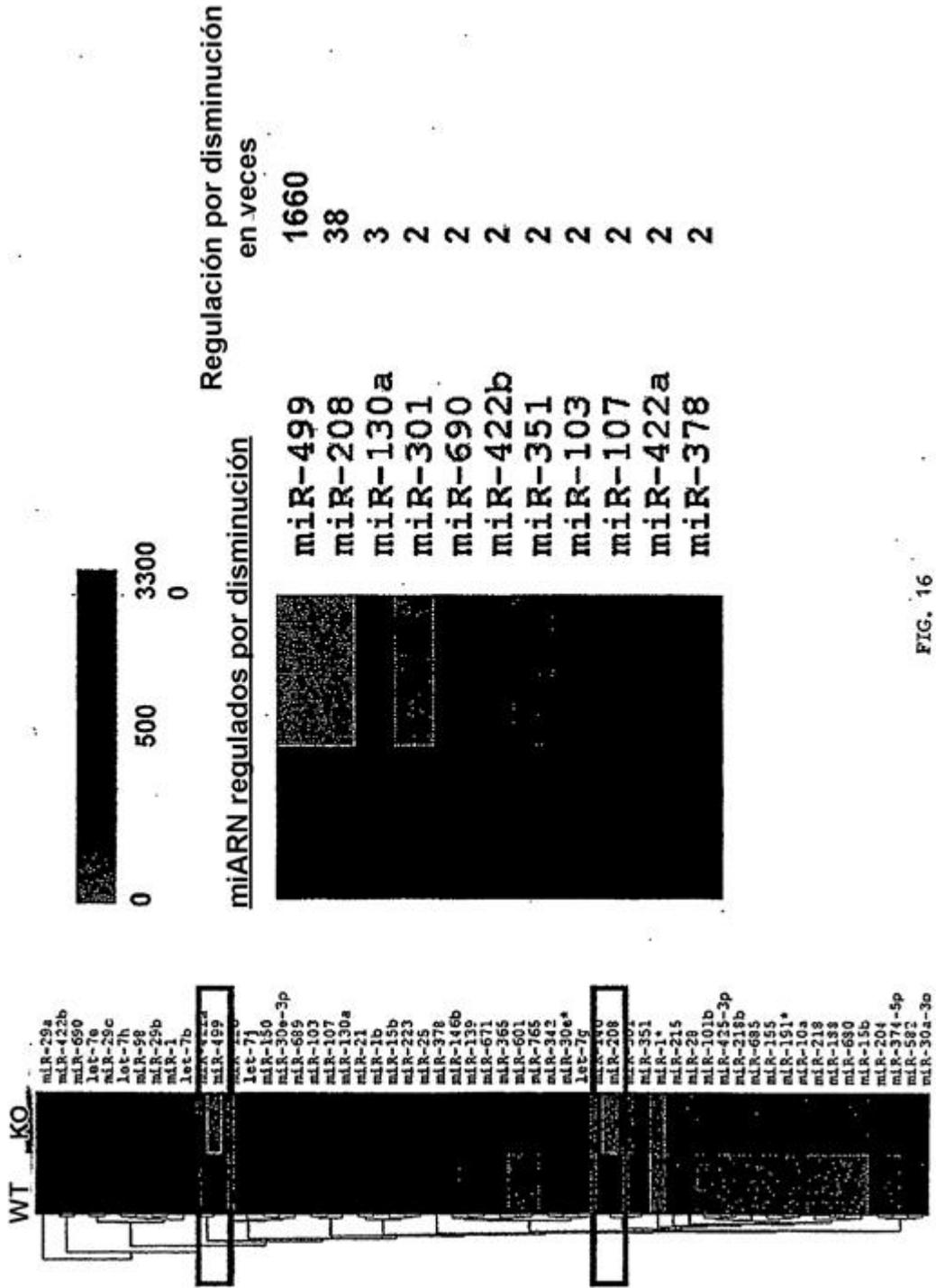
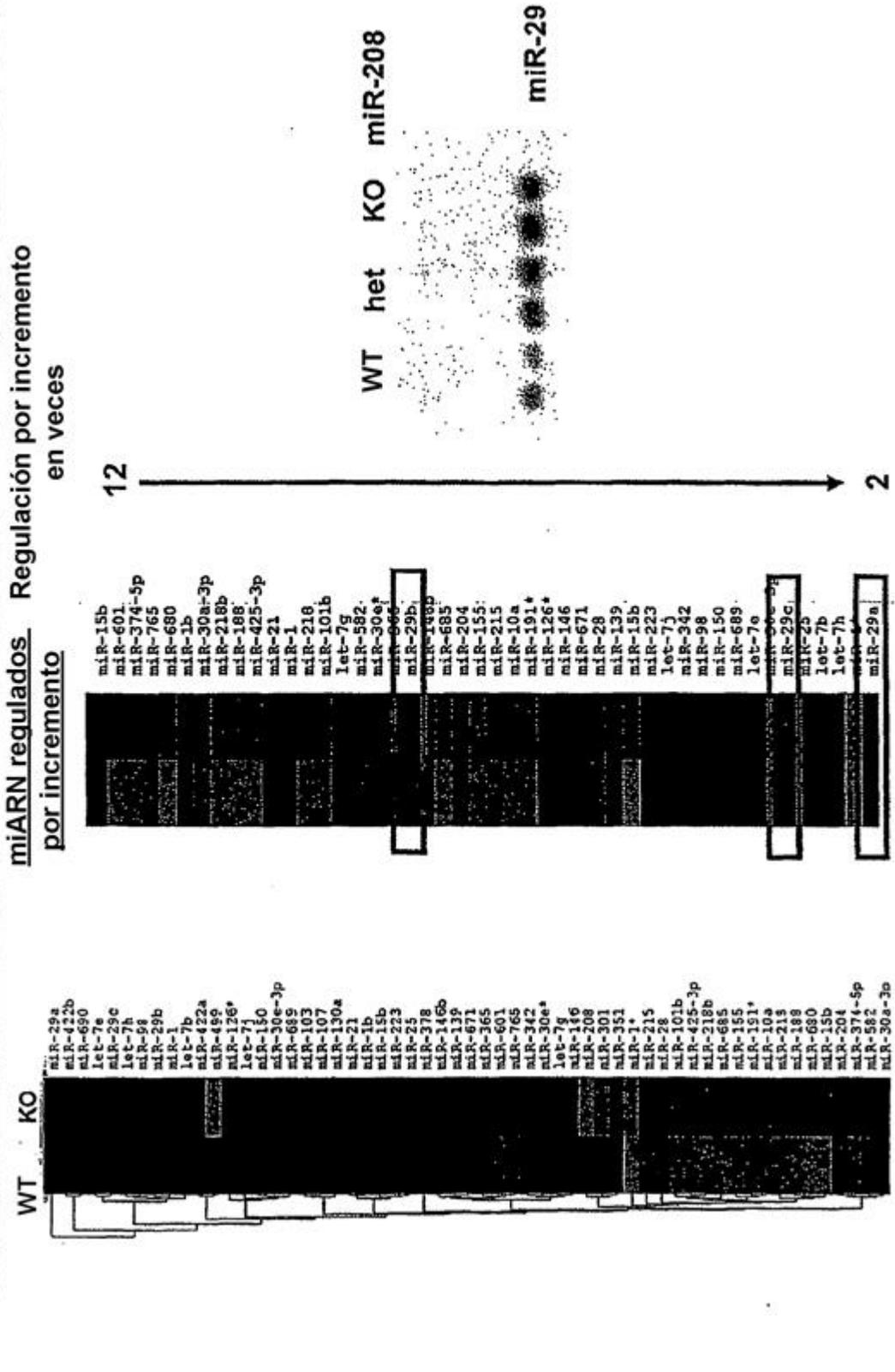


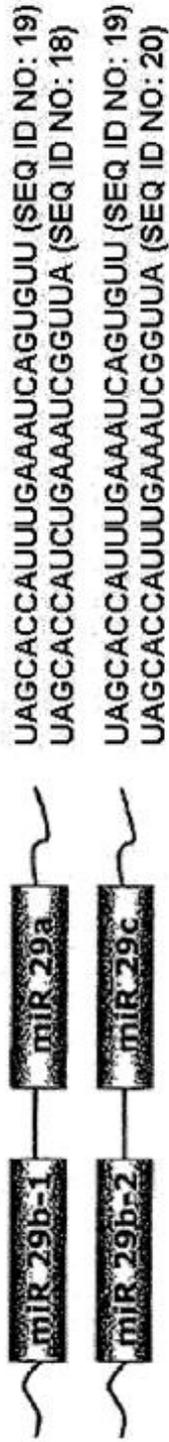
FIG. 16

miARN regulados por incremento en miR-208 KO frente a tipo natural



FIG, 17

Familia de miR-29 dirigida a colágenos diana



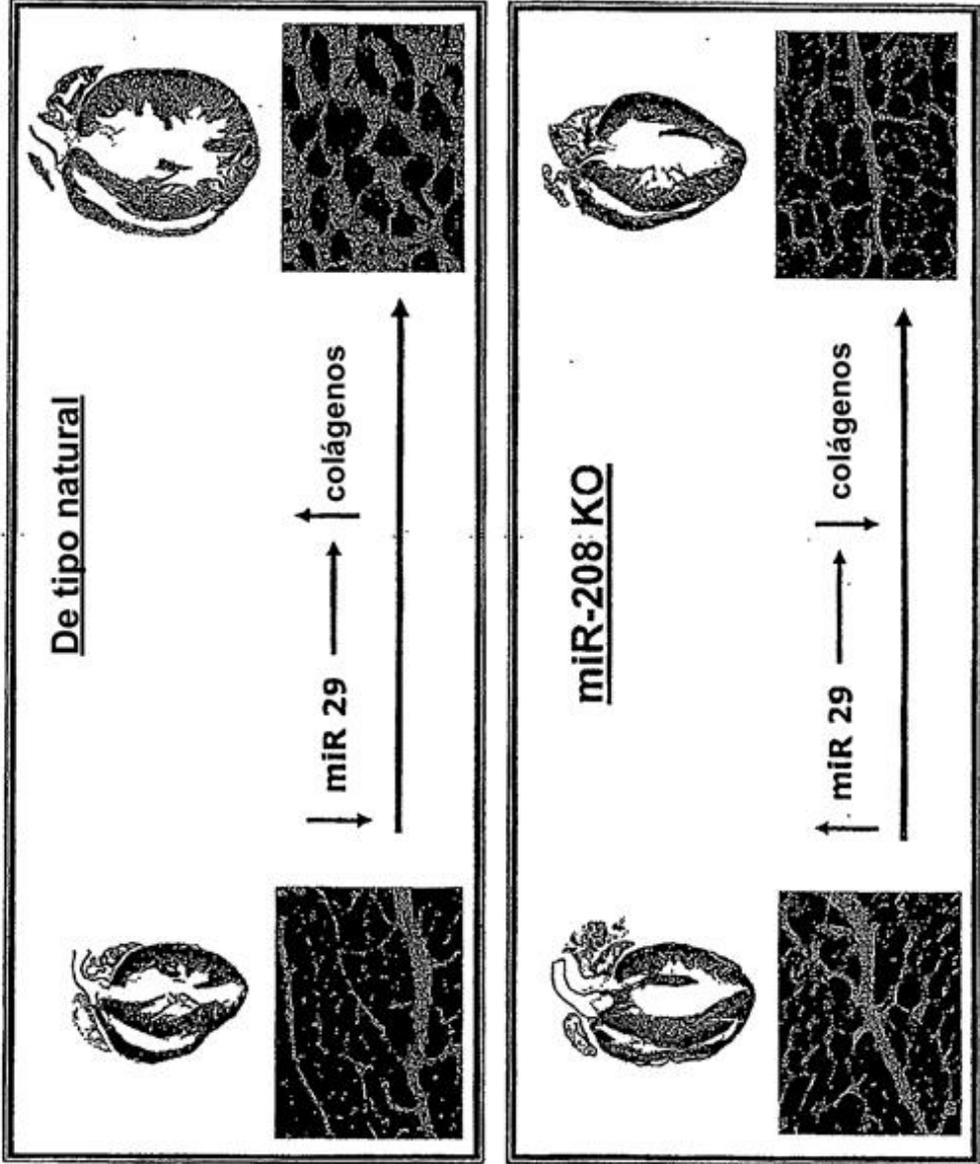
Familia de miR-29

genes diana

- colágeno, tipo III, alfa 1
- colágeno, tipo IV, alfa 4
- fibrilina 1
- elastina
- colágeno, tipo V, alfa 5
- colágeno, tipo XI, alfa 1
- colágeno, tipo V, alfa 1
- colágeno, tipo I, alfa 2
- colágeno, tipo IV, alfa 5

: FIG. 18

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



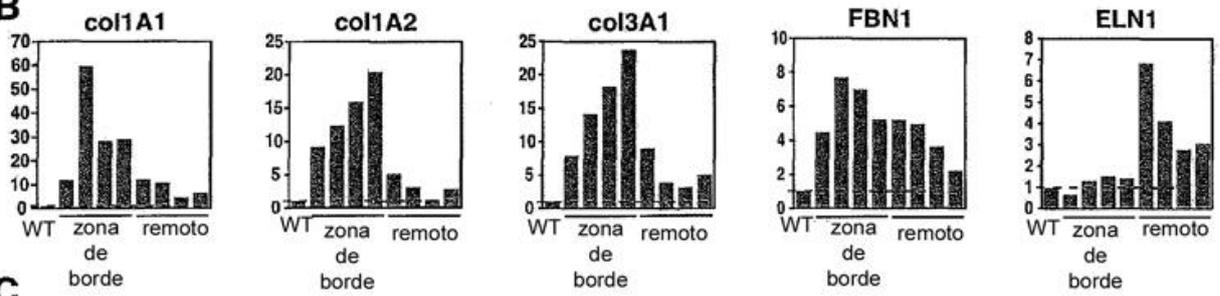
FIG, 19

A

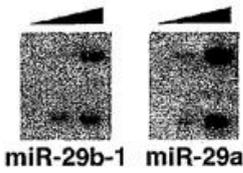
3' -UUGUGACUAAAGAAAGUUUACCACGAU-5' miR-29 (SEQ ID NO: 22)

COL3A1	UGGUGCUA	de 8 meros
FBN1	UGGUGCUA	de 8 meros
	UGGUGCUU	de 7 meros-1A
	UGGUGCUA	de 8 meros
ELN1	UGGUGCUA	de 8 meros
	UGGUGCUC	de 7 meros-1A
	AGGUGCUA	de 7 meros-m8
COL1A2	AGGUGCUA	de 7 meros-m8
COL1A1	UGGUGCUA	de 8 meros
	AGGUGCUA	

B



C



D

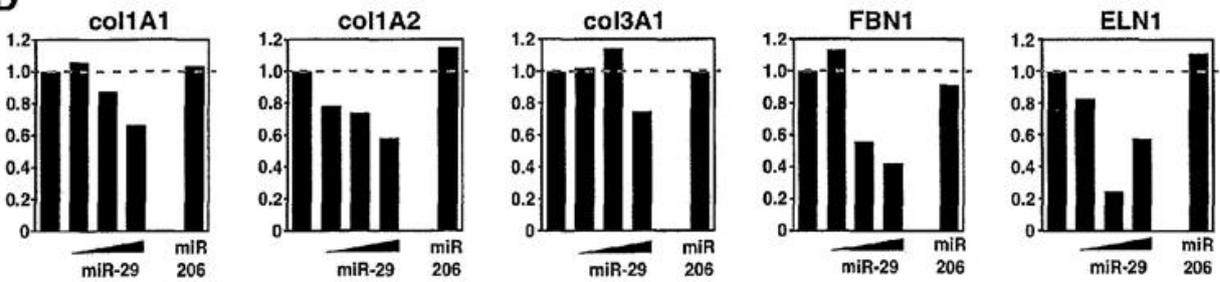


FIG. 20A-D

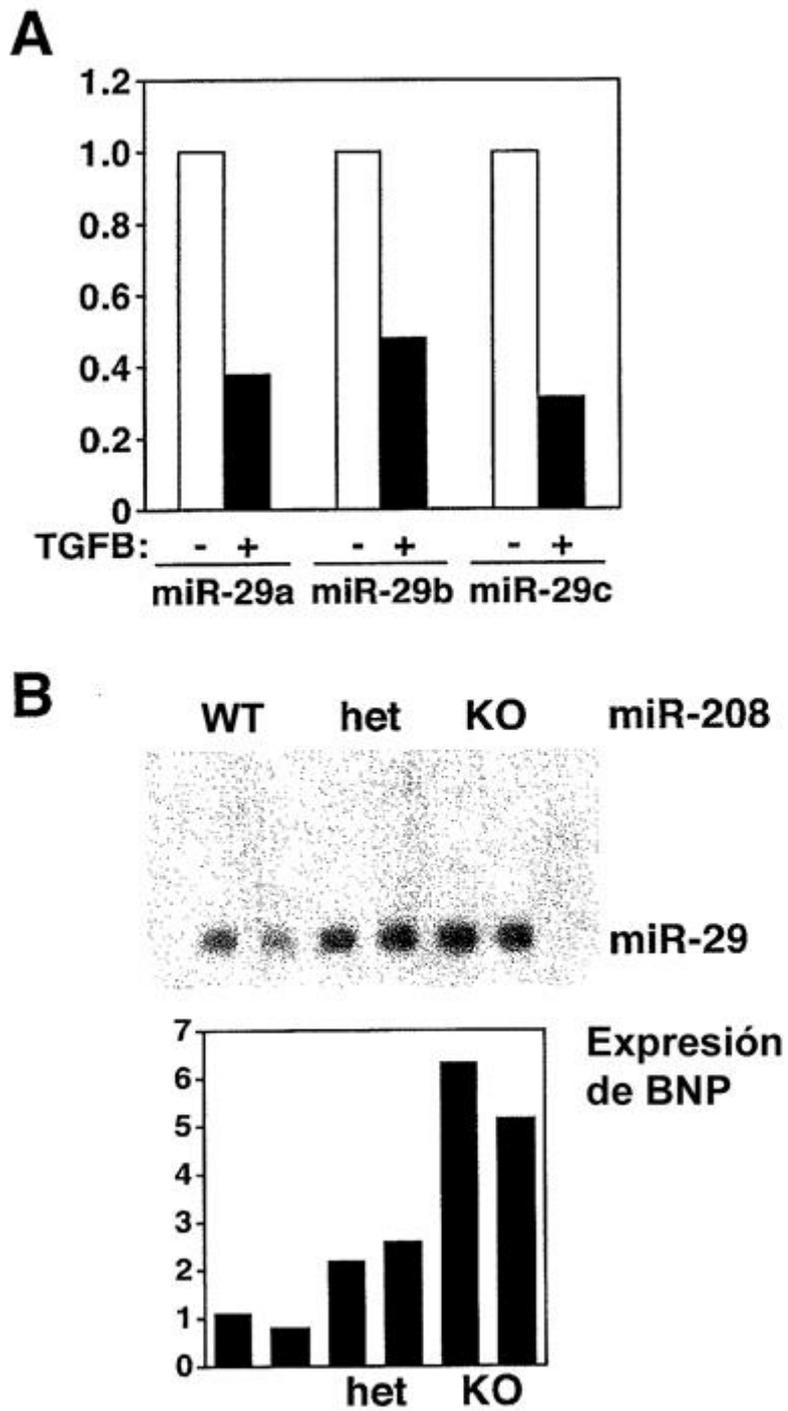


FIG. 21A-B

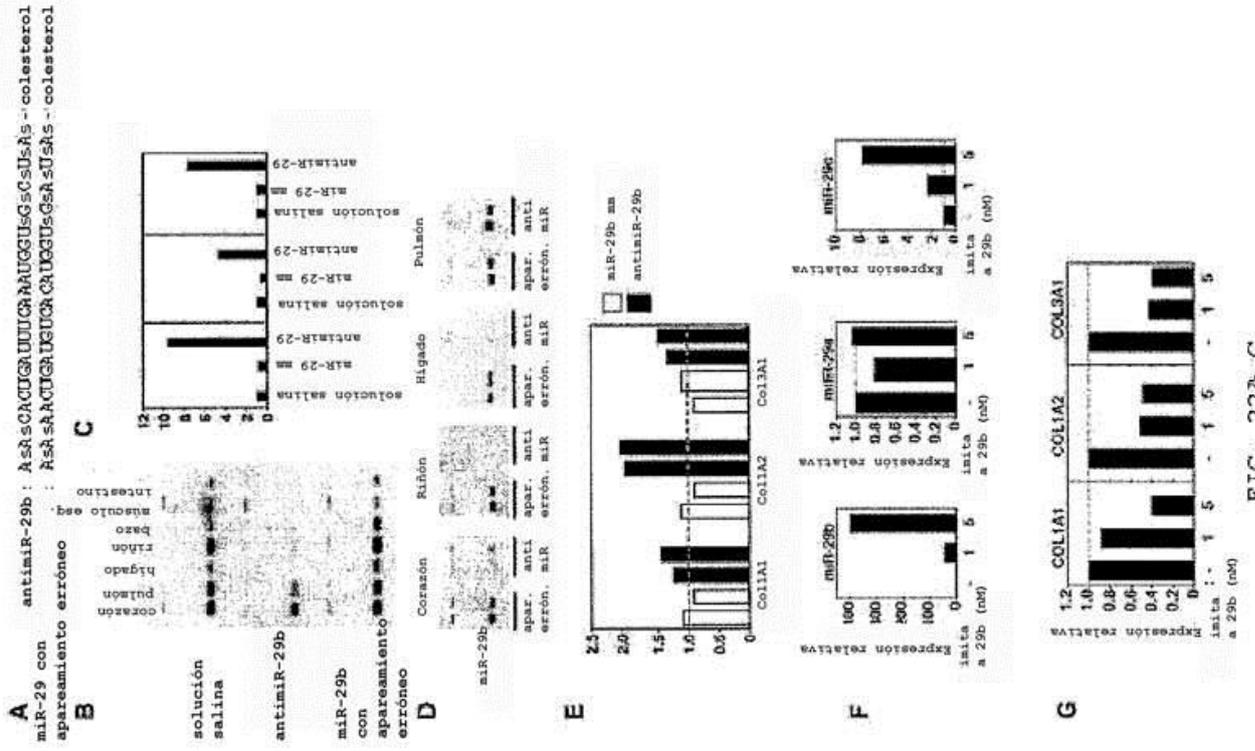


FIG. 22A-G

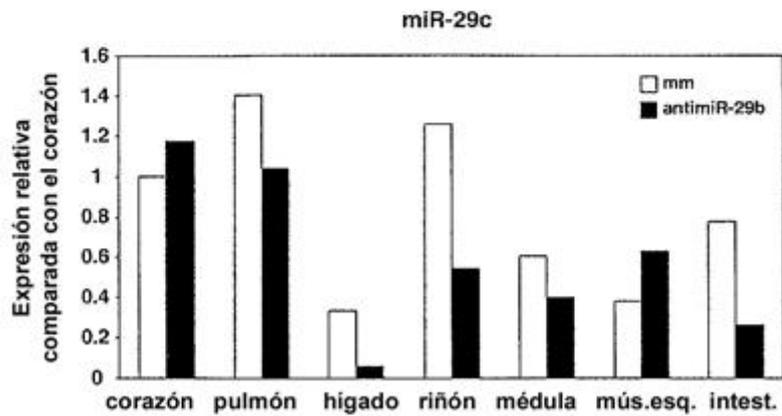
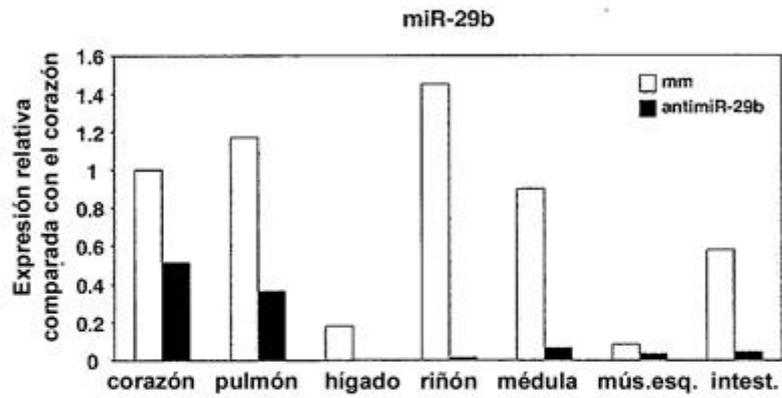
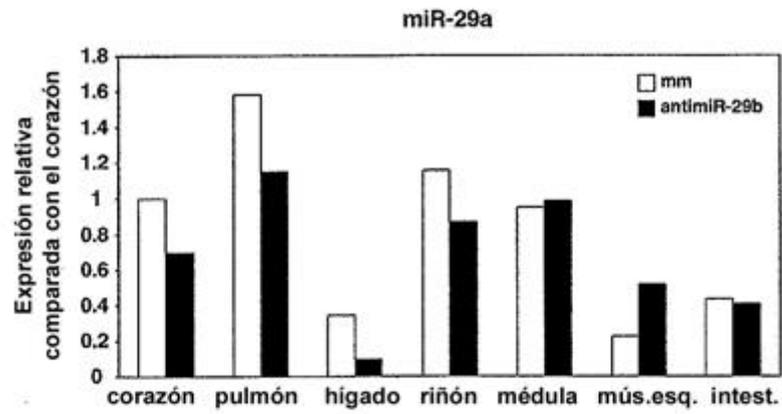


FIG. 23