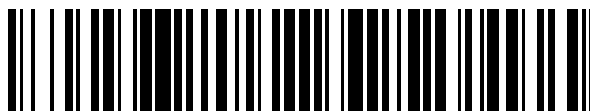


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 574**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/IB2012/057590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12823043 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2794882**

54 Título: **MicroARN para la regeneración cardíaca mediante la inducción de proliferación de miocitos cardíacos**

30 Prioridad:

23.12.2011 IT RM20110685

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

29.11.2017

73 Titular/es:

**I.C.G.E.B. INTERNATIONAL CENTRE FOR
GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY
(100.0%)**

**Area Science Park Padriciano 99
34149 Trieste, IT**

72 Inventor/es:

**GIACCA, MAURO;
ZACCHIGNA, SERENA;
CUNHA MANO, MIGUEL LUIS y
BREGIEIRO EULALIO, ANA SOFIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 644 574 T3

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

DESCRIPCIÓN

MicroARN para la regeneración cardíaca mediante la inducción de proliferación de miocitos cardíacos

La presente invención se refiere a los campos de los productos farmacéuticos y la biotecnología. En particular, la presente invención desvela un conjunto de microARN humanos y su uso como medicamentos, especialmente como
 5 terapia génica, para inducir la proliferación de cardiomiocitos como un medio para estimular la regeneración cardíaca para el tratamiento de enfermedades cardíacas asociadas con una pérdida de cardiomiocitos (infarto de miocardio, miocardiopatía de origen isquémico y no isquémico, miocarditis e insuficiencia cardíaca).

Además, la invención desvela un procedimiento para la selección de compuestos biológicos y farmacéuticos activos por su capacidad para aumentar la proliferación de cardiomiocitos.

10 **Antecedentes de la invención**

A pesar de los enormes progresos realizados en los últimos años en términos de prevención y diagnóstico precoz, el análisis epidemiológico en los países occidentales indica que los trastornos cardiovasculares se encuentran entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad entre las personas mayores de 60 años. Se producen aproximadamente
 15 600.000 muertes/año en Europa por infarto de miocardio y, lo que es aún más relevante, se estima que la insuficiencia cardíaca afecta a más de 15 millones de personas en todo el mundo, lo que representa una de las principales causas de muerte; este número seguramente va a aumentar como consecuencia del envejecimiento de la población mundial y de los avances en las tecnologías médicas. A pesar del tratamiento farmacológico, el pronóstico a largo plazo de los pacientes con insuficiencia cardíaca sigue siendo deficiente: más del 60 % de estos
 20 pacientes fallecen en 5 años, por un empeoramiento de la enfermedad o por arritmias ventriculares repentinas. Hasta el 16 % de los pacientes son hospitalizados de nuevo en los primeros 6 meses después del alta, lo que hace que esta enfermedad sea la causa más frecuente de hospitalización (aproximadamente 20 %) en la población mayor de 65 años.

A la luz de estas consideraciones, se requiere absolutamente el desarrollo de nuevas terapias que tengan un
 25 impacto directo sobre la proliferación, viabilidad y función de los miocitos cardíacos, siendo así dirigidas colectivamente para mejorar el mantenimiento y la regeneración del tejido cardíaco.

En los mamíferos, el agrandamiento del corazón durante el desarrollo embrionario depende principalmente del aumento del número de cardiomiocitos, pero poco después del nacimiento los miocitos cardíacos dejan de proliferar y el crecimiento ulterior del miocardio ocurre a través del aumento hipertrófico de las células miocárdicas existentes (Ahuja y col. Amerongen y Engel, 2008). Este cambio en el potencial de crecimiento de los cardiomiocitos se
 30 produce en diferentes etapas de desarrollo en diferentes especies: en el ratón, se produce poco después del nacimiento, mientras que en la rata entre el día post-natal 3 y 4; mientras que los cardiomiocitos humanos muestran una notable reducción de la capacidad proliferativa después de los 7 meses de edad. Las evidencias recientes obtenidas por la datación del ADN de cardiomiocitos en seres humanos han indicado que los cardiomiocitos se renuevan fisiológicamente a una tasa del 1 % a la edad de 25 y del 0,45 % a la edad de 75 y que durante un período vital normal existe un recambio de menos del 50 % de los cardiomiocitos (Bergmann y col., 2009).

Como consecuencia de esta limitada capacidad de proliferación de los cardiomiocitos adultos, la capacidad del corazón adulto de mamífero para repararse después de la lesión es muy limitada (Senyo y col., 2012). En particular, la pérdida de cardiomiocitos que se produce después de varios tipos de daño miocárdico, generalmente después del infarto de miocardio, no se repara por la generación de nuevo tejido contráctil sino por la formación de una cicatriz.
 40 Esto compromete significativamente la función cardíaca, que a menudo tiende a empeorar con el tiempo, conduciendo a la insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la identificación de nuevos medios para promover la regeneración del tejido cardíaco contráctil después de la lesión parece obligatoria.

La transición de los cardiomiocitos desde un estado proliferativo, característico de los estadios embrionarios, al fenotipo hipertrófico diferenciado típico de las células adultas es un proceso altamente regulado, en el que participan
 45 varios reguladores del ciclo celular, factores transcripcionales, factores de crecimiento, citocinas y vías de señalización y col., 2007, van Amerongen y Engel, 2008). Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos que controlan esta transición y los responsables de mantener la proliferación y diferenciación de miocitos cardíacos siguen siendo en gran parte desconocidos.

Los microARN son pequeños ARN no codificantes evolutivamente conservados que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. En las células animales, la represión de la expresión génica por microARN se logra mediante el apareamiento de bases con secuencias parcialmente complementarias presentes principalmente en 3' UTR de ARN mensajeros (ARNm) diana, lo que tiene como resultado la represión de la traducción, la degradación del ARNm o ambos (Eulalio y col., 2008). La secuencia de semillas de microARN, esencial para la unión del microARN al ARNm, es una secuencia conservada que está situada generalmente en las posiciones 2-8 desde el extremo 5' del microARN (Filipowicz y col., 2008). Aunque el apareamiento de bases de microARN y su ARNm diana no es perfecto, la región correspondiente a la secuencia semilla tiene que ser perfectamente complementaria. Por lo tanto, la secuencia semilla es el determinante de la especificidad primaria para la selección de diana. El tamaño pequeño de la secuencia semilla significa que un único microARN puede regular muchos, incluso cientos, de genes

diferentes.

Los microARN son secuencias codificadas por el genoma generalmente transcritas por la ARN polimerasa II en microARN primarios (pri-microARN). Los pri-microARN son procesados secuencialmente por dos endonucleasas de la familia RNasa III: en el núcleo, Drosha procesa el pri-microARN en un microARN precursor (pre-microARN) de aproximadamente 60-80 nucleótidos, después de lo cual el pre-microARN es posteriormente procesado, en el citoplasma, por Dicer para formar un dúplex que contiene dos cadenas, de aproximadamente 19-23 nucleótidos. El dúplex de microARN se desenrolla a continuación y el microARN maduro se incorpora al complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que contiene, entre otras, las proteínas Argonauta y GW182 esenciales para el silenciamiento por microARN (revisado en Ghildiyal y Zamore 2009). El repositorio de referencias de secuencias de microARN publicadas y anotaciones asociadas (miRBase; www.mirbase.org) en su publicación de 18 de noviembre de 2011, contiene 18.226 entradas que representan microARN precursores de horquilla que expresan 21.643 productos maduros de microARN en 168 especies.

Teniendo en cuenta que los microARN individuales pueden tener cientos de dianas, se predice que aproximadamente un tercio del transcriptoma humano está regulado por microARN. Otra capa de complejidad reguladora se introduce por el hecho de que cada ARNm puede ser dirigido por múltiples microARN (Bartel 2009).

Se ha demostrado que el control de la expresión génica por microARN juega un papel importante en una amplia gama de procesos biológicos que incluyen desarrollo, diferenciación celular, proliferación, apoptosis, metabolismo y respuesta inmunitaria (Kedde y Agami 2008, O'Connell y col., 2010). Teniendo en cuenta la noción de que los microARN juegan un papel crucial en el control de la expresión génica, la regulación deficiente de la expresión de microARN se ha correlacionado con varias patologías, incluyendo el cáncer (Croce 2009) y las infecciones víricas (Umbach y Cullen 2009) y la investigación está comenzando a desentrañar el papel de los microARN en las enfermedades cardiovasculares (van Rooij y Olson 2007, Latronico y Condorelli 2009, Williams y otros 2009, Small y Olson 2011).

En comparación con muchos factores celulares implicados en la enfermedad, los cuales son difíciles de modular terapéuticamente, los niveles de microARN pueden ser fácilmente modulados *in vivo* utilizando imitadores de microARN (que reemplazan la acción del microARN) y antimicroARN (secuencias complementarias a la secuencia madura de microARN que bloquean su actividad). De hecho, el uso eficiente de antimicroARN se ha demostrado en primates no humanos (Elmen y col., 2008; Lanford y col., 2010) y estos estudios se han avanzado a ensayos clínicos en seres humanos.

La importancia de la regulación de microARN en la función de los cardiomiocitos fue puesta en evidencia por varios estudios en ratones, en los que las enzimas requeridas para la biogénesis de microARN (Dicer y Dgcr8) se han inactivado específicamente en el corazón (Chen y col., 2007; 2009). Estos estudios demostraron que el deterioro postnatal de la vía ARNi en el tejido muscular cardíaco conduce a la muerte prematura de los animales con signos de insuficiencia cardíaca y miocardiopatía (Rao y col., 2009).

Los perfiles de microARN de diversos tipos de patologías cardíacas muestran patrones de expresión de microARN alterados (Ikeda y col., 2007; Matkovich y col., 2009; Thum y col., 2007; van Rooij y col., 2006), lo que indica que los microARN asociados a enfermedades puede constituir una poderosa herramienta de diagnóstico, así como un prometedor enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Algunos microARN específicos se han asociado con enfermedades cardíacas, incluyendo la hipertrofia cardíaca (Callis y col., 2009; Care y col., 2007; Lin y col., 2009), la insuficiencia cardíaca (Callis y col., 2009; Care y col., 2007; van Rooij y col., 2007), las arritmias cardíacas (Callis y col., 2009; Yang y col., 2007), la fibrosis (Thum y col., 2008; van Rooij y col., 2008) y los trastornos metabólicos (Najafi-Shoushtari y col., 2010). Además, se ha demostrado que algunos microARN específicos son necesarios y suficientes para inducir patologías cardíacas mediante la realización de experimentos de pérdida y ganancia de función (revisados en: Huang y col., 2010, Small y col., 2010).

Solo unos pocos microARN han sido hasta ahora claramente implicados en la proliferación de cardiomiocitos, incluyendo miR-1, miR-133 y, más recientemente, los miembros de la familia miR-15. Se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-1 en el corazón embrionario inhibe la proliferación de cardiomiocitos, la cual estaba asociada a la represión de Hand2, un factor de transcripción necesario para el crecimiento cardíaco durante la embriogénesis (Zhao y col., 2005). miR-133 inhibe la proliferación de cardiomiocitos a través de la represión de SRF y ciclina D2, dos reguladores esenciales de la diferenciación de células musculares (Liu y col., 2008). Finalmente, se demostró que la familia miR-15 regulaba la detención mitótica posnatal de los cardiomiocitos de ratón, a través de la regulación negativa de la expresión de Chek1 (Porrello y col., 2011). Hasta la fecha, no se ha realizado ninguna búsqueda exhaustiva de microARN capaces de inducir la regeneración cardíaca.

La técnica anterior es rica en divulgaciones que relacionan el uso de microARN tanto como marcadores de diagnóstico como agentes terapéuticos.

Una lista ilustrativa de estas patentes es:

WO2011133288; WO2012160551; US20120295963; WO2012149557;
US20120270826; WO2012122447; EP2496711; WO2012119051;

- WO2012115885; US20120207744; EP2288703; EP2475372; WO2012094366; EP2474616; US20120165392; WO2012083004; EP2462228; WO2012072685; US20120137379; US20120128761; WO2012061810; WO2012052953; US20120093885; US20120088687; EP2425016; US20120053227; 5 US20120053333; WO2012020308; WO2012020307; WO2012012870; WO2012010905; EP2401365; WO2011157294; US20110262928; WO2011133036; EP2377559; CA2795776; WO2011112732; US20110160290; US20110160285; US20110152352; US20110144914; EP2322616; US20110086353; US20110086348; EP2305810; US20110003704; EP2257625; 10 EP2254586; US20100267804; EP2234483; EP2228444; US20100227325; EP2202309; US7709616; EP2179060; WO2010033871; US20100029003; US20090306181; US20090298910; US20090291131; US20090081640; US20080261908; US20080256072; US20050256072.
- 15 El documento WO201111824 desvela microARN que promueven la proliferación de cardiomiocitos, en particular miR-148a, miR-148b, miR-152 y miR-373.
- El documento WO2006/107826 desvela microARN que regulan la diferenciación, proliferación y muerte de células de músculo cardíaco y esquelético. Estos pueden utilizarse como agentes activos para inducir la diferenciación en células progenitoras y su regulación negativa permite el mantenimiento y la expansión de la población de células progenitoras.
- 20 El documento WO2008/063919 proporciona microARN de β -miosina y procedimientos para reducir o inhibir su expresión con el fin de detectar agentes activos que modulan su expresión y procedimientos de diagnóstico para el riesgo de trastornos cardiovasculares.
- El documento WO2009/058818 identifica miR-21, que altera el metabolismo energético en los cardiomiocitos, contribuyendo a la remodelación cardíaca. Su inhibición se desvela como un procedimiento para tratar la hipertrofia cardíaca, la insuficiencia cardíaca y/o el infarto de miocardio. 25
- El documento US2010/0010073 desvela 29 secuencias de microARN para el diagnóstico, la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades cardíacas, tales como infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica y/o hipertrofia cardíaca.
- 30 El documento CN101643791 desvela microARN-328 y la aplicación de un antisentido del mismo para diagnosticar y controlar enfermedades cardíacas. El nucleótido antisentido tiene efectos preventivos y terapéuticos.
- El documento WO2010/117860 desvela la firma de microARN para predecir el pronóstico en la insuficiencia cardíaca. Los microARN son hsa-miR-367, hsa-miR-10a, hsa-miR-187, hsa-miR-452, hsa-miR-218, hsa-miR-10b, hsa-miR-214, hsa-miR-193a y hsa-miR-565.
- 35 El documento WO2010/129950 desvela un procedimiento para tratar o prevenir la hipertrofia cardíaca patológica, la remodelación cardíaca, el infarto de miocardio o la insuficiencia cardíaca mediante la inhibición de la expresión o actividad de miR-451 en las células cardíacas.
- 40 El documento US20120165392 desvela un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares mediante la modulación de la expresión de ciertos microARN mediante la administración de un inhibidor o un agonista, según sea el caso. El documento EP2425016 desvela un procedimiento similar, en el que se administra un inhibidor o un microARN funcional. Los documentos WO2012020308 y WO2012020307 desvelan un procedimiento para tratar el daño agudo del tejido mediante la administración de una población celular o microvesículas capaces de inducir la reparación tisular. Estas células expresan un número considerable de proteínas heterogéneas y microARN. Por ejemplo, las células PDPC están indicadas para el daño isquémico cardíaco, pero no existe una conexión específica entre el microARN individual y la regeneración cardíaca; estos factores expresados y microARN son muy heterogéneos por lo tanto para ser considerados como marcadores de identidad celular en lugar de agentes terapéuticos específicos. 45
- El documento EP2228444 desvela algunos microARN para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, específicamente enfermedades hipertróficas. Estos microARN inducen un cambio fenotípico del tamaño de miocitos cardíacos con el alcance de la remodelación del corazón hipertrófico.
- 50 Otras referencias de la lista anterior se refieren a enfermedades distintas de las enfermedades cardiovasculares o a la determinación del perfil de microARN para el diagnóstico de una enfermedad cardiovascular; algunos microARN se muestran como dianas para inhibidores terapéuticos.
- 55 Sin embargo, no existe una descripción explícita de los microARN que fueron específicamente seleccionados por su capacidad de estimular la proliferación de cardiomiocitos adultos en el tejido cardíaco que está dañado o alterado en su función fisiológica, permitiendo de este modo la regeneración cardíaca in vivo.

Sigue existiendo la necesidad de encontrar formas eficaces de tratar las enfermedades cardiovasculares, en particular aquellas asociadas con una pérdida de cardiomiocitos (en particular, como consecuencia de un infarto de miocardio, una miocardiopatía de origen isquémico y no isquémico, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca).

5 En particular, es de extrema importancia el descubrimiento de agentes activos capaces de estimular la proliferación de cardiomiocitos, especialmente en la parte del tejido cardíaco dañada o alterada en su función fisiológica, permitiendo de este modo específicamente la regeneración cardíaca *in vivo*.

10 El documento WO2010/138263 desvela microARN que pueden administrarse utilizando virus adenoasociados (AAV), a un tejido diana, en el que se menciona el corazón en una larga lista de posibles tejidos diana. Hsa-miR-210 y hsa-miR-590-3p se desvelan en dicho documento. Los dos microARN son parte de una lista muy larga. No se hace ninguna divulgación de habilitación suficiente para ninguno de los microARN citados para ninguno de los tejidos diana citados. Además, no se establece ninguna relación específica con ninguno de los microARN enumerados con ninguno de los tejidos diana enumerados. No existe una descripción explícita, inequívoca y suficiente de que hsa-miR-210 y hsa-miR-590-3p sean útiles para estimular la regeneración cardíaca a través de la proliferación de miocitos cardíacos.

15 El microARN-210 se desvela tal como se expresa en cardiomiocitos y es capaz de aumentar la regulación positiva de varios factores angiogénicos y prevenir la apoptosis celular y su utilidad en el tratamiento del infarto de miocardio y las cardiopatías isquémicas (Hu y col., 2010). El experto en la materia sabe que la regulación positiva de los factores angiogénicos y la prevención de la apoptosis celular son mecanismos útiles en la fase aguda del infarto, pero son de menor o ninguna utilidad en situaciones prolongadas de enfermedad cardíaca donde se necesita una regeneración de cardiomiocitos. En este contexto, el experto en la materia, un médico experto en cardiología, es muy consciente del diferente significado clínico entre una terapia basada en la promoción de la angiogénesis y la prevención de la apoptosis celular, esta terapia es adecuada para el tratamiento de fases agudas de enfermedades cardiovasculares como infarto de miocardio y una terapia basada en la regeneración de cardiomiocitos, como las consecuencias de un infarto de miocardio, una miocardiopatía isquémica y no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca. Esta persona también es consciente de que la terapia para el tratamiento de la fase aguda no es adecuada para el tratamiento de enfermedades cardíacas donde la proliferación de cardiomiocitos es necesaria para la regeneración del corazón.

20 Se ha descubierto ahora que 208 microARN humanos son capaces de aumentar significativamente la proliferación de cardiomiocitos de rata *in vitro*. De estos, 36 microARN también aumentaban la proliferación de cardiomiocitos aislados de corazones de ratón neonatal y de cardiomiocitos derivados de células madre humanas.

25 Además, se ha descubierto que los microARN seleccionados inducen la proliferación de cardiomiocitos en modelos animales, en particular después de la inyección intracardíaca de microARN sintéticos en ratas o la inyección intraperitoneal de vectores adenoasociados (AAV) que expresan los microARN en el ratón. Hay que señalar que estos microARN mejoran la función cardíaca en un modelo animal de infarto de miocardio, inducido por ligadura de la arteria coronaria mediante inducción de la regeneración cardíaca.

30 Estos resultados, obtenidos en modelos animales bien evaluados y aceptados, permiten el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades cardíacas en sujetos humanos.

Sumario de la invención

35 Los objetos de la presente invención se especifican en las reivindicaciones adjuntas, sin embargo, otros objetos y alcances de la invención serán evidentes a partir de la especificación anterior.

Los objetos de la presente invención son:

40 i) MicroARN, en particular un grupo de 6 microARN seleccionados, preferentemente de origen humano dotados de la actividad para estimular la proliferación de miocitos cardíacos, y de este modo proporcionar un procedimiento y un medicamento para estimular la regeneración cardíaca *in vivo* estimulando la proliferación de cardiomiocitos y, por tanto, un medicamento y composiciones, vectores y formulaciones para su administración para el tratamiento de patologías cardíacas asociadas con la pérdida de miocitos cardíacos (en particular como consecuencia de un infarto de miocardio, una miocardiopatía de derivación isquémica o no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca).

45 ii) MicroARN, preferentemente de origen humano, en particular los mismos 6 microARN del apartado i), dotados de la capacidad de estimular la proliferación de cardiomiocitos en cultivo celular y dotados así de la capacidad para mejorar la obtención y expansión de cardiomiocitos de células madre embrionarias (obtenidas a partir de cultivos de embriones, transferencia nuclear y clonación de animales, a través de la tecnología de células iPS o cualquier otra tecnología), o de tejidos adultos, con el fin último de estimular la generación de cardiomiocitos para su uso en laboratorio (diagnóstico de enfermedad humana) o aplicación clínica *in vivo* (reparación cardíaca para las aplicaciones antes mencionadas).

50 El procedimiento siguiente es también objeto de la presente invención.

iii) La provisión de procedimientos para los microARN anteriores para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. En particular, los vectores, composiciones y formulaciones están dentro del alcance de la presente invención.

5 También se desvela un procedimiento para la selección de alto rendimiento de compuestos biológicamente activos por su capacidad para aumentar la proliferación de cardiomiocitos a base de microscopía de alto contenido, este procedimiento se utiliza en la presente invención para la selección de los microARN que son objeto de la presente invención.

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para estimular la regeneración cardíaca a través de la proliferación de miocitos cardíacos, en particular a un sujeto que lo necesite, mediante la administración de un microARN de acuerdo con la presente invención o una combinación de los mismos.

10 En particular, el procedimiento se refiere al tratamiento de una patología cardíaca asociada con la pérdida de miocitos cardíacos, por ejemplo como consecuencia de un infarto de miocardio, una miocardiopatía isquémica y no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca.

En una realización preferida, dicho procedimiento se realiza mediante terapia génica.

Descripción de la invención

15 Es un objeto de la presente invención microARN humanos, en particular 6 microARN humanos individuales, o imitadores de tales microARN, o precursores de tales microARN, o transcritos primarios de tales microARN, o una combinación de los mismos capaces de inducir la proliferación de miocitos cardíacos de diferentes orígenes (rata, ratón y humanos), como se enumeran en la Tabla 1.

20 Tabla 1. Lista de microARN que inducen la proliferación en miocitos cardíacos de diferentes orígenes (rata, ratón y humanos)

SEQ ID	Nombre	N.º Acceso miRBase	Secuencia
1	hsa-miR-18a*	MIMAT0002891	ACUGCCCUAAGUGCUCUCCUUCUGG
10	hsa-miR-33b*	MIMAT0004811	CAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCC
14	hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
29	hsa-miR-590-3p	MIMAT0004801	UAAUUUUUAUGUAUAAGCUAGU
33	hsa-miR-1248	MIMAT0005900	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUGAAA
35	hsa-miR-1825	MIMAT0006765	UCCAGUGCCCUCCUCUCC

En la Tabla 2 siguiente se enumeran otros miARN, que no son objeto de la presente invención, capaces de inducir la proliferación de miocitos cardíacos de diferentes orígenes.

Tabla 2. Lista de microARN que inducen la proliferación cardíaca

SEQ ID	Nombre	N.º Acceso miRBase	Secuencia
2	hsa-miR-18b*	MIMAT0004751	UGCCCUAAAUGCCCCUUCUGGC
3	hsa-miR-19a*	MIMAT0004490	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA
4	hsa-miR-19b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA
5	hsa-miR-23a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
6	hsa-miR-23b	MIMAT0000418	AUCACAUUGCCAGGGAUUUACC
7	hsa-miR-26b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
8	hsa-miR-30a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
9	hsa-miR-30e*	MIMAT0000693	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
11	hsa-miR-130a*	MIMAT0004593	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC
12	hsa-miR-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU
13	hsa-miR-181a	MIMAT0000256	AACAUUAACGCUGUCGGUGAGU
15	hsa-miR-219-5p	MIMAT0000276	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU
16	hsa-miR-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA
17	hsa-miR-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG

(continuación)

SEQ ID	Nombre	N.º Acceso miRBase	Secuencia
18	hsa-miR-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG
19	hsa-miR-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUGGGGGUACCUGCUG
20	hsa-miR-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU
21	hsa-miR-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUUCCAUGCUU
22	hsa-miR-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUUUUGCUCCUGACC
23	hsa-miR-372	MIMAT0000724	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
24	hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG
25	hsa-miR-511	MIMAT0002808	GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA
26	hsa-miR-520a-3p	MIMAT0002834	AAAGUGCUUCCCUUUGGACUGU
27	hsa-miR-520b	MIMAT0002843	AAAGUGCUUCCUUUUGAGGGG
28	hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	AAAGUGCUUCCUUUUGAGGGU
30	hsa-miR-875-5p	MIMAT0004922	UAUACCUCAGUUUUAUCAGGUG
31	hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
32	hsa-miR-1244	MIMAT0005896	AAGUAGUUGGUUGUAUGAGAUGGUU
34	hsa-miR-1281	MIMAT0005939	UCGCCUCCUCCUCUCCC
36	hsa-miR-2052	MIMAT0009977	UGUUUUGAUACAGUAAUGU

Es otro objeto de la presente invención uno de los microARN de la Tabla 1, o una combinación de los mismos, para su uso en la promoción de la proliferación de cardiomiocitos *in vivo*, en el tratamiento de patologías cardíacas asociadas con la pérdida de miocitos cardíacos (incluyendo pero no limitándose a las consecuencias de un infarto de miocardio, una miocardiopatía isquémica y no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca) a través de la inducción de la regeneración cardíaca.

Un objeto adicional de la presente invención es uno de los microARN de la Tabla 1, o una combinación de los mismos, para su uso *in vitro* o *ex vivo* en la promoción de la proliferación de cardiomiocitos y en la expansión de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias (ES), células pluripotentes inducidas (iPS) o células madre obtenidas por otros procedimientos, o de cardiomiocitos adultos.

También se desvela un procedimiento para la selección de alto rendimiento de compuestos biológicos y terapéuticamente activos para su capacidad para aumentar la proliferación de cardiomiocitos. Dicho procedimiento se utiliza para la selección de los microARN que son objeto de la presente invención.

Un objeto adicional de la presente invención es una extensión de ARN que comprende una o una combinación de los microARN de la Tabla 1 descritos anteriormente. Dicha extensión de ARN se obtiene *in vitro* mediante procedimientos de transcripción *in vitro* sin células, se produce sintéticamente o se expresa en las células tras la transferencia de la secuencia codificadora de ADN relativa, o se introduce o expresa en las células mediante la administración de un plásmido, un vector viral o de otro tipo, con la condición de que no sea un ARN que se produce naturalmente.

La presente invención proporciona dicha extensión de ARN para su uso como un medicamento para estimular la regeneración del corazón a través de la proliferación de miocitos cardíacos.

La presente invención también proporciona uno de los microARN de la Tabla 1, o su combinación, para su uso como un medicamento.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende uno de los microARN de la Tabla 1, o su combinación, como ingredientes activos para el tratamiento de patologías cardíacas asociadas con la pérdida de miocitos cardíacos (incluyendo, pero sin limitarse a, las consecuencias de un infarto de miocardio, una miocardiopatía, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca).

Estos y otros objetos de la invención se desvelarán en detalle en la especificación anterior también por medio de ejemplos y figuras.

En las figuras:

5 La Figura 1 muestra los resultados de la selección para la inducción de la proliferación de cardiomiocitos por microARN. Cada punto indica el efecto sobre la proliferación de cardiomiocitos por los microARN individuales en dos experimentos idénticos. Los microARN de control están en el cuadro caja inferior (líneas punteadas); los 36 microARN que son objeto de esta invención, están dentro del cuadro superior (número de cardiomiocitos proliferantes EdU+, Ki-67+> 35 % hasta 55 %).

La Figura 2 muestra ejemplos de microARN que aumentan la proliferación neonatal de cardiomiocitos de rata *in vitro*, evaluada por la positividad de EdU y Ki-67. cel-miR-67 es un microARN ineficaz utilizado como control.

10 La Figura 3 muestra ejemplos de microARN que aumentan la proliferación de cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (hESCs) *in vitro*, evaluada por la positividad para EdU. cel-miR-67 es un microARN ineficaz utilizado como control.

La Figura 4 muestra ejemplos de microARN que aumentan la proliferación neonatal de cardiomiocitos de rata y la citocinesis *in vitro*, evaluada por la fosforilación de la histona H3 (izquierda) y la positividad para la localización de Aurora B en los cuerpos medios (derecha). cel-miR-67 es un microARN ineficaz utilizado como control.

15 La Figura 5 muestra ejemplos de microARN (hsa-miR-590-3p y hsa-miR-199a-3p) que aumentan la proliferación de cardiomiocitos de rata completamente diferenciados *ex vivo*, aislados de animales adultos (2 meses de edad), evaluada por la positividad para EdU (panel izquierdo). El tratamiento con estos microARN aumentó significativamente el número de cardiomiocitos a los 4 y 7 días después del tratamiento (panel derecho). cel-miR-67 es un microARN ineficaz utilizado como control.

20 La Figura 6 muestra ejemplos de microARN que aumentan la proliferación neonatal de cardiomiocitos de rata *in vivo*, evaluada por la positividad para EdU en los corazones tratados; cel-miR-67 es un microARN ineficaz utilizado como control.

25 La Figura 7 muestra los efectos de los microARN hsa-miR-590-3p y microARN hsa-miR-199a-3p tras la administración, utilizando un vector AAV, al corazón de ratones infartados. A. Área de infarto de miocardio (MI). B. De izquierda a derecha, los histogramas muestran: fracción de eyección ventricular izquierda (EF), acortamiento ventricular izquierdo (FS) y espesamiento sistólico de la pared anterior del ventrículo izquierdo (LVAWs) a los días 12 y 30 después del tratamiento. Los controles son animales infartados tratados con un microARN irrelevante.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona microARN, preferentemente de origen humano, que tienen la propiedad de inducir la proliferación de cardiomiocitos *in vitro* e *in vivo* y que han sido seleccionados de una biblioteca a través de procedimientos de selección de alto rendimiento, en particular basados en análisis de imágenes de alto contenido. El procedimiento preferido es la selección de alto rendimiento a base de microscopía de fluorescencia en cardiomiocitos neonatales de rata utilizando secuencias maduras de microARN sintéticos, que corresponden a todos los microARN humanos registrado (según miRBase publicación 13.0, 2009).

El procedimiento para seleccionar microARN, preferiblemente de origen humano, comprende:

- a. obtener una biblioteca de microARN
- b. transfectar cada microARN en un primer cardiomiocito aislado de un primer sujeto animal;
- c. cultivar dicho primer cardiomiocito transfectado;
- 40 d. probar la capacidad de proliferación de dicho primer cardiomiocito transfectado;
- e. seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho primer cardiomiocito transfectado;
- f. transfectar cada microARN seleccionado de la etapa e) en un segundo cardiomiocito aislado de un segundo animal sujeto de una especie diferente de dicho primer animal;
- g. cultivar dicho segundo cardiomiocito transfectado,
- 45 h. probar la capacidad de proliferación de dicho segundo cardiomiocito transfectado;
- i. seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho segundo cardiomiocito transfectado de la etapa h).

En una realización de dicho procedimiento, después de la etapa i), se proporcionan además las siguientes etapas:

- j. transfectar cada microARN seleccionado de la etapa i) en un tercer cardiomiocito previamente aislado de un

sujeto humano;

k. cultivar dicho tercer cardiomiocito transfectado,

l. probar la capacidad de proliferación de dicho tercer cardiomiocito transfectado;

5 m. seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho tercer cardiomiocito transfectado de la etapa l).

Preferiblemente, en dicha etapa de selección e), i) o m) se selecciona al menos un microARN capaz de aumentar significativamente la proliferación de cardiomiocitos al menos en 2 veces.

Las bibliotecas útiles para la presente invención están disponibles a través de proveedores comerciales, por ejemplo Thermo Scientific, Sigma, Ambion.

10 Como se describe con más detalle en el Ejemplo 1, se trataron células cardiomiocitos de rata primarios con cada uno de los microARN en la biblioteca, se tiñeron con un colorante nuclear convencional, por ejemplo Hoechst 33342, anticuerpos contra la alfa-actinina sarcomérica marcadora de cardiomiocitos y el antígeno de proliferación Ki-67 y con EdU, un análogo de uridina que se incorpora en ADN recién sintetizado.

15 Con este procedimiento, se identifican 208 microARN, lo que puede aumentar significativamente la proliferación de cardiomiocitos.

Se utilizan animales de laboratorio, por ejemplo ratas, para aislar miocitos cardíacos. Preferiblemente, los miocitos se aíslan a partir de animales neonatales según procedimientos bien conocidos. Se utilizan preferentemente los miocitos de los ventrículos.

20 Los microARN individuales de la biblioteca se transfieren a placas de micropocillos, cada una en un pocillo individual. Posteriormente, cada uno de estos microARN se transfecta a cardiomiocitos animales. El orden preferido de magnitud de las células sembradas es 1×10^4 células por pocillo. Se puede usar un protocolo estándar de transfección inversa, a una concentración final adecuada de microARN, por ejemplo de 25 nM. La selección se repite varias veces para una experimentación precisa, por ejemplo por duplicado.

25 Después de la transfección y siembra de células, por ejemplo veinticuatro horas, el medio de cultivo puede ser reemplazado por medio fresco. A continuación, como 28 h después, es decir, 52 h después de la siembra, el medio de cultivo se reemplaza con un medio apropiado para ensayar la vitalidad celular, se utilizan al menos dos marcadores de proliferación, por ejemplo EdU y Ki-67, durante un tiempo adecuado (20 h). Las células son fijadas, generalmente aproximadamente 72 h después de la siembra, y procesadas para la inmunofluorescencia como se conoce en la técnica. Las células se tiñen después, preferiblemente durante la noche a la temperatura habitual (por ejemplo 4 °C) con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Ejemplos de anticuerpos primarios son anticuerpos monoclonales de ratón contra la alfa-actinina sarcomérica, anticuerpo de conejo contra Ki-67. Se pueden usar otros anticuerpos. Las células se lavan a continuación con un medio, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato y se incuban durante un tiempo suficiente (tal como 2 h) con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con un marcador detectable. Las células se procesan adicionalmente para revelar la
35 incorporación de EdU y se tiñen como se conoce en la técnica.

La adquisición de imágenes se realiza a continuación con un equipo comercial, como microscopio de fluorescencia de selección de alto contenido y se realiza el análisis de la imagen. Las células se califican como proliferantes solo si son positivas para ambos de los al menos dos marcadores de proliferación; los cardiomiocitos se distinguen de otras células presentes en los cultivos primarios (por ejemplo, fibroblastos y células endoteliales) por su positividad para la
40 alfa-actinina sarcomérica.

La selección de microARN que inducen la proliferación de cardiomiocitos también se repite en células cardiomiocitos adultas. Estas se obtienen preferiblemente, pero no exclusivamente, del ventrículo izquierdo del corazón usando un procedimiento estándar para el aislamiento de cardiomiocitos adultos diferenciados. Estos se tratan a continuación con dichos microARN; después del tratamiento, la proliferación de cardiomiocitos adultos se verifica evaluando la positividad para diferentes marcadores de proliferación, tales como EdU y Ki-67, tal como se describe para los
45 cardiomiocitos neonatales.

La selección de microARN se repite en un animal de laboratorio diferente del animal utilizado en la primera selección con el fin de examinar los microARN que actúan dirigiéndose a un conjunto conservado de dianas.

50 La selección de microARN para aumentar la proliferación de cardiomiocitos en seres humanos se realiza a continuación transfectando los microARN resultantes de la segunda selección en cardiomiocitos humanos derivados de células madre embrionarias, que están comercializadas (por ejemplo por cardiomiocitos Cytiva de GE Healthcare). Estas células comprenden subtipos ventriculares, auriculares y nodales, la mayoría son miocitos ventriculares, y se caracterizan por su morfología, electrofisiología y expresión de marcadores cardíacos, constituyendo así una alternativa biológicamente relevante a las células primarias, las cuales son difíciles de obtener

de humanos donantes para pruebas predictivas.

5 Colectivamente, los resultados descritos en el presente documento identifican un subconjunto de microARN capaces de aumentar la proliferación de miocitos cardíacos de diferentes especies, incluyendo células humanas, que se derivan de células embrionarias, de individuos neonatales o de individuos adultos. Hay que señalar que estos microARN son la base para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos contra enfermedades cardíacas en seres humanos, con el propósito específico de inducir la regeneración de tejido cardíaco adulto promoviendo la proliferación de cardiomiocitos.

Las modificaciones de los procedimientos descritos anteriormente que no modifican esencialmente los resultados obtenidos están dentro de los límites de la presente invención.

10 En el presente documento se presentan otras realizaciones.

También se desvela un método de selección de microARN, preferiblemente de origen humano, comprendiendo dicha selección: a) transfectar cada microARN en un cardiomiocito aislado de un primer sujeto animal, b) cultivar dicho cardiomiocito transfectado c) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado; d) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado.

15 También se desvela un método de selección de microARN, preferiblemente de origen humano, comprendiendo dicha selección: a) transfectar cada microARN en un cardiomiocito aislado de un primer sujeto animal, b) cultivar dicho cardiomiocito transfectado c) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado; d) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado; e) transfectar cada microARN seleccionado de la etapa d) en un cardiomiocito aislado de un segundo sujeto animal diferente de dicho primer animal, f) cultivar dicho cardiomiocito transfectado, g) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado; h) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado de la etapa g).

25 También se desvela un método de selección de microARN, preferiblemente de origen humano, comprendiendo dicha selección: a) transfectar cada microARN en un cardiomiocito aislado de un primer sujeto animal, b) cultivar dicho cardiomiocito transfectado c) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado; d) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado; e) transfectar cada microARN seleccionado de la etapa d) en un cardiomiocito aislado de un segundo sujeto animal diferente de dicho primer animal, f) cultivar dicho cardiomiocito transfectado, g) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado; h) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado de la etapa g), i) transfectar cada microARN seleccionado de la etapa h) en un cardiomiocito aislado derivado de una célula madre humana, j) cultivar dicho cardiomiocito transfectado, k) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado, l) seleccionar microARN capaces de inducir proliferación en dicho cardiomiocito transfectado de la etapa k).

35 Las etapas de prueba y selección en los procedimientos anteriores se realizan preferiblemente con procedimientos de selección de alto rendimiento, en particular basados en análisis de imágenes de alto contenido. El procedimiento preferido es la selección de alto rendimiento basado en la microscopía de fluorescencia.

Los microARN obtenidos a partir del procedimiento anterior son capaces de inducir proliferación en cardiomiocitos, *in vitro* e *in vivo*, en particular son capaces de inducir proliferación de cardiomiocitos de un sujeto animal, más en particular en diferentes sujetos animales, incluso más en particular en seres humanos.

40 La presente invención también comprende transcritos primarios, precursores e imitadores de los microARN desvelados en el presente documento. Los conceptos de transcrito primario de miARN, precursor e imitador son bien conocidos en la técnica.

45 También se proporcionan en la presente invención modificaciones de la cadena principal de microARN o ácidos nucleicos sintéticos que imitan de alguna manera la función del microARN natural. Estas modificaciones pueden realizarse de acuerdo con técnicas bien conocidas, con la condición de que dichas modificaciones no alteren la función de los microARN de la presente invención. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, sustitución de átomos de oxígeno no unidos en el grupo fosfato, introducción de un grupo alquilo en la molécula de azúcar de nucleótidos, inclusión de enlaces adicionales que conectan átomos de carbono u oxígeno en los azúcares de nucleótidos por ejemplo, la tecnología LNA) y similares. Estas modificaciones son bien conocidas en la técnica y no necesitan revelación adicional específica.

Los microARN de la presente invención son capaces de aumentar la mitosis de miocitos cardíacos, la división celular (citocinesis) y el número de células *in vitro* e *in vivo*, como se demuestra en los Ejemplos siguientes.

55 En las realizaciones de la presente invención que relacionan los microARN como medicamentos, en particular para el tratamiento de enfermedades cardíacas asociadas con una pérdida de cardiomiocitos (como consecuencia de un infarto de miocardio, una miocardiopatía de origen isquémico y no isquémico, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca), pueden ser administrados a un sujeto que padece dicha enfermedad por procedimientos convencionales

con el objetivo específico de inducir la regeneración cardíaca estimulando la proliferación de cardiomiocitos.

Convenientemente, dicho medicamento está en forma de una preparación para administración parenteral, intracoronaria, intravenosa o intracardíaca, pero otras formas son igualmente adecuadas para llevar a cabo la presente invención. El experto en la materia decidirá el tiempo efectivo de administración, dependiendo de las condiciones del paciente, el grado de gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente y cualquier otro parámetro clínico dentro del conocimiento general de esta materia.

Las composiciones farmacéuticas contendrán al menos uno de los siguientes: ARN sintético correspondiente al microARN de la presente invención o su transcrito o precursor primario, ADN que codifica dicho microARN, ADN que codifica un transcrito primario o precursor de dicho ARN tal como el microARN que se produce dentro de las células que contienen este ADN. La administración de uno de los microARN (o transcrito primario o precursor) de la presente invención o de los correspondientes ADN codificantes puede administrarse junto con moléculas lipídicas tales como lípidos catiónicos, o péptidos, o en el contexto de andamios poliméricos, que pueden facilitar su administración, según la técnica. Otro procedimiento para administrar tales microARN o sus correspondientes ADN es por medio de un vector adecuado conocido para la administración de ARN o ADN. Un vector más preferido es el vector adenoasociado (AAV) de cualquier serotipo de la cápside, ya sea natural (tal como, pero sin limitarse a, AAV1, AAV2, AAV8, AAV9) o artificial, un vector viral bien conocido para la administración de ADN *in vivo* (Mingozzi y col., 2011). Todos estos procedimientos y formulación para administrar el ARN sintético anterior correspondiente al microARN de la presente invención, el ADN que codifica para dicho microARN, el ADN que codifica un transcrito primario o precursor para dicho ARN tal como el microARN que se produce dentro de las células que contienen este ADN, son convencionales y bien conocidos en la técnica y no necesitan explicación adicional.

La inyección es una vía de administración preferida. Sin embargo, el experto en la materia puede decidir administrar microARN por medio de cualquier composición farmacéutica convencional. Se puede hacer referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición.

El régimen de administración, la dosificación y la posología serán determinados por el médico según su experiencia, la enfermedad a tratar y las condiciones del paciente.

De acuerdo con la vía de administración elegida, las composiciones estarán en forma sólida o líquida, adecuadas para administración oral, parenteral, intravenosa o intraarterial. La terapia génica es también otra realización. Las composiciones de acuerdo con la presente invención contienen, junto con el principio activo, al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos pueden ser coadyuvantes de formulación particularmente útiles, por ej., agentes solubilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión y agentes emulsionantes.

Los agentes activos para su uso en la presente invención se pueden administrar como un medicamento, es decir, una composición farmacéutica. La composición contiene al menos un agente activo de la presente invención con un vehículo adecuado. Se pueden utilizar una variedad de vías y técnicas de administración, entre ellas técnicas parenterales tales como inyecciones intravenosas, intracardíacas e intraarteriales, cateterizaciones y similares. Las cantidades medias del agente activo pueden variar y en particular deben basarse en las recomendaciones y la prescripción de un médico cualificado.

Un procedimiento para la selección de compuestos biológicos y terapéuticamente activos por su capacidad para aumentar la proliferación de cardiomiocitos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: a) proporcionar un cardiomiocito transfectado con cualquiera de los microARN anteriores, b) obtener un candidato para un compuesto terapéuticamente activo en contacto con dicho cardiomiocito, c) probar la capacidad de proliferación de dicho cardiomiocito transfectado, d) seleccionar compuestos capaces de inducir la proliferación de dicho cardiomiocito transfectado.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

La selección funcional identifica microARN que controlan la proliferación de cardiomiocitos neonatales de rata *in vitro*

Dada la participación de los microARN en la regulación de varios procesos biológicos, incluida la proliferación celular, queríamos investigar si los microARN podrían controlar la proliferación de los miocitos cardíacos primarios *ex vivo* e identificar los microARN más eficaces en el aumento de la capacidad proliferativa de estas células.

Para abordar este problema, se realizó una selección de alto rendimiento basada en microscopía de fluorescencia en cardiomiocitos neonatales de rata utilizando una biblioteca comercial de 988 imitadores de microARN (miRIDIAN microRNA mimics, Dharmacon, Thermo Scientific) correspondiente a todos los microARN humanos registrados (de acuerdo con miRBase publicación 13.0, 2009). Las células se tiñeron con el colorante nuclear Hoechst 33432, anticuerpos contra el marcador de cardiomiocitos alfa-actinina sarcomérica y el antígeno de proliferación Ki-67 y con EdU, un análogo de la uridina que se incorpora en el ADN recién sintetizado. Se utilizaron dos marcadores de proliferación (Ki-67 y EdU incorporación) para aumentar la fiabilidad en la identificación de células en proliferación; el

análisis automatizado de la imagen se realizó en aproximadamente 3.000 células por condición experimental.

Utilizando este enfoque, identificamos 208 microARN capaces de aumentar significativamente la proliferación de cardiomiocitos neonatales de ratas en más de dos veces (de 12,5 % de proliferación basal hasta más del 40 %).

5 La Figura 1 muestra los resultados de la selección para la inducción de la proliferación de cardiomiocitos por microARN. Cada punto indica el efecto sobre la proliferación de cardiomiocitos por los microARN individuales en dos experimentos idénticos. Los microARN de control están en el cuadro inferior (líneas punteadas); los 36 microARN que son objeto de esta invención, están en la caja superior (número de cardiomiocitos proliferantes EdU+, Ki-67+> 35 % hasta 55 %).

10 La Figura 2 muestra ejemplos de microARN que aumentan la proliferación de cardiomiocitos *in vitro*, evaluada por la positividad para EdU y Ki-67.

PROCEDIMIENTOS

El cuidado y los tratamientos de los animales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices institucionales, de conformidad con las leyes y políticas nacionales e internacionales (Directiva 86/609/CEE del Consejo, DO L 358, de 12 de diciembre de 1987).

15 Las ratas Wistar se adquirieron a Charles River Laboratories Italia Srl. Los miocitos cardíacos de ratas neonatales se aislaron como se describió anteriormente (Collesi y col., 2008), con modificaciones menores. En resumen, se separaron los ventrículos de las ratas neonatales (día 0) de las aurículas, se cortaron en trozos y luego se disociaron en calcio y Hanks sin bicarbonato con tampón HEPES (CBFHH) que contenía 1,75 mg/ml de tripsina (BD Difco) y 10 microgramos/ml de ADNasa II (Sigma) bajo agitación constante. La digestión se realizó a temperatura ambiente en etapas de ocho a diez minutos, recogiendo el sobrenadante en suero bovino fetal (FBS, Invitrogen) después de cada etapa. El sobrenadante se centrifugó para aislar células que se resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa (Invitrogen) suplementado con FBS al 5 % y vitamina B12 (Sigma) 20 µg/ml. Las células recogidas se pasaron a través de un filtro de células (40 µm, BD Falcon) y luego se sembraron en placas de plástico de 100 mm sin revestir durante 2 horas a 37 °C en CO₂ al 5 % y atmósfera humidificada. A 20
25 continuación se recogió el sobrenadante, compuesto principalmente de cardiomiocitos, se contaron las células y se sembraron; los cultivos de cardiomiocitos ventriculares neonatales de rata se prepararon usando este procedimiento que tiene una pureza >90 %.

La biblioteca de microARN correspondiente a todos los microARN maduros humanos (miRIDIAN microRNA mimics), se obtuvo de Dharmacon, Thermo Scientific. Los microARN individuales se transfirieron robóticamente a placas Primaria de 96 pocillos (BD-Falcon) dejando las columnas 1 y 12 vacías para la adición de microARN de control (cel-miR-67, hsa-miR-1). Los microARN fueron transfectados a cardiomiocitos neonatales de rata (se sembraron 1,0x10⁴ células por pocillo), a una concentración final de 25 nM, mediante un protocolo estándar de transfección inversa utilizando reactivo de transfección Lipofectamine RNAimax (Invitrogen); la selección se realizó por duplicado. 30

Veinticuatro horas después de la transfección y siembra de células, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo; 28 h después, es decir, 52 h después de la siembra, el medio de cultivo se reemplazó con medio que contenía 5 µM de EdU durante 20 h. Las células se fijaron a 72 h después de la siembra y se procesaron para inmunofluorescencia. En resumen, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 10 minutos, seguido de bloqueo durante 30 minutos en albúmina de suero bovino (BSA) al 1 %. Las células se tiñeron después durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo: anticuerpo monoclonal de ratón contra alfa-actinina sarcomérica (Abcam) y anticuerpo de conejo contra Ki-67 (Monosan). Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 2 h con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 o 647 (Invitrogen). Las células se procesaron adicionalmente usando el kit Click-IT EdU555 Imaging (Invitrogen) para revelar la incorporación de EdU, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se tiñeron con Hoechst 33432 (Invitrogen). 35
40
45

La adquisición de imágenes se realizó utilizando un microscopio automatizado de fluorescencia de selección de alto contenido ImageXpress Micro (Molecular Devices) con un aumento de 10x; se adquirió un total de 16 imágenes por longitud de onda, pocillo y replicado, lo que corresponde a aproximadamente 3.000 células analizadas por condición. El análisis de imágenes se realizó utilizando el módulo de aplicación "Multi-Wavelength Cell Scoring" implementado en el software MetaXpress (Molecular Devices). Las células se clasificaron como en proliferación solo si eran positivas para ambos marcadores de proliferación (Ki-67 y EdU); los cardiomiocitos se distinguieron de otras células presentes en los cultivos primarios (por ejemplo, fibroblastos y células endoteliales) por su positividad para la alfa-actinina sarcomérica. 50

Ejemplo 2**Un subconjunto de microARN controlan la proliferación *in vitro* de cardiomiocitos de diferentes organismos (rata, ratón y ser humano)**

5 Durante el desarrollo, los cardiomiocitos en el corazón del ratón dejan de dividirse antes que sus homólogos en el corazón de la rata (poco después del nacimiento y 3 a 4 días después del nacimiento, respectivamente). Como consecuencia de esto, los cardiomiocitos aislados de ratones recién nacidos tienen una capacidad proliferativa significativamente inferior a los aislados de ratas de la misma edad; mientras que la proliferación de los cardiomiocitos aislados de ratas neonatales (día 0 postnatal) es de aproximadamente 12,5 %, la de los cardiomiocitos de ratones es aproximadamente 5 %.

10 Por lo tanto, se repitieron los experimentos basados en fluorescencia de alto rendimiento descritos en el Ejemplo 1 en cardiomiocitos neonatales de ratón, utilizando los 208 microARN seleccionados que se demostró que aumentan la proliferación de cardiomiocitos de rata. Los resultados de estos experimentos mostraron que de los 208 microARN probados, 36 microARN también aumentaban la proliferación de cardiomiocitos de ratón, lo que sugiere que estos pueden actuar dirigiéndose a un conjunto conservado de dianas.

15 Para evaluar el potencial de la aplicación de microARN para aumentar la proliferación de cardiomiocitos en humanos, se transfectaron los 36 microARN seleccionados de los experimentos realizados en cardiomiocitos primarios de rata y ratón en cardiomiocitos humanos derivados de células madre embrionarias (ESC), comercializados (cardiomiocitos Cytiva, GE Healthcare). Estas células comprenden subtipos ventriculares, auriculares y nodales, en su mayoría miocitos ventriculares y se han caracterizado extensamente en términos de morfología, electrofisiología y expresión de marcadores cardíacos, constituyendo así una alternativa biológicamente relevante a las células primarias, las cuales son difíciles de obtener de donantes humanos para pruebas predictivas. Los resultados de estos experimentos demostraron que el tratamiento de cardiomiocitos humanos derivados de células troncales embrionarias con los microARN seleccionados condujo a un aumento muy significativo de la proliferación de cardiomiocitos (de aproximadamente 3 % hasta aproximadamente 30 %); ejemplos de microARN que incrementan la proliferación de cardiomiocitos humanos derivados de ESC se muestran en la Figura 3.

20 Colectivamente, los resultados descritos en el presente documento identifican un subconjunto de 6 microARN capaces de aumentar la proliferación de miocitos cardíacos de diferentes especies, incluyendo células humanas. Estos microARN son la base para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos contra enfermedades cardíacas en seres humanos, específicamente dirigidos a inducir la regeneración del tejido cardíaco mediante la estimulación de la proliferación *in vivo* de cardiomiocitos.

PROCEDIMIENTOS

Los ratones CD1 se adquirieron en Charles River Laboratories Italia Srl. Se aislaron cardiomiocitos de ratón de ratones recién nacidos (día 0 postnatal), como se describe en el Ejemplo 1 para cardiomiocitos de rata.

35 Se obtuvieron cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias humanas (hESCs) (cardiomiocitos Cytiva) de GE Healthcare. Estas células se han caracterizado extensamente y constituyen por lo tanto una alternativa relevante a las células primarias. Las células se descongelaron según las instrucciones del proveedor.

40 Los microARN individuales seleccionados se transfirieron de forma robótica a partir de placas madre de bibliotecas de microARN y se dispusieron nuevamente en placas de 96 pocillos de fondo transparente recubiertas de colágeno (Perkin-Elmer). La transfección de los microARN seleccionados en células de ratón y humanas se realizó como se describe en los Procedimientos del Ejemplo 1, excepto que el número de células sembradas por pocillo fue de $1,5 \times 10^4$ y 1×10^4 para ratón y células humanas, respectivamente, y la concentración final de microARN fue 50 nM y 25 nM para células de ratón y humanas, respectivamente.

Otros reactivos y procedimientos, incluyendo la adquisición y análisis automatizado de imágenes, son los mismos que se describen en los Procedimientos del Ejemplo 1.

Ejemplo 3**Los microARN aumentan la mitosis de los miocitos cardíacos, la división celular (citocinesis) y el número de células *in vitro***

50 Para demostrar que el aumento de la proliferación de cardiomiocitos, evaluada mediante tinción con marcador de la proliferación Ki-67 y la incorporación de EdU durante la síntesis de ADN, se correlaciona con un aumento de los eventos de división celular de los cardiomiocitos (citocinesis), se trataron cardiomiocitos con microARN individuales y se evaluaron marcadores adicionales, concretamente i) tinción de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (P-S10-H3), que detecta células en G2 tardía/mitosis; ii) tinción para la AuroraB quinasa, un componente de los cuerpos medios, una estructura transitoria que aparece cerca del final de la citocinesis justo antes de, y que se mantiene durante un breve período después de, la separación completa de las células en división; y iii) número de cardiomiocitos a los 6 días después de la transfección de microARN.

El tratamiento de los cardiomiocitos con los microARN seleccionados condujo a un aumento significativo tanto en el número de células positivas para P-S10-H3 (del 1,7 % con el microARN de control hasta el 8 %) como en el número de células que presentaban cuerpos medios (del 0,5 % al 4 %), como se muestra en la Figura 4. Como era de esperar, los porcentajes de células positivas para P-S10-H3 y los cuerpos medios fueron significativamente menores que los de Ki-67 y EdU, ya que los primeros son marcadores de acontecimientos de duración relativamente más corta.

En concordancia con una progresión eficaz a través del ciclo celular y el éxito de la citocinesis, el análisis de los cardiomiocitos tratados con los microARN seleccionados durante 6 días reveló que los microARN seleccionados también aumentó significativamente el número de cardiomiocitos en comparación con los controles.

10 PROCEDIMIENTOS

Los microARN individuales seleccionados se transfirieron robóticamente a placas Primaria de 96 pocillos (BD Falcon). La transfección de los microARN seleccionados en cardiomiocitos neonatales de ratas y la inmunofluorescencia se realizaron como se describe en los Procedimientos del Ejemplo 1. Las células se tiñeron con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón contra la alfa-actinina sarcomérica (Abcam), anticuerpo de conejo contra la histona H3 fosforilada en Serina 10 (Millipore) y anticuerpo de conejo contra la AuroraB quinasa (Sigma).

Otros reactivos y procedimientos, incluyendo la adquisición y análisis automatizado de imágenes, son los mismos que se describen en los Procedimientos del Ejemplo 1. La cuantificación de los cuerpos medios teñidos con anticuerpo anti-AuroraB se realizó mediante inspección manual y recuento de las 16 imágenes adquiridas por pocillo.

Ejemplo 4

Los microARN aumentan la proliferación de cardiomiocitos adultos completamente diferenciados

Un pequeño porcentaje de cardiomiocitos aislados a partir de animales recién nacidos están todavía implicados en el ciclo celular y son capaces de proliferar (aproximadamente 3-15 % de cardiomiocitos, dependiendo de la especie) y por lo tanto se podría prever que los microARN aumenten la capacidad proliferativa de estas células.

Para probar si los microARN seleccionados, además de los cardiomiocitos neonatales, también podrían inducir la reentrada en el ciclo celular de células completamente diferenciadas, se aislaron cardiomiocitos de ratas adultas (2 meses de edad) y se transfectaron con microARN seleccionados. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestran los efectos de dos de los microARN seleccionados: hsa-miR-199a-3p y hsa-miR-590-3p (los microARN que mejor se comportaron induciendo la proliferación de cardiomiocitos de ratón y de rata in vitro, respectivamente).

Sorprendentemente, el tratamiento con microARN determinó una reentrada dependiente del tiempo de las células en el ciclo celular (desde prácticamente ninguno hasta aproximadamente 6 % de cardiomiocitos EdU+ para hsa-miR-590-3p y aproximadamente 8 % de cardiomiocitos EdU+ para hsa-miR-199a-3p a los 7 días en cultivo), conduciendo eventualmente a un aumento significativo del número de células en la placa.

Estos experimentos demuestran claramente que los microARN son capaces de inducir la proliferación no solo de las células cardíacas neonatales, sino también de los cardiomiocitos no divididos y completamente diferenciados recuperados de individuos adultos.

PROCEDIMIENTOS

Se aislaron cardiomiocitos ventriculares a partir de corazones perfundidos de Langendorff de ratas hembra Wistar adultas (2 meses de edad) como se describió anteriormente (Xiao y col., 2001), con modificaciones menores. En resumen, se extrajeron los corazones y se perfundieron retrogradualmente con tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit (KHB) sin calcio. A continuación, los corazones se perfundieron con tampón KHB conteniendo 1 mg/ml de Liberase (Roche) durante 10 min. Después de la eliminación de las aurículas y los grandes vasos, los corazones se trocearon en tampón KHB y la mezcla celular se filtró a través de un filtro de células (100 µm, BD Falcon). Las células se sedimentaron después por centrifugación a 530 g durante 3 min a temperatura ambiente. El sedimento de células se resuspendió en una mezcla de DMEM 1,0 g/l de glucosa (Life Technologies) y tampón de perfusión (1:1) y la separación de cardiomiocitos de otros tipos de células se consiguió mediante sedimentación en una albúmina de suero bovino al 6 % (BSA, Sigma) durante 15 min. El sedimento de cardiomiocitos se resuspendió y se sembró en placa en DMEM glucosa 1,0 g/l suplementada con 2 g/l de BSA, L-carnitina 2 mM (Sigma), creatina 5 mM (Sigma), taurina 5 mM (Sigma), 2,3 -butanodiona monóxima 1 mM (BDM, Sigma) y con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertos con laminina (Sigma) y se mantuvieron a 37 °C en 5 % de CO₂ y atmósfera humidificada. El medio se cambió 24 h después con DMEM con 4,5 g/l de glucosa suplementado con 5 % de FBS, 20 µg/ml de vitamina B12 y las células se transfectaron como se describe a continuación.

La transfección de los cardiomiocitos de rata aislados de animales adultos se realizó esencialmente como se describe en los Procedimientos del Ejemplo 1 para cardiomiocitos neonatales, excepto que las transfecciones se realizaron 24 h después de la siembra de células usando un protocolo de transfección directo a una concentración final de microARN de 50 nM. El medio se reemplazó por medio que contenía 5 μ M de EdU 48 h después de la transfección y cada 24 h después hasta que las células se fijaron, 6 días después de la transfección.

Otros reactivos y procedimientos, incluyendo la adquisición y análisis automatizado de imágenes, son los mismos que se describen en los Procedimientos del Ejemplo 1.

Ejemplo 5

Los microARN aumentan la proliferación de cardiomiocitos *in vivo*

Dado el aumento observado en la proliferación de cardiomiocitos tras el tratamiento con microARN seleccionados *in vitro*, se quiso determinar si estos microARN también aumentarían la proliferación *in vivo*. A modo de ejemplo, aquí se muestran los efectos de dos de los microARN seleccionados: hsa-miR-199a-3p y hsa-miR-590-3p (los microARN que mejor se comportaron en inducir la proliferación de cardiomiocitos de ratón y rata *in vitro*, respectivamente).

Los microARN sintéticos que forman complejos con el reactivo de transfección, se inyectaron directamente en el corazón de ratas neonatales, y su efecto se evaluó 4 días más tarde, comparando el número de células que incorporaron EdU en animales inyectados con cada uno de los dos microARN seleccionados con el de los animales inyectados con un microARN de control (cel-miR-67). Se observó un aumento significativo en el número de células proliferantes en el corazón de animales inyectados con los microARN seleccionados (del 3 % en animales inyectados con cel-miR-67 a aproximadamente el 10 % en animales inyectados con hsa-miR-199a-3p y hsa-miR-590-3p). Hay que señalar que se confirmó por microscopía de fluorescencia confocal que una fracción significativa de las células proliferantes eran de hecho cardiomiocitos. En la Figura 6 se muestran resultados significativos, donde se ofrecen ejemplos de microARN que aumentan la proliferación de cardiomiocitos *in vivo*, evaluada por positividad para EdU.

Como alternativa al uso de microARN sintéticos, se realizaron experimentos adicionales por inyección intraperitoneal (IP) de vectores de virus adenoasociados (AAV) que codifican para hsa-miR-199a y hsa-miR-590 en ratones neonatales. Diversos serotipos de vectores de AAV (por ejemplo, AAV9, AAV8, AAV1 y AAV2, según la vía de administración) transducen eficazmente el corazón (Inagaki y col., 2006; Collesi y col., 2008); la expresión de los microARN a partir de estos vectores es impulsada por el promotor constitutivo de CMV. La proliferación de células en el corazón se evaluó 12 días después de la inyección, mediante tinción con anticuerpos contra la alfa-actinina y P-S10-H3 para detectar las células que sufren G2 tardía/mitosis. Se observó un aumento significativo en el número de cardiomiocitos en proliferación en el corazón de los animales inyectados con los microARN seleccionados, en comparación con los animales inyectados con AAV control.

Usando estos enfoques se determinó que los microARN seleccionados en base a los estudios *in vitro* descritos en los Ejemplos 1, 2 y 3 son capaces de aumentar significativamente la proliferación de cardiomiocitos *in vivo*, tanto en ratas neonatales como en ratones. Además, hemos demostrado que estos microARN son activos, independientemente de si se introducen como secuencias maduras sintéticas, o expresadas a partir de un vector viral.

PROCEDIMIENTOS

Se anestesiaron ratas Wistar neonatales (día post-natal1) enfriando en un lecho de hielo durante 5 min. La toracotomía lateral en el cuarto espacio intercostal se realizó por disección de los músculos intercostales después de la incisión de la piel. Después de la inyección intracardiaca de los complejos de microARN usando una jeringa de insulina con aguja de calibre 30 incorporada (Roche), los recién nacidos se retiraron del lecho de hielo, la pared torácica y las incisiones cutáneas se suturaron. Los neonatos se colocaron entonces bajo una lámpara de calor y se calentaron durante varios minutos hasta que se recuperaron. Los complejos de microARN se prepararon mezclando el microARN (aprox. 2,8 μ g de cel-miR-67, hsa-miR-590-3p o hsa-miR-199a-3p, Dharmatech Thermo Scientific) con reactivo de transfección Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El volumen total de la mezcla inyectada por corazón de rata fue de 30 μ l.

Para la producción de los vectores de AAV, se amplificaron las secuencias flanqueantes en dirección 5' y en dirección 3' (total aproximadamente 300 pb) pre-hsa-miR-199a y pre-hsa-miR-590 a partir de ADN genómico humano aislado de células HeLa usando el QIAamp DNA mini kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. Las secuencias amplificadas se clonaron en el vector pZac.

Los vectores AAV recombinantes se obtuvieron como se describió anteriormente (Zentilin y col., 2001). En resumen, los vectores AAV se generaron en células HEK293T, utilizando una co-transfección de plásmido triple para el empaquetado (Gao y col., 2004). Las reservas virales se obtuvieron mediante gradiente de centrifugación en CsCl₂. La titulación de partículas virales AAV se realizó por cuantificación de PCR en tiempo real del número de genomas virales, como se describió anteriormente (Zentilin y col., 2001); las preparaciones virales utilizadas en este trabajo tuvieron títulos entre 1×10^{12} y 1×10^{13} de genoma viral (vg) por ml.

En los experimentos utilizando vectores AAV, se inyectaron ratones CD1 neonatales (día post-natal 1) por vía intraperitoneal, utilizando una jeringuilla de insulina con aguja de calibre 30 incorporada (Roche), con AAV-LacZ, AAV-hsa-miR-199a o AAV-hsa-miR-590 a una dosis de 1×10^{11} vg por animal.

5 Los corazones de las ratas y ratones inyectados se recogieron 4 y 12 días después de la inyección, respectivamente, y se lavaron brevemente en PBS para eliminar la sangre residual de los ventrículos. Los corazones se fijaron en formol al 10 % a temperatura ambiente y se procesaron rutinariamente para su inclusión en parafina. La tinción con hematoxilina/eosina y la tinción tricrómica de Masson se realizaron de acuerdo con procedimientos estándar y se analizaron en cuanto a la morfología regular y la magnitud de la fibrosis. Para la tinción por inmunofluorescencia, los cortes de muestra se desparafinaron y se rehidrataron y se procesaron como se describe en el Ejemplo 1. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón contra la alfa-actinina sarcomérica (Abcam) y anticuerpo de conejo contra la Histona H3 fosforilada en la serina 10 (Millipore), seguido de tinción de anticuerpos secundarios con anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con Alexa Fluor 488 o 555 (Invitrogen). Se identificaron los núcleos mediante cortes contra tinción con TOTO-3 (Invitrogen). Los portas se montaron en Vectashield con DAPI (Vector Labs) y las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio automatizado de fluorescencia de selección de alto contenido ImageXpress Micro (Molecular Devices) o un microscopio 510 META confocal de láser (Carl Zeiss MicroImaging).

La cuantificación de las células EdU o P-S10-H3 positivo en los diferentes cortes de corazón se realizó mediante análisis automático de imágenes, como se describe en los Ejemplos 1 y 3.

Ejemplo 6

20 Los microARN preservan la función cardíaca después del infarto de miocardio

Teniendo en cuenta el aumento observado en la proliferación de cardiomiocitos tras el tratamiento con microARN seleccionados *in vitro* e *in vivo*, se evaluó el efecto de los microARN sobre la función cardíaca después del infarto de miocardio en ratones.

25 Para este propósito, los ratones se sometieron a una ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior, seguida inmediatamente por inyección en el área peri-infartada del ventrículo izquierdo de los vectores de AAV que expresan los microARN seleccionados o el vector de control. Como se evaluó por ecocardiografía a los 12 días y 1 mes después del infarto de miocardio, la fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF) y el acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo (LVFS) se conservaron significativamente en ratones infartados inyectados con AAV-hsa-miR-199a o AAV-hsa-miR-590, en comparación con los animales tratados con AAV control (a 1 mes: LVEF 42 %, 53 %, 54 %, LVFS 20 %, 27 %, 26 % en animales control, hsa-miR-199a y hsa-miR-590 respectivamente; $P < 0,05$). El espesamiento sistólico final de la pared del VI de los corazones infartados inyectados con los vectores AAV que expresan los microARN seleccionados también había mejorado notablemente en comparación con el grupo control (de 0,77 mm en animales inyectados con AAV control a 0,98 y 0,97 mm en animales inyectados con AAV-hsa-miR-199a y AAV-hsa-miR-590, respectivamente).

35 Para determinar si la mejora de la función cardíaca inducida por los microARN seleccionados se correlaciona con una disminución en el tamaño del infarto, se sacrificó un subgrupo de los animales ($n = 6$) a los 12 días después del infarto de miocardio y se examinaron los corazones después de la fibrosis post-infarto. El análisis de los cortes transversales del corazón teñidos con tinción tricrómica mostró que los ratones tratados con AAV-hsa-miR-199a y AAV-hsa-miR-590 tuvieron una reducción significativa del tamaño del infarto en comparación con los ratones control infartados (del 28 % del área del ventrículo izquierdo en animales inyectados con AAV de control al 14 % y 13 % en animales inyectados con AAV-hsa-miR-199a y AAV-hsa-miR-590, respectivamente).

En conjunto, estos datos indican que la expresión de hsa-miR-199a y hsa-miR-590 en un modelo animal de infarto de miocardio puede reducir el tamaño del infarto y mejorar significativamente la función cardíaca.

45 La Figura 7 muestra los efectos de los microARN hsa-miR-590-3p y microARN hsa-miR-199a-3p tras la administración, utilizando un vector AAV, en el corazón de ratones infartados.

PROCEDIMIENTOS

El infarto de miocardio se produjo en ratones CD1 hembras (8-12 semanas de edad), por ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior (LAD). En resumen, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilazina, se intubaron endotraquealmente y se colocaron en un ventilador de roedores. 50 La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C con una almohadilla calentadora. Se accedió al corazón latente mediante una toracotomía izquierda. Después de retirar el pericardio, se visualizó una rama descendente de la arteria coronaria LAD con un estereomicroscopio (Leica) y se ocluyó con una sutura de nylon. La ligadura se confirmó mediante el blanqueamiento de una región ventricular izquierda inmediatamente después de la ligadura. Los vectores recombinantes de AAV a una dosis de 1×10^{11} vg por animal, producidos como se describe en el Ejemplo 5, se inyectaron inmediatamente después de la ligadura de LAD en el miocardio que bordeaba la zona del infarto (inyección única), utilizando una jeringa de insulina con una aguja de calibre 30 incorporada (Roche). Se estudiaron tres grupos de animales ($n = 12$ /grupo), que recibieron AAV-LacZ, AAV-hsa-miR-199a, o AAV-hsa-miR-

590. El tórax se cerró y los animales se movieron a una posición prona hasta la aparición de respiración espontánea.

Para evaluar la función y las dimensiones del ventrículo izquierdo, se realizó una ecocardiografía transtorácica bidimensional 12 días y 1 mes después del infarto de miocardio, en ratones sedados con isoflurano al 5 %, utilizando un equipo Visual Sonics Vevo 770 Ultrasound (Visual Sonics) equipado con una serie de transductores en línea a 30 MHz. Se utilizaron trazados de modo M para medir el espesor de la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo y el diámetro interno en la sístole final y en la diástole final, el acortamiento fraccional y la fracción de eyección.

Al final del estudio ecocardiográfico (12 días o 1 mes después del infarto), se recogieron corazones y se procesaron para histología e inmunofluorescencia, como se describe en el Ejemplo 5. El tamaño del infarto se midió como el área fibrótica como porcentaje del área ventricular total.

10 REFERENCIAS CITADAS

Ahuja, P., Sdek, P., and MacLellan, W.R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiological reviews* 87, 521-544.

Bartel, D.P. (2009). MicroARN: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.

Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, NY)* 324, 98-102.

Bueno, M.J., Perez de Castro, I., and Malumbres, M. (2008). Control of cell proliferation pathways by microARN. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 3143-3148.

Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., et al. (2009). MicroARN-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 2772-2786.

Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., et al. (2007). MicroARN-133 controls cardiachypertrophy. *Nature medicine* 13, 613-618.

Chen, J.F., Murchison, E.P., Tang, R., Callis, T.E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S.M., Schneider, M.D., Selzman, C.H., et al. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2111-2116.

Collesi, C., Zentilin, L., Sinagra, G., and Giacca, M. (2008). Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes. *The Journal of cell biology* 183, 117-128.

Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microARN dysregulation in cancer. *Nature reviews* 10, 704-714.

Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008). LNA-mediated microARN silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microARN: are the answers in sight? *Nature reviews* 9, 102-114.

Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *Journal of virology* 78, 6381-6388.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews* 10, 94-108.

Hu, S., Huang, M., Li, Z., Jia, F., Ghosh, Z., Lijkwan, M., Fasanaro, P., Sun, S., Wang, X., Martelli, F., Robbins, R.C., Wu, J., MicroARN-210 as a Novel Therapy for Treatment of Ischemic Heart Disease, *Circulation* 2010 September 14; 122(11 Suppl.): S124-S131.

Huang, Z.P., Neppl, R.L., and Wang, D.Z. (2010). MicroARN in cardiac remodeling and disease. *Journal of cardiovascular translational research* 3, 212-218.

Ikeda, S., Kong, S.W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P.D., Golub, T.R., Pieske, B., and Pu, W.T. (2007). Altered microARN expression in human heart disease. *Physiological genomics* 31, 367-373.

Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., McTiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust

- systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 14, 45-53.
- Kedde, M., and Agami, R. (2008). Interplay between microARN and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell cycle (Georgetown, Tex 7)*, 899-903.
- 5 Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., and Orum, H. (2010). Therapeutic silencing of microARN-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science (New York, NY 327)*, 198-201.
- Latronico, M.V., and Condorelli, G. (2009). MicroARN and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol* 6, 419-429.
- 10 Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J., and Li, P.F. (2009). miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12103-12108.
- Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microARN 1 and 133. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20844-20849.
- 15 Matkovich, S.J., Van Booven, D.J., Youker, K.A., Torre-Amione, G., Diwan, A., Eschenbacher, W.H., Dorn, L.E., Watson, M.A., Margulies, K.B., and Dorn, G.W., 2nd (2009). Reciprocal regulation of myocardial microARN and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microARN signature by biomechanical support. *Circulation* 119, 1263-1271.
- 20 Mingozi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 341-355.
- Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., and Naar, A.M. (2010). MicroARN-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science (New York, NY 328)*, 1566-1569.
- 25 O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., and Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microARN in the immune system. *Nat Rev Immunol* 10, 111-122.
- Porrello, E.R., Johnson, B.A., Aurora, A.B., Simpson, E., Nam, Y.J., Matkovich, S.J., Dorn, G.W., 2nd, van Rooij, E., and Olson, E.N. (2011). MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circulation research* 109, 670-679.
- 30 Rao, P.K., Toyama, Y., Chiang, H.R., Gupta, S., Bauer, M., Medvid, R., Reinhardt, F., Liao, R., Krieger, M., Jaenisch, R., et al. (2009). Loss of cardiac microARN-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation research* 105, 585-594.
- Senyo, S.E., Steinhilber, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., Lee, R.T. 2012. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, in press
- 35 Small, E.M., Frost, R.J., and Olson, E.N. (2010). MicroARN add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 121, 1022-1032.
- Small, E.M., and Olson, E.N. Pervasive roles of microARN in cardiovascular biology. *Nature* 469, 336-342.
- Thum, T., Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L.W., Doevendans, P.A., Mummery, C.L., Borlak, J., Haverich, A., et al. (2007). MicroARN in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 116, 258-267.
- 40 Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., et al. (2008). MicroARN-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980-984.
- Umbach, J.L., and Cullen, B.R. (2009). The role of RNAi and microARN in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & development* 23, 1151-1164.
- 45 van Amerongen, M.J., and Engel, F.B. (2008). Features of cardiomyocyte proliferation and its potential for cardiac regeneration. *Journal of cellular and molecular medicine* 12, 2233-2244.
- van Rooij, E., and Olson, E.N. (2007). MicroARN: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *The Journal of clinical investigation* 117, 2369-2376.
- 50 van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., and Olson,

E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microARN that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18255-18260.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., and Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microARN. *Science* (New York, NY 316, 575-579.

5 van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2008). Dysregulation of microARN after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13027-13032.

Williams, A.H., Liu, N., van Rooij, E., and Olson, E.N. (2009). MicroARN control of muscle development and disease. *Current opinion in cell biology* 21, 461-469.

10 Xiao, L., Pimental, D.R., Amin, J.K., Singh, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S. 2001. MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33, 779-87.

15 Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., et al. (2007). The muscle-specific microARN miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature medicine* 13, 486-491.

Zentilin, L., Marcello, A., and Giacca, M. (2001). Involvement of cellular doublestranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *Journal of virology* 75, 12279-12287.

Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microARN that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214-220.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (ICGEB)

25 <120> MICROARN PARA LA REGENERACIÓN CARDÍACA MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE MIOCITOS CARDÍACOS

<130> RBW12594

30 <150> ITRM2011A000685

<151> 23-12-2011

<160> 36

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ARN

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

acugcccuaa gugcuccuuc ugg 23

<210> 2

45 <211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

50 ugcccuaau gcccucug gc 22

<210> 3

<211> 22

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

aguuuugcau aguugcacua ca 22

ES 2 644 574 T3

	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5		
	<400> 4	
	aguuuugcag guuugcauuu ca	22
10		
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15		
	<400> 5	
	aucacauugc cagggauuuc c	21
20		
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25		
	<400> 6	
	aucacauugc cagggauuac c	21
30		
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35		
	<400> 7	
	uucaaguaau ucaggauagg u	21
40		
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45		
	<400> 8	
	cuuucagucg gauguuugca gc	22
50		
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55		
	<400> 9	
	cuuucagucg gauguuuaca gc	22
60		
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65		
	<400> 10	
	cagugccucg gcagugcagc cc	22
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 11	
	uucacauugu gcuacugucu gc	22
	<210> 12	
	<211> 22	

ES 2 644 574 T3

	<212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 12 ggugcagugc ugcaucucug gu	22
10	<210> 13 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 13 aacauucaac gcugucggug agu	23
20	<210> 14 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 14 acaguagucu gcacauuggu ua	22
30	<210> 15 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 15 ugauugucca aacgcauucu	21
40	<210> 16 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 16 uaagugcuuc cauguuuugg uga	23
50	<210> 17 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 17 uaagugcuuc cauguuuuag uag	23
60	<210> 18 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 18 uaagugcuuc cauguucag ugg	23
	<210> 19 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 19 uuuaacaugg gguaccugc ug	22
	<210> 20 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 644 574 T3

	<400> 20 uaagugcuuc cauguugag ugu	23
5	<210> 21 <211> 17 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 21 uaagugcuuc caugcuu	17
15	<210> 22 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 22 uuuucauuu uugcuccuga cc	22
25	<210> 23 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 23 aaagugcugc gacauugag cgu	23
35	<210> 24 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 24 uaugugccuu uggacuacau cg	22
45	<210> 25 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 25 gugucuuuug cucugcaguc a	21
55	<210> 26 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 26 aaagugcuuc ccuuuggacu gu	22
65	<210> 27 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27 aaagugcuuc cuuuagagg g	21
	<210> 28 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 28	

ES 2 644 574 T3

	aaagugcuuc cuuuuagagg gu	22
5	<210> 29 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 29 uaauuuuauug uauaagcuag u	21
15	<210> 30 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 30 uauaccucag uuuuaucagg ug	22
25	<210> 31 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 31 uccauuacac uaccugccu cu	22
35	<210> 32 <211> 26 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 32 aaguaguugg uuuguauagag augguu	26
45	<210> 33 <211> 27 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 33 accuucuugu auaagcacug ugcuaaa	27
55	<210> 34 <211> 17 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 34 ucgccuccuc cucuccc	17
65	<210> 35 <211> 18 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
70	<400> 35 uccagugccc uccucucc	18
75	<210> 36 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
80	<400> 36 uguuuugaua acaguaaugu	20

REIVINDICACIONES

1. Un microARN seleccionado del grupo que consiste en:

5 UAAUUUUUAUGUAUAAGCUAGU (SEQ ID NO: 29),
 ACAGUAGUCUGCACAUJGGUUA (SEQ ID NO: 14),
 ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG (SEQ ID NO: 1),
 CAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCC (SEQ ID NO: 10),
 ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUAAA (SEQ ID NO: 33), y
 UCCAGUGCCCUCCUCUCC (SEQ ID NO: 35),

10 o un transcrito primario para dicho microARN, o un precursor de dicho microARN, o un imitador de dicho microARN o una combinación de los mismos para su uso como medicamento para estimular la regeneración del corazón a través de la proliferación de miocitos cardíacos.
2. El microARN como se desvela en la reivindicación 1 para su uso como medicamento para el tratamiento de una patología cardíaca asociada con la pérdida de miocitos cardíacos.
3. El microARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha patología se selecciona del grupo

15 que consiste en las consecuencias de un infarto de miocardio, una miocardiopatía isquémica y no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca.
4. El microARN de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en terapia génica.
5. El microARN para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microARN se selecciona del grupo que

20 consiste en ACAGUAGUCUGCACAUJGGUUA (SEQ ID NO: 14) y UAAUUUUUAUGUAUAAGCUAGU (SEQ ID NO: 29).
6. Un vector para su uso como medicamento para estimular la regeneración cardíaca mediante la proliferación de miocitos cardíacos, comprendiendo dicho vector al menos un microARN de acuerdo con la reivindicación 1 y/o un ADN que codifica al menos dicho microARN y/o un ADN que codifica al menos un transcrito primario o un precursor para dicho microARN, o una combinación de los mismos.
7. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, que es un vector adenoasociado (AAV) de cualquier serotipo de la cápside, ya sea natural o artificial.
8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un microARN de acuerdo con la reivindicación 1 y/o un transcrito primario de dicho microARN y/o un precursor de dicho microARN y/o un ADN que codifica al menos dicho microARN, transcrito primario o precursor y/o un imitador de al menos dicho microARN, o una combinación de los

30 mismos, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso como medicamento para estimular la regeneración del corazón induciendo la proliferación de miocitos cardíacos.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento de una patología cardíaca asociada con la pérdida de miocitos cardíacos.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha patología se selecciona del

35 grupo que consiste en las consecuencias de un infarto de miocardio, una miocardiopatía isquémica y no isquémica, una miocarditis y una insuficiencia cardíaca.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que la administración se selecciona del grupo que consiste en parenteral intravenosa, intracoronaria e intracardíaca.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que

40 comprende además moléculas lipídicas, preferiblemente lípidos catiónicos, péptidos, polímeros y otras moléculas vehículo.
13. Un procedimiento *in vitro* o *ex vivo* para la expansión de cardiomiocitos derivados de células madre, o cardiomiocitos adultos, que comprende añadir a dichas células al menos uno de los microARN de la reivindicación 1.
14. Procedimiento para estimular la proliferación de cardiomiocitos en cultivos celulares que comprende añadir a

45 dicho cultivo celular al menos uno de los microARN de la reivindicación 1.
15. Una extensión de ARN para su uso como medicamento para estimular la regeneración del corazón a través de la proliferación de miocitos cardíacos, comprendiendo dicha extensión al menos una o una combinación de los microARN, transcritos primarios, precursores o imitadores de la reivindicación 1 que se obtiene *in vitro* a través de procedimientos de transcripción sin células, producidos sintéticamente, expresados en células tras la transferencia de la secuencia codificadora de ADN correspondiente, o introducidos o expresados en las células mediante la

50 administración de un vector plasmídico, viral u otro tipo de vector.

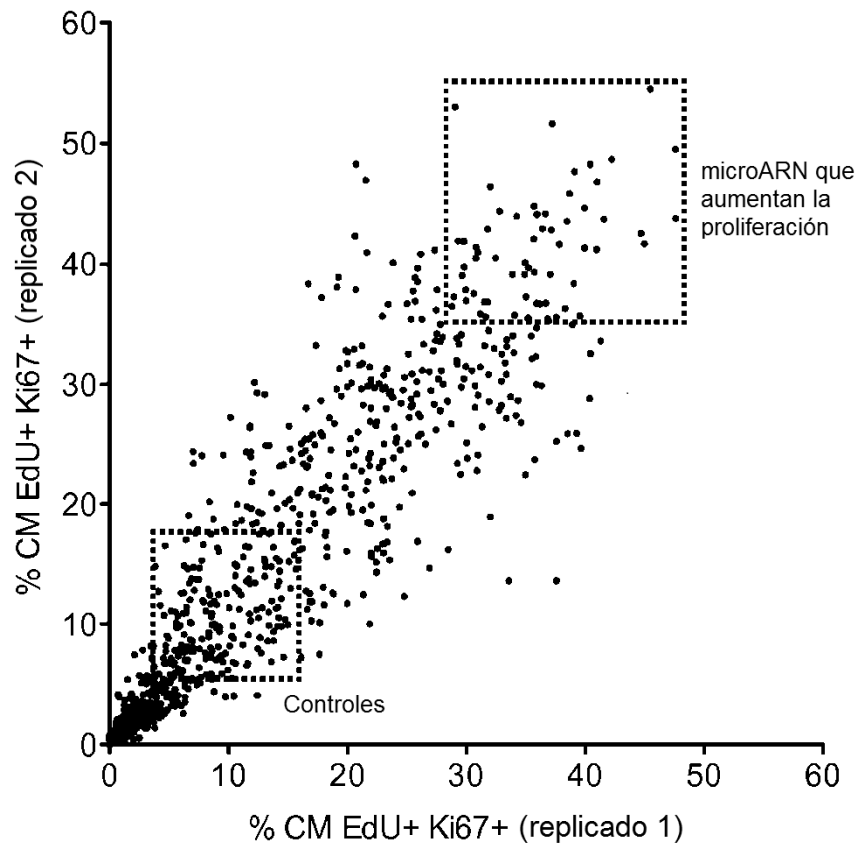


FIGURA 1

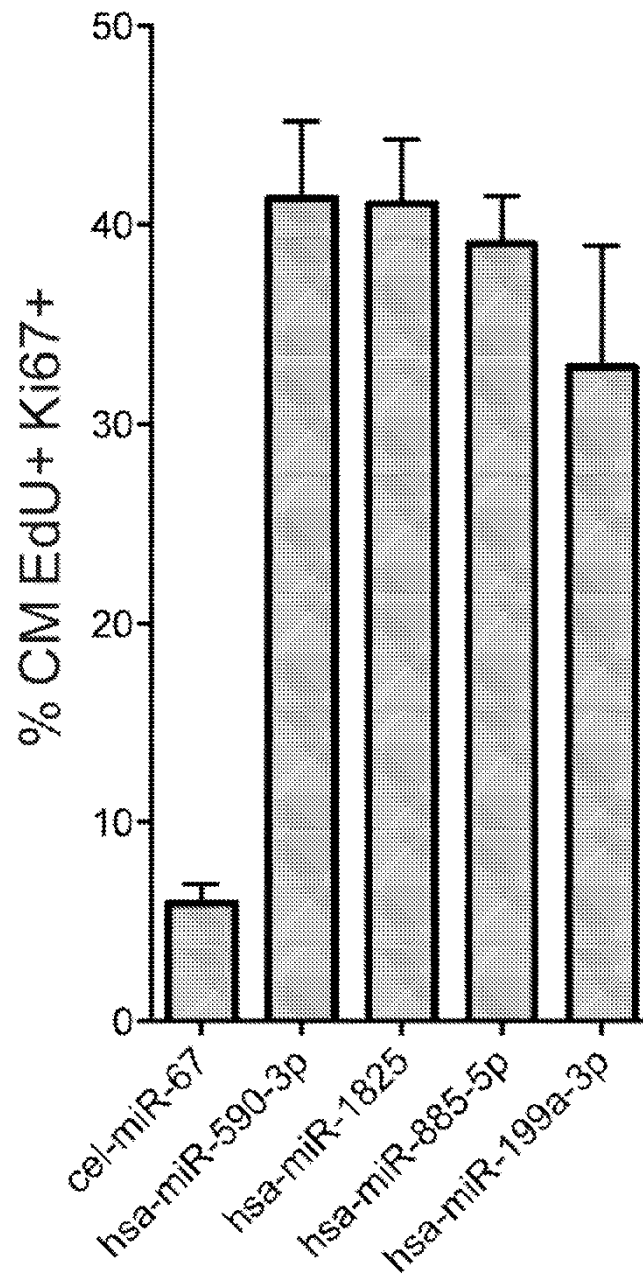


FIGURA 2

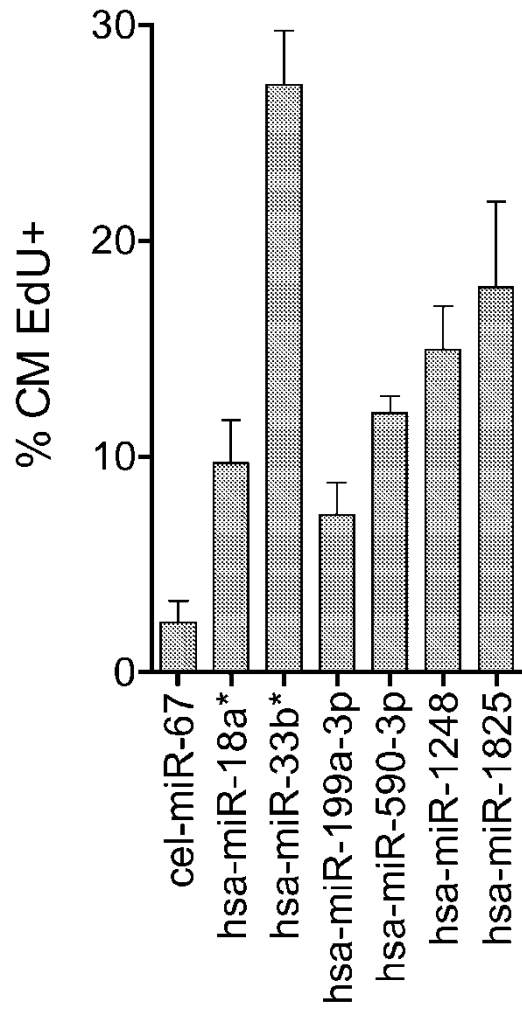


FIGURA 3

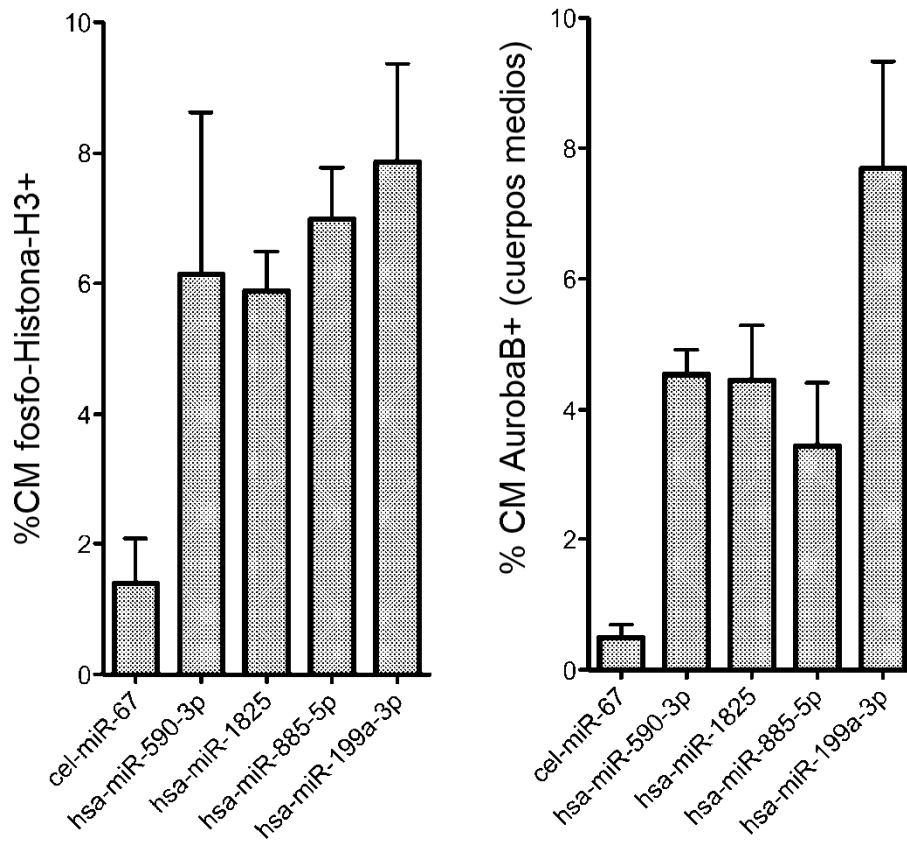


FIGURA 4

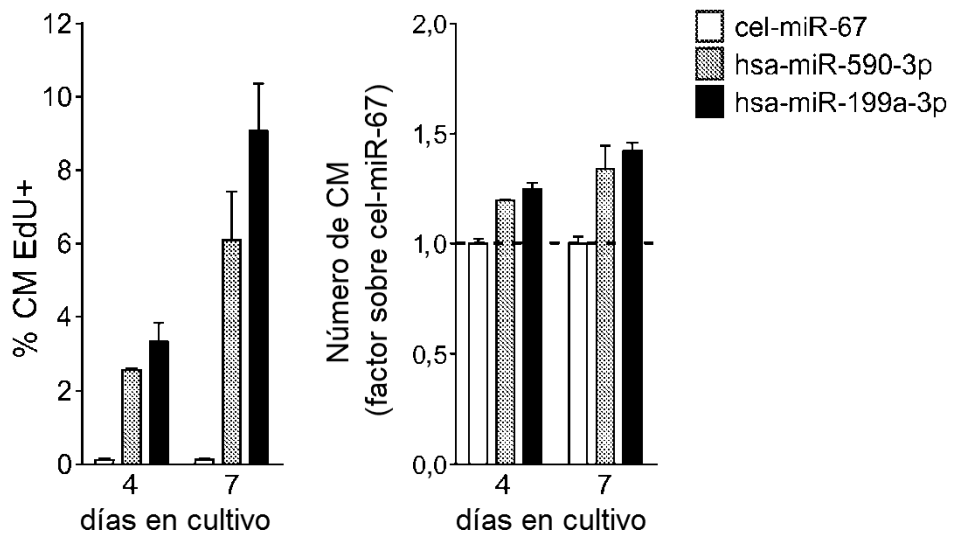


FIGURA 5

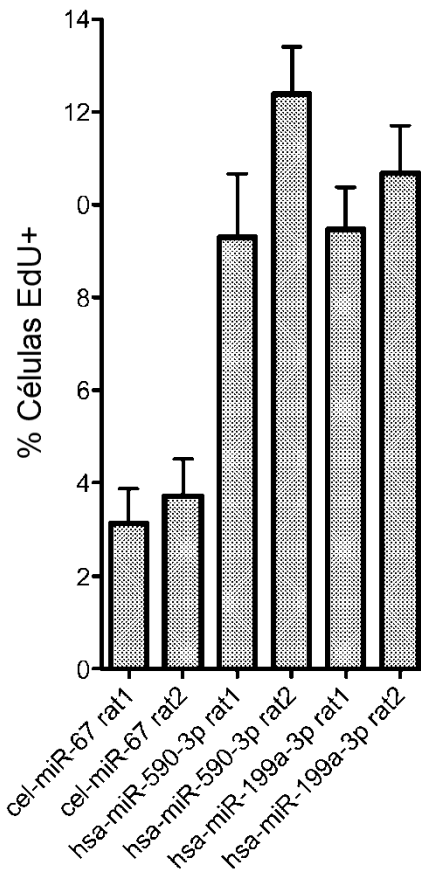


FIGURA 6

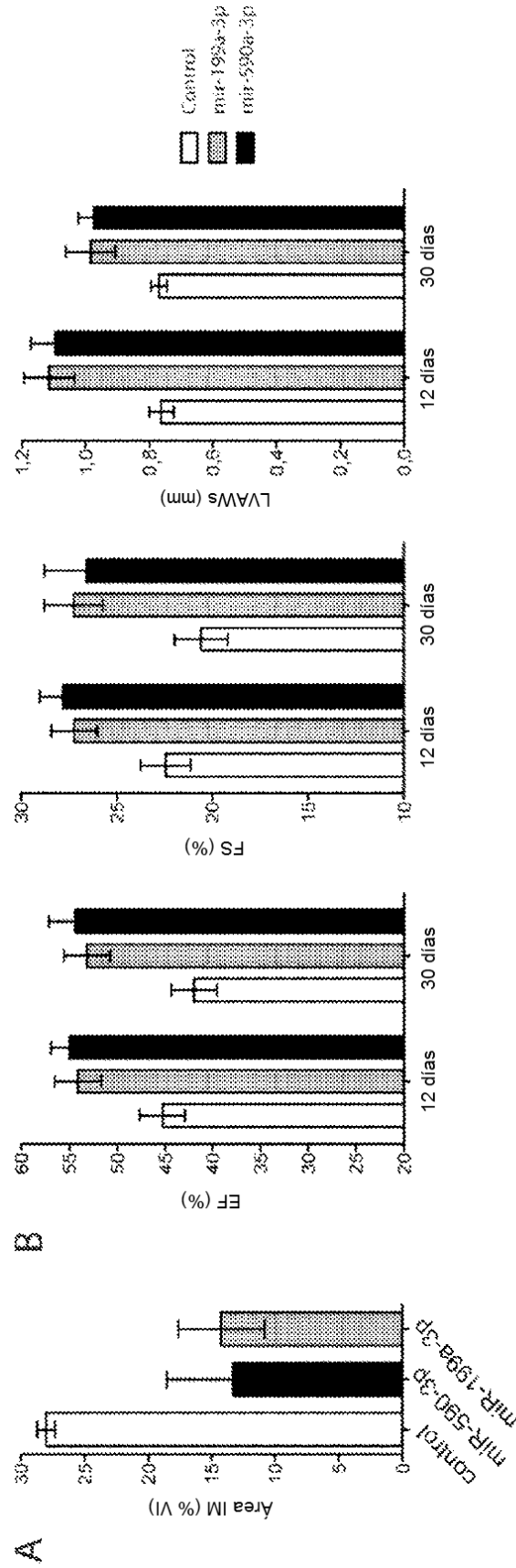


FIGURA 7