

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 334**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/US2014/069349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14868815 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3080269**

54 Título: **Señalización de complejo de hippo y distrofina en la renovación de cardiomiocitos**

30 Prioridad:

**09.12.2013 US 201361913715 P**

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

**18.12.2019**

73 Titular/es:

**TEXAS HEART INSTITUTE (50.0%)  
6720 Bertner Avenue  
Houston, TX 77030, US y  
BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTIN, JAMES F.;  
MORIKAWA, YUKA;  
HEALLEN, TODD RYAN y  
LEACH, JOHN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 735 334 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

Señalización de complejo de hippo y distrofina en la renovación de cardiomiocitos

Esta solicitud reivindica la prioridad de Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. de Serie 61/913.715, presentada el 9 de diciembre de 2013.

### 5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere al menos a los campos de la biología celular, la biología molecular y la medicina.

### **Antecedentes**

Distrofia Muscular de Duchene

10 La distrofia muscular de Duchenne (DMD, por sus siglas en inglés), un trastorno hereditario ligado a X que ocurre en 1 de cada 3.500 nacimientos masculinos (Emery, 2002), se caracteriza por una degeneración rápida y progresiva de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas. Es importante destacar que los pacientes con DMD desarrollan una enfermedad cardíaca caracterizada por necrosis miocárdica, fibrosis y miocardiopatía dilatada. La DMD surge de la mutación del gen de la *distrofina* que codifica una proteína citoesquelética de 427 kd presente en las células musculares esqueléticas, cardíacas y lisas (Hoffman et al., 1987; Hoffman et al., 1988). En los pacientes con DMD, se suprime la expresión de la *distrofina*, lo que conduce a la interrupción del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC), una estructura esencial de la membrana localizada en el músculo esquelético y cardíaco (Ohlendieck y Campbell, 1991; Ohlendieck et al., 1993). Un valioso modelo de ratón para la DMD es el ratón *mdx*, una cepa nula para distrofina que muestra un fenotipo de enfermedad similar al de la DMD humana (Bulfield et al., 1984). Aunque son mucho menos graves que la DMD humana, los ratones *mdx* tienen las características de la enfermedad humana, tales como la degeneración/regeneración del músculo esquelético y la cardiomiopatía después del envejecimiento.

Introducción a la señalización de Hippo

25 Los componentes de señalización de Hippo del núcleo de mamíferos incluyen las quinasas Ste20 Mst1 y Mst2 que son ortólogas respecto a la quinasa de Hippo de *Drosophila*. Las quinasas Mst, cuando forman complejos con la proteína de andamiaje Salvador (Salv), fosforilan las quinasas Homólogas de Supresores Tumorales Grandes (Lat). *Lats1* y *Lats2* de mamífero son quinasas de la familia NDR y son ortólogas con respecto a las *Verrugas de Drosophila*. Las quinasas Lats, a su vez, fosforilan Yap y Taz, dos coactivadores transcripcionales relacionados que son los componentes de señalización de Hippo más aguas abajo y asociados con factores de transcripción tales como Tead para regular la expresión génica. Yap también interactúa con  $\beta$ -catenina, un efector de la señalización de Wnt canónica para regular la expresión génica. Tras la fosforilación, Yap y Taz se excluyen del núcleo y se vuelven transcripcionalmente inactivos (Fig. 1).

35 Los estudios previos de pérdida de función cardíaca en ratones revelaron que la señalización de Hippo inhibe la proliferación de cardiomiocitos para controlar el tamaño del corazón (Heallen et al., 2011). Los corazones con deficiencia de Salv desarrollan cardiomegalia con un aumento de 2,5 veces el tamaño del corazón debido a la hiperplasia de los cardiomiocitos. Además, los experimentos que investigan Yap en el desarrollo de cardiomiocitos respaldan la conclusión de que Yap es la principal molécula efectora de Hippo durante el desarrollo de cardiomiocitos (von Gise et al., 2012; Xin et al., 2011). Yap es un cofactor que se asocia con reguladores transcripcionales de unión al ADN. La bibliografía actual indica que los cofactores de la familia Tead son socios primarios de Yap (Halder y Johnson, 2011).

40 La presente descripción se refiere a métodos y composiciones que abordan una necesidad sentida durante mucho tiempo en la técnica para proporcionar una terapia para afecciones cardíacas, que incluyen al menos DMD, dirigiéndose a la ruta de Hippo.

### **Breve compendio**

45 La presente descripción está dirigida a métodos y composiciones que proporcionan terapia para al menos una afección médica que afecta directa o indirectamente a las células musculares cardíacas (cardiomiocitos) en un individuo mamífero, incluyendo seres humanos, perros, gatos, caballos, cerdos, etc. La afección médica puede ser de cualquier tipo, incluyendo una afección cardíaca tal como insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, infarto de miocardio, etc. La afección médica puede tener una afección cardíaca como principal síntoma o causa o puede ser un síntoma o causa secundarios. El individuo puede ser hombre o mujer y puede tener cualquier edad.

50 En aspectos particulares de la descripción, a un individuo que necesita terapia para una afección médica cardíaca se le proporciona una cantidad eficaz de uno o más ácidos nucleicos, o células que comprenden uno o más ácidos nucleicos, en donde los ácidos nucleicos proporcionan un beneficio terapéutico al individuo. En realizaciones específicas, el ácido nucleico es una forma que proporciona, directa o indirectamente, interferencia de ARN, que

incluye al menos ARNhc. En realizaciones particulares, la composición de ARNhc se dirige a un miembro de la ruta de Hippo. Aunque puede dirigirse a cualquier miembro de la ruta de Hippo, en realizaciones específicas, el ARNhc se dirige a Salvador (*Sav1*).

5 En las realizaciones de la descripción, hay composiciones de ácido nucleico que se dirigen a *Sav1* de un mamífero, y en realizaciones específicas las composiciones de ácido nucleico son moléculas de ARNhc. En realizaciones específicas, hay composiciones terapéuticas que comprenden moléculas de ARNhc que comprenden uno o más de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. Las composiciones pueden estar incluidas o no en un vector, incluyendo un vector viral o un vector no viral. En realizaciones particulares, las secuencias de ARNhc se utilizan en un vector no integrativo.

## 10 **Compendio**

En algunas realizaciones, hay una composición de ácido nucleico sintético aislado que comprende ARNhc o ARNip capaz de reducir la expresión de *Sav1*, que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12 y/o un ácido nucleico derivado que comprende al menos 90% de identidad con uno de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. El ácido nucleico derivado puede ser al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a uno de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

20 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 (o SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 4 (o, respectivamente, SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12), en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan entre sí para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle.

25 En realizaciones específicas, el ácido nucleico tiene una longitud de al menos 43 nucleótidos o no más de 137 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la estructura de bucle tiene entre 5 y 19 nucleótidos de longitud. En realizaciones particulares, el ácido nucleico derivado tiene 1 o 2 emparejamientos erróneos en comparación con los respectivos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12.

30 En algunas realizaciones de la composición, el ácido nucleico o el ácido nucleico derivado están comprendidos en un vector, tal como un vector viral o un vector no viral. El vector puede ser un vector no integrativo. El vector puede ser un vector no integrativo que es un vector lentiviral. En algunas realizaciones del vector, dos o más ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 están presentes en el mismo vector.

35 En realizaciones específicas, la expresión del ácido nucleico está regulada por un promotor específico del tejido o específico de la célula, tal como un promotor específico del cardiomiocito, por ejemplo, la cadena ligera 2 del promotor de miosina cardíaca específica del ventrículo (MLC-2v) de rata; el promotor del gen de la cadena pesada de la alfa miosina (MHC) específica del músculo cardíaco; el promotor mínimo específico de células cardíacas de -137 a +85 del promotor NCX1; la troponina T cardíaca de pollo (cTNT), o una combinación de los mismos.

40 En ciertas realizaciones, dos o más de los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12 están presentes en el mismo vector. En casos específicos, dos o más ácidos nucleicos están regulados por la misma secuencia reguladora o están regulados por una secuencia reguladora diferente.

45 En una realización, hay una composición de ácido nucleico sintético aislado, que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9 y/o un ácido nucleico derivado que comprende al menos 80% de identidad con uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, en donde la composición es para su uso en un método de tratamiento de un individuo por una afección cardíaca, que comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de la composición al individuo. El ácido nucleico derivado puede ser al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a uno de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. En realizaciones particulares, el ácido nucleico derivado tiene 1, 2, 3 o 4 emparejamientos erróneos en comparación con los respectivos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, la afección cardíaca en el individuo hace que el individuo necesite renovación de cardiomiocitos. En ciertas realizaciones, el corazón del individuo presenta apoptosis, necrosis y/o autofagia de cardiomiocitos. En realizaciones específicas, la afección cardíaca comprende enfermedad cardiovascular, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, isquemia, necrosis, fibrosis o cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía relacionada con la edad. En realizaciones particulares, el individuo tiene distrofia muscular de Duchenne. La composición se le puede proporcionar al individuo más de una vez. La composición se le puede proporcionar al individuo sistémicamente o localmente. En una

realización específica, se le proporciona al individuo una terapia adicional para la afección cardíaca.

En ciertas realizaciones, hay un kit que comprende una composición tal como la incluida en la descripción, en donde la composición está alojada en un recipiente adecuado.

5 En realizaciones particulares, la invención proporciona un ARNhc que se dirige a Salvador (*Sav1*) para su uso en un método para el tratamiento de una afección cardíaca en un individuo, que comprende la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del ARNhc que se dirige a Salvador (*Sav1*). En una realización específica, el ARNhc se proporciona al individuo en el vector AAV9. En realizaciones particulares, el individuo tiene distrofia muscular de Duchenne.

10 El texto que antecede ha delimitado de manera bastante amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención de modo que pueda comprenderse mejor la descripción detallada de la invención que figura a continuación. A continuación se describirán las características y ventajas adicionales de la invención que forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán que la concepción y las modalidades específicas descritas podrán utilizarse fácilmente como fundamento para la modificación o diseño de otras estructuras para llevar a cabo los mismos objetivos de la presente invención. Los expertos en la técnica también reconocerán que tales interpretaciones equivalentes no se apartan del espíritu y alcance de la invención como se establece en las reivindicaciones adjuntas. Las características novedosas que se consideran características de la invención, tanto en cuanto a su organización como en cuanto a su método de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas, se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se considere en relación con las figuras adjuntas. Sin embargo, debe entenderse expresamente que cada una de las figuras se proporciona solo con fines de ilustración y descripción y no se pretende que sea una definición de los límites de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

Para lograr un entendimiento más completo de la presente invención, se hará referencia ahora a las siguientes descripciones junto con las figuras adjuntas, en las que:

La FIG. 1 ilustra un ejemplo de un modelo para la señalización de Hippo durante el desarrollo y la regeneración;

25 La FIG. 2 muestra que Yap regula los genes de motilidad y división celular en la regeneración cardíaca. Los mapas de calor (A) y la validación qRT-PCR (B) muestran los niveles de transcripción relativos para un subconjunto de dianas de Yap.\* p <0,05, \*\* p <0,001, \*\*\* p <0,0001. Adaptado de (Morikawa et al., 2014);

30 La FIG. 3 muestra corazones Salv CKO y Salv CKO; mdx; utr después de la resección del ápice. Los corazones se extirparon el día 8 postnatal, una fase no regenerativa, y se evaluaron mediante inmunohistoquímica a las tres semanas después de la resección. Los corazones mutantes Salv CKO se pueden regenerar como se informó (panel izquierdo y (Heallen et al., 2013). Además, los corazones Salv CKO mutantes compuesto; mdx-; utr +/- también se pueden regenerar como se muestra en el panel de la derecha. Notablemente, los corazones mutantes mdx no se regeneran después de la resección de cardiomiocitos;

35 La FIG. 4 demuestra que el agotamiento de Hippo promueve la recuperación funcional cardíaca después de la isquemia crónica y la insuficiencia cardíaca establecida. Los corazones adultos se sometieron a LAD-O (t = 0) y se estudiaron por ecocardiografía tres semanas después. Los corazones que tenían insuficiencia se incorporaron al estudio y se les inyectó tamoxifeno para inactivar *Salv*. Los ratones se estudiaron por ecocardiografía a intervalos de dos semanas como se muestra. Los corazones con deficiencia de Hippo mostraron una recuperación de la función dos semanas después de la inyección de tamoxifeno y en torno a las seis semanas, la recuperación funcional era completa;

La FIG. 5 muestra que el ARNip de *Salv* reduce de manera eficaz la expresión del ARNm de *Salv*. Los ARNip se transfectaron en cardiomiocitos neonatales y los niveles de ARNm de *Salv* se estudiaron mediante RT PCR cuantitativa. Los tres ARNip redujeron eficazmente los niveles de ARNm de *Salv*.

45 La FIG. 6 ilustra la secuencia de ADNc de *Sav1* de ratón. Las regiones en color gris demuestran ejemplos de secuencias de ARNhc (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente). Los exones alternativos se muestran mediante secuencias que tienen doble subrayado en comparación con las secuencias que no tienen doble subrayado. Los dominios estructurales de proteínas se muestran mediante secuencias que tienen un subrayado sencillo, en orden de 5' a 3'; dominio WW, dominio WW, dominio SARAH;

50 La FIG. 7 ilustra la secuencia de ADNc de *Sav1* de cerdo. Las regiones en color gris demuestran ejemplos de secuencias de ARNhc (SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). Los exones alternativos se muestran mediante secuencias que tienen doble subrayado en comparación con las secuencias que no tienen doble subrayado. Los dominios estructurales de proteínas se muestran mediante secuencias que tienen un subrayado sencillo, en orden de 5' a 3'; dominio WW, dominio WW, dominio SARAH;

La FIG. 8 ilustra la secuencia de ADNc de *Sav1* humano. Las regiones en color gris demuestran ejemplos de secuencias de ARNhc (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, respectivamente). Los exones alternativos se muestran mediante secuencias que tienen doble subrayado en comparación con las secuencias que no tienen doble subrayado. Los dominios estructurales de proteínas se muestran mediante secuencias que tienen un subrayado sencillo, en orden de 5' a 3'; dominio WW, dominio WW, dominio SARA;H;

## Descripción detallada

### I. Definiciones ilustrativas

Se debe interpretar que el uso de los términos "un", "uno", "una" y "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) incluye tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. Se debe considerar que las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" son expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario. Se pretende que la mención de intervalos de valores en la presente memoria sirva solamente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor independiente comprendido en el intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que se contradiga de otro modo claramente por el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos o las expresiones ilustrativas (por ej., "tal como") que se proporcionan en la presente memoria ilumine mejor la invención y no presente una limitación al alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. No se debe interpretar ninguna expresión de la memoria descriptiva como indicación de que algún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

Como se emplea en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos complementaria", también conocida como "secuencia antisentido", se refiere a una secuencia de un ácido nucleico que es completamente complementaria a la secuencia de un ácido nucleico "efector" que codifica una proteína (*p. ej.*, complementario a la hebra codificante de una molécula de ADNc de doble hebra o complementario a una secuencia de ARNm). En la presente memoria, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "corresponde a una secuencia de nucleótidos" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que codifica una secuencia idéntica. En algunos casos, cuando los nucleótidos (ácidos nucleicos) antisentido o de ARNip (RNA inhibidor pequeño) (procesado a partir de ARNhc) se unen a una secuencia diana, una secuencia de RNA antisentido o de ARN inhibidor pequeño (ARNip) particular es sustancialmente complementaria a la secuencia diana, y por lo tanto se unirá específicamente a una porción de un ARNm que codifica un polipéptido. Como tal, típicamente las secuencias de esos ácidos nucleicos serán altamente complementarias a la secuencia diana del ARNm, y no tendrán más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 emparejamientos erróneos en toda la secuencia. En muchos casos, puede ser deseable que las secuencias de los ácidos nucleicos sean emparejamientos exactos, es decir, que sean completamente complementarias a la secuencia a la que se une específicamente el oligonucleótido, y por lo tanto tienen cero emparejamientos erróneos a lo largo del tramo complementario. Las secuencias altamente complementarias típicamente se unirán de manera bastante específica a la región de la secuencia diana del ARNm y, por lo tanto, serán altamente eficaces para reducir, y/o incluso inhibir la traducción de la secuencia de ARNm diana al producto polipeptídico. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.416.849.

Las secuencias de oligonucleótidos sustancialmente complementarias serán más de aproximadamente 80 por ciento complementarias (o '% de coincidencia exacta') con la secuencia diana de ARNm correspondiente a la cual se une específicamente el oligonucleótido, y, más preferiblemente, será más de aproximadamente 85 por ciento complementaria a la secuencia diana de ARNm correspondiente a la que se une específicamente el oligonucleótido. En ciertos aspectos, como se describió anteriormente, será deseable tener secuencias de oligonucleótidos aún más sustancialmente complementarias para su uso en la práctica de la invención, y en tales casos, las secuencias de oligonucleótidos serán más de aproximadamente 90 por ciento complementarias a la secuencia diana de ARNm correspondiente a la que se une específicamente el oligonucleótido, y en ciertas realizaciones pueden ser más de aproximadamente 95 por ciento complementarias a la secuencia diana de ARNm correspondiente a la que se une específicamente el oligonucleótido, e incluso hasta 96%, 97%, 98%, 99%, e incluso una complementariedad de coincidencia exacta de 100% con el ARNm diana al que se une específicamente el oligonucleótido diseñado. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.416.849. El porcentaje de similitud o el porcentaje de complementariedad de cualquier secuencia de ácido nucleico se pueden determinar, por ejemplo, utilizando cualquier programa informático conocido en la técnica.

Como se emplea en la presente memoria, el término "modificación genética para reducir la expresión de un gen" o "tecnología de modificación genética para reducir la expresión de un gen" se refiere a una técnica de silenciamiento

génico en la que la expresión de un gen o gen diana de interés se reduce en comparación con la expresión del gen antes de la introducción del ARNhc, que puede conducir a la inhibición de la producción del producto del gen diana. El término "reducido" se utiliza en la presente memoria para indicar que la expresión del gen diana se reduce en 0,1-100%. Por ejemplo, la expresión se puede reducir en 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o incluso 99%. La expresión se puede reducir en cualquier cantidad (%) dentro de esos intervalos, tal como por ejemplo, 2-4, 11-14, 16-19, 21-24, 26-29, 31-34, 36-39, 41-44, 46-49, 51-54, 56-59, 61-64, 66-69, 71-74, 76-79, 81-84, 86-89, 91-94, 96, 97, 98 o 99. La modificación genética para reducir de la expresión génica se puede dirigir mediante el uso de ARNip o ARNhc.

Como se emplea en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un polímero de ADN o ARN que puede ser de hebra sencilla o de doble hebra, conteniendo opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o alteradas capaces de incorporarse a polímeros de ADN o ARN. El término "polinucleótido" se usa de manera indistinta con el término "oligonucleótido". El término "secuencia de nucleótidos" es intercambiable con "secuencia de ácidos nucleicos" a menos que se indique lo contrario. "Secuencia de nucleótidos" y "secuencia de ácido nucleico" son términos que se refieren a una secuencia de nucleótidos en una molécula de polinucleótido.

Como se emplea en la presente memoria, el término "unido operablemente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un polinucleótido, de modo que la función de una de las secuencias se ve afectada por la otra. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN reguladora está "unida operablemente a" una secuencia de ADN que codifica un ARN ("una secuencia codificante de ARN" o "secuencia codificante de ARNhc") o un polipéptido, si las dos secuencias están situadas de manera tal que la secuencia de ADN reguladora afecta a la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o el ARN funcional están bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar unidas operablemente a secuencias reguladoras en orientación efectora o antisentido. Una secuencia codificante de ARN se refiere a un ácido nucleico que puede servir como molde para la síntesis de una molécula de ARN, tal como un ARNip y un ARNhc. Preferiblemente, la región codificante de ARN es una secuencia de ADN.

Como se emplea en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" es un portador, diluyente, excipiente y/o sal que es compatible con los otros ingredientes de la formulación, y no es perjudicial para el receptor de la misma. El ingrediente activo para la administración puede estar presente en forma de polvo o en forma de gránulos; en forma de una solución, una suspensión o una emulsión o como se describe en otra parte a lo largo de la memoria descriptiva.

Como se emplea en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos, generalmente aguas arriba (5') de su secuencia codificante, que dirige y/o controla la expresión de la secuencia codificante proporcionando el reconocimiento de la ARN polimerasa y otros factores requeridos para la correcta transcripción. "Promotor" incluye un promotor mínimo que es una secuencia corta de ADN comprendida por una caja TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, a la que se añaden elementos reguladores para el control de la expresión. "Promotor" también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que son capaces de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos aguas arriba y proximales y más distales, referidos los últimos elementos a menudo como potenciadores. Por consiguiente, un "potenciador" es una secuencia de ADN que estimula la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para mejorar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Es capaz de operar en ambas orientaciones (efectora o antisentido), y puede funcionar incluso cuando se mueve aguas arriba o aguas abajo del promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores aguas arriba se unen a proteínas de unión a ADN específicas de la secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo o pueden estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que participan en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo. Se considera cualquier promotor conocido en la técnica que regula la expresión de la secuencia codificante de ARNhc o ARN en la práctica de la invención.

Como se emplea en la presente memoria, el término "elemento informador" o "marcador" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido susceptible de ser detectado en un ensayo de escrutinio. Los ejemplos de polipéptidos codificados por elementos informadores incluyen, pero no se limitan a, lacZ, GFP, luciferasa y cloranfenicol acetiltransferasa. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.416.849. Muchos elementos indicadores y genes marcadores son conocidos en la técnica y se consideran para su uso en las invenciones descritas en la presente memoria.

Como se emplea en la presente memoria, el término "transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por una ARN polimerasa de una secuencia de ADN. "Transcrito de ARN mensajero (ARNm)" se refiere al ARN que no tiene intrones y que puede ser traducido a proteína por la célula.

Como se emplean en la presente memoria, los términos "interferente pequeño" o "ARN interferencia pequeño" o "ARNip" se refieren a un dúplex de ARN de nucleótidos que se dirige a un gen deseado y que son capaces de inhibir la expresión de un gen con el que comparten homología. El dúplex de ARN comprende dos ARN complementarios de hebra sencilla de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos que forman 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de bases y poseen salientes 3' de dos nucleótidos. El dúplex de ARN está formado por el emparejamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. El ARNip está "dirigido" a un gen porque la secuencia de nucleótidos de la porción dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen elegido como diana. En algunas realizaciones, la longitud del dúplex de los ARNip es inferior a 30 nucleótidos. El dúplex puede tener 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. La longitud del dúplex puede ser una longitud de 17-25 nucleótidos. El ARN dúplex se puede expresar en una célula a partir de una sola construcción.

Como se emplea en la presente memoria, el término "ARNhc" (ARN de horquilla corta) se refiere a un dúplex de ARN en donde una porción del ARNip es parte de una estructura en horquilla (ARNhc). Además de la porción dúplex, la estructura de horquilla puede contener una porción de bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede tener una longitud variable. En algunas realizaciones, el bucle tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura de la horquilla también puede contener porciones salientes de 3' o 5'. En algunos aspectos, el saliente es un saliente 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. En un aspecto de esta invención, una secuencia de nucleótidos en el vector sirve como molde para la expresión de un ARN de horquilla corto, que comprende una región efectora, una región de bucle y una región antisentido. Tras la expresión, las regiones efectora y antisentido forman un dúplex. Es este dúplex, que forma el ARNhc, el que hibrida, por ejemplo, con el ARNm de *de Sav1* y reduce la expresión de *Sav1*.

Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a mejorar al menos un síntoma, curar y/o prevenir el desarrollo de una enfermedad o trastorno tal como, por ejemplo, pero no limitado a, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía, etc.

Como se emplea en la presente memoria, el término "vector" se refiere a cualquier vector viral o no viral, así como a cualquier plásmido, cósmido, fago o vector binario en forma lineal o circular de hebra doble o sencilla que puede o no ser auto-transmisible o movilizable, y que puede transformar células anfitrionas procarióticas o eucarióticas mediante la integración en el genoma celular o que puede existir extracromosómicamente (*p. ej.*, plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Se considera cualquier vector conocido en la técnica para su uso en la práctica de esta invención.

## II. Aspectos generales

Los aspectos de la descripción se refieren a métodos y composiciones para el tratamiento de afecciones médicas cardíacas, incluyendo aquellas en las que los cardiomiocitos necesitan ser renovados. Los cardiomiocitos pueden necesitar renovación por cualquier motivo, incluyendo enfermedad, afección genética subyacente y/o trauma, por ejemplo. En aspectos específicos, el individuo presenta lesión de los cardiomiocitos, necrosis y/o fibrosis del corazón, tal como la distrofia muscular de Duchenne (DMD), por ejemplo.

En aspectos específicos, se emplean métodos y composiciones para un individuo con DMD. El corazón enfermo en pacientes con DMD tiene una lesión generalizada de los cardiomiocitos, necrosis y fibrosis. De manera similar, los ratones mutantes *mdx* que sirven como modelo para la DMD humana tienen cardiomiopatía con insuficiencia cardíaca y fibrosis severa y dilatación. La ruta de señalización de Hippo se identificó como un represor crítico de la regeneración cardíaca después de una amputación tisular o un infarto de miocardio (Heallen et al., 2013). Además, los datos indican que Hippo regula la transcripción de los genes relacionados con la DMD en el corazón. Tomados en conjunto, se consideró que la señalización de Hippo inhibe una respuesta de reparación a la cardiomiopatía de Duchenne. Como se muestra en la presente memoria, los corazones *mdx* neonatales no se regeneran después de la resección del vértice, en contraste con los corazones neonatos regenerativos de tipo salvaje. En particular, esta capacidad regenerativa se restauró en gran medida en Hippo; corazones mutantes para el compuesto *mdx*, lo que indica la supresión genética del fenotipo del corazón *mdx*. En conjunto, la modulación de la señalización de Hippo sirve como un enfoque poderoso para reparar el músculo cardíaco, tal como el músculo cardíaco con DMD.

Además de mejorar la cardiomiopatía por DMD, se muestra en la presente memoria que la inhibición de la ruta de Hippo después de la insuficiencia cardíaca (HF) establecida mejoró drásticamente la función cardíaca en un modelo de ratón de cardiomiopatía isquémica y HF. Los ratones con cardiomiopatía isquémica establecida y HF se generaron esperando tres semanas después de la inducción de un infarto de miocardio para agotar la ruta de Hippo. En el punto temporal de tres semanas, se inactivó la ruta de Hippo y se realizó un seguimiento de la función cardíaca a intervalos de dos semanas mediante ecocardiografía. La deficiencia de Hippo mejora considerablemente la reparación cardíaca en el contexto de la HF establecida, de modo que los mutantes para Hippo recuperan una función igual a la de los controles simulados no operados.

En la presente memoria se demuestra un conjunto único, pero ilustrativo, de tres ARN de horquilla corta (ARNhc)

que se dirigen específicamente al miembro de la ruta de Hippo Salvador (*Sav1*). Los ARNhc proporcionan una reducción selectiva en los niveles de ARNm de *Sav1* similar a una modificación genética para reducir la expresión del gen en un modelo de ratón. En realizaciones específicas, los ARNhc se pueden suministrar utilizando un vector AAV9 (Virus Adeno Asociado de serotipo 9) que tiene tropismo para el corazón. Las realizaciones particulares de la descripción contemplan la secuencia de ARNhc de nucleótidos específicos para la diana *Sav1*.

### III. Salvador

En aspectos particulares, el miembro de la ruta de Hippo Salvador (familia WW de salvador que contiene la proteína 1) se dirige al ARNhc en tratamientos para afecciones médicas cardíacas. El gen puede denominarse homólogo de salvador 1, Salv, SAV1, SAV, WW45 o WWP4. Se proporciona un ácido nucleico representativo en el número de acceso de GenBank® CR457297.1, y se proporciona una secuencia de proteína representativa en el número de acceso de GenBank® Q9H4B6.

El gen codifica una proteína que incluye 2 dominios WW (un dominio de proteína modular que media interacciones específicas con ligandos de proteína) y una región de bobina enrollada. Se expresa de forma ubicua en tejidos adultos. También incluye un dominio SARAH (*Sav/Rassf/Hpo*) en el extremo C (tres clases de supresores de tumores eucarióticos que dan su nombre al dominio). En las familias *Sav* (Salvador) y *Hpo* (Hippo), el dominio SARAH media la transducción de señales desde *Hpo* a través de la proteína de andamiaje *Sav* hasta el componente *Wts* (verrugas) aguas abajo; la fosforilación de *Wts* por *Hpo* desencadena la detención del ciclo celular y la apoptosis al regular por disminución la ciclina E, Diap 1 y otras dianas. El dominio SARAH también puede estar implicado en la dimerización.

### IV. Ejemplos de métodos de tratamiento

En aspectos de la descripción, existen métodos para el tratamiento de un individuo con una afección cardíaca utilizando ácidos nucleicos que se dirigen al gen *Sav1*. En aspectos específicos, la afección cardíaca incluye cardiomiocitos que necesitan renovación, ya sea debido a una enfermedad (contraída o genética, por ejemplo) ya sea debido a un trauma, por ejemplo. En aspectos específicos, existe un corazón enfermo en el individuo. El individuo puede tener cardiomiocitos que necesitan renovación por cualquier motivo. Los cardiomiocitos en el individuo pueden ser apoptóticos, autofágicos, o el tejido puede ser necrótico, por ejemplo.

En aspectos específicos, el individuo puede tener insuficiencia cardíaca, fibrosis del corazón, cardiomiopatía, cardiomiopatía isquémica, necrosis miocárdica, miocardiopatía dilatada, degeneración de fibras musculares esqueléticas y/o cardíacas, cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía relacionada con la edad, etc. En aspectos específicos, los métodos de la descripción facilitan la facultad de los cardiomiocitos para volver a entrar en el ciclo celular. El individuo puede necesitar una función cardíaca mejorada por cualquier motivo, incluso debido a su edad, enfermedad, trauma, etc.

En aspectos particulares, al individuo se le proporciona una cantidad eficaz de ácido nucleico que se dirige a *Sav1*, de modo que los cardiomiocitos existentes en el individuo puedan renovarse. En otros aspectos, se le proporcionan al individuo ácidos nucleicos que se dirigen a *Sav1*, en donde los ácidos nucleicos ya están presentes en una célula en el momento del suministro, incluyendo un cardiomiocito o una célula madre, por ejemplo.

Las composiciones de ácido nucleico de la descripción se pueden proporcionar al individuo una vez o más de una vez. El suministro se puede producir tras el diagnóstico de una necesidad de renovación de cardiomiocitos o tras el diagnóstico de una afección cardíaca. Se puede producir el suministro a una persona que es susceptible de una afección cardíaca, por ejemplo que tiene antecedentes personales o familiares, sobrepeso, colesterol alto y/o hábito de fumar. El suministro puede cesar o continuar una vez que se determina que un síntoma cardíaco mejora y/o que los cardiomiocitos se renuevan.

### V. Ácidos nucleicos que se dirigen a *Sav1*

En realizaciones particulares, hay uno o más ácidos nucleicos que se dirigen a *Sav1*, de manera que la expresión de *Sav1* se reduce de forma detectable. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN, pero en realizaciones específicas, los ácidos nucleicos son ARN, tal como ARNhc.

En una realización, el ARNhc es una molécula de ARN de "horquilla" o tallo-bucle, que comprende una región efectora, una región bucle y una región antisentido complementaria a la región efectora. En otras realizaciones, el ARNhc comprende dos moléculas de ARN distintas que están asociadas de forma no covalente para formar un dúplex. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.195.916.

En casos particulares, el ARNhc es una molécula de ARN de hebra sencilla que forma una estructura de tallo-bucle *in vivo*, y puede tener una longitud de aproximadamente 40 a 135 nucleótidos. En al menos ciertos casos, el bucle de 5 a 19 nucleótidos conecta los dos fragmentos de ARN complementarios de 19 a 29 nucleótidos de longitud que crean el tallo de doble hebra mediante el emparejamiento de bases. La transcripción y la síntesis de ARNhc *in vivo*

está dirigida por el promotor Pol III, y a continuación el ARNhc resultante es escindido por Dicer, una enzima ARNasa III, para generar el ARNip maduro. El ARNip maduro entra en el complejo RISC. Por lo tanto, en realizaciones específicas, el ARNhc para la inhibición de la expresión de *Sav1* de acuerdo con la presente descripción contiene secuencias de nucleótidos efectoras y antisentido.

5 Aunque la presente descripción proporciona ejemplos específicos de ARNhc dirigidos a *Sav1* (SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12), se pueden emplear otras composiciones de ARNhc. Los expertos en la técnica pueden identificar secuencias apropiadas de cualquier manera, pero en realizaciones específicas se puede alinear el gen de dos o más organismos, escanear las regiones solapantes para la secuencia que codifica los aminoácidos, revisar la secuencia para determinar regiones de una cierta longitud (tal como, por ejemplo, 19 nt), revisar la secuencia para determinar aquellas que tienen repeticiones de no más de 3 nt, y/o secuencias de potencial blast para asegurar que haya una homología <15 pb con cualquier otra parte del genoma humano.

10 Cuando se dirige apropiadamente a través de su secuencia de nucleótidos a un ARNm específico en las células, el ARNhc suprime específicamente la expresión génica de *Sav1*. En al menos algunos casos, los ARNhc pueden reducir el nivel celular de los ARNm específicos y disminuir el nivel de proteínas codificadas por tales ARNm. Los ARNhc utilizan la complementariedad de secuencias para dirigirse a un ARNm para su destrucción, y son específicos de la secuencia. Por lo tanto, pueden ser altamente específicos de la diana, y en mamíferos se ha demostrado que se dirigen a los ARNm codificados por diferentes alelos del mismo gen.

15 En realizaciones específicas, un ARNhc que corresponde a una región de un gen diana que va a ser regulado por disminución o modificado genéticamente para reducir la expresión del gen se expresa en la célula. El dúplex de ARNhc puede tener una secuencia sustancialmente idéntica (por ejemplo, al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico) a la secuencia del gen diana para la regulación por disminución. En realizaciones específicas, no hay más de 5 emparejamientos erróneos entre la secuencia del ARNhc y la secuencia diana de *Sav1*. En realizaciones específicas, se utiliza una homología de un mínimo de 18 pb para la región de complementariedad entre la secuencia de ARNhc y su diana. En realizaciones particulares, se utilizan ensayos específicos para someter a prueba los emparejamientos erróneos adecuados para el ARNhc y su diana. En ciertas realizaciones, se puede emplear un algoritmo para identificar los emparejamientos erróneos adecuados para el ARNhc y su diana.

20 Por lo tanto, se debe observar que no se requiere una complementariedad completa entre la secuencia diana y el ARNhc. Es decir, el ARNip antisentido resultante (después del procesamiento del ARNhc) es suficientemente complementario con la secuencia diana. La hebra efectora es sustancialmente complementaria a la hebra antisentido para la reasociación (hibridación) con la hebra antisentido en condiciones biológicas.

25 En particular, la secuencia polinucleotídica complementaria de ARNhc se puede diseñar para que hibride específicamente con una región particular de una proteína o ARNm diana deseados para interferir en la replicación, la transcripción o la traducción. El término "hibridar" o variaciones del mismo, se refiere a un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento entre una secuencia de nucleótidos antisentido y un ADN o ARNm diana, de modo que se produzca una unión estable y específica entre ellos. En particular, es deseable un 100% de complementariedad o emparejamiento, pero no es necesario. La hibridación específica se produce cuando se produce una hibridación suficiente entre la secuencia de nucleótidos antisentido y sus ácidos nucleicos diana deseados en ausencia sustancial de unión no específica de la secuencia de nucleótidos antisentido a secuencias no diana en condiciones predeterminadas, *p. ej.*, para fines de tratamiento *in vivo*, preferiblemente en condiciones fisiológicas. Preferiblemente, la hibridación específica da como resultado la interferencia con la expresión normal del producto génico codificado por el ADN o ARNm diana.

30 Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos antisentido se puede diseñar para que hibride específicamente con las regiones reguladoras de la replicación o la transcripción de un gen diana, o las regiones reguladoras de la traducción tales como la región de inicio de la traducción y las uniones exón/intrón, o las regiones codificantes de un ARNm diana. En realizaciones específicas, el ARNhc se dirige a una secuencia que codifica la región N-terminal de la proteína *Sav1*, secuencia que codifica la mitad de la proteína *Sav1*, o secuencia que codifica la región C-terminal de la proteína *Sav1*.

#### ARNhc: Síntesis

35 Como se conoce generalmente en la técnica, los oligonucleótidos utilizados comúnmente son oligómeros o polímeros de ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico que tienen una combinación de bases de purina y pirimidina naturales, azúcares y enlaces covalentes entre nucleósidos que incluyen un grupo fosfato en un enlace fosfodiéster. Sin embargo, se observa que el término "oligonucleótidos" también abarca varios miméticos y derivados no naturales, es decir, formas modificadas, de oligonucleótidos naturales como se describe a continuación.

40 Las moléculas de ARNhc de la descripción se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Estos incluyen mecanismos para sintetizar químicamente oligodesoxirribonucleótidos y oligorribonucleótidos bien conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, síntesis

química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN se pueden generar mediante transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARNhc. Tales secuencias de ADN pueden ser incorporadas a una gran variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, las construcciones de ADNc antisentido que sintetizan ARNhc de forma constitutiva o inducible, dependiendo del promotor utilizado, se pueden introducir de forma estable en líneas celulares.

Las moléculas de ARNhc se pueden sintetizar químicamente utilizando ribonucleósido fosforamiditas protegidas adecuadamente y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los servicios de síntesis de ARNhc personalizados están disponibles en proveedores comerciales tales como Ambion (Austin, Texas, EE. UU.) y Dharmacon Research (Lafayette, Colorado, EE. UU.). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Se pueden introducir varias modificaciones bien conocidas de las moléculas de ADN como un medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones útiles incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso del fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de conexiones fosfodiésterasa dentro de la cadena principal del oligodesoxirribonucleótido. Se puede construir un ácido nucleico antisentido de la invención utilizando la síntesis química o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Un oligonucleótido antisentido se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de manera diferente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y efector (*p. ej.*, se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina).

Las moléculas de ARNhc de la invención pueden ser varios equivalentes modificados de las estructuras de cualquier ARNhc de *Sav1*. Un "equivalente modificado" significa una forma modificada de una molécula de ARNip particular que tiene la misma especificidad por la diana (*es decir*, que reconoce las mismas moléculas de ARNm que complementan la molécula de ARNip particular no modificada). Por lo tanto, un equivalente modificado de una molécula de ARNip no modificada puede tener ribonucleótidos modificados, es decir, ribonucleótidos que contienen una modificación en la estructura química de una base nucleotídica no modificada, azúcar y/o fosfato (o enlace fosfodiéster). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Preferiblemente, las moléculas de ARNhc modificadas contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales, *p. ej.*, cadenas principales modificadas que contienen fósforo y cadenas principales no fosforadas, tales como cadenas principales de morfolino; cadenas principales de siloxano, sulfuro, sulfóxido, sulfona, sulfonato, sulfonamida y sulfamato; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidacino; cadenas principales de amida, y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Los ejemplos de cadenas principales modificadas que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a fosforotioatos, fosforoditioatos, fosforotioatos quirales, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, alquil fosfonatos, tionalquil fosfonatos, fosfinatos, fosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquil fosfotriésteres, y borano fosfatos y diversas formas salinas de los mismos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Los ejemplos de las cadenas principales que no contienen fósforo descritas anteriormente son conocidos en la técnica, *p. ej.*, Patente de Estados Unidos Núm. 5.677.439. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Las formas modificadas de compuestos de ARNhc también pueden contener nucleósidos modificados (análogos de nucleósidos), *es decir*, bases de purina o pirimidina modificadas, *p. ej.*, pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxi benceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidinas (*p. ej.*, 5-metilcitidina), 5-alquiluridinas (*p. ej.*, ribotimidina), 5-*halouridina* (*p. ej.*, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (*p. ej.*, 6-metiluridina), 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-(carboxihidroxi metil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetil uridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 4-acetilcitidina, 3-metilcitidina, propino, quesosina, wibutosina, wibutoxosina, beta-D-galactosilqueosina, purinas sustituidas en N-2, N-6 y O, inosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 2-metil-N-6-isopentenil adenosina, beta-D-manosilqueosina, ácido uridino-5-oxiacético, 2-tiocitidina, derivados de treonina, y similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Además, los compuestos de ARNhc modificados también pueden tener radicales de azúcar sustituidos o modificados, *p. ej.*, radicales de azúcar 2'-O-metoxietilo. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Además, para ayudar en el diseño de los ARNhc para el silenciamiento eficaz de cualquier gen diana, varias compañías de suministro mantienen herramientas de diseño basadas en la red que utilizan estas pautas generales

para "seleccionar" los ARNhc cuando se presentan con el ARNm o la secuencia de ADN codificante del gen diana. Se pueden encontrar ejemplos de tales herramientas en los sitios de la red de Dharmacon, Inc. (Lafayette, Colo.), Ambion, Inc. Austin, Tex. Como ejemplo, la selección de ARNhc implica la elección de un sitio/secuencia únicos para el gen diana (*es decir*, secuencias que no comparten una homología significativa con otros genes distintos al que se está seleccionando como diana), de modo que otros genes no sean atacados inadvertidamente por el mismo ARNhc diseñado para esta secuencia diana particular.

Otro criterio a considerar es si la secuencia diana incluye o no un sitio polimórfico conocido. Si es así, los ARNhc diseñados para dirigirse a un alelo en particular pueden no dirigirse eficazmente a otro alelo, ya que los emparejamientos erróneos de una sola base entre la secuencia diana y su hebra complementaria en un ARNhc dado pueden reducir en gran medida la eficacia del ARNi inducido por ese ARNhc. Dada esa secuencia diana y tales herramientas de diseño y criterios de diseño, un experto en la materia informado de la presente descripción debería ser capaz de diseñar y sintetizar compuestos de ARNip adicionales útiles en la reducción del nivel de ARNm de *Sav1*.

#### ARNhc: Administración

La presente descripción proporciona una composición de un polímero o excipiente y uno o más vectores que codifican una o más moléculas de ARNhc. El vector se puede formular en una composición farmacéutica con portadores adecuados y se puede administrar a un mamífero utilizando cualquier ruta de administración adecuada.

Debido a esta precisión, se pueden reducir o eliminar los efectos secundarios típicamente asociados con los medicamentos tradicionales. Además, los ARNhc son relativamente estables y, al igual que los antisentido, también se pueden modificar para lograr características farmacéuticas mejoradas, tales como una mayor estabilidad, capacidad de suministro y facilidad de fabricación. Además, debido a que las moléculas de ARNhc obtienen ventaja de una ruta celular natural, *es decir*, la interferencia de ARN, son muy eficaces para destruir las moléculas de ARNm elegidas como diana. Como resultado, es relativamente fácil lograr una concentración terapéuticamente eficaz de un compuesto de ARNhc en un sujeto. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.410.944.

Los compuestos de ARNhc se pueden administrar a mamíferos por diversos métodos a través de diferentes rutas. También se pueden suministrar directamente a un órgano o tejido en particular mediante cualquier método de administración localizada adecuado, tal como la inyección directa en un tejido diana. Alternativamente, se pueden administrar encapsulados en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas.

La inhibición *in vivo* de la expresión génica específica por ARNi inyectado por vía intravenosa se ha logrado en diversos organismos, incluidos los mamíferos. En realizaciones particulares, las moléculas de ARNhc están comprendidas en un vector, incluyendo un vector viral o no viral. En realizaciones específicas, el vector no es integrativo, aunque en otras realizaciones es integrativo. Los vectores virales pueden ser lentivirales, adenovirales, virales adenoasociados y retrovirales, por ejemplo. Los vectores no virales incluyen plásmidos. En realizaciones específicas, se emplea el vector AAV9 (Piras et al., 2013). Los vectores pueden ser suministrados a un individuo sistémicamente o localmente. En ciertas realizaciones, los vectores utilizan promotores específicos de tejido o específicos de célula, tales como promotores específicos de cardiomiocitos. En aspectos específicos, los vectores se suministran por medio de inyección local.

Una vía de administración de moléculas de ARNhc de la invención incluye la inyección directa del vector en un sitio de tejido deseado, tal como, por ejemplo, en tejido cardíaco enfermo o en tejido cardíaco isquémico.

En general, se incluye en la descripción un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos y un promotor unido operablemente a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un primer segmento, un segundo segmento ubicado inmediatamente 3' del primer segmento, y un tercer segmento localizado inmediatamente 3' del segundo segmento, en donde el primer y el tercer segmentos tienen cada uno menos de 30 pares de bases de longitud y cada uno más de 10 pares de bases de longitud, y en donde la secuencia del tercer segmento es el complemento de la secuencia del primer segmento. El segundo segmento, ubicado inmediatamente 3' del primer segmento, codifica una estructura de bucle que contiene 4-10 nucleótidos (*es decir*, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). La secuencia de ácido nucleico se expresa como un ARNip y funciona como una molécula de ARN de horquilla corta (ARNhc) dirigida contra una secuencia de ácido nucleico designada.

Más específicamente, la presente descripción incluye composiciones y métodos para reducir selectivamente la expresión del producto génico de *Sav1*. La presente descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNhc dirigido contra *Sav1*. El ARNhc forma una estructura de horquilla que comprende una estructura dúplex y una estructura de bucle. La estructura del bucle puede contener de 4 a 10 nucleótidos, tal como 4, 5 o 6 nucleótidos. El dúplex tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, tal como de 10 a 27 nucleótidos. El ARNhc puede comprender además una región saliente. Tal saliente puede ser una región saliente 3' o una región saliente 5'. La región saliente puede tener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos de longitud.

La descripción proporciona, *entre otros*, un método para tratar a un mamífero administrando al mamífero una composición que comprende uno o más vectores descritos en la presente memoria. En un aspecto de la descripción, se pueden administrar simultánea o consecutivamente al mamífero múltiples vectores, cada uno de los cuales codifica un ARNhc diferente (dirigido a una región diferente de la secuencia de ácido nucleico de *Sav1*). Un vector individual puede codificar múltiples ARNhc dirigidos a diferentes áreas del mismo gen; *es decir*, que comprende dos o más de un ARNhc que comprende SEQ ID NO: 10 y un ARNhc que comprende SEQ ID NO: 11 y un ARNhc que comprende SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, un vector individual puede codificar múltiples copias de ARNhc que comprenden SEQ ID NO: 10 o múltiples copias de ARNhc que comprenden SEQ ID NO: 11 o múltiples copias de ARNhc que comprenden SEQ ID NO: 12, en cualquier proporción.

El vector de la invención puede comprender además un promotor. Los ejemplos de promotores incluyen promotores regulables y promotores constitutivos. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor de CMV o RSV. El vector puede comprender además una señal de poliadenilación, tal como una señal de poliadenilación mínima sintética. Muchos de estos promotores son conocidos en la técnica y están previstos para su uso en esta invención. En otros casos, el promotor puede ser un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de tejido cardíaco.

El vector puede comprender adicionalmente uno o más genes marcadores o genes informadores. Se conocen en la técnica muchos genes marcadores y genes informadores. La presente invención contempla el uso de uno o más genes marcadores y/o genes informadores conocidos en la técnica en la práctica de la invención. Los genes marcadores o genes informadores proporcionan un método para rastrear la expresión de uno o más genes vinculados. Los genes marcadores o los genes informadores tras la expresión dentro de la célula, proporcionan productos, generalmente proteínas, detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros. Los productos de expresión génica, ya sean del gen de interés, de los genes marcadores o de los genes informadores también se pueden detectar mediante marcaje. Las marcas previstas para su uso en las invenciones incluidas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes, reactivos densos a electrones, enzimas (por ejemplo, como las empleadas comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que se pueden volver detectables, *p. ej.*, incorporando una marca radiactiva al péptido o se pueden utilizar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 7.419.779.

En un aspecto de la descripción, uno o más vectores que comprenden uno o más de los ARNhc de la invención se pueden volver a administrar un número ilimitado de veces después de una primera administración en cualquier intervalo o intervalos de tiempo después de la primera administración.

#### ARNhc: Composiciones farmacéuticas

Los ácidos nucleicos que codifican el ARNhc de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas, que se preparan de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. Véase, *p. ej.*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa). Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del vector que codifica ARNhc. Estas composiciones pueden comprender, además del vector, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. El portador puede adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, *p. ej.*, intravenosa, oral, intramuscular, subcutánea, intratecal, epineural o parenteral.

Cuando los vectores de la invención se preparan para su administración, se pueden combinar con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables para formar una formulación farmacéutica o una forma de dosificación unitaria. El total de ingredientes activos en tales formulaciones incluye de 0,1 a 99,9% en peso de la formulación.

En otro aspecto de la invención, los vectores de la invención se pueden formular adecuadamente e introducir en el entorno de la célula por cualquier medio que permita que una porción suficiente de la muestra entre en la célula para inducir el silenciamiento génico, si es que se produce. Muchas formulaciones para vectores son conocidas en la técnica y se pueden utilizar siempre que los vectores entren en las células diana para que puedan actuar.

Por ejemplo, los vectores se pueden formular en soluciones tampón tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato que comprenden liposomas, estructuras micelares y cápsidas. Las formulaciones farmacéuticas de los vectores de la invención también pueden adoptar la forma de una solución o dispersión acuosa o anhidra, o alternativamente la forma de una emulsión o suspensión. Las formulaciones farmacéuticas de los vectores de la presente invención pueden incluir, como ingredientes opcionales, agentes solubilizantes o emulsionantes, y sales del tipo que son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitantes específicos de los portadores y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua y soluciones salinas fisiológicamente aceptables. Otros portadores farmacéuticamente aceptables para preparar una composición para su administración a un individuo incluyen, por ejemplo, disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol o ésteres

orgánicos inyectables. Un portador farmacéuticamente aceptable puede contener compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o aumentar la absorción del vector codificante de ARNhc. Otros vehículos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores o excipientes, solución salina, soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol, o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El portador también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservantes.

Se reconocerá que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la ruta de administración de la composición. La composición que contiene los vectores también puede contener un segundo reactivo, tal como un reactivo de diagnóstico, una sustancia nutricional, una toxina o un agente terapéutico adicional. Muchos agentes útiles en el tratamiento de la enfermedad cardíaca son conocidos en la técnica y se contemplan para su uso junto con los vectores de esta invención.

Las formulaciones de vectores con lípidos catiónicos se pueden utilizar para facilitar la transfección de los vectores en células. Por ejemplo, se pueden utilizar lípidos catiónicos, tales como lipofectina, derivados catiónicos de glicerol, y moléculas policatiónicas, tales como polilisina. Los lípidos adecuados incluyen, por ejemplo, Oligofectamina y Lipofectamina (Life Technologies) que se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se deben introducir cantidades adecuadas de vector y estas cantidades se pueden determinar empíricamente utilizando métodos convencionales. Típicamente, las concentraciones eficaces de especies de vectores individuales en el entorno de una célula serán aproximadamente 50 nanomolar o menos 10 nanomolar o menos, o composiciones en las cuales se pueden utilizar concentraciones de aproximadamente 1 nanomolar o menos. En otros aspectos, los métodos utilizan una concentración de aproximadamente 200 picomolar o menos e incluso se puede utilizar una concentración de aproximadamente 50 picomolar o menos en muchas circunstancias. Un experto en la técnica puede determinar la concentración eficaz para cualquier sujeto mamífero particular utilizando métodos convencionales.

El ARNhc se administra preferiblemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad real administrada y la velocidad y período de tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que esté siendo tratado. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosis, la cronología, etc., es responsabilidad de los médicos generales o especialistas, y generalmente tiene en cuenta el trastorno, la afección o la enfermedad a tratar, la afección del sujeto mamífero individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los profesionales. Se pueden encontrar ejemplos de técnicas y protocolos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa).

Alternativamente, se pueden utilizar terapias de direccionamiento para suministrar los vectores codificantes de ARNhc más específicamente a ciertos tipos de células, mediante el uso de sistemas de direccionamiento tales como anticuerpos o ligandos específicos de células. La orientación puede ser deseable por una variedad de razones, *p. ej.*, si el agente fuera inaceptablemente tóxico, o si de otro modo necesitara una dosis demasiado alta, o si de otra manera no pudiera ingresar en las células diana.

#### ARNhc: Terapia génica

El ARNip también se puede administrar a células de mamíferos, particularmente células humanas, mediante un enfoque de terapia génica, utilizando un vector de ADN a partir del cual los compuestos de ARNip, *p. ej.*, en forma de horquilla corta (ARNhc), se pueden transcribir directamente. Estudios recientes han demostrado que, si bien los ARNip de doble hebra son muy eficaces en la mediación de ARNi, los RNA cortos, de hebra sencilla, en forma de horquilla también pueden mediar en ARNi, probablemente porque se pliegan en dúplex intramoleculares que se procesan a ARNip de doble hebra por enzimas celulares. Este descubrimiento tiene implicaciones importantes y de gran alcance, ya que la producción de tales ARNhc se puede lograr fácilmente *in vivo* mediante la transfección de células o tejidos con vectores de ADN que llevan repeticiones invertidas cortas separadas por un pequeño número (*p. ej.*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) nucleótidos que dirigen la transcripción de tales ARN de horquilla corta. Además, si se incluyen mecanismos para dirigir la integración del vector o un segmento de vector en el genoma de la célula anfitriona, o para asegurar la estabilidad del vector de transcripción, el ARNi causado por los ARNhc codificados se puede hacer estable y heredable. Estas técnicas no solo se han utilizado para "modificar genéticamente para reducir" la expresión de genes específicos en células de mamíferos, sino que ahora se han empleado con éxito para modificar genéticamente para reducir la expresión de transgenes expresados de forma exógena, así como genes endógenos en el cerebro y el hígado de ratones vivos.

La terapia génica se lleva a cabo de acuerdo con métodos generalmente aceptados que se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.837.492 y 5.800.998 y las referencias citadas en las mismas. Los vectores en el contexto de la terapia génica están destinados a incluir aquellas secuencias

polinucleotídicas que contienen secuencias suficientes para expresar un polinucleótido codificado en ellas. Si el polinucleótido codifica un ARNhc, la expresión producirá la secuencia del polinucleótido antisentido. Por lo tanto, en este contexto, la expresión no requiere que el producto proteico sea sintetizado. Además del ARNhc codificado en el vector, el vector también contiene un promotor funcional en las células eucarióticas. La secuencia de ARNhc está bajo el control de este promotor. Los promotores eucarióticos adecuados incluyen los descritos en otras partes de la presente memoria y los conocidos en la técnica. El vector de expresión también puede incluir secuencias, tales como marcadores seleccionables, genes informadores y otras secuencias reguladoras utilizadas convencionalmente.

Por consiguiente, la cantidad de ARNhc generado *in situ* se regula controlando factores tales como la naturaleza del promotor utilizado para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico (*es decir*, si el promotor es constitutivo o regulable, fuerte o débil) y el número de copias de la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de ARNhc que están en la célula.

Para la expresión del ARNhc de *Sav1*, un promotor está unido operativamente a una secuencia de ARNhc. Como se emplea en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ADN que regula la expresión de la secuencia del gen diana que está unida operativamente a la secuencia del promotor en una determinada célula anfitriona. El término "unido operativamente" significa que un fragmento de ácido nucleico está unido a otro fragmento de ácido nucleico, de modo que la función o expresión del mismo se ve afectada por el otro fragmento de ácido nucleico. El casete de expresión de la presente invención puede comprender adicionalmente varias secuencias reguladoras de la expresión, tales como una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuado, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El promotor utilizado en la presente invención puede ser un promotor constitutivo que induce de forma constitutiva la expresión de un gen diana, o un promotor inducible que induce la expresión de un gen diana en una posición y un punto temporal dados. Los ejemplos específicos del promotor pueden incluir el promotor U6, el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor SV40, el promotor CAG (Hitoshi Niwa et al., *Gene*, 108: 193-199, 1991; y Monahan et al., *Gene Therapy*, 7:24-30, 2000), el promotor CaMV 35S (Odell et al., *Nature* 313: 810-812, 1985), el promotor Rsyn7 (solicitud de patente de EE. UU. Núm. de serie 08/991.601), el promotor de ubiquitina (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 12: 619-632, 1989), el promotor de ALS (solicitud de patente de EE.UU. Núm. de serie 08/409.297) y similares. También se describen promotores utilizables en las Patentes de EE. UU. Núm. 5.608.149, 5.608.144, 5.604.121, 5.569.597, 5.466.785, 5.399.680, 5.268.463, 5.608.142, *etc.*

El vector recombinante de la presente descripción se puede introducir en una célula anfitriona, utilizando un método convencional conocido en la técnica. La célula anfitriona se puede emplear para la manipulación del vector o como un medio para transferir el vector a un individuo. Preferiblemente, la incorporación intracelular del vector a la célula anfitriona se puede llevar a cabo mediante un método convencional conocido en la técnica, tal como cloruro de calcio, bombardeo de microproyectiles, electroporación, fusión mediada por PEG, microinyección, método mediado por liposomas y similares.

Los ejemplos de la célula anfitriona que se puede utilizar en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, células procarióticas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus*, células eucarióticas inferiores tales como hongos (*p. ej.*, *Aspergillus*), levaduras (*p. ej.*, *Pichia pastoris*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* y *Neurospora crassa*, y células eucarióticas superiores tales como células de insectos, células de plantas, células de mamíferos. Preferiblemente, la célula anfitriona puede ser una célula humana.

Mientras tanto, el ADN recombinante convencional y los mecanismos de clonación molecular utilizados en la presente descripción son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar en la siguiente bibliografía: Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989); Silhavy, T.J., Bannan, M.L. y Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); y Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del vector recombinante de la presente invención y un fármaco cardíaco solo o combinado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Como se emplea en la presente memoria, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es capaz de producir la respuesta terapéutica deseada mayor que la mostrada por un control negativo. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis suficiente para prevenir o tratar la enfermedad cardiovascular.

Una cantidad terapéuticamente eficaz del vector recombinante en la presente descripción puede estar en un intervalo de 0,0001 a 100 mg/día/kg (peso corporal), preferiblemente de 0,005-0,05 mg/día/kg. Sin embargo, una dosis eficaz del fármaco puede variar según diversos factores, tales como los tipos y la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso, la salud y el sexo de los pacientes, las vías de administración y la duración del tratamiento.

Como se emplea en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que el compuesto es fisiológicamente aceptable y no causa reacciones alérgicas (tales como trastornos gastrointestinales y vértigo) o reacciones similares sin efectos inhibidores sobre la acción de un ingrediente activo, cuando se administra a seres humanos o animales. Los ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable pueden incluir todos los tipos de disolventes, medios de dispersión, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, composiciones acuosas, liposomas, microesferas y microsomas.

Mientras tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular de manera apropiada junto con cualquier portador adecuado mediante un método convencional conocido en la técnica, dependiendo de las rutas de administración del fármaco. No hay un límite particular para la vía de administración de la composición farmacéutica. Por lo tanto, la composición de fármaco de acuerdo con la presente invención se puede administrar *por vía* oral o parenteral. Los ejemplos de la vía de administración parenteral pueden incluir las vías transdérmica, intranasal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea e intravenosa.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra *por vía* oral, la composición farmacéutica junto con cualquier vehículo aceptable por vía oral se puede formular en diversas formas de dosificación tales como polvos, gránulos, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, soluciones, geles, jarabes, suspensiones y obleas, de acuerdo con un método convencional conocido en la técnica. Los ejemplos de vehículos adecuados pueden incluir diversos tipos de cargas, por ejemplo azúcares tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol y maltitol; almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; sustancias celulósicas tales como celulosa, metil celulosa, carboximetil celulosa sódica e hidroxipropil metil celulosa; gelatina, polivinilpirrolidona (PVP) y similares. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar y ácido algínico o alginato de sodio. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, fragancias, emulsionantes y conservantes.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra *por vía* parenteral, la composición farmacéutica junto con cualquier vehículo parenteralmente aceptable se puede formular, por ejemplo, en una preparación inyectable, una preparación transdérmica o un inhalante nasal, de acuerdo con un método convencional conocido en la técnica. Tras la formulación de la preparación inyectable, se debe realizar la esterilización junto con la protección de la preparación farmacéutica frente a la contaminación microbiana, incluidas las bacterias y hongos patógenos. Los ejemplos del vehículo adecuado para la preparación inyectable pueden incluir, pero no se limitan a, disolventes o medios de dispersión que incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas de los mismos y/o aceite vegetal. Más preferiblemente, los ejemplos del vehículo adecuado pueden incluir soluciones isotónicas tales como solución de Hank, solución de Ringer, PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contiene trietanolamina, agua estéril para inyectables, etanol al 10%, propilenglicol al 40% y dextrosa al 5%. Para proteger la preparación inyectable frente a la contaminación microbiana, la preparación puede comprender adicionalmente varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcar o cloruro sódico.

En el caso de la formulación transdérmica, la composición farmacéutica de la invención se puede formular en forma de pomadas, cremas, lociones, geles, soluciones externas, pastas, linimentos o aerosoles. El término "administración transdérmica" significa que una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo contenido en una composición farmacéutica se transmite a la piel cuando la composición farmacéutica se aplica tópicamente a la piel. Estas formulaciones se describen en la bibliografía que es una guía generalmente conocida en todos los campos de la química farmacéutica (Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª edición, 1975, Mack Publishing Company, Easton, Pa).

Para la administración por inhalación, los compuestos que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, que se utilizan en un inhalador o insuflador, se pueden formular de forma que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Otros vehículos farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en la bibliografía (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más tampones (p. ej., solución salina o PBS), carbohidratos (p. ej., glucosa, manosa, sacarosa o dextrano), antioxidantes, agentes bacteriostáticos, agentes quelantes (p. ej., EDTA o glutatión), coadyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio), agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes.

Adicionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular de manera apropiada mediante un método convencional conocido en la técnica, de modo que sea posible lograr una liberación rápida, sostenida o retardada de ingredientes activos después de la administración de la composición a un mamífero.

5 Adicionalmente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar combinada con un fármaco conocido que tiene efectos terapéuticos para el tratamiento de una afección cardíaca.

### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertos aspectos no limitantes de la invención. Los expertos en la técnica entenderán que los mecanismos descritos en los siguientes ejemplos representan los mecanismos descubiertos por los autores de la presente invención que funcionan correctamente en la práctica de la invención.

10

#### EJEMPLO 1

##### LA SEÑALIZACIÓN DE HIPPO PROMUEVE LA RENOVACIÓN DE CARDIOMIOCITOS EN ADULTOS

Mientras que otros órganos tienen capacidad de regeneración, los cardiomiocitos no pueden renovarse o regenerarse lo suficiente como para reparar el corazón dañado (Kikuchi y Poss, 2012). Para investigar la hipótesis de que la señalización de Hippo es un regulador negativo de la renovación de cardiomiocitos postnatal, los autores de la presente invención inactivaron los genes *Salv* y *Lats* en cardiomiocitos adultos.

15

Para someter a prueba el papel de *Salv*, *Lats1* y *Lats2* en cardiomiocitos adultos, se utilizaron alelos nulos condicionales para los genes de Hippo y el transgén *Myh6<sup>creERT2</sup>* que dirige la actividad de *cre* de cardiomiocitos regulada por tamoxifeno (Sohal et al., 2001). Debido a que el corazón contiene múltiples tipos de células, los cardiomiocitos se visualizaron utilizando el alelo *R26<sup>mTmG</sup>* (*mTmG*), que expresa eGFP tras la activación de *cre*, para rastrear el linaje de los cardiomiocitos (Muzumdar et al., 2007). Se generaron cardiomiocitos adultos que eran mutantes para *Salv* y *Lats1/2* al inyectar tamoxifeno a ratones de tres meses (Heallen et al., 2013). Para determinar si la deficiencia de Hippo produce reentrada en el ciclo celular, a los ratones se les inyectó 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU). La incorporación de EdU nuclear, que indica una síntesis de ADN *de novo*, se detectó en cardiomiocitos modificados genéticamente para inactivar la expresión de *Salv* (*CKO*) condicional y modificados genéticamente para inactivar la expresión de *Lats1/2* *CKO* que revela una capacidad de renovación de cardiomiocitos endógenos cuando se elimina la señalización de Hippo. La cuantificación de células positivas para EdU mostró una inducción significativa de la síntesis de ADN en corazones con deficiencia de Hippo con un mayor aumento en los mutantes *Lats1/2* en comparación con los cardiomiocitos *Salv* *CKO* (Heallen et al., 2013). La reentrada en el ciclo celular también se cuantificó en núcleos de cardiomiocitos aislados utilizando el análisis FACS (Bergmann et al., 2009; Heallen et al., 2013). Los núcleos de cardiomiocitos tanto *Lats1/2* *CKO* como *Salv* *CKO* tuvieron un mayor número de cardiomiocitos que expresaban Ki-67 en comparación con los controles (Heallen et al., 2013). Estos resultados muestran que los cardiomiocitos vuelven a entrar en el ciclo celular tras la interrupción de la vía de Hippo, lo que apoya la hipótesis de que la señalización de Hippo es un regulador negativo de la renovación de cardiomiocitos adultos.

20

25

30

Se evaluó si los cardiomiocitos *Salv* *CKO* y *Lats1/2* *CKO* progresan a través de la mitosis y la citocinesis. La inmunohistoquímica se realizó con el marcador de fase M Aurora B quinasa (*Aurkb*) para determinar si se producía citocinesis en cardiomiocitos con deficiencia de Hippo. La expresión de *Aurkb* en cardiomiocitos *Lats1/2* y *Salv* *CKO* fue claramente detectable en el surco de escisión proporcionando evidencia directa de citocinesis (Heallen et al., 2013). A diferencia de los corazones con deficiencia de Hippo, no se detectó la expresión de *Aurkb* en los corazones de control.

35

40

En resumen, la inactivación de la ruta de Hippo en el corazón del ratón adulto sin estrés da como resultado una mayor renovación de los cardiomiocitos con un aumento de entrada en la fase S del miocardio y progresión a través de la mitosis (Heallen et al., 2013). Estos hallazgos descubren un papel inhibitorio para la señalización de Hippo en la renovación de cardiomiocitos adultos.

45

#### EJEMPLO 2

##### LA SEÑALIZACIÓN DE HIPPO PROMUEVE LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN ADULTO EN UN MODELO DE LESIÓN AGUDA

La resección del ápice cardíaco en los primeros seis días de vida da como resultado la regeneración cardíaca, mientras que las resecciones realizadas el día postnatal (P) 7 y más tarde producen fibrosis y cicatrización (Porrello et al., 2011).

50

Para someter a prueba la capacidad regenerativa, se realizó la resección del ápice de tamaño uniforme en la fase P8 normalmente no regenerativa en corazones de control y con deficiencia de Hippo. Para inactivar *Salv*, se les inyectaron a los ratones cuatro dosis de tamoxifeno antes y después de la resección. Tanto la fluorescencia de GFP,

que detecta la recombinación en el informador mTmG como la inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-Salv indicaron una eliminación eficaz de Salv *en* el miocardio mutante a los cuatro días de la resección (4 dpr). La evaluación de 21 corazones dpr por medio de seccionamiento en serie reveló una cicatrización severa de los corazones de control en todos, excepto algunos casos. En contraste, los corazones con deficiencia de Hippo resecados regeneraron de manera eficaz el miocardio con una reducción del tamaño de la cicatriz (Heallen et al., 2013). El ápice cardíaco regenerado se obtuvo principalmente de cardiomiocitos preexistentes.

La oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) se realizó tanto en P8 como a los dos meses de edad. En los corazones P8, después de la oclusión de LAD (LADO) hubo una recuperación funcional y una reducción del tamaño de la cicatriz cuando se analizó a los veintiún días de la oclusión. La histología también confirmó la recuperación del miocardio con menos tejido cicatricial después de LADO (Heallen et al., 2013). En los corazones adultos, hubo evidencia histológica y funcional igualmente fuerte para la regeneración de cardiomiocitos después de LADO. El Acortamiento Fraccionado y la Fracción de Eyección evaluados por ecocardiografía indicaron que a las tres semanas de LADO, los corazones adultos con deficiencia de Hippo habían recuperado una función comparable a la de los animales operados de manera simulada, lo que sugiere que los cardiomiocitos con deficiencia de Hippo tienen una mayor supervivencia y/o proliferación después de un daño isquémico (Heallen et al., 2013).

### EJEMPLO 3

#### LOS CARDIOMIOCITOS DEFICIENTES EN HIPPO PROLIFERAN EXTENSAMENTE Y ADQUIEREN PROPIEDADES MIGRATORIAS DURANTE LA REGENERACIÓN

Se evaluaron con mayor profundidad cuatro corazones dpr (P12) con deficiencia de Hippo. Cuatro horas antes de la cosecha, los corazones se pulsaron con EdU para visualizar las células que habían entrado en el ciclo celular. En los corazones de control, las células positivas para EdU se encontraron principalmente en el linaje no cardiomiocítico negativo para GFP cerca de la zona reseca y, muy probablemente, son células inflamatorias infiltrantes y fibroblastos cardíacos en proliferación. También se observaron células negativas para GFP en proliferación similares en corazones *Salv* CKO. A diferencia de los controles, los corazones resecados con *Salv* CKO tenían cardiomiocitos doblemente positivos para EdU/GFP tanto en la zona limítrofe como en las regiones distales del corazón (Heallen et al., 2013; Morikawa et al., 2014).

La deficiencia de Hippo mejora la capacidad de los cardiomiocitos para volver a entrar en el ciclo celular en todo el corazón. En los corazones mutantes *Salv* CKO, las células derivadas del linaje de cardiomiocitos se desprendieron de los cardiomiocitos de la zona del borde circundante y entraron en la zona reseca que contenía un gran número de células no cardiomiocíticas. Además, las células derivadas de miocardio positivas para GFP con deficiencia de Hippo extendieron protuberancias similares a lamelipodios. En los corazones de control, las células positivas para GFP se agruparon dentro de la zona fronteriza y no se infiltraron en la región reseca del corazón (Morikawa et al., 2014).

### EJEMPLO 4

#### YAP REGULA DIRECTAMENTE LOS GENES QUE PROMUEVEN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR Y LA REMODELACIÓN CITOSQUELÉTICA

Para obtener información adicional sobre las dianas directas de la señalización de Hippo en la regeneración cardíaca, se realizaron experimentos de secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) utilizando un anticuerpo contra el efector de Hippo Yap. Los autores de la presente invención utilizaron datos de expresión de ARNm de experimentos de micromatrices para solapar el conjunto de datos de ChIP-seq con genes regulados por incremento en corazones mutantes para *Nkx2.5<sup>Cre</sup> Salv* (Figura 2 A, B). Los cambios en la expresión génica se validaron mediante experimentos de qRT-PCR (Figura 2 B). El análisis Ontológico de Genes indicó que Yap regula directamente los genes implicados en la progresión del ciclo celular y la dinámica del citoesqueleto (Figura 2 A y (Morikawa et al., 2014)). También están incluidas entre los genes del ciclo celular regulados por Yap las quinasas dependientes de ciclina, tales como *Cdk6*, y la diana de Yap previamente validada, *CiclinaE2*. Otra diana de Yap, el gen del ciclo celular *Lin9*, es un miembro del complejo MuvB, que mejora la transición G2/M (Kleinschmidt et al., 2009; Sadasivam et al., 2012) (Figura 2 A, B).

Los genes diana de Yap que regulan tanto la progresión citoesquelética como del ciclo celular incluyen *Aurkb* y *Birc5* (*survivina*) (Figura 2 A, B). Tanto *Aurkb* como *Birc5* son componentes complejos del pasajero del cromosoma y son importantes para la condensación y la segregación del cromosoma durante la mitosis, así como para la citocinesis. De manera importante, se había demostrado previamente que *Birc5*, está regulado por la señalización de Hippo en el corazón en desarrollo (Heallen et al., 2011). Los genes expresados en el surco citocinético y la zona media del huso que regulan la citocinesis, tales como *Anillin*, *Pkp4* y *Ect2*, son genes diana directos de Yap, lo que indica que Yap promueve la citocinesis en la regeneración de cardiomiocitos (Hesse et al., 2012; Matthews et al., 2012; Wolf et al., 2006).

EJEMPLO 5

YAP REGULA DIRECTAMENTE LOS GENES QUE PROMUEVEN LA REMODELACIÓN CITOSQUELÉTICA Y LA MOTILIDAD CELULAR DURANTE LA REGENERACIÓN CARDÍACA

De acuerdo con los cambios drásticos en la morfología celular, los autores de la presente invención encontraron que Yap también se une directamente a los genes que regulan el citoesqueleto de actina (Figura 2 A, B). Se sabe que varias dianas reguladas por Yap se localizan en lamelipodios y filopodios tales como *Enah*, un regulador de actina Ena/VASP que causa disfunción cardíaca cuando se desorganiza en ratones (Mejillano et al., 2004; Morikawa et al., 2014).

Yap también se une a los genes implicados en la transmisión de fuerza entre los cardiomiocitos y la matriz extracelular (ECM). Estos incluyen genes que están implicados en la conexión del citoesqueleto de actina a la membrana citoplásmica. El sarcoglicano delta (*Sgcd*) y la Sintrofina B1 (*Sntb1*) son componentes del complejo de la glicoproteína distrofina (DGC), que es importante para conectar el citoesqueleto de actina a la ECM y puede transmitir fuerza entre las células musculares (Barton, 2006; Goyenvalle et al., 2011). Ambos genes están mutados en pacientes humanos con distrofia muscular y estabilizan la membrana plasmática en respuesta al estrés mecánico. La proteína de unión a actina, *Talina 2*, conecta el citoesqueleto de actina a las integrinas y la ECM. Por último, *Ctnna3*, un gen asociado a la cadherina expresado en el disco intercalar (ICD), conecta el citoesqueleto de actina tanto al ICD como a la ECM y probablemente detecta la tensión entre los cardiomiocitos (Li et al., 2012).

EJEMPLO 6

EL AGOTAMIENTO DE HIPPO RESCATA EL DEFECTO DE REGENERACIÓN CARDÍACA EN LOS CORAZONES MUTANTES MDX

Para determinar si la pérdida de función de la vía de Hippo podría suprimir el fenotipo de regeneración fallida *mdx*, los autores de la presente invención generaron corazones dobles mutantes *Salv; mdx* y realizaron la resección del ápice el día 8 postnatal en muestras de los dobles mutantes y de control. Como se muestra en la FIG. 3, *Salv* CKO y *Salv; mdx* los dobles mutantes *mdx* regeneraron el miocardio en contraste con los mutantes *mdx* que no pueden regenerar el miocardio (Morikawa et al., 2014). Esto indica que el agotamiento de Hippo, con la regulación por incremento de Yap resultante y la regulación por incremento del gen diana de Yap, puede suprimir el fenotipo del corazón *mdx*. Los hallazgos de los autores de la presente invención indican que el agotamiento de Hippo en el miocardio es un enfoque prometedor para tratar la cardiomiopatía por DMD.

EJEMPLO 7

EL AGOTAMIENTO DE HIPPO PROMUEVE LA REGENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS EN EL CONTEXTO DE LA INSUFICIENCIA CARDÍACA ESTABLECIDA

Se determinó si la inactivación de la ruta de Hippo tres semanas después del infarto de miocardio todavía promueve la regeneración de cardiomiocitos con una función cardíaca mejorada. Esta es una pregunta clínicamente importante ya que muchos pacientes sufren infartos crónicos que conducen a remodelación cardíaca patológica con insuficiencia cardíaca y muerte. Antes de esto, se desconocía si el agotamiento de Hippo podía promover eficazmente la regeneración del corazón en el contexto de una cicatriz madura establecida. Se introdujo un infarto de miocardio en los corazones de control y los corazones *Salv* CKO que no habían recibido inyección en el punto temporal cero (FIG. 4). Los ratones *Salv* CKO que no habían recibido inyección todavía expresan niveles de control de *Salv*. Los controles simulados también se establecieron en tiempo cero. Tres semanas después del infarto, todos los ratones se estudiaron cuidadosamente mediante ecocardiografía y los ratones operados que se encontraban en insuficiencia cardíaca con EF reducida se incluyeron en el estudio y recibieron una inyección de tamoxifeno para inactivar la vía de Hippo.

Los parámetros de la función cardíaca se evaluaron en todos los corazones a intervalos de dos semanas después de la inyección de tamoxifeno (FIG. 4). Los mutantes *Salv* CKO tuvieron una recuperación funcional a partir del punto temporal de dos semanas (5 semanas después del MI) y la función continuó mejorando hasta que alcanzó el nivel de los controles no operados (9 semanas después del MI). La inactivación de la vía de Hippo después de una insuficiencia cardíaca establecida da como resultado una reparación cardíaca con retorno de la función cardíaca.

EJEMPLO 8

DISEÑO DE ARN DE HORQUILLA CORTA (ARNHC) PARA INACTIVAR LA RUTA DE HIPPO

EN EL CORAZÓN ADULTO

Tres ejemplos de ARNhc contra *Salv* en regiones de la molécula que se conservan entre ratón, ser humano y cerdo, de modo que se pueden utilizar indistintamente entre estas tres especies utilizando métodos convencionales (Tafer, 2014); Figuras 6, 7, y 8). La eficacia funcional de cada ARNhc se validó, utilizando experimentos de modificación

genética para disminuir la expresión de un gen con ARNip, para suprimir la expresión endógena de *Salv* en cardiomiocitos neonatales (Figura 5). Los tres ARNhc modificaron genéticamente la expresión de *Salv* disminuyéndola de manera eficaz en aproximadamente 70% con ARNhc núm. 3, lo que proporciona la mayor eficiencia de modificación genética para disminuir la expresión de un gen.

5

## REFERENCIAS

Barton, ER (2006). Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *American journal of physiology Cell physiology* 290, C411-419.

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* 324, 98-102.

10 Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A. y Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1189-1192.

Emery, A.E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687-695.

Goyenvalle, A., Seto, J.T., Davies, K.E., y Chamberlain, J. (2011). Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 20, R69-78.

15 Halder, G., y Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 138, 9-22.

Heallen, T., Morikawa, Y., Leach, J., Tao, G., Willerson, J.T., Johnson, R.L., y Martin, J.F. (2013). Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development* 140, 4683-4690.

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R.L., y Martin, J.F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 332, 458-461.

20 Hesse, M., Raulf, A., Pilz, G.A., Haberlandt, C., Klein, A.M., Jabs, R., Zaehres, H., Fugemann, C.J., Zimmermann, K., Trebicka, J., et al. (2012). Direct visualization of cell division using high-resolution imaging of M-phase of the cell cycle. *Nature communications* 3, 1076.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., y Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.

25 Hoffman, E.P., Hudecki, M.S., Rosenberg, P.A., Pollina, C.M., y Kunkel, L.M. (1988). Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1, 411-420.

Kikuchi, K., y Poss, K.D. (2012). Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* 28, 719-741.

30 Kleinschmidt, M.A., Wagner, T.U., Liedtke, D., Spahr, S., Samans, B., y Gaubatz, S. (2009). *lin9* is required for mitosis and cell survival during early zebrafish development. *The Journal of biological chemistry* 284, 13119-13127.

Li, J., Goossens, S., van Hengel, J., Gao, E., Cheng, L., Tyberghein, K., Shang, X., De Rycke, R., van Roy, F., y Radice, G.L. (2012). Loss of alphaT-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia. *Journal of cell science* 125, 1058-1067.

35 Matthews, H.K., Delabre, U., Rohn, J.L., Guck, J., Kunda, P., y Baum, B. (2012). Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev Cell* 23, 371-383.

Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., y Borisy, G.G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118, 363-373.

40 Morikawa, Y., Zhang, M., Heallen, T., Leach, J., Tao, G., Xiao, Y., Bai, Y., Willerson, J.T., y Martin, J.F. (2014). Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo deficient mice. submitted.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., y Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605.

Ohlendieck, K., y Campbell, KP (1991). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol* 115, 1685-1694.

45 Ohlendieck, K., Matsumura, K., Ionasescu, V.V., Towbin, J.A., Bosch, E.P., Weinstein, S.L., Sernett, S.W., y Campbell, K.P. (1993). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* 43, 795-800.

Piras, B.A., O'Connor, D.M., French, B.A. (2013). Systemic Delivery of shRNA by AAV9 Provides Highly Efficient Knockdown of Ubiquitously Expressed GFP in mouse Heart, but Not Liver. *PLOS One* 8(9), 1-11.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., y Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080.

5 Sadasivam, S., Duan, S., y DeCaprio, J.A. (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev* 26, 474-489.

Sohal, D.S., Nghiem, M., Crackower, M.A., Witt, S.A., Kimball, T.R., Tymitz, K.M., Penninger, J.M., y Molkentin, J.D. (2001). Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 89, 20-25.

10 Tafer, H.(2014). Bioinformatics of siRNA design. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 1097, 477-490.

von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L.B., Pan, G.M., Buck, J.N., Ma, Q., Ishiwata, T., Zhou, B., Camargo, F.D., et al. (2012). YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2394-2399.

15 Wolf, A., Keil, R., Gotzl, O., Mun, A., Schwarze, K., Lederer, M., Huttelmaier, S., y Hatzfeld, M.(2006). The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nature cell biology* 8, 1432-1440.

Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L.B., Qi, X., McAnally, J., Schwartz, R.J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., y Olson, E.N. (2011). Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Science signaling* 4, ra70.

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Martin, James F. Yuka, Morikawa Todd, Heallen Ryan Leach, John

5 <120> SEÑALIZACIÓN COMPLEJA DE HIPPO Y DISTROFINA EN LA RENOVACIÓN DE CARDIOMIOCITOS

<130> BAYM.P0129WO

10 <140> DESCONOCIDO  
<141> 09-12-2014

<150> 61 / 913,715  
<151> 09-12-2013

15 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
<211> 1161  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 1

atgctgtccc gcaagaaaac caaaaacgag gtgtctaagc cggccgaggt gcagggcaag	60
tacgtgaaga aggagacgtc gccctgctg cggaatctca tgccttcatt cattcggcac	120
ggtccaacaa ttcccagacg gactgacctc tgtcttccag attcaagtgc tactgctttc	180
tcagcttctg gagatgggtg agtttcaaga aaccagagtt tcctgagaac tgcaattcaa	240
aggacacctc atgaagtaat gagaagagaa agccacagac tgtctgcccc ttcttacctt	300
gtcaggagcc tagcagatgt ccctcgagag tgtggctcat cacagtcatt tttgacagaa	360
gttaactttg ctgttgagaa tggagactct ggctccgat acttcttctc agataacttt	420
tttgatggac agagaaggcg gccacttga gatcgtgcac aagaagatta cagatattat	480
gaatacaacc atgatctctt ccagaggatg ccacagagtc aggggaggca cacttcaggt	540
attgggagag tcacggctac atctctaggg aatttaacta accatggatc tgaagattta	600
ccccttctc ctggctggtc tgtggactgg acaatgagag ggagaaaata ctacatagat	660
cataacacaa ataccactca ctggagtcac ccccttgaac gagaaggact tcctcctggc	720
tgggaacgag tagagtcatc agaatttga acctattacg tggatcacac caataaaagg	780
gctcagtaca ggcaccctg tgcctcgagt gtacctcggc atgatcagcc tcacccatc	840
acgtatcagc cacaacaaac tgaaagaaat cagtctctcc tggctcctgc aaatccctac	900
catactgcag aaattcctga ctggcttcag gtttatgccc gagcccctgt gaaatatgac	960
cacattctga agtgggagct cttccagctg gctgacctgg acacgtacca gggaatgctg	1020
25 aagttgctct tcatgaagga actggagcag attgtgaagt tgtacgaggc ctacagacag	1080
gctcttctca ctgagttgga aaaccgcaag cagaggcagc agtgggatgc ccagcagcat	1140
ggcaagacgt tcttaagtta a	1161

ES 2 735 334 T3

	<210> 2	
	<211> 1155	
	<212> ADN	
5	<213> Sus scrofa	
	<400> 2	
	atgctgtccc gaaagaaaac caaaaatgaa gtgtccaagc cggccgaggt gcaggggaag	60
	tacgtgaaga aggagacgtc gcctctgctg cggaatctca tgccttcatt catccggcac	120
	ggtcccacaa ttccaagacg aactgatatc tgtcttccag attccagctc taatgccttt	180
	tcagcttctg gagatggaat agtttcaaga aaccagagtt tccttagaac tccaattcaa	240
	agaacacctc atgaaataat gagaagagaa agcaacagat tatctgcacc ttcttatctt	300
	gccaggagtc tagcagatgt ccctagggaa tatggctctt ctcagtcatt tttaacagaa	360
	gttaattttg ctgttgaaaa tggagactct ggttcccgat attattattc cgataattat	420
	tttgatggtc agaggaggcg ccagcttggg gatcgcacac atgaagacta tagatattat	480
	gactacaacc acgatctctt ccaaagagtg ccacaaaatc aggggaggca tgcttcaggt	540
	attgggagaa ttgctgctac atcttttagga aatttaacaa accatgggtc tgaagattta	600
	ccccttcctc ctggctggtc tgtggactgg acaatgagag ggaggaaata ctatatagat	660
	cacaacacaa atacaactca ttggagccat cctcttgagc gagaaggact tcctccagga	720
	tgggagcgag ttgagtcatc agaatttggg acctattatg tagatcacac aaataaaaag	780
	gctcaatata ggcatccctg tgctcctagc gtacctgat atgatcaacc tcctcctggt	840
	acataccagc cacagcaaac tgaaagaaat cagtccttc tgggtacctgc aaatccgtat	900
	catgctgcag aaattcctga ctggcttcag gtttatgctc gagcccctgt gaaatatgac	960
	cacattctca agtgggaact cttccagctg gctgacctgg atacatacca gggaatgctg	1020
	aagttgcttt tcatgaaaga actggaacag attgttaaaa tgtatgaagc ctacagacag	1080
	gctcttctca cagagttgga aaatcgcaag cagagacaac agtgggatgc ccagcaacat	1140
	ggcaagaatt tttaa	1155
10	<210> 3	
	<211> 1152	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 3	
	atgctgtccc gaaagaaaac caaaaacgaa gtgtccaagc cggccgaggt gcaggggaag	60
	tacgtgaaga aggagacgtc gcctctgctt cggaatctta tgccttcatt catccggcat	120
	ggtccaacaa ttccaagacg aactgatatc tgtcttccag attcaagccc taatgccttt	180

ES 2 735 334 T3

tcaacttctg gagatgtagt ttcaagaaac cagagtttcc ttagaactcc aattcaaaga 240  
 acacctcatg aaataatgag aagagaaagc aacagattat ctgcaccttc ttatcttgcc 300  
 agaagtctag cagatgtccc tagagagtat ggttcttctc agtcatttgt aacggaagtt 360  
 agttttgctg ttgaaaatgg agactctggt tcccgatatt attattcaga caattttttt 420  
 gatggtcaga gaaagcggcc acttgagat cgtgcacatg aagactacag atattatgaa 480  
 tacaaccatg atctcttcca aagaatgcca cagaatcagg ggagcatgc ttcaggtatt 540  
 gggagagttg ctgctacatc tttaggaaat ttgactaacc atggttctga agatttacc 600  
 cttcctcctg gctggctgtg ggactggaca atgagaggga gaaaatatta tatagatcat 660  
 aacacaaata caactcactg gagccatcct cttgagcag aaggacttcc tctggtgag 720  
 gaacgagttg agtcatccga atttggaacc tattatgtag atcacacaaa taagaaggcc 780  
 caatacaggc atccctgtgc tcttagtgta cctcggtag atcaaccacc tctgtcaca 840  
 taccagccac agcaaaactga aagaaatcag tcccttctgg tacctgcaaa tccatatcat 900  
 actgcagaaa ttcctgactg gcttcaggtt tacgcacgag cccctgtgaa atatgaccac 960  
 attctgaagt gggaaactct ccagctggct gacctggata cataccaggg aatgctaaag 1020  
 ttgctcttca tgaagaatt ggagcagatt gttaaaatgt atgaagcata cagacaagcc 1080  
 cttcttacag agttggaaaa ccgaaagcag agacagcagt ggtatgccca acaacatgga 1140  
 aaaaattttt ga 1152

5 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

10 <400> 4  
 aagtacgtga agaaggagac g 21

15 <210> 5  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

20 <400> 5  
 aagatttacc cttcctcct g 21

25 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

30 <400> 6  
 attcctgact ggcttcaggt 20

35 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Sus scrofa

<400> 7  
 aagtacgtga agaaggagac g 21  
 <210> 8  
 <211> 21

# ES 2 735 334 T3

<212> ADN  
<213> Sus scrofa

5 <400> 8  
aagattacc ccttctctct g 21

10 <210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Sus scrofa

<400> 9  
attctgact ggcttcaggt 20

15 <210> 10  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20 <400> 10  
aagtacgtga agaaggagac g 21

25 <210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

30 <400> 11  
aagattacc ccttctctct g 21

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

35 <400> 12  
attctgact ggcttcaggt 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ARNhc que se dirige a Salvador (*Sav1*) para su uso en un método para el tratamiento de una afección cardíaca en un individuo, que comprende la etapa de proporcionar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del ARNhc que se dirige a Salvador (*Sav1*).
2. El ARNhc para su uso en el método de la reivindicación 1, en donde el ARNhc se proporciona al individuo en el vector AAV9; y/o el individuo tiene distrofia muscular de Duchenne.
- 10 3. Una composición de ácido nucleico sintético aislado, que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9 y/o un ácido nucleico derivado que se dirige a Salvador (*Sav1*), que comprende al menos 80% de identidad con uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, en donde la composición es para su uso en un método de tratamiento de un individuo por una afección cardíaca, que comprende la etapa de proporcionar una cantidad eficaz de la composición al individuo.
- 15 4. La composición para su uso en el método de la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico derivado es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9.
5. La composición para su uso en el método de la reivindicación 3, en donde:
- 20 (a) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 10, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (b) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 11, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 25 (c) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 12, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (d) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 4, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 30 (e) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 5, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 35 (f) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 6, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (g) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 7, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 40 (h) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 8, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (i) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 9, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle.
- 45 6. La composición para su uso en el método de la reivindicación 5, en donde:
- (a) dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 43 nucleótidos; y/o
- (b) dicho ácido nucleico no tiene más de 137 nucleótidos de longitud; y/o
- (c) la estructura de bucle tiene una longitud entre 5 y 19 nucleótidos.

7. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde:

(a) el ácido nucleico derivado tiene 1, 2, 3 o 4 emparejamientos erróneos en comparación con los respectivos SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9; y/o

5 (b) el ácido nucleico o ácido nucleico derivado están comprendidos en un vector.

8. La composición para su uso en el método de la reivindicación 7(b), en donde:

(i) el vector es un vector viral; o

(ii) el vector es un vector no viral; o

(iii) el vector es un vector no integrativo, opcionalmente en donde el vector no integrativo es un vector lentiviral.

10 9. La composición para su uso en el método de la reivindicación 7(b), en donde:

(i) la expresión del ácido nucleico está regulada por un promotor específico de tejido o específico de célula, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico de cardiomiocito, adicionalmente opcionalmente en donde el promotor específico de cardiomiocito es el promotor de la cadena ligera 2 de miosina cardíaca específica de ventrículo (MLC-2v) de rata; el promotor del gen de la cadena pesada de la alfa miosina (MHC) específica de músculo cardíaco; el promotor mínimo específico de células cardíacas de -137 a +85 del promotor NCX1; LA troponina T cardíaca de pollo (cTNT), o una combinación de los mismos; o

15

(ii) dos o más de los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, están presentes en el mismo vector, opcionalmente en donde: (i') los dos o más ácidos nucleicos están regulados por la misma secuencia reguladora; o (ii') los dos o más ácidos nucleicos están regulados por una secuencia reguladora diferente.

20

10. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la afección cardíaca en el individuo hace que el individuo necesite la renovación de cardiomiocitos; y/o en donde el corazón del individuo presenta apoptosis, necrosis y/o autofagia de cardiomiocitos.

11. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde la afección cardíaca comprende enfermedad cardiovascular, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, isquemia, necrosis, fibrosis o cardiomiopatía diabética, cardiomiopatía relacionada con la edad.

25

12. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde el individuo tiene distrofia muscular de Duchenne.

13. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde:

30 (a) la composición se proporciona al individuo más de una vez; y/o

(b) la composición se proporciona al individuo (i) sistémicamente o (ii) localmente; y/o

(c) el individuo recibe una terapia adicional para la afección cardíaca.

14. Una composición de ácido nucleico sintético aislado que comprende ARNhc o ARNip capaz de reducir la expresión de Sav1, que comprende SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9 y/o un ácido nucleico derivado que comprende al menos 90% de identidad con uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9.

35

15. La composición de la reivindicación 14, en donde el ácido nucleico derivado es al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a uno de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9.

40

16. La composición de la reivindicación 14, en donde:

(a) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 10, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o

45 (b) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 11, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o

- (c) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 12, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 5 (d) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 4, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (e) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 5, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 10 (f) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 6, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 15 (g) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 7, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- (h) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 8, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle; o
- 20 (i) el ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y adicionalmente comprende una secuencia antisentido de SEQ ID NO: 9, en donde cuando la secuencia y la secuencia antisentido hibridan juntas para formar una estructura dúplex, la secuencia y la secuencia antisentido están separadas por una estructura de bucle.
17. La composición de la reivindicación 14, en donde:
- (a) dicho ácido nucleico tiene una longitud de al menos 43 nucleótidos; y/o
- (b) dicho ácido nucleico no tiene más de 137 nucleótidos de longitud; y/o
- 25 (c) la estructura de bucle tiene una longitud entre 5 y 19 nucleótidos.
18. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde:
- (a) el ácido nucleico derivado tiene 1 o 2 emparejamientos erróneos en comparación con los respectivos SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9; y/o
- 30 (b) el ácido nucleico o ácido nucleico derivado están comprendidos en un vector.
19. La composición de la reivindicación 18(b), en donde:
- (i) el vector es un vector viral; o
- (ii) el vector es un vector no viral; o
- (iii) el vector es un vector no integrativo, opcionalmente en donde el vector no integrativo es un vector lentiviral.
- 35 20. La composición de la reivindicación 18(b), en donde:
- (i) la expresión del ácido nucleico está regulada por un promotor específico de tejido o específico de célula, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico de cardiomiocito, adicionalmente opcionalmente en donde el promotor específico de cardiomiocito es el promotor de la cadena ligera 2 de miosina cardíaca específica de ventrículo (MLC-2v) de rata; el promotor del gen de la cadena pesada de la alfa miosina (MHC) específica de músculo cardíaco; el promotor mínimo específico de células cardíacas de -137 a +85 del promotor NCX1; la troponina T cardíaca de pollo (cTNT), o una combinación de los mismos; o
- 40 (ii) dos o más de los ácidos nucleicos que comprenden SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 9, están presentes en el mismo vector, opcionalmente en donde: (i') los dos o más ácidos nucleicos están regulados por la misma secuencia reguladora; o (ii') los dos o más ácidos nucleicos están regulados por una secuencia reguladora diferente.
- 45 21. Un kit que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 14-20, en donde la composición está alojada en un recipiente adecuado.

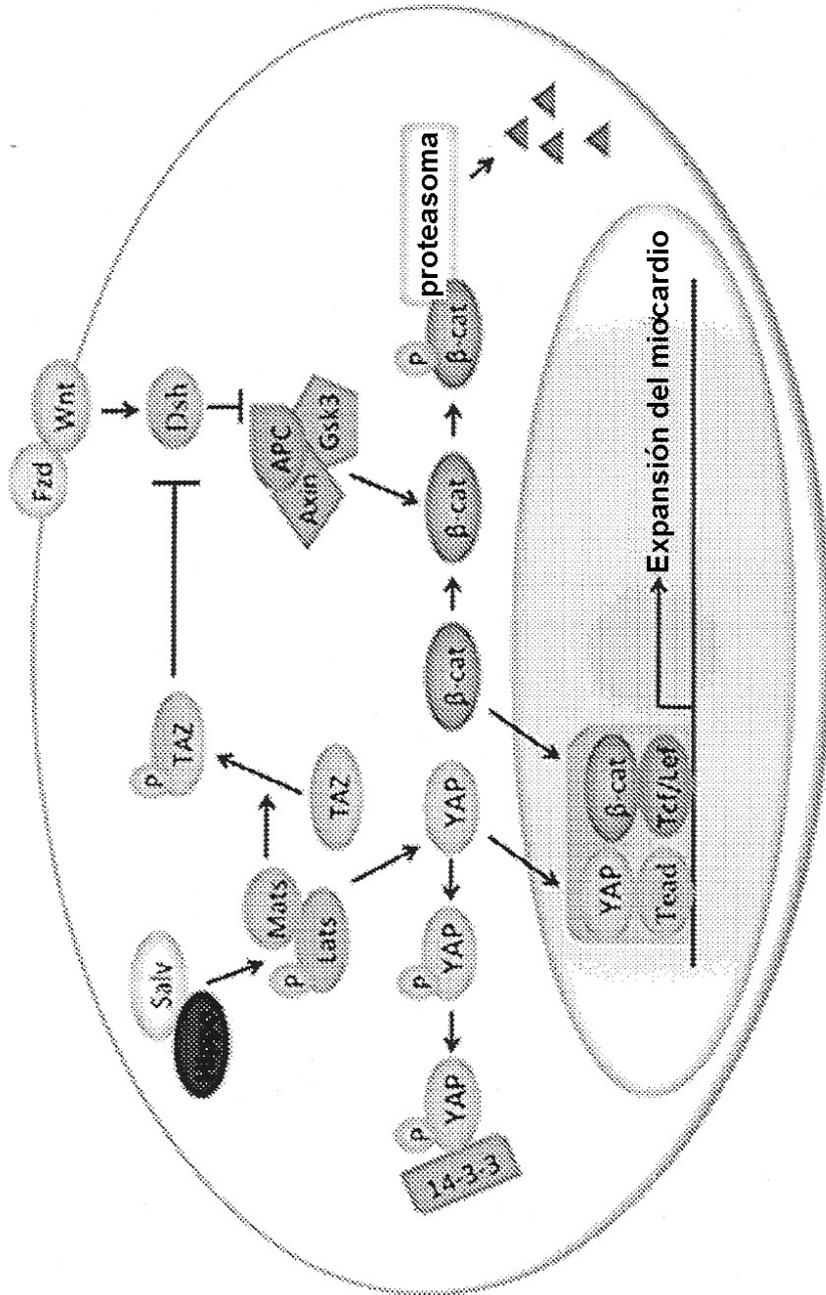


FIG. 1

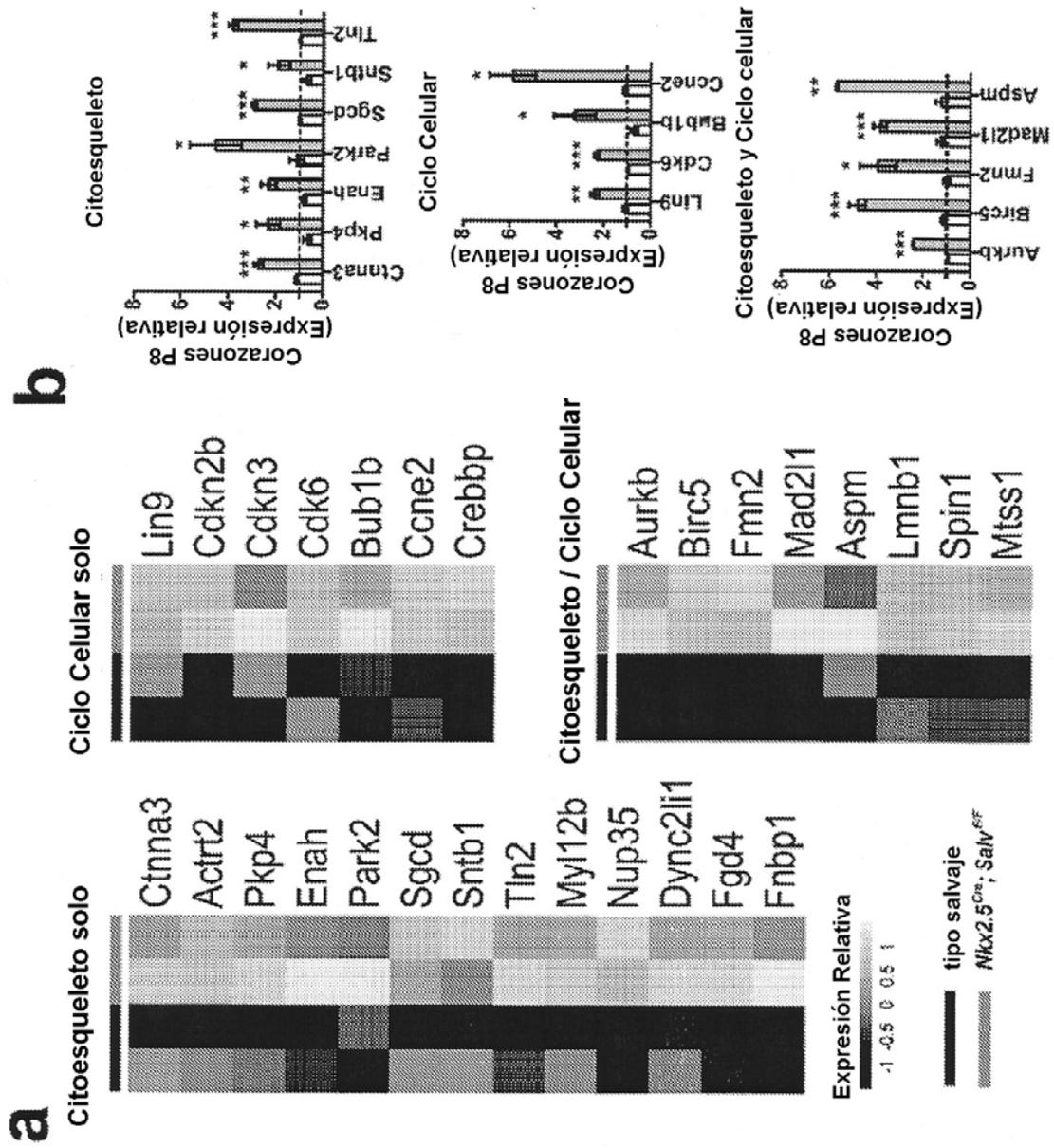


FIG. 2

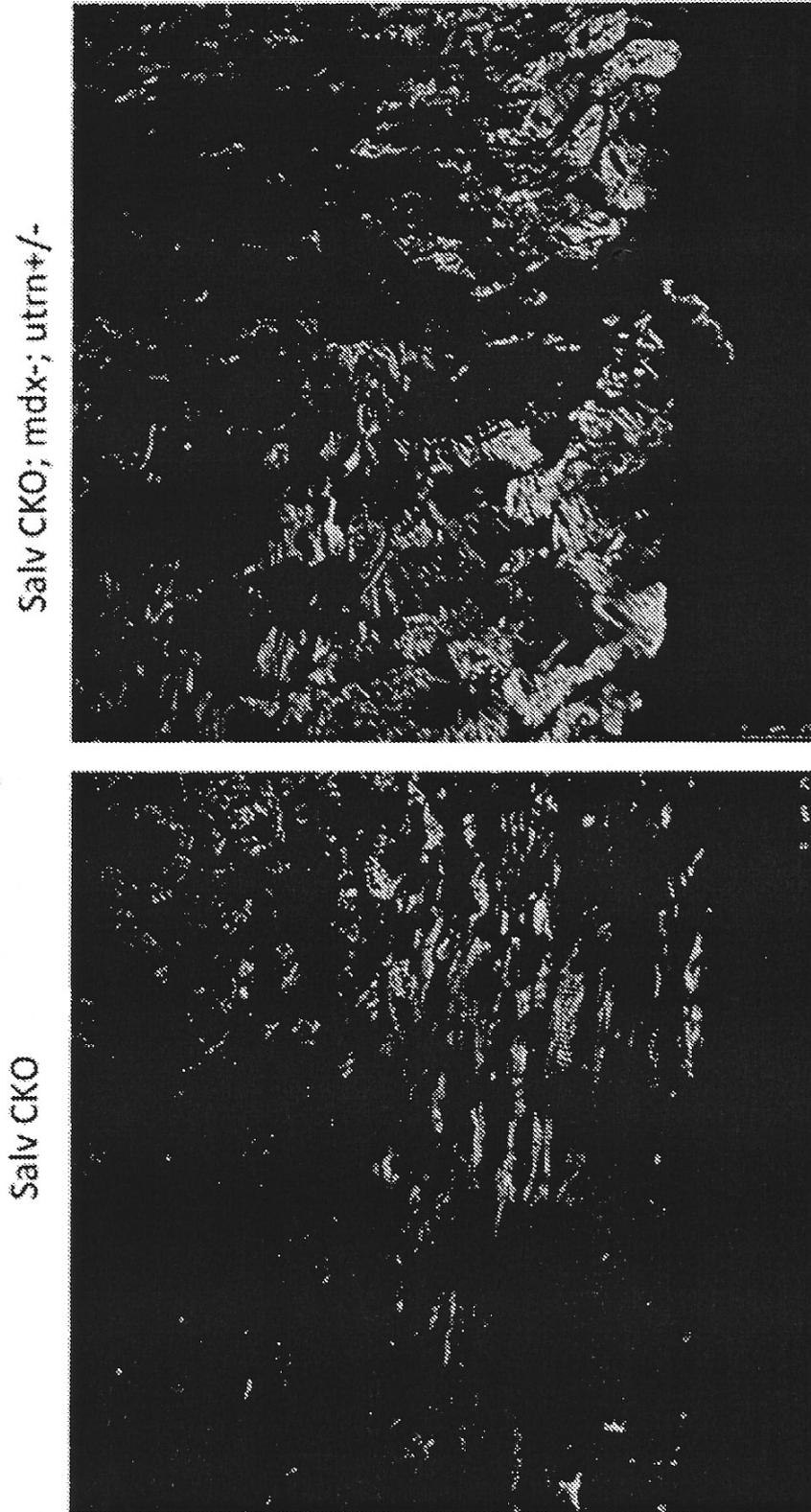


FIG. 3

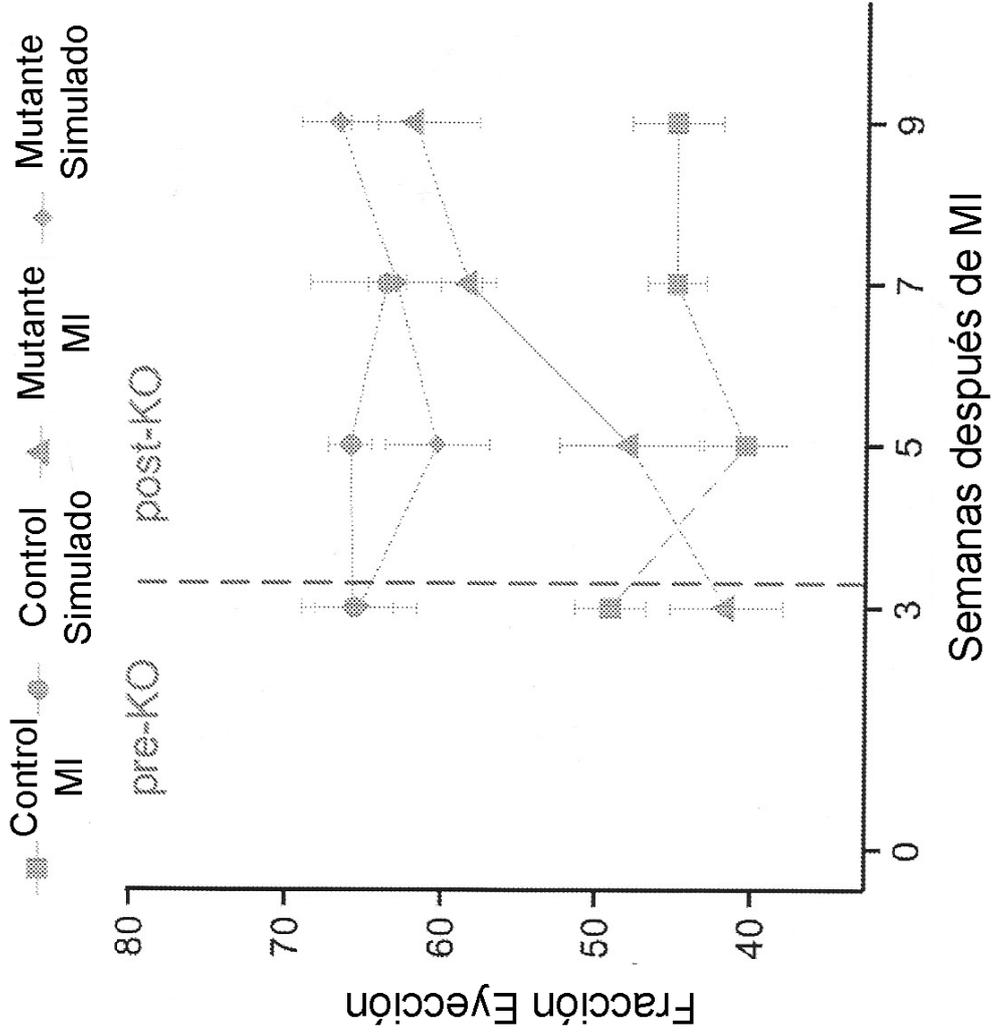


FIG. 4

Validación de ARNip de Sav1

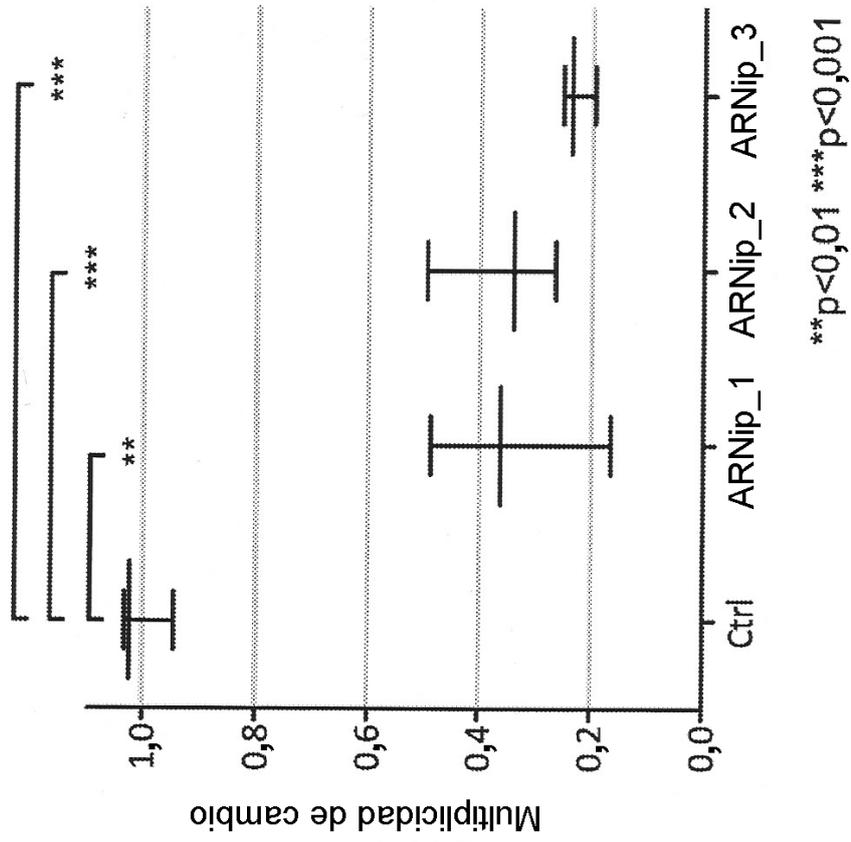


FIG. 5

**Secuencia de ADNc de Sav1 de ratón:**

ATGCTGTCCGCAAGAAAACCAAAAACGAGGTGTCTAAGCCGGCCGAGGTGCAGGG  
 CAAGTACGTGAAGAAGGAGACGTGCGCCCTGCTGCGGAATCTCATGCCTTCATTCAT  
 TCGGCACGGTCCAACAATTCCCAGACGGACTGACCTCTGTCTTCCAGATTCAAGTGC  
 TACTGCTTTCAGCTTCTGGAGATGGGTAGTTTCAAGAACCAGAGTTTCCCTGAGA  
 ACTGCAATTCAAAGGACACCTCATGAAGTAATGAGAAGAGAAGCCACAGACTGTC  
 TGCCCTTCTTACCTTGTACGGAGCCTAGCAGATGTCCCTCGAGAGTGTGGCTCATCA  
 CAGTCATTTTGGACAGAAGTTAACTTTGCTGTTGAGATGGAGACTCTGGCTCCCGAT  
 ACTTCTTTCAGATAACTTTTTTIGATGGACAGAGAAGCGGGCCACTTGGAGATCGTG  
 CACAAGAAGATTACAGATATTATGAATACAACCATGATCTTCCAGAGGATGCCAC  
 AGAGTCAGGGGAGGCACACTTCAGGTATTGGGAGAGTACGGCTACATCTCTAGGG  
 AATTTAACTAACCATGGATCTGAGATTACCCCTTCCCTGGCTGGTCTGIGGACT  
 GGACAATGAGAGGGAGAAAATACTACATAGATCATAACACAATAACCACTCACTGG  
 AGTCATCCCTTGAACGAGAAGGACTTCCCTCGCTGGGACCGAGTAGAGTCATCA  
 GAATTTGGAAACCTATTACGTGGATCACACCAATAAAGGGCTCAGTACAGGCACCCC  
 TGTGCTCCGAGTGTACCTCGGTATGATCAGCCCTCCACCCATCACGTATCAGCCACAA  
 CAAACTGAAAGAAATCAGTCTCTCCCTGGTCCCTGCAAAATCCCTACCATACTGCAGAA  
 ATTCCCTGACTGGCTTCAGGTTTATGCCCGAGCCCTGTGAAATATGACCACATTTCIGA  
 AGTGGGAGCTCTTCCAGCTGGCTGACCTGGACACGTACCCAGGGAATGCTGAAGTTGC  
 TCTTCATGAAGGAACTGGAGCAGATTGTGAAGTTGTACGAGGCCCTACAGACAGGCTC  
 TTCCTCACTGAGTTGGAAAACCCGCAAGCAGAGGCAGCAGTGGTATGCCACAGCAGCAT  
 GGCAAGACGTTCTTAAAGTTAA

FIG. 6

Secuencia de ADNc de Sav1 de cerdo:

ATGCTGCCGAAAGA AACC A A A A TGAAGTGTCCAAGCCGGCCGAGGTGCAGGG  
 GAGTACGTGAGAGGAGACGTCGCCCTCTGCTGCGGAATCTCATGCCCTTCATTCAT  
 CCGGCACGGTCCCA AATTCCAAGACGAACTGATATCTGTCTTCCAGATTCAGCTCT  
 AATGCCCTTTCAGCTTCTGGAGATGGAAATAGTTTCAAGAAACCAGAGTTTCCCTTAGA  
 ACTCCAATTCAAAGAACACCTCATGAAATAATGAGAAGAGAAAGCAACAGATTATC  
 TGCACTTCTTATCTTGCCAGGAGTCTAGCAGATGTCCCTAGGGAATATGGCTCTTCT  
 CAGTCATTTTAAACAGAGTTAATTTGCTGTTGAAATGGAGACTCTGGTTCCCGAT  
 ATTATTATCCGATAATTATTGATGGTCAGAGGCGCCAGCTTGGAGATCGCA  
 CACATGAAGACTATAGATAATTATGACTACAACCACGATCTCTTCCAAGAGTGCCAC  
 AAAATCAGGGGAGGCATGCTTCAGGTATTGGGAAATTGCTGTACATCTTTAGGAA  
 ATTTAAACAACCATGGTTCTGAAGATTTACCCCTTCCCTGGCTGGTCTGTGGACTG  
 GACAAATGAGAGGGAGGAAATACTATA TAGATCACAAACAATAACA ACTCATTTGGA  
 GCCATCCCTTGAGCGGAGAGGACTTCCCTCCAGGATGGGAGCGGAGTTGAGTCA TCAG  
 AATTTGGAACCTATTATGTAGATCACACAATAAAAGGCTCAATATAGGCATCCCT  
 GTGCTCCTAGCGTACCCTCGATA TGATCAACCCTCCTCTGTACATA C C C A C A G C A  
 AACTGAAAGAAATCAGTCCCTTCTGGTACCTGCAAAATCCGTA TCATGCTGCAGAAAT  
 TCCTGACTGGCTTCAGGTTTATGCTCGAGCCCTGTGAAATATGACCACATTCCTCAAAG  
 TGGGA ACTCTCCAGCTGGCTGACCTGGATA CATACCAGGGAATGCTGAAGTTGCTT  
 TTCATGAAAGAACTGGAACAGATTGTTAA AATGTATGAAGCCTACAGACAGGCTCTT  
 CTCACAGAGTTGGAA AATCGCAAGCAGAGACAACAGTGGTATGCCCAGCAACATGG  
 CAAGAATTTTAA

FIG. 7

**Secuencia de ADNc de Sav1 humano:**

ATGCTGCCGAAAGAAACCAAAACGAAAGTGTCCAAGCCGGCCGAGGTGCAGGG  
 GAAGTACGTGAAGAGGAGACGTCGCCTCTGCTTCGGAATCTTATGCCCTTCATTCAT  
 CCGCATGGTCCAACAATCCAAGACGAACTGATATCTGCTCCAGATTCAGGCC  
 TAATGCCCTTTCAACTTCTGGAGATGTAGTTCAAGA AACCCAGAGTTTCCTTAGAACT  
 CCAATCAAGAACAACCTCATGAATAATGAGAAGAGAAGCAACAGATTATCTGC  
 ACCTTCTTATCTTGCCAGAAGCTAGCAGATGTCCTTAGAGAGTATGGTTCCTTCAG  
 TCATTTGTAACGGAAAGTTAGTTTGGCTGTGAAATGGAGACTCTGTTCCCGATAAT  
 ATTATCAGACAATTTTTGATGGTCAGAGAAAGCGGCCACTTGGAGATCGTGCAC  
 ATGAAGACTACAGATATATGAATACAACCAATGATCTCTCCAAGAATGCCACAGA  
 ATCAGGGAGGCATGCTTCAGGTAATGGGAGAGTTGCTGTACATCTTTAGGAAATT  
 TGACTAACCATGGTCTGAAGATTTACCCCTTCCTCCCTGGCTGGTCTGGACTGGAC  
 AATGAGAGGAGAAATAATTATATAGATCATAACACAAATAACAACCTCACTGGAGCC  
 ATCCTCTTGAGCGGAGAGGACTTCCTCCTGGATGGGACCGAGTTGAGTCAATCCGAAT  
 TTGGAACCTATTATGTAGATCACACAAATAAGAAAGGCCCAATACAGGCATCCCTGTG  
 CTCCTAGTGTACCCTCGGTATGATCAACCACTCCTGTCAATACCAAGCCACAGCAA  
 CTGAAAGAAATCAGTCCCTTCTGGTACCCTGCAATCCATATCATACTGCAGAAATTC  
 CTGACTGGCTTCAGGTTACGCACGAGCCCTGTGAAATATGACCACATTTCTGAAGT  
 GGGAACTCTCCAGCTGGCTGACCTGGATACATACCAAGGAATGCTAAAGTTGCTCT  
 TCATGAAAGAATTGGAGCAGATTGTTAAAATGTATGAAGCATACAGACAAGCCCTTC  
 TTACAGAGTTGGAAAACCGAAAGCAGAGACAGCAGTGGTATGCCCAACAACATGGA  
 AAAAAATTTTGA

FIG. 8