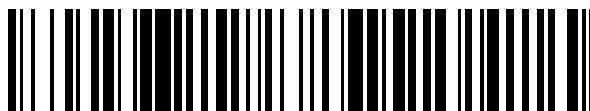


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 030**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00	(2006.01) A61K 31/19	(2006.01)
C12N 5/02	(2006.01)	
C12N 15/00	(2006.01)	
A01K 67/027	(2006.01)	
A61K 48/00	(2006.01)	
C12N 5/077	(2010.01)	
C12N 5/0775	(2010.01)	
C12N 15/86	(2006.01)	
C12N 15/113	(2010.01)	
A61K 31/7105	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2015 PCT/US2015/030990**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15175889**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2015 E 15792355 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3143123**

54 Título: **Inducción por microARN de la regeneración cardíaca**

30 Prioridad:

16.05.2014 US 201461994250 P

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

24.06.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

MORRISEY, EDWARD E.

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 769 030 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

Inducción por microARN de la regeneración cardíaca

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y procedimientos *ex vivo* para la estimulación de la proliferación celular y la desdiferenciación de células en células madre para fomentar la regeneración de tejidos. Específicamente, la invención se refiere a la administración transitoria de un microARN (miR) o su mimético para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos y la regeneración cardíaca.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Históricamente, el corazón de los mamíferos adultos se ha considerado un órgano terminalmente diferenciado con capacidad limitada para regenerarse después de una lesión. En contraste, la evidencia reciente ha demostrado que el corazón de neonatos puede regenerarse a través de la proliferación aumentada de cardiomiocitos. Esta capacidad de regeneración en respuesta a la lesión termina siete días después del nacimiento en ratones, lo que corresponde a la salida de los cardiomiocitos del ciclo celular. Aunque hay alguna evidencia de un nivel muy bajo de proliferación posnatal de cardiomiocitos que puede aumentarse después de la lesión, este es insuficiente para reponer los cardiomiocitos perdidos después de la lesión y restablecer la función cardíaca adecuada. Un obstáculo importante para superar el reingreso de los cardiomiocitos al ciclo celular es la rigidez de la estructura del sarcómero, que debe desensamblarse para que ocurra la citocinesis. Tal desensamble puede requerir señales para la desdiferenciación de los cardiomiocitos, lo cual se acompaña de múltiples cambios celulares, que incluyen la reactivación de programas de expresión génica restringidos al estado embrionario. Por lo tanto, los enfoques que reactivan o aumentan la proliferación postnatal de cardiomiocitos podrían tener un efecto positivo en la reparación y regeneración cardíacas, pero su persistencia necesitaría ajustarse cuidadosamente para evitar la disfunción de cardiomiocitos asociada con un estado altamente proliferativo y desdiferenciado.

Los microARN (miR) pueden tener efectos potentes sobre la expresión génica y pueden alterar el fenotipo celular al dirigirse de manera coordinada a múltiples componentes en vías celulares importantes. Varias agrupaciones o familias de miR se expresan en el desarrollo temprano y desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de la identidad progenitora específica del tejido. Una de estas agrupaciones, miR302-367, se expresa durante la embriogénesis temprana en las células madre embrionarias y en el endodermo pulmonar en desarrollo, donde promueve un fenotipo desdiferenciado caracterizado por altos niveles de proliferación celular.

En consecuencia, existe una necesidad de comprender los mecanismos de miR302-367 y, de esta manera, desarrollar composiciones y procedimientos basados en miARN mejorados.

40 **Sumario de la invención**

En la presente memoria se proporciona un procedimiento *ex vivo* para la estimulación de la proliferación celular y la desdiferenciación de células de cardiomiocitos en células madre para la regeneración de tejido cardíaco, el procedimiento que comprende: poner en contacto transitoriamente dichas células con una composición que comprende una agrupación de microARN (miR) 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o de dicho mimético de la agrupación de miR, en el que dicho contacto transitorio es suficiente para activar transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no para reactivar el ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales.

Además en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una agrupación miR 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para su uso en la estimulación de la reparación y regeneración cardíaca en un sujeto o para su uso en la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos en un sujeto mediante la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o dicho mimético de la agrupación de miR en cardiomiocitos, en la que la administración transitoria de la composición a dicho sujeto activa transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no reactiva el ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales.

En otra realización, la composición comprende ácido valproico.

En una realización, el miR se une operativamente a una secuencia reguladora, en la que, opcionalmente, dicha secuencia reguladora es un promotor inducible tal como un promotor inducible por doxiciclina.

En una realización, el miR está codificado por una secuencia de ácido nucleico presente dentro de un vector. En una realización, el vector es un vector viral tal como un vector de lentivirus, o en el que el vector es un vector plasmídico.

En una realización, la agrupación de microARN (miR) 302-367 o el mimético de la agrupación miR 302-367 comprende uno o más de miR302b, miR302c y miR367.

En una realización, la administración transitoria es la administración sistémica. En una realización, la administración transitoria es la administración intravenosa. En una realización, la administración transitoria comprende una administración única de la composición al sujeto.

5 En otra realización, la composición comprende ácido valproico.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, ejemplos y figuras. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican las realizaciones preferidas de la invención, se dan solamente a modo de ilustración.

10 Breve descripción de los dibujos

La invención se comprenderá mejor a partir de una lectura de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos.

15 **Figura 1.** miR302-367 se expresa en el corazón temprano y es importante para la proliferación de los cardiomiocitos. (A) Expresión relativa de los miembros de la agrupación miR302-367 durante el desarrollo del corazón como se determina por qRT-PCR. (B) Secciones inmunoteñidas y teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) de corazones de control E14.5 que muestran adelgazamiento de la pared ventricular, tabique ventricular hipoplásico y proliferación reducida de cardiomiocitos en mutantes $Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox}$ en comparación con ratones $miR302-367^{flox/flox}$. RV, ventrículo derecho; LV, ventrículo izquierdo; VS, tabique ventricular; RA, aurícula derecha. (C) Cuantificación de Ki67 (proliferación) a partir de imágenes en (B). (D) Cambios en la expresión génica asociados con la proliferación y la diferenciación de cardiomiocitos en mutantes nulos $Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox}$ frente a controles en E14.5. Los datos (C y D) son la media $\pm$ SEM ($n = 3$). Los valores de P se determinan mediante la prueba *t* de Student.

25 **Figura 2.** La sobreexpresión de la agrupación miR302-367 en el corazón en desarrollo da como resultado una proliferación aumentada de cardiomiocitos y cardiomegalia. (A) $Nkx2.5^{cre}$: Los mutantes $R26R-miR302-367^{Tg/+}$ tienen un corazón agrandado con el miocardio ventricular engrosado y defectos del tabique ventricular en comparación con los controles $Nkx2.5^{cre}$. (B) Cardiomegalia y proliferación aumentada de cardiomiocitos en corazones mutantes $Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$ en P20. (A y B) Las inmunostenciones para PH3 y α -actinina y aglutinina de germen de trigo (WGA) muestran el número de cardiomiocitos mitóticos. Barras de escala, 100 μ m. Alto aumento revela cardiomiocitos PH3⁺. LA, aurícula izquierda. Los datos son la media $\pm$ SEM ($n = 3$). Los valores de P se determinan mediante la prueba *t* de Student.

35 **Figura 3.** La sobreexpresión de miR302-367 conduce a una proliferación celular aumentada, así como también a una diferenciación y metabolismo alterados en los cardiomiocitos. (A) Tinción de aglutinina de germen de trigo y de α -actinina de corazones en P20. El área de superficie celular se cuantificó en E18.5 y P20. Los análisis cuantitativos representan el recuento de cinco campos de tres muestras independientes por grupo. (B) Mapa de calor y perfil de rutas del análisis de microarreglos de corazones mutantes $Nkx2.5^{cre}$ y $Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$ en P14. (C y D) Cambios en la expresión génica relacionados con la proliferación celular (C) y la muerte celular programada (D) en P14. (E y F) Cambios en la expresión génica relacionados con la diferenciación (E) y el metabolismo de los ácidos grasos (F) en P14 y P23. Los datos son la media $\pm$ SEM ($n = 3$ por grupo). * $P < 0,05$ frente a animales de control $Nkx2.5^{cre}$ (prueba *t* de Student).

45 **Figura 4.** miR302-367 promueve la proliferación de cardiomiocitos a través de la regulación de las quinasas de la vía de Hippo. (A) Expresión de *Mob1b*, *Lats2*, y *Mst1* en corazones mutantes $Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$ en E18.5 y corazones mutantes nulos $Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{flox/flox}$ en E12.5 por qRT-PCR. (B) Ensayos de reportero luciferasa que muestran que miR302-367 puede reprimir la expresión de *Mst1*, *Lats2*, y *Mob1b* a través de sus respectivas 3'UTR. Esta represión puede revertirse mediante mutaciones de los sitios de unión de miR302-367. (C) Microscopía de fluorescencia confocal de fosfo-Yap y tinción nuclear de Yap, con o sin DAPI, en cardiomiocitos ventriculares de corazones de ratón $Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$ en E18.5. La relación citoplasmática y nuclear para la proteína Yap total se cuantificó mediante el uso del software Fiji. (A a C) * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ frente a corazones de control $Nkx2.5^{cre}$ (prueba *t* de Student). (D) Sobreexpresión de miR302-367 en cardiomiocitos neonatales de ratón primarios. La proliferación de cardiomiocitos se cuantificó mediante el uso de la inmunotinción de Ki67. ** $P < 0,01$ frente a control de shARN Yap. Barras de escala, 100 μ m. (E) Modelo propuesto de miR302-367 que promueve la proliferación de cardiomiocitos a través de la regulación de las quinasas de la vía de Hippo. (A a D) Los datos son la media $\pm$ SEM ($n = 3$ para A, C y D; $n = 5$ para B).

60 **Figura 5.** miR302-367 puede promover la proliferación de cardiomiocitos en el corazón adulto. (A) Esquema de la sobreexpresión inducible de miR302-367 en corazón adulto mediante el uso de ratones $Myh6^{mercremer}$. (B a D) Imágenes confocales con apilamiento z y cuantificación que muestran el número de células que vuelven a entrar en el ciclo celular [5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)+] (B), se observa mitosis (PH3⁺) (C), o se observa citocinesis [Aurora B (AuB)*] (D) 7 días después de la inducción de la expresión de miR302-367 en el corazón adulto. (E) Número de cardiomiocitos en animales $Myh6^{mercremer}$ y $Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$. Recuadro: El trazado de la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) muestra que el 98,6 % de las células aisladas contadas en los corazones adultos son cardiomiocitos cTnT+. (F) Número de núcleos en control y cardiomiocitos $Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}$.

Barras de escala, 100 μ m. mono, mononucleado; bi, binucleado; multi, multinucleado Se contaron aproximadamente 1 x 103 cardiomiocitos por muestra. **(G)** Tamaños celulares de los cardiomiocitos aislados. Los datos son la media $\pm$ SEM ($n = 3$). Los valores de P se determinaron con prueba de t de Student. n.s., cambio no significativo.

5 **Figura 6.** La sobreexpresión prolongada de miR302-367 en el corazón adulto reduce el tamaño de la cicatriz fibrótica pero compromete la función cardíaca después del infarto del miocardio (MI). **(A)** Diseño del estudio de la sobreexpresión de miR302-367 por inyección intraperitoneal de tamoxifeno después del MI mediante ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). **(B)** Secciones del corazón teñido con tricrómica de Masson desde el sitio de ligadura hacia el vértice del control y ratones Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+} a 21 días después del MI. Las secciones en serie se cortaron a intervalos de 500 μ m desde el sitio de la ligadura hacia el ápice. Se muestran un representante Myh6^{mercremer} y dos de Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+} de corazones ($n = 6$ por grupo). **(C)** Cuantificación de las regiones fibróticas en secciones de corazón en **(B)**. **(D)** Inmunotinción y cuantificación de células PH3⁺/α-actinina⁺ en corazones Myh6^{mercremer} y Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+} a 21 días después del MI. **(E)** Función cardíaca en ratones sometidos a ligadura de LAD, evaluados por ecocardiografía ($n = 7$ por grupo). EF, fracción de eyección; FS, acortamiento fraccional; EDV, volumen diastólico final; ESV, volumen sistólico final. Los datos son la media $\pm$ SEM ($n = 6$ a 7). **(C y D)** Valores de P determinados con la prueba t de Student. **(E)** * $P < 0,05$ frente a simulación, mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA).

20 **Figura 7.** La terapia transitoria mimética de miR302 promueve la regeneración cardíaca y mejora la función de los corazones lesionados. **(A)** Esquema del tratamiento mimético de miR302 de 7 días después del MI ($n = 3$ simulado; $n = 8$ control; $n = 18$ miR302). **(B)** Tinción tricrómica de Masson de las secciones del corazón 50 días después del MI y 42 días después del tratamiento final con control o con mimético de miR302. Las secciones en serie se cortaron a intervalos de 500 μ m desde el sitio de la ligadura hacia el ápice. Se muestran dos corazones representativos de control y tres tratados con mimético de miR302. **(C)** Cuantificación de las áreas fibróticas en secciones del corazón. Los datos son la media $\pm$ SEM. **(D y E)** La función cardíaca de los ratones sometidos a ligadura de la LAD se evaluó mediante ecocardiografía. Los datos son la media $\pm$ SEM. Valores de P determinados mediante ANOVA unidireccional.

30 **Figura 8.** Generación de ratones con una delección condicional de la agrupación miR302-367. **(A)** Hibridación in situ que muestra la agrupación miR302-367 expresado en el miocardio de ratón en desarrollo en E8.5, E9.5, y E10.5. Las puntas de las flechas indican la agrupación miR302-367 en el tracto de salida (OFT) del corazón en desarrollo. A, atrio; V, ventrículo. **(B)** Representación esquemática del locus miR302-367 de ratón y la estrategia de direccionamiento para la delección de miR302-367. **(C)** Análisis de transferencia Southern de cruces de ratones Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{lox/+} y de tipo salvaje. **(D)** Expresión de miembros de la agrupación miR302-367 en corazones mutantes nulos Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{lox/lox} en E12.5. **(E)** La expresión del gen huésped *Larp7* en corazones mutantes nulos Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{lox/lox} en E12.5. Los cebadores usados para qRT-PCR que abarcan los exones 8 y 9 y los exones 8 y 10 de *Larp7*, muestran empalmes normales en la región diana. Los cebadores dirigidos a la región 3' del locus de ARNm (exones 12 y 13) mostraron una transcripción intacta de *Larp7*. **(F)** Análisis de apoptosis mediante tinción TUNEL de corazones en E14.5. DAPI indica los núcleos celulares. Barras de escala, 100 μ m. Los datos en **(E y F)** son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). Los valores de P se determinaron mediante la prueba de t de Student. n.s., no significativo.

40 **Figura 9.** Generación de ratones con una sobreexpresión condicional de la agrupación miR302-367. **(A)** Esquema del alelo activado miR302-367 flanqueado por sitios loxP y la estrategia dirigida para la sobreexpresión activada por Cre de miR302-367. **(B)** Análisis de transferencia Southern de ratones de tipo salvaje (11 kb) y los activados con R26R-miR302-367 (3,8 kb) después de la digestión del ADN genómico con EcoRV. **(C)** qRT-PCR que muestra una sobreexpresión específica de todos los miembros de la familia miR302-367 en corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} en E18.5. **(D)** Cuantificación del número de núcleos en corazón Nkx2.5^{cre} y Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} en P17. **(E)** Relaciones de peso cardíaco con longitud de la tibia (HW/TL) en P20. **(F)** La inmunotinción de cardiomiocitos con α-actinina muestra estructuras sarcoméricas en P20. **(G)** La función cardíaca P20 se evaluó mediante ecocardiografía. EF, fracción de eyección; FS, acortamiento fraccional. **(H)** Inmunotinción para TUNEL y DAPI en corazones en P20. Los datos son la media $\pm$ s.e.m. Los valores de P se determinan mediante la prueba t de Student. Barras de escala en **(D y H)**, 100 μ m.

55 **Figura 10.** miR302-367 regula la proliferación de cardiomiocitos a través de la vía de Hippo. **(A)** Se identificaron múltiples dianas de miR302 mediante comparación de las dianas previstas Ago-HITS-CLIP y miRanda. **(B)** Análisis de transferencia Western del nivel de las proteínas Mob1, Lats2, Mst1 y P-Yap en corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} en P20. **(C)** Análisis de transferencia Western de Mob1, Lats2 y Mst1 en corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{lox/lox} en E12.5. Los datos en **(B y C)** son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). * $p < 0,05$ frente a Nkx2.5^{cre}, mediante la prueba t de Student. **(D)** Información de la secuencia de la 3'UTR de mutaciones en el sitio de unión de Mst1, Lats2, Mob1b y miR. **(E)** Inmunotinción de fosfo-Yap y Yap nuclear, con o sin DAPI, en los cardiomiocitos de corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{lox/lox} en E10.5. Barras de escala, 100 μ m. **(F)** Análisis de transferencia Western de la proteína Yap en cardiomiocitos neonatales 48 h después del tratamiento con lentivirus ARNhc Yap. Yap ARNhc-3 se usó en experimentos posteriores. **(G)** Sobreexpresión de los miARN individuales en cardiomiocitos primarios neonatales de ratones mediante el uso de miméticos de miARN. La proliferación de cardiomiocitos se cuantificó mediante inmunotinción de Ki67. Los datos son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, frente a mimético de control, por ANOVA unidireccional.

Figura 11. Perfiles de expresión génica en corazones adultos después de la sobreexpresión inducible de miR302-367. **(A)** Esquema de la sobreexpresión de miR302-367 inducida en el corazón adulto mediante el uso de ratones *Myh6^{mercremer}* y niveles de expresión de todos los miembros de la agrupación miR302-367 en corazones adultos *Myh6^{mercremer};R26R-miR302-367^{Tg/+}* por qRT-PCR dos semanas después de la inducción de Cre con tamoxifeno. **(B)** Inmunotinción y cuantificación de TUNEL y DAPI en corazones adultos dos semanas después de la inducción de Cre con tamoxifeno. Barras de escala, 100 μ m. **(C)** Relaciones de peso cardíaco a longitud de la tibia (HW/TL) 2 semanas después de la administración de tamoxifeno. **(D)** Expresión diferencial de genes en corazones *Myh6^{mercremer};R26R-miR302-367^{Tg/+}* dos semanas después de la inducción de Cre. Los datos en **(B a D)** son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 3$). * $p < 0,05$ frente a control *Myh6^{mercremer}*, mediante la prueba t de Student.

Figura 12. Actividad de señalización de Hippo y características miocárdicas en el corazón adulto después de la sobreexpresión inducible de miR302-367. **(A)** Tinción nuclear y fosfo-Yap en cardiomiocitos ventriculares después del MI. **(B)** Expresión diferencial de genes relacionados con la proliferación celular (*Cks2*) y maduración y disfunción (relación de *Myh6* a *Myh7*) en los puntos de tiempo temprano (día 10) y tardío (día 21) después de la inducción de Cre en corazones *Myh6^{mercremer};R26R-miR302-367^{Tg/+}*. Los datos son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 6$). * $P < 0,05$ frente a control *Myh6^{mercremer}*, por ANOVA unidireccional. **(C)** La tinción de α -actinina revela una expresión de proteína sarcomérica reducida y una estructura sarcomérica desorganizada en las células positivas de linaje miocárdico (GFP+) en la línea *Myh6^{mercremer};R26R-miR302-367^{Tg/+}*.

Figura 13. Vida media del tratamiento con mimético de miR302-367 y los efectos sobre la proliferación de cardiomiocitos, la apoptosis y la perfusión vascular. **(A)** Expresión de miR302b/c/367 en el corazón adulto en diversos puntos de tiempo después del tratamiento mimético post-miARN. Los números en las barras indican el nivel de expresión relativa de miARN por qRT-PCR. **(B)** Esquema del experimento de tratamiento mimético y expresión de *Mst1*, *Lats2*, y *Mob1b* en el corazón el último día del tratamiento mimético miR. Se eligió el tratamiento diario mimético debido a la vida media relativamente corta de los miméticos de miARN in vivo (véase **A**). **(C)** Esquema del experimento de tratamiento mimético y qRT-PCR que muestra la expresión relativa de genes asociados con la proliferación celular y el programa génico fetal. **(D)** Esquema del infarto de miocardio (MI) y experimento de tratamiento mimético y qRT-PCR de componentes de señalización de Hippo en el día 7 después del MI. **(E)** Imágenes de inmunotinción y cuantificación para PH3, Tnnt2 y TUNEL en el día 7 después del MI. **(F)** Análisis de qRT-PCR que muestra la activación transitoria de genes relacionados con la proliferación celular, la supervivencia y el programa génico fetal en corazones tratados con mimético de miR después del MI. **(G)** El plexo vascular se destacó por Microfil a los 9 días después del MI y después de 7 días de tratamiento mimético de miR302b/c. (Fila inferior) Imágenes con mayor aumento. **(H)** Inmunotinción para CD31 y Tnnt2, marcadores de vasculatura, en corazones tratados con mimético de miR302-control. Barras de escala, 100 μ m. **(I)** La inmunotinción para SMA, vWF y Ki67 no muestra un aumento en la proliferación de las células de músculo liso y células endoteliales en corazones tratados con mimético de miR302 7 días después del MI. Los datos en **(A a F)** son la media $\pm$ s.e.m. ($n = 6$). * $p < 0,05$, frente a mimético de control, mediante la prueba t de Student.

Figura 14. Expresión de miméticos de miR302 en la histología pulmonar y de órganos después del tratamiento sistémico con miméticos. **(A)** qRT-PCR que muestra los niveles de miR302b/c/367 en el pulmón en varios puntos de tiempo después del tratamiento con miméticos-miARN. Los números en las barras indican el nivel de expresión relativa de miARN. **(B)** Análisis histológico que muestra la morfología normal en el pulmón, el hígado y el intestino en los ratones a las 6 semanas después del tratamiento con mimético de miR. Barras de escala, 100 μ m. Las imágenes son representativas de $n = 6$ animales.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a composiciones y procedimientos *ex vivo* para la estimulación de la proliferación celular y la desdiferenciación de células en células madre para fomentar la regeneración de tejidos. Específicamente, la invención se refiere a la administración transitoria de un microARN (miR) o su mimético para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos y la regeneración cardíaca.

Los inventores de esta solicitud han descubierto de manera sorprendente e inesperada que miR302-367 se expresa en el desarrollo cardíaco temprano y es importante para la proliferación de cardiomiocitos durante el desarrollo embrionario. El aumento de la expresión de miR302-367 conduce a la proliferación persistente y de alto nivel de cardiomiocitos y, finalmente, a cardiomegalia. miR302-367 funciona, en parte, al dirigirse a varios componentes de la vía de transducción de señales de Hippo, que incluyen *Mst1*, *Lats2* y *Mob1b*.

Los inventores de esta solicitud han encontrado además de manera sorprendente e inesperada que la reexpresión persistente de miR302-367 en el corazón posnatal reactiva el ciclo celular de los cardiomiocitos y aumenta la regeneración de los cardiomiocitos, pero conduce a la desdiferenciación de los cardiomiocitos y a la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, la aplicación temporal de miR302-367 o sus miméticos promueve la regeneración cardíaca sin los efectos no deseados en la función cardíaca. Estos estudios muestran un enfoque terapéutico del uso de miR o sus miméticos para la estimulación de la regeneración cardíaca e indican además que dichos enfoques deben ser transitorios para evitar la desdiferenciación y disfunción de los cardiomiocitos.

- Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un procedimiento *ex vivo* para la estimulación de la proliferación celular y la desdiferenciación de células de cardiomiocitos en células madre para la regeneración de tejido cardíaco, el procedimiento que comprende: poner en contacto transitoriamente dichas células con una composición que comprende una agrupación de microARN (miR) 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o de dicho mimético de la agrupación de miR, en el que dicho contacto transitorio es suficiente para activar transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no para reactivar el ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales.
- Además en la presente memoria se proporciona una composición que comprende una agrupación miR 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para su uso en la estimulación de la reparación y regeneración cardíaca en un sujeto o para su uso en la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos en un sujeto mediante la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o dicho mimético de la agrupación de miR en cardiomiocitos, en la que la administración transitoria de la composición a dicho sujeto activa transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no reactiva el ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales.
- Los términos "aplicación transitoria" o "temporal", como se usan en la presente memoria, pueden referirse a la aplicación o administración de una molécula de miR o su mimético suficiente para activar transitoriamente la proliferación de los cardiomiocitos, pero no para reactivar el ciclo celular de los cardiomiocitos postnatales. Por ejemplo, la aplicación transitoria o temporal puede comprender una única administración de la composición.
- Una composición para su uso en la invención puede incluir una agrupación de microARN (miR) 302-367, un mimético de la agrupación miR 302-367 o una combinación de los mismos.
- El término "agrupación de miR", como se usa en la presente memoria, se refiere a una región o locus genético que contiene una pluralidad de microARN. La agrupación de miR puede incluir una agrupación de genes adyacentes o relacionados, que en una realización, se cotranscriben de manera policistónica. Los genes miR en una agrupación pueden transcribirse bajo el control de un único promotor o una pluralidad de promotores. En una realización, una agrupación miR 302-367 incluye una única secuencia que tiene múltiples miR, todos correspondientes al locus 302-367.
- En algunas realizaciones, una agrupación de microARN (miR) 302-367 comprende una pluralidad de miARN, que incluyen, pero no se limitan a, miR-302a, miR-302a*, miR-302b, miR-302b*, miR-302c, miR-302c*, miR-302d, miR-367 y miR-367*.
- Las secuencias de ácido nucleico de miR-302b, miR-302b*, miR-302c, miR-302c*, miR-302a, miR-302a*, miR-302d, miR-367, y miR-367* son conocidas en la técnica y se describen en los documentos US2013/0035374 y WO2011/133288. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de miR-302b es: UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG (SEQ ID NO: 1) (núm. de acceso miRBase: MI0000772; ENTREZGENE: 442894); la secuencia de ácido nucleico de miR-302b* es: ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUCU (SEQ ID NO: 2) (núm. de acceso miRBase: MIMAT0000714); la secuencia de ácido nucleico de miR-302c es: UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG (SEQ ID NO: 3) (núm. de acceso miRBase: MI0000773; ENTREZGENE: 442895); la secuencia de ácido nucleico de miR-302c* es: UUUUAACAUGGGGUACCUGCUG (SEQ ID NO: 4) (núm. de acceso miRBase: MIMAT0000716); la secuencia de ácido nucleico de miR-302a es: UAAGUGGUUCCAUGUUUUGGUGA (SEQ ID NO: 5) (núm. de acceso miRBase: MI0000738; ENTREZGENE: 407028); la secuencia de ácido nucleico de miR-302a* es: UAAACGUGGAUGUACUUGCUUU (SEQ ID NO: 6) (núm. de acceso miRBase: MIMAT0000683); la secuencia de ácido nucleico de miR-302d es: UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU (SEQ ID NO: 7) (núm. de acceso de miRBase: MI0000774; ENTREZGENE: 442896); la secuencia de ácido nucleico de miR-367 es: AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA (SEQ ID NO: 8) (núm. de acceso de miRBase: MIMAT0004686; ENTREZGENE: 442912); y la secuencia de ácido nucleico de miR-367* es: ACUGUUGCUAAUAUGCAACUCU (SEQ ID NO: 9) (núm. de acceso de miRBase: MI0000772).
- Las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria pueden incluir secuencias de fragmentos homólogos, variantes y funcionales. Dichas secuencias se conocen en la técnica y se describen en US2013/0035374, WO2011/133288 y WO2009/091659.
- Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden reemplazarse por fragmentos u homólogos funcionalmente equivalentes, que en una realización, tienen al menos una homología de secuencia de 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 %. En particular, por ejemplo, los genes mir-302a, mir-302b, mir-302c y mir-302d y los ARN descritos en la presente memoria pueden reemplazarse por otros genes y ARN con funciones similares como, por ejemplo, mir-302a* mir-302b*, mir-302c*, mir-367, mir-93, mir-371, mir-372, mir-373, mir-520 y similares.
- En una realización, la agrupación miR302-367 para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención es el locus miR302-367 completo. En otra realización, la agrupación miR302-367 para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención es el intrón de la agrupación de genes miR302-367. En otra realización, la agrupación miR302-367 para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención son los primeros 1234 nucleótidos de la agrupación de genes miR302-367. En otra realización, la agrupación miR302-367 para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención es un gen recombinante que comprende uno o más de miR302b, miR302c, miR302a, miR302d y miR367 unidos para transcribirse como una sola unidad. En otra

realización, la agrupación miR302-367 para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención es un gen recombinante que comprende uno o más de miR302b, miR302c y miR367 unidos para transcribirse como una sola unidad. En una realización, solo los genes que codifican los miR se incluyen en la agrupación miR 302-367, mientras que en otra realización, las secuencias intrónicas entre y adyacentes a los genes que codifican los miR se incluyen en la agrupación miR 302-367. En otra realización, la agrupación miR302-367 es un fragmento de 644 pb de la región miR302-367 de ser humano o un fragmento de 690 pb de la región miR302-367 de ratón. En otra realización, la agrupación miR302-367 es la región intrónica entre los exones 8 y 9 del gen *Larp7* como se indica en la base de datos Ensembl.

En una realización, los miembros mir-302 comparten una secuencia idéntica (100 %) en sus primeros diecisiete (17) nucleótidos 5', que incluyen el motivo de semilla completo, y una homología global de 83 %-96 % en sus secuencias de miARN maduro de 23 nucleótidos. El motivo de la semilla se encuentra en los primeros ocho nucleótidos 5' de una secuencia de miARN maduro, lo que determina la especificidad de unión y la eficiencia entre el miARN y sus genes diana. Basado en la predicción de TARGETSCAN (<http://www.targetscan.org/>) y PICTAR-VERT (http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi?) Programas vinculados a la miRBase Sanger: Sitio web de secuencias (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), están dirigidos contra casi los mismos genes celulares, que incluyen más de 445 genes conservados en ser humano y ratón. La mayoría de estos genes diana son señales de desarrollo y factores transcripcionales involucrados en el inicio y/o facilitación de la diferenciación celular específica de linaje durante la embriogénesis temprana (Lin y otros, (2008) RNA 14:2115-2124). Muchos de estos genes diana son además oncogenes bien conocidos. Por ejemplo, la agrupación mir-302/367 se dirige, *entre otros*, a dieciocho miembros de las vías de señalización del receptor IGF (IGFR)-Ras/PI3K donde los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) son potentes señales de desarrollo para la diferenciación del linaje celular específico de neuronas a través de la proteína quinasa activada por Ras/Raf/mitógeno (MAPK) o la vía de transducción de señales de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt, que son las mismas vías de señalización involucradas en muchas transformaciones de tumor/cáncer, tales como tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y melanoma de piel. Por lo tanto, en una realización, las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden usarse para suprimir tumores o la formación de tumores.

Los procedimientos descritos aquí pueden usarse además con familias de miARN distintas de miR-302-367. En una realización, la familia de miARN es la agrupación miR290/295 en el cromosoma 7 en el ratón. En otra realización, la familia de miARN es la agrupación hsa-miR-372 (MI0000780), hsa-miR-373 (MI0000781) o hsa-miR-373/373*; hsa-miR-371-373; hsa-miR-520c (MI0003158) o hsa-miR-520c-5p/520c-3p; mmu-miR-290 (MI0000388), mmu-miR-291a (MI0000389) o mmu-miR-291a-5p/291a-3p; mmu-miR-294 (MI0000392) o mmu-miR-294/294*; y mmu-miR-295 (MI0000393), o mmu-miR-295/295* u otros descritos en Suh y otros. (2004) Dev. Biol. 270:488-498, o de cualquier otra manera conocido en la técnica. En una realización, puede usarse una combinación de los miR mencionados anteriormente en las composiciones y procedimientos descritos aquí. Esta lista no debe interpretarse como limitante, y pueden usarse otras familias de miARN expresadas de manera muy específica en células madre embrionarias en los procedimientos descritos aquí.

En la presente memoria se describe que los siguientes miARN pueden usarse en las composiciones y procedimientos descritos aquí, en lugar de o adicionalmente a la agrupación miR-302-367: miR106, miR20a/b, miR93, miR17-92, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, se usa un mimético de microARN en las composiciones y procedimientos descritos aquí. El mimético de miARN puede incluir un oligonucleótido bicatenario diseñado para mimetizar la función del miARN maduro endógeno. En algunas realizaciones, el mimético de miARN puede incluir una o más modificaciones químicas que mejoran la estabilidad y/o funcionalidad del dúplex. En una realización, la modificación puede incluir la modificación 2'-O-metilo de algunos o todos los nucleótidos de la cadena codificante y/o minimiza la sensibilidad a nucleasa de la cadena y/o mejora la entrada de la cadena no codificante en el complejo de silenciamiento por interferencia del ARN (RISC). El mimético puede mejorarse químicamente para programar preferentemente el Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC) con la cadena de miARN activa.

El mimético de miARN puede comprender además una o más modificaciones químicas como se describe en el documento US2007/0269889. Pueden usarse además los miméticos disponibles comercialmente, por ejemplo, de Dharmacon o Qiagen.

En un ejemplo, el mimético es un mimético modificado con colesterol. En una realización, el mimético permite la expresión del miARN no mediada por virus. En una realización, el mimético es una versión pequeña y activa de un microARN. En otra realización, el mimético es un fragmento de ARN similar al miRNA bicatenario no natural, que en una realización se diseña para tener su extremo 5' que contenga un motivo parcialmente complementario a la secuencia seleccionada en la UTR 3' única para el gen diana. En una realización, este fragmento de ARN puede unirse específicamente a su gen diana de una manera específica del gen. En una realización, el mimético es un mimético de miARN múltiples, que es capaz de silenciar múltiples genes. En una realización, el mimético es un mimético de miARN múltiples, como se describe en Wang, 2009 (Multi-miRNA Hairpins and Multi-miRNA Mimics Technologies in MicroRNA Interference Technologies, Springer Berlin Heidelberg).

Pueden usarse uno o más precursores pre-miARN en las composiciones y procedimientos descritos aquí. El precursor pre-ARNm puede actuar para ganar función para el miARN. Puede usarse cualquier forma adecuada de un precursor pre-ARNm.

En algunas realizaciones, cuando se usa un precursor mimético o pre-miARN, pueden usarse uno o más precursores miméticos o pre-miARN en lugar de todos en la agrupación.

En una realización, el miARN de las composiciones y procedimientos descritos aquí puede ser miARN maduro. Alternativamente, el miARN puede ser un precursor de miARN. En una realización, un precursor de miARN es un pre-miARN, que está sujeto a escisión por una endonucleasa bicatenaria de tipo ARNasa III llamada Dicer, lo que da como resultado un dúplex miARN:miARN* imperfecto que tiene un tamaño de alrededor de 20-25 nucleótidos. Este dúplex contiene la cadena de miARN maduro y su cadena de miARN* complementaria opuesta.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición que comprende a) un ácido nucleico aislado que comprende una agrupación de microARN (miR) 302-367 o su mimético y b) un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC). Preferentemente, el inhibidor de HDAC es ácido valproico. Otros inhibidores de HDAC adecuados son conocidos en la técnica y pueden usarse. Un inhibidor de HDAC interfiere con la función de la histona desacetilasa para eliminar las agrupaciones acetilo de los residuos de lisina lo que conduce a la formación de cromatina condensada y silenciada transcripcionalmente.

En otro aspecto, se proporcionan además en la presente memoria los vectores de expresión. Un vector de expresión que tiene un miARN puede suministrarse a las células de un sujeto. Las moléculas de ácido nucleico se suministran a las células de un sujeto en una forma en que puedan asimilarse y se expresen ventajosamente de modo que puedan alcanzarse niveles terapéuticamente eficaces.

Los procedimientos para el suministro de polinucleótidos a una célula incluyen el uso de un sistema de suministro, tales como liposomas, polímeros, microesferas, vectores de terapia génica y vectores de ADN desnudos.

Puede usarse la transducción viral (*por ejemplo*, vectores retrovirales, adenovirales, lentivirales y virales asociados a adeno) para la terapia génica de células somáticas, especialmente debido a su alta eficacia de infección y su integración y expresión estables (*véase, por ejemplo*, Cayouette y otros, Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido y otros, Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer y otros, Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini y otros, Science 272:263-267, 1996; y Miyoshi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:10319, 1997). Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una molécula de miARN se clona en un vector retroviral y la expresión se guía a partir de su promotor endógeno, a partir de la repetición terminal larga retroviral o a partir de un promotor específico para un tipo de célula diana de interés. Otros vectores virales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, un virus vaccinia, un virus del papiloma bovino o un virus del herpes, tal como el virus de Epstein-Barr (*véase también*, por ejemplo, los vectores de Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis y otros, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev y otros, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta y otros, Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller y otros, Biotechnology 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle y otros, Science 259:988-990, 1993; y Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995). Los vectores retrovirales están particularmente bien desarrollados y se han usado en entornos clínicos (Rosenberg y otros, N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson y otros, documento US5,399,346). Los enfoques no virales pueden emplearse además para la introducción de un miARN terapéutico en una célula de un sujeto. Por ejemplo, puede introducirse un miARN en una célula mediante administración del ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413, 1987; Ono y otros, Neuroscience Letters 17:259, 1990; Brigham y otros, Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger y otros, Methods in Enzymology 101:512, 1983), conjugación asialoorosomucoide-polilisina (Wu y otros, Journal of Biological Chemistry 263:14621, 1988; Wu y otros, Journal of Biological Chemistry 264:16985, 1989), o por microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff y otros, Science 247: 1465, 1990). Preferentemente, las moléculas de microARN se administran en combinación con un liposoma y protamina.

La transferencia de genes puede lograrse además mediante el uso de medios no virales que implican transfección *in vitro*. Dichos procedimientos incluyen el uso de fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas pueden además ser potencialmente beneficiosos para el suministro de ADN a una célula. La expresión de micro ARN para su uso en procedimientos de terapia de polinucleótidos puede guiarse a partir de cualquier promotor adecuado (*por ejemplo*, los promotores del citomegalovirus de ser humano (CMV), del virus simio 40 (SV40) o de metalotioneína), y se regula por un elemento regulador apropiado de mamíferos. Por ejemplo, si se desea, los potenciadores conocidos por dirigir preferentemente la expresión génica en tipos celulares específicos pueden usarse para dirigir la expresión de un ácido nucleico. Los potenciadores usados pueden incluir, sin limitación, aquellos que se caracterizan como potenciadores específicos de tejidos o de células. Para un sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

En otra realización, se proporcionan composiciones terapéuticas que aumentan la expresión de los microARN descritos en la presente memoria para el tratamiento. En otra realización, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un agente que potencia la expresión de un miARN descrito aquí. Los polinucleótidos descritos aquí pueden

administrarse como parte de una composición farmacéutica. La composición está preferentemente estéril y contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de polinucleótido en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un sujeto.

La molécula polinucleotídica terapéutica descrita aquí puede administrarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional puede emplearse para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar los compuestos a los pacientes.

El vehículo como se usa en la presente memoria incluye vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que está expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponada. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

Los ingredientes activos pueden encerrarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistema de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Las formulaciones que se usan para la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se realiza fácilmente por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles. Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilo-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (documento US3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no-degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan las proteínas durante períodos de tiempo más corto.

Las composiciones descritas aquí pueden administrarse en combinación con uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos, que incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasas, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteína tirosina quinasa (PTK), anticuerpos adicionales, u otros agentes terapéuticos. En una realización, las composiciones de la invención se administran junto con radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, cirugía u otra inmunoterapia, a un paciente que tiene un trastorno hiperproliferativo, tal como cáncer o un tumor.

La administración puede comenzar antes de que el paciente presente síntomas. Puede emplearse cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intratumoral, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intrahepática, intracapsular, intratecal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, supositorio o administración oral. Por ejemplo, las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas aquí se administran sistémicamente. Preferentemente, la administración sistémica incluye administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal y rectal. En una realización, es ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los procedimientos bien conocidos en la técnica para elaborar formulaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" Ed. A. R. Gennaro, Lippincourt Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2000. Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados. Puede usarse un polímero de lactida, copolímero de lactida/glicólido, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno que sean biocompatibles y biodegradables para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de suministro parenteral para moléculas inhibidoras de ácidos nucleicos incluyen partículas de copolímeros de acetato de etilenvinilo,

bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilen-9-lauril éter, glicocolato y desoxicocolato, o pueden ser soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

La dosis para tratar a un sujeto puede depender de la elección de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la enfermedad del sujeto, el tamaño, el peso, el área superficial, la edad y el sexo del sujeto, otros fármacos que se administran y el juicio del médico a cargo.

Además en la presente memoria se divulgan kits que comprenden: un ácido nucleico aislado que comprende una agrupación del microARN (miR) 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 e instrucciones. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC).

El término "aproximadamente" como se usa en la presente memoria puede referirse en términos cuantitativos más o menos 5 %, o más o menos 10 %, o más o menos 15 %, o más o menos 20 %.

El término "sujeto", como se usa en la presente memoria se refiere a un mamífero que incluye un ser humano que necesita la terapia para, o es susceptible a, una afección o sus secuelas. El sujeto puede incluir perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, carneros, caballos, ratas y ratones y humanos. El término "sujeto" no excluye a una persona que es normal en todos los aspectos. Un sujeto a tratar puede identificarse a juicio del sujeto o de un profesional de la salud, que puede ser subjetivo u objetivo.

El término "tratamiento", como se usa en la presente memoria, puede referirse a la administración de una sustancia a un sujeto con el propósito de curar, aliviar, mitigar, remediar, prevenir, suprimir, inhibir o mejorar un trastorno, síntomas del trastorno, una enfermedad estado secundario al trastorno, o predisposición hacia el trastorno. "Tratar" puede referirse a un tratamiento terapéutico o medidas preventivas o profilácticas, en el que el objetivo es prevenir o aliviar la afección o trastorno patológicos específicos como se describió anteriormente o "tratar" puede referirse solo al tratamiento terapéutico. Por lo tanto, "tratar" puede incluir directamente afectar o curar, suprimir, inhibir, evitar, reducir la severidad de, retrasar el inicio de, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o condición, o una combinaciones de los mismos. Adicionalmente, "tratar" se refiere, *entre otros*, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de, o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o una combinación de los mismos. Además, "prevenir" se refiere, *entre otros*, a retrasar la aparición de síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir la cantidad o frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre los episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos. Además, "suprimir", se refiere, *entre otros*, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir la cantidad de síntomas, reducir la incidencia de los síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de los mismos.

Los términos "cantidad eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un compuesto que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El resultado médicamente deseable puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto).

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las modalidades preferentes de la invención. Los procedimientos para realizar los experimentos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Una vía de microARN-Hippo que promueve la proliferación de cardiomiocitos y la regeneración cardíaca en ratones

A diferencia de los vertebrados inferiores, el corazón de los mamíferos tiene una capacidad limitada para regenerarse después de una lesión, en parte debido a la reactivación ineficaz de la proliferación de cardiomiocitos. Si bien existe evidencia de un bajo nivel de proliferación de cardiomiocitos en el corazón adulto, no está claro si el aumento de esta tasa podría usarse para la estimulación de terapéuticamente la regeneración cardíaca. En este ejemplo, se muestra que la agrupación de microARN miR302-367 es importante para la proliferación de cardiomiocitos durante el desarrollo y es suficiente para inducir la proliferación de cardiomiocitos en el adulto y promover la regeneración cardíaca. La pérdida de miR302-367 conduce a una disminución de la proliferación de cardiomiocitos durante el desarrollo. Por el contrario, el aumento de la expresión de miR302-367 conduce a un profundo aumento de la proliferación de cardiomiocitos, en parte a través de la represión de la vía de Hippo de transducción de señales. La expresión posnatal de miR302-367 conduce a la reactivación del ciclo celular en los cardiomiocitos, lo que resulta en una formación reducida de cicatrices después del infarto. Sin embargo, la expresión a largo plazo de miR302-367 conduce a la desdiferenciación y disfunción de los cardiomiocitos, lo que sugiere que no es deseable la reactivación persistente del ciclo celular en los cardiomiocitos posnatales. Es importante destacar que esta limitación puede superarse mediante la aplicación sistémica transitoria de

miméticos de miR302-367, lo que conduce al aumento de la proliferación y masa de los cardiomiocitos, disminución de la fibrosis y una mejor función después de la lesión. Nuestros datos demuestran la capacidad de los enfoques terapéuticos basados en microARN para la estimulación de la reparación y regeneración cardíaca a través de la activación transitoria de la proliferación de cardiomiocitos.

5

Materiales y procedimientos

Alelos de ratón

10 El alelo miR302-367flox/flox se generó mediante flanqueo de los cinco miARN en esta agrupación con sitios loxP mediante el uso de recombinación homóloga estándar en células ES. El alelo R26R-miR302-367Tg/+ se generó mediante el uso de vectores descritos previamente para insertar una secuencia de ADN que contiene los cinco miembros de la agrupación miR302-367 en el locus CAG-R26R mediante el uso de recombinación homóloga estándar en células ES. La genotipificación de cebadores para estos dos nuevos alelos se enumeran en la Tabla 5. La
15 La generación y genotipificación de las líneas Nkx2.5cre y Myh6mercremer se ha descrito anteriormente. Los ratones mantuvieron un trasfondo mixto C57BL/6:129SVJ. Todos los procesos con animales se realizaron de acuerdo con el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania.

Histología

20

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se embebieron en parafina y se seccionaron a intervalos de 6 µm. La tinción inmunohistoquímica y otros procedimientos histológicos se realizaron mediante el uso de protocolos descritos previamente. Los anticuerpos primarios fueron: MF20 (1:20; Banco de Hibridomas-Universidad de Iowa), Ki67 (1:50; Abcam, ab16667), α-actinina (1:100; Sigma, A7811), Fosfo-Histona H3 (PH3, 1:200; Cell Signaling Technology; 9706L), fosfo-Yap (1:200; Cell Signaling Technology, 4911), Yap (1:100; TCell Signaling Technology, 4912S), Troponina T
25 cardíaca (cTnT, 1:100; Thermo Scientific, MS-295-P1), Troponin TC (Tnnt2, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, sc-8121), AuB (1:100; Abcam, ab2254), BrdU (1:50; Banco de Hibridomas en la Universidad de Iowa). El tamaño celular se cuantificó mediante el uso del software ImageJ a partir de tres corazones independientes por grupo y 6 secciones histológicas por corazón. La hibridación in situ de montaje completo se realizó mediante el uso de una sonda pri-miR302-367 y protocolos obtenidos de Exiqon. La relación citoplásmica y nuclear para la proteína Yap total se cuantificó
30 mediante el uso de imágenes de inmunofluorescencia y el software de imágenes Fiji.

Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos neonatales

35 Los cardiomiocitos neonatales de ratón se prepararon por el Laboratorio Central de Miocitos Cardíacos de la Universidad de Pensilvania. En resumen, los cardiomiocitos de ratón se aislaron por disociación enzimática de corazones de neonatos de 1 día de edad (PI). Las células se colocaron en placas diferencialmente durante 2 horas para eliminar los fibroblastos. Los cardiomiocitos se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con laminina (10 mg/cm²) en placas de 12 pocillos a $2,5 \times 10^5$ células por pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con
40 medio nuevo, y las células se sometieron a transducción con lentivirus miR-302-367 y lentivirus de ARNhc Yap (ARNhc de pLKO.1-Yap) (Thermo Scientific Open Biosystems, RMM4534), mediante el uso de polibreno (5 mg/mL; American Bioanalytical). Después de 48 horas, los cardiomiocitos se fijaron y procesaron para inmunotinción con los anticuerpos indicados.

Expresión de lentivirus en cardiomiocitos

Se cultivaron células embrionarias de ser humano 293T de riñón (HEK) (Colección Americana de Tipos de Cultivos) en placas de 100 mm con una confluencia de 70 %. Los vectores lentivirales se empaquetaron en células 293T mediante el uso de X-tremeGENE9 (Roche) para suministrar 5 mg del plásmido lentiviral, 2,5 mg de psPAX2 y 2,5 mg de pMD2.G (plásmido Addgene 12259). El sobrenadante viral se colectó a las 48 horas después de la transfección, se concentró y
50 se aplicó a los cardiomiocitos.

Expresión génica y análisis de microarreglos

55 El análisis cuantitativo por PCR se realizó mediante el uso de ARN aislado con Trizol y se usó para generar ADNc mediante el uso de cebadores de hexámeros aleatorios y SuperScript II RT (Invitrogen). Las secuencias del cebador por qRT-PCR se enumeran en la Tabla 5. Los ensayos de microARN TaqMan se usaron para la detección de la expresión de miARN. Para el análisis de microarreglos, se extrajo el ARN total de tres corazones Nkx2.5cre y tres Nkx2.5cre:R26R-miR302-367Tg/+ en P14, se convirtió a ADNc y se usó en matrices Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST. Los
60 datos se analizaron mediante el uso de Affymetrix Microarray Suite 5.0, Análisis de Significación de Microarreglos (SAM) y Análisis Bayesiano Empírico de Microarreglos (EBAM). Los genes con cambios de 1,5 veces o más sobre la media experimental con $p < 0,01$ (ANOVA) se consideraron significativos. El conjunto completo de datos de microarreglos se ha depositado en la base de datos GEO (número de acceso GSE54988).

Aislamiento de cardiomiocitos adultos y análisis FACS

65

Se disecaron corazones adultos (de 8 a 10 semanas de edad). Los miocitos ventriculares se aislaron mediante el uso de un procedimiento modificado de un protocolo descrito previamente. Brevemente, los corazones extirpados se montaron en un aparato Langendorf y se perfundieron con solución de Tyrode libre de Ca^{2+} durante 6 min a 3,0 a 3,5 mL/min a una temperatura de 37 °C, seguido de 12 a 15 min de perfusión con solución de Tyrode libre de Ca^{2+} que contiene colagenasa B (0,35 mg/mL), colagenasa D (0,25 mg/mL; Roche Chemical Co.) y proteasa tipo XIV (0,05 mg/mL; Sigma Chemical Co.). Los ventrículos se desmenuzaron en pedazos pequeños con pinzas, y las secciones de tejido ventricular se trituraron suavemente con una pipeta Pasteur para disociar los miocitos individuales. Los no cardiomiocitos se drenaron por centrifugación. La suspensión de cardiomiocitos se enjuagó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se fijó en tampón de fijación intracelular (eBioscience). Para los análisis FACS de la pureza de los cardiomiocitos, las células se permeabilizaron primero en tampón de permeabilización 1× (eBioscience) y después se incubaron con troponina T cardíaca (1:100; Thermo Scientific, MS-295-P1) durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de incubación con anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647, Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron en un BD FACSCanto II (BD Biosciences).

Modelo experimental de infarto del miocardio (MI)

Se usaron ratones adultos (12-15 semanas de edad, 30-35 gramos y género mixto) del genotipo y trasfondo indicados. Para el estudio de miméticos de miR, se usaron ratones adultos (10-12 semanas de edad, 25-30 gramos, machos) del trasfondo C57BL/6J. Después de alcanzar una profundidad adecuada de anestesia mediante inyección intraperitoneal de Avertin (200-300 mg/kg, IP) y/o inhalación de isoflurano (1-3 %), las regiones de las áreas quirúrgicas (cuello y tórax) se afeitaron y se aplicaron agentes antisépticos después (betadina y etanol al 70 %). El ratón se fijó en posición supina con cinta adhesiva. La lengua se retrajo y se sostuvo con pinzas, y se insertó un catéter IV 20 G por vía oral en la tráquea. El catéter se unió a un Minivent (tipo 845, aparato de Harvard) a través del conector en forma de Y. La ventilación se realizó con un volumen corriente de 0,25-0,35 mL (10 mL/kg) y una frecuencia respiratoria de 80-110/min. Se proporcionó oxígeno puro (100 %) a la entrada del ventilador.

Se realizó una toracotomía por separación del cuarto o quinto espacio intercostal para exponer el corazón. Se abrió el pericardio y se visualizó el corazón mediante una suave retracción en la caja torácica. Una ligadura de seda 8-0, que ingresó al corazón en el margen izquierdo del cono pulmonar y salió cerca de la inserción del apéndice auricular izquierdo, se ató suavemente a la arteria coronaria LAD para inducir un MI permanente. La incisión en el pecho y la piel se cerró por capas con suturas 4-0 o 5-0. El ratón se retiró del ventilador a los 10-30 minutos después del MI y se colocó en jaulas externas calientes durante aproximadamente 15-45 minutos hasta la recuperación completa. El procedimiento simulado se realizó de manera idéntica, con la excepción de que la ligadura de oclusión no estaba atada.

Suministro sistémico de miméticos de miARN mediante el uso de una emulsión de lípidos neutros

Los miméticos sintéticos de miR302b/c y el mimético de control de miARN (Dharmacon) se formularon con emulsión de lípidos neutros (NLE, MaxSuppressor in vivo RNALancerII, BIOO Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ratones adultos (10 semanas) recibieron una dosis única de miméticos de miARN formulados con NLE de 10 mg mediante inyección intravenosa de la vena de la cola. Se eligió una dosis única por día sobre la base de estudios que muestran que la vida media de los miméticos en el tejido cardíaco estaba entre 8 y 24 horas (Figura 13A). Los corazones se perfundieron con PBS para eliminar la sangre circulante y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido en los puntos de tiempo indicados después del tratamiento con mimético de miARN. Para la qRT-PCR de la concentración del mimético en el tejido, se aisló el ARN de los tejidos del corazón y se siguió el procedimiento del kit de aislamiento de miARN mirVana (Ambion). Para determinar el efecto de los miméticos de miARN en el resultado cardiovascular después del MI, se administraron miméticos de miR-302b/c o miméticos de control de miARN (10 mg por ratón sistémicamente) diariamente durante 7 días después del MI.

Ecocardiografía

Los ratones se anestesiaron con inhalación de inducción de isoflurano al 3 %, seguido de mantenimiento al 2 % mediante el uso de un cono nasal. El ratón se colocó en una plataforma tibia en posición supina para mantener la temperatura corporal alrededor de 37 °C. El pelo torácico se eliminó mediante el uso de una crema de depilación en gel (Nair). Las extremidades se pegan con cinta adhesiva a los cables metálicos de EKG. El eco se realizó mediante el uso del sistema VisualSonic Vevo 2100 con un transductor de 40 MHz para imágenes cardíacas. En resumen, al colocar el transductor a lo largo del eje largo del LV y dirigir hacia el lado derecho del cuello del ratón, se obtiene el eje largo bidimensional del LV. Luego, el transductor se gira 90 grados en el sentido de las manecillas del reloj y se visualiza la vista del eje corto del LV. El modo M del LV guiado por 2D a nivel del músculo papilar se registra desde la vista del eje corto y/o la vista del eje largo. Los espectros Doppler de entrada transmitral se registran en una vista apical de 4 cámaras al colocar el volumen de muestra en la punta de las válvulas mitrales. Las imágenes de eco se descargan y analizan sin conexión mediante el uso del software de análisis de imágenes (Vevo 2100, 1.6, VisualSonic). Se midieron y promediaron al menos tres latidos de imágenes para la interpretación de cualquier medición dada. Los diámetros internos diastólicos y sistólicos finales del ventrículo izquierdo (LVIDd, LVID) se midieron desde la vista del eje corto ventricular izquierdo con imágenes en modo M orientadas en 2D. La función sistólica del ventrículo izquierdo se estimó mediante acortamiento fraccional (FS, %) de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{FS (\%)} = [(\text{LVIDd} - \text{LVIDs}) / \text{LVIDd}] \times 100$

100. La fracción de eyección (FE) se calculó mediante el uso de los volúmenes final sistólico y final diastólico como se describió.

Perfusión retrógrada y llenado del corazón del ratón con Microfil para la visualización de la vasculatura coronaria

La visualización de la arteria coronaria del ratón se realizó mediante la adopción de una técnica para llenar in vivo los vasos coronarios del ratón. Brevemente, el ratón se sacrificó con desangrado bajo anestesia profunda, y el corazón se purgó de sangre con solución salina fría a través de la vena cava inferior. Las principales ramas de los vasos, excepto la aorta ascendente y la arteria pulmonar, se ligaron para evitar fugas. Se introdujo un angiocatéter de calibre 26 en la aorta proximal y se perfundió el corazón con solución salina fría (1-2 mL), solución de KCl 0,1 M (1 mL), después con fijador (PFA al 2 %, 1 mL) durante aproximadamente 2 minutos. Se inyectó Microfil amarillo (Flow Tech, Inc.) en la aorta hasta que se evidenció un buen llenado de los vasos coronarios (arterias y venas) con la visualización al microscopio. Una vez que se completó el llenado, la raíz de la aorta ascendente y la arteria pulmonar se unieron rápidamente para mantener el Microfil dentro de los vasos cardíacos para obtener imágenes. Se extrajo el corazón y se fijó en PFA al 4 % durante la noche a 4 °C antes de obtener la imagen. Las imágenes generales de la vasculatura coronaria se tomaron con una cámara digital bajo microscopía.

Análisis de la transferencia Western

Las proteínas se aislaron y se solubilizaron después de la extracción de ARN y ADN con TRIzol a partir de células cultivadas como se describió previamente. Brevemente, los cardiomiocitos neonatales de ratón se homogeneizaron en reactivo TRIzol, seguido de la adición de cloroformo. El ARN en la fase acuosa superior se separó con el ADN y las proteínas en la fase orgánica inferior. El ADN se precipitó mediante la adición de etanol. La proteína en el sobrenadante de fenol-etanol se precipitó con acetona. El sedimento de proteínas se lavó luego con clorhidrato de guanidina 0,3 M/etanol al 95 % y se disolvió en SDS al 1 % a 50 °C. Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el uso del kit de reactivo de ensayo de proteína BCA (Bio-Rad Laboratories). Los extractos de proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida (gel NuPAGE bis-tris al 10 %, Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Laboratorios Bio-Rad). Se usaron anti-Yap de conejo (1:500; Cell Signaling Technology) y anti-gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de ratón (1:1000; Sigma) como los anticuerpos primarios. Las manchas se detectaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Scientific).

Secuenciación de alto rendimiento del ARN aislado mediante inmunoprecipitación con entrecruzamiento (HITS-CLIP)

La HITS-CLIP se realizó según lo publicado con el uso del anticuerpo monoclonal Argonauta 2A8.3 x 10E6 para células madre embrionarias de ratón que se colocaron en placas y, 48 horas después, se entrecizaron una vez con 400 mJ/cm² y una adicional de 200 mJ/cm² sobre hielo. La genoteca Illumina se secuenció en un Illumina GA-IIx en el Centro de Genómica Funcional de la Universidad de Pensilvania. Las lecturas se alinearon con el genoma de ratón (mm9), RefSeqs y pre-miARN (mirBase 13.0) mediante el uso de ELAND y se permitió hasta dos desajustes. Se identificaron picos significativos de agrupación con etiqueta CLIP ubicados en la 3'UTR del ARNm, y se identificaron reguladores potenciales de miARN como se describió previamente.

Ensayos de reportero luciferasa

El gen de luciferasa de luciérnaga se derivó del vector básico con pGL3 (Promega) y se clonó en el vector pcDNA3.1(-). El fragmento de ADN que contiene la UTR 3' de longitud completa para supuestas dianas de miR-302-367 se insertó en el pcDNA3.1(-) corriente abajo del ADNc de luciferasa. Las células NIH-3T3 se transfectaron mediante el uso del reactivo Eugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante con reportero luciferasa y un plásmido de expresión para miR302-367 (pcDNA3.1- miR-302-367). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los extractos celulares se analizaron para determinar la expresión de luciferasa mediante el uso de un kit comercialmente disponible (Promega). Las actividades relativas del reportero se expresan como unidades de luminiscencia normalizadas para la expresión de β -galactosidasa en los extractos celulares.

Estadística

Los datos se informan como la media $\pm$ SEM de al menos tres ensayos independientes a menos que se indique lo contrario. La prueba t de Student no pareada se usó para comparaciones individuales y la ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples. La significación estadística se muestra como *P <0,05 o **P <0,01 a menos que se indique lo contrario.

Resultados

Se requiere la agrupación miR302-367 para la proliferación de cardiomiocitos durante el desarrollo

La expresión de miR302-367 durante el desarrollo pulmonar temprano en ratones sugiere que esta agrupación de miARN puede expresarse en otros tejidos durante el desarrollo. Para determinar si la agrupación miR302-367 se expresó durante el desarrollo cardíaco, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en ARN aislado de corazones embrionarios de ratón en múltiples etapas de desarrollo. Los cinco miembros de la agrupación miR302-367 se expresaron en el día embrionario (E) 9.5, pero su expresión disminuyó significativamente después de E11.5 (Figura 1A). La hibridación in situ indicó que la agrupación miR302-367 se expresa en el miocardio del corazón embrionario de ratón ya en E8.5 (Figura 8A). En las etapas posnatal y adulta, la expresión de estos miARN no fue detectable por qRT-PCR (Figura 1A).

Para investigar el papel de la agrupación miR302-367 en el desarrollo cardíaco, generamos una línea de ratón miR302-367^{flox/flox} y se usó la línea Nkx2.5^{cre} para eliminar toda la agrupación durante la cardiogénesis (Figura 8, Banda C). Se observó por qRT-PCR una disminución de la expresión de los miembros de la agrupación miR302-367 en corazones Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} (Figura 8D). La agrupación miR302-367 se encuentra en el intrón 8 del gen *Larp7*. Sin embargo, la expresión de *Larp7* no se vio afectada por la eliminación genética del locus miR302-367. Los corazones Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} exhibieron paredes ventriculares más delgadas y disminuyeron la proliferación en comparación con los compañeros de camada de control (Figura 1, B y C).

La disminución de la expresión del gen de proliferación del ciclo celular *Ccnd1* (ciclina D1) fue consistente con la disminución de la proliferación celular en corazones mutantes Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} (Figura 1D). Además, los corazones mutantes Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} mostraron una expresión disminuida de *Gata4*, *Nkx2.5*, *Myh6* y *Myh7*, lo que indica defectos en la diferenciación de los cardiomiocitos en E14.5 (Figura 1D). Sin embargo, no observamos un cambio significativo en la muerte celular programada o la pérdida de viabilidad en mutantes Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} (Figura 8F), lo que sugiere una compensación por otros miARN o vías más adelante en el desarrollo.

La sobreexpresión de miR302-367 promueve la proliferación de cardiomiocitos en corazones embrionarios y posnatales

Se generó una línea de ratón condicional para realizar experimentos de ganancia de función miR302-367 *in vivo* (R26R-miR302-367^{Tg/+}) (Figura 9, A y B). Mediante activación de este alelo con el uso de la línea Nkx2.5^{cre} dio como resultado una expresión de alto nivel de todos los miembros de la agrupación miR302-367 (Figura 9C) y un marcado aumento en la proliferación de cardiomiocitos en E18.5 (Figura 2A). Los mutantes Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} murieron en P28. En P20, los mutantes Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} exhibieron un agrandamiento cardíaco profundo, o cardiomegalia, acompañado de una extensa proliferación de cardiomiocitos (Figura 2B). Esto está en contraste con los compañeros de camada de control, que no exhibieron una proliferación de cardiomiocitos notable en P20, de acuerdo con las observaciones anteriores.

Se aislaron los cardiomiocitos de corazones P17 y se encontró que tenían un aumento significativo en el porcentaje de cardiomiocitos mononucleados y binucleados y una disminución en el porcentaje de cardiomiocitos multinucleados (Figura 9D), lo que sugiere que la sobreexpresión de miR302-367 afecta tanto la actividad del ciclo celular como la nucleación de cardiomiocitos cuando se expresan desde el comienzo del desarrollo cardíaco. Aunque las relaciones de peso cardíaco a la longitud de tibia fueron significativamente mayores para los mutantes Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} en P20 (Figura 9E), los cardiomiocitos en estos mutantes eran más pequeños y exhibían una estructura sarcomérica desorganizada en comparación con los cardiomiocitos de control, lo que sugiere un aumento en el número de cardiomiocitos y un fenotipo menos maduro (Figura 3A y Figura 9F). Los corazones mutantes Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} tenían una función cardíaca deficiente con fracción de eyección y acortamiento fraccional reducidos (Figura 9G). La apoptosis de cardiomiocitos se incrementó en corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} en P20 en comparación con los corazones Nkx2.5^{cre} de la camada de control, pero esto puede deberse a los defectos generales en la maduración de los cardiomiocitos, lo que condujo a una función e insuficiencia cardíacas comprometidas (Figura 9H).

Para comprender mejor los efectos que la sobreexpresión de miR302-367 tiene en el transcriptoma de los cardiomiocitos, se realizó un análisis de microarreglos en los ventrículos de corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} mutantes P14 y de control. El análisis de ontología génica reveló que los genes con modulación más diferencial en corazones Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+} pertenecían a vías involucradas en el control de la proliferación celular y la regulación negativa de la diferenciación celular (Figura 3B). qRT-PCR confirmó el aumento de la expresión de una variedad de genes asociados a la proliferación celular, que incluyen *Brca2*, *RacGap1*, *Nusap1*, *Myh10y* *Cks2*, en comparación con corazones Nkx2.5^{cre} (Figura 3C), además de una mayor expresión de *Bcl2*, que es un represor de la apoptosis, y varios marcadores asociados con la regulación negativa de la diferenciación de cardiomiocitos, que incluyen *Myh7*, *c-Kit*, y *Nppa* (Figura 3, D y E). La expresión de *Myh6* no se vio afectada por la sobreexpresión de miR302-367 (Figura 3E). La sobreexpresión de miR302-367 en cardiomiocitos en desarrollo condujo a un fenotipo desdiferenciado inmaduro altamente proliferativo en los cardiomiocitos.

Por el contrario, la sobreexpresión de miR302-367 resultó en una baja regulación de la muerte celular programada (Figura 3D). También se observó que la sobreexpresión de miR302-367 da como resultado una baja regulación de los genes del metabolismo de los ácidos grasos, que incluyen *PparA*, *PparD*, y *Acox1*, lo que sugiere la disfunción de los cardiomiocitos (Figura 3F). Juntos, estos datos demuestran un aumento de la proliferación e inhibición de la maduración de los cardiomiocitos en mutantes Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}, lo que indica que la sobreexpresión persistente de miR302-367 conduce a un fenotipo de cardiomiocitos desdiferenciados y una función cardíaca comprometida.

miR302-367 inhibe la vía de Hippo para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos

Para identificar aún más los genes diana miR302-367, se realizó una secuenciación de alto rendimiento de ARN aislado mediante inmunoprecipitación con entrecruzamiento (HITS-CLIP) con complejos argonauta-2/miARN:mARN. Se usaron células ES de ratón dado el alto nivel de expresión de miR302-367 en estas células. Mediante el uso de un límite estricto de 100 lecturas por millón (RPM), se detectaron 51 miARN que incluyen los miembros de miR302-367 (Tabla 1). Las dianas de ARNm identificados a partir de HITS-CLIP se compararon con todas las predicciones posibles de las relaciones de selección de miARN/ARNm obtenidas de miRanda. El conjunto de superposición contenía 48 genes, muchos de los cuales estaban asociados con la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Figura 10A y Tabla 2).

En los datos de HITS-CLIP, miR-302 se dirigió a secuencias en la región no traducida 3' (3'UTR) de *Mst1* (*Stk4*), un componente central de la cascada de quinasa de señalización de Hippo (Tabla 3). Además, miRanda predijo que *Lats2* y *Mob1b*, quinasas esenciales en la vía de Hippo, eran dianas potenciales de miR302. La vía de transducción de señales de Hippo regula el tamaño de los órganos y la proliferación celular, y la pérdida de las quinasas *Mst1/2* y *Lats* en el corazón del ratón en desarrollo provoca una mayor proliferación en los cardiomiocitos. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que miR302-367 regula la proliferación de cardiomiocitos a través de la inhibición de la señalización de Hippo.

Para verificar los cambios en la expresión de los componentes de Hippo mediados por la pérdida y ganancia de la función de miR302-367, se realizaron qRT-PCR y transferencias Western en corazones *Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{fllox/fllox}* y *Nkx2.5^{cre}:R26RmiR302-367^{Tg/+}*. Estos datos revelaron que la sobreexpresión de miR302-367 condujo a una disminución de la expresión de *Mst1*, *Lats2*, y *Mob1b*, mientras que la pérdida de la expresión de miR302-367 condujo a una mayor expresión de estos genes (Figura 4A y Figura 10, B y C). La expresión de miR302-367 condujo además a una disminución de la actividad de los reporteros luciferasa para las 3'UTR de *Mst1*, *Lats2*, y *Mob1b*, y la mutación de los sitios de unión de miR302-367 invalidó esta represión (Figura 4B y Figura 10D). Estos hallazgos sugieren que miR302-367 inhibe la actividad de la vía de Hippo a través de la represión de las quinasas *Mst1*, *Lats2*, y *Mob1b*.

Sí, la proteína activada (Yap) es el efector transcripcional corriente abajo de la señalización de Hippo. La Yap fosforilada (fosfo-Yap) normalmente reside en el citoplasma y es transcripcionalmente inactiva. Tras la pérdida de la señalización de Hippo, Yap se transloca al núcleo donde se une a los miembros de la familia del factor de transcripción TEAD y activa la expresión génica, que incluye las vías que promueven la proliferación y la supervivencia. La sobreexpresión de una forma transcripcionalmente activa de Yap (*YapS127A*) en el corazón del ratón promueve la proliferación de cardiomiocitos y la regeneración cardíaca. Para determinar si la sobreexpresión de miR302-367 afectó la fosforilación y la actividad de Yap, se examinó la expresión de Yap y fosfo-Yap en corazones *Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}*. Los cardiomiocitos de corazones de control en E18.5 exhibieron localización citoplasmática difusa de fosfo-Yap (Figura 4C). Los corazones *Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* mostraron una expresión reducida de fosfo-Yap. Por el contrario, la inmunotinción para Yap total reveló un aumento en Yap nuclear en corazones *Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 4C). La pérdida de la expresión de miR302-367 condujo además a una mejor fosforilación de Yap, pero disminuyó la expresión de Yap nuclear, en el miocardio en desarrollo de corazones *Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{fllox/fllox}* en E10.5 (Figura 10E).

Para investigar si la regulación de miR302-367 de la señalización de Hippo fue responsable, al menos en parte, del aumento de la proliferación observada en los cardiomiocitos de corazones *Nkx2.5^{cre}:R26R-miR302-367^{Tg/+}*, se inhibió la expresión de Yap mediante el uso de ARN horquillado corto (ARNhc) en presencia de expresión de miR302-367 en cardiomiocitos neonatales aislados de ratón. La sobreexpresión lentiviral de miR302-367 dio como resultado un aumento de la proliferación de cardiomiocitos neonatales (Figura 4D). La inhibición de Yap mediada por ARNhc dio como resultado una disminución de la proliferación causada por la sobreexpresión de miR302-367 (Figura 4D y Figura 10F).

Además se examinaron los efectos de los miembros individuales de la familia miR-302 sobre la proliferación de cardiomiocitos. El tratamiento de los cardiomiocitos neonatales de ratón con un mimético de miR302b condujo a un mayor número de cardiomiocitos Ki67⁺/troponina T cardíaca (cTnT)⁺, mientras que los miméticos de miR302c no indujeron un aumento significativo similar en la proliferación (Figura 3G). El uso de miméticos de miR302b y miR302c condujo a un aumento aditivo en la proliferación de cardiomiocitos, mayor que con cualquiera de los miméticos solos (Figura 10G). Juntos, estos datos demuestran que miR302-367 se dirige a múltiples componentes de la vía de transducción de señales Hippo para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos, como se ilustra en el esquema de la Figura 4E.

miR302-367 promueve la regeneración cardíaca en adultos después de un infarto del miocardio a través de una proliferación de cardiomiocitos aumentada

Después se examinó si la sobreexpresión condicional de miR302-367 en el corazón adulto podría reactivar la proliferación de cardiomiocitos. Se generaron animales *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* para sobreexpresar específicamente miR302-367 en cardiomiocitos en el corazón adulto. qRT-PCR confirmó la expresión de alto nivel de todos los miembros de la agrupación miR302-367 después de la administración de tamoxifeno (Figura 11A y Tabla 4).

Ocho días después del inicio del tratamiento con tamoxifeno, los cardiomiocitos en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* volvieron a entrar en el ciclo celular (Figura 5, A y B). El número de cardiomiocitos sometidos a mitosis (PH3⁺) y citocinesis (quinasa Aurora B⁺) también se incrementó en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 5, C y D), en paralelo a una reducción de la apoptosis (Figura 11B).

La relación entre el peso del corazón a la longitud de la tibia aumentó en animales *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* 2 semanas después del inicio de la sobreexpresión de miR302-367 (Figura 11C). El número total de cardiomiocitos, así como también el porcentaje de cardiomiocitos mononucleados aumentó después de 2 semanas (Figura 5, E y F). El tamaño de los cardiomiocitos en el corazón *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Ts/+}* fue además más pequeño en comparación con los cardiomiocitos de control (Figura 5G). La expresión de genes asociados con la proliferación celular, que incluyen *Cks2* y *Ccnd1*, aumentó en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 11D). En contraste, la expresión de genes asociados con componentes de señalización de Hippo y muerte celular programada disminuyó en mutantes *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 11D). Por lo tanto, la sobreexpresión de miR302-367 en el corazón adulto resultó en la reactivación del ciclo celular de cardiomiocitos.

Para determinar si la expresión ectópica de miR302-367 puede promover la regeneración cardíaca en ratones adultos, se realizó inducción de infarto de miocardio (MI) por ligadura de LAD en ratones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* y *Myh6^{mercremer}* de control (Figura 6A). Tres semanas después de la lesión, los corazones *Myh6^{mercremer}* exhibieron cicatrices fibróticas extensas y pérdida de tejido miocárdico, mientras que los corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* habían reducido significativamente las cicatrices fibróticas con un aumento en el tejido miocárdico (Figura 6, B y C). La inmunotinción mostró una expresión reducida de fosfo-Yap, pero una expresión mejorada de Yap nuclear, en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* comparados con corazones *Myh6^{mercremer}* (Figura 12A). Además, el número de cardiomiocitos PH3⁺ fueron significativamente mayores en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* que en controles *Myh6^{mercremer}* 3 semanas después de la lesión (Figura 6D). Estos datos indican que la expresión de miR302-367 en el corazón adulto puede promover la proliferación de cardiomiocitos, lo que contribuye a reducir la cicatrización fibrótica posterior a la lesión.

A pesar de estos hallazgos desconcertantes, los corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* exhibieron dilatación ventricular y una reducción en el acortamiento fraccional y la fracción de eyección 3 semanas después de la lesión (Figura 6E). Se supuso que la proliferación sostenida de cardiomiocitos en el corazón adulto era causada por una sobreexpresión prolongada de miR302-367 que afectaba la función cardíaca, posiblemente por inducción de un fenotipo desdiferenciado y altamente proliferativo persistente. La expresión de genes asociados con la proliferación y diferenciación de cardiomiocitos se examinó a los días 10 y 21 después de la sobreexpresión de miR302-367. Hubo una persistente regulación por aumento de *Cks2*, un marcador para la proliferación celular, en ambos puntos de tiempo en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 12B). En contraste, observamos la regulación persistente por disminución en la relación de *Myh6* (cadena pesada de α-miosina) a *Myh7* (cadena pesada de β-miosina), un marcador para la activación del gen fetal en los corazones de roedores que se asocia con disfunción y falla cardíaca, en corazones *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* (Figura 12B).

Para determinar si el linaje miocárdico había sufrido una desdiferenciación y un desmontaje sarcomérico por sobreexpresión de miR302-367, rastreamos el linaje de la línea *Myh6^{mercremer}:R26R-miR302-367^{Tg/+}* y se observó sarcómeros desorganizados y expresión de gen sarcomérico reducida en las células positivas de linaje miocárdico *Myh6* (Figura 12C). Juntos, estos hallazgos demuestran que la expresión persistente de miR302-367 en el corazón adulto reactiva el ciclo celular de los cardiomiocitos y aumenta la regeneración de los cardiomiocitos. Sin embargo, un estímulo tan persistente conduce a la inducción de un fenotipo desdiferenciado y una disfunción de todo el órgano que conduce a insuficiencia cardíaca.

La terapia transitoria con mimético de miR302 promueve la regeneración cardíaca y mejora la función después de la lesión.

Para examinar si la expresión transitoria de miR302-367 podría superar los efectos adversos de la expresión persistente en el corazón, los ratones adultos se trataron con miméticos de miARN miR302-367. Se evaluó si la inyección en la vena de la cola de miméticos de miR302b/c/367 condujo a la acumulación de estos miARN en el corazón. Los niveles de miméticos de miR302b/c/367 alcanzaron su punto máximo entre 4 y 8 horas después de la inyección y volvieron a la línea base 24 horas después de la inyección (Figura 13A). Se observó una expresión transitoria similar de miR302b/c/367 en otros órganos, que incluye el pulmón (Figura 14A). Para experimentos posteriores, solo se usaron miméticos de miR302b/c, porque estos miARN se dirigen a los componentes de señalización de Hippo aquí (Figura 10G y Tabla 3) y en un estudio previo.

Los miméticos de miR302b/c o un mimético de control negativo se administraron diariamente durante 7 días mediante inyecciones en la vena de la cola. La expresión de genes dirigidos a miR302 relacionados con la vía de Hippo, que incluyen *Mst1*, *Lats2* y *Mob1b*, disminuyeron en los corazones de los ratones tratados con miméticos de miR302b/c (Figura 13B). La expresión de genes asociados con la diferenciación y proliferación de cardiomiocitos se examinó en un punto de tiempo temprano (día 8) y en un punto de tiempo tardío (día 21) después del tratamiento con miméticos. La expresión del gen *Ccnd1* asociado a la proliferación aumentó en el día 8, pero volvió a los niveles basales en el día 21

(Figura 13C). La expresión de *Nppa* y la relación de *Myh6* con la la expresión de *Myh7* también se alteró el día 8, pero volvió a los niveles normales el día 21 (Figura 13C).

5 A continuación, los ratones adultos se trataron con mimético de miR302b/c o un mimético de miARN de control negativo, mediante el uso de inyecciones diarias en la vena de la cola que comenzaron el día 1 después del MI y continuaron
 10 diariamente durante 7 días. La expresión de los componentes de señalización de Hippo *Mst1* y *Mob1b* disminuyó significativamente en corazones tratados con mimético de miR302b/c después de un MI en comparación con los controles (Figura 13D). Cuarenta y ocho horas después del tratamiento final, se observó un aumento de la proliferación de cardiomiocitos y una disminución de la apoptosis en los corazones de ratones tratados con mimético de miR302b/c
 15 (Figura 13E). En el día final del tratamiento (día 8 después del MI), hubo un aumento significativo en la expresión de genes asociados con la proliferación celular (*Ccnd1*), antiapoptosis (*Bcl2*) y el programa de genes fetales (*Nppa*, *Myh7*) en corazones tratados con mimético de miR302b/c; sin embargo, la expresión volvió a los niveles basales 4 semanas después de la cirugía (Figura 13F). Esta relación de expresión de *Myh6* con *Myh7*, que disminuyó a los 8 días, aumentó a las 4 semanas (Figura 13F), lo que sugiere una desdiferenciación transitoria de los cardiomiocitos en los corazones tratados con miR302b/c.

El análisis de los corazones tratados con miR302b/c 50 días después de la lesión mostró que tenían además significativamente menos cicatrices fibróticas que los corazones tratados con mimético de control (Figura 7, A a C). La
 20 evaluación funcional de los animales tratados con mimético de miR302b/c mostró que exhibieron un acortamiento fraccional y una fracción de eyección después de la lesión significativamente mayores en comparación con los animales tratados con mimético de control, pero no alcanzaron la fracción de eyección y el acortamiento fraccional de los animales simulados (Figura 7D). Los ratones tratados con mimético de miR302b/c mostraron una remodelación cardíaca reducida, medida por el volumen diastólico final y las mediciones de volumen sistólico final (Figura 7E). Además, los
 25 miméticos de miR302b/c aumentaron la densidad de nuevos vasos sanguíneos en la zona del alrededor del infarto pero no afectaron la proliferación de células vasculares (Figura 13, G a I). No se observaron anomalías en otros órganos, que incluyen pulmón, hígado e intestino, en ratones tratados con miméticos de miR302b/c a 50 días después del MI (6 semanas después del tratamiento final), lo que sugiere que no hay efectos adversos (Figura 14B). Juntos, estos datos indican que la expresión transitoria de los miméticos de miR302 dio como resultado una mejor reparación y regeneración cardíaca después del MI.

TABLA 1: DATOS DE HITS-CLIPS

ID de Secuencia	Puntuación
mmu-miR-293	465744
mmu-miR-294	124328.5
mmu-miR-2134-3	119289
mmu-miR-19b-2	51813
mmu-miR-19b-1	51813
mmu-miR-19a	45137.99
mmu-miR-27a	39680.33
mmu-miR-92a-1	38676.06
mmu-miR-291a-3p	30613.46
mmu-miR-30e	24779
mmu-miR-25	22700.27
mmu-miR-18b	20369.99
mmu-miR-106a	18738.99
mmu-miR-669f-5p	18383.15
mmu-miR-2132	15172
mmu-miR-302b	12211.98
mmu-miR-292-3p	11321
mmu-miR-2144	9943
mmu-miR-669c-3p	9460
mmu-miR-23b	9357.999

(Continuación)

ID de Secuencia	Puntuación
mmu-miR-714	8907
mmu-miR-2133-2-3p	8877.997
mmu-miR-543	8845
mmu-miR-363	8686
mmu-miR-433	8470
mmu-miR-425	8345
mmu-miR-154	8100
mmu-miR-191	8069
mmu-miR-1944-5p	7115
mmu-miR-302a	6828.022
mmu-miR-429	6541
mmu-miR-467a	6458
mmu-miR-467d	6458
mmu-miR-466i-5p	5741.412
mmu-miR-149	5438
mmu-miR-96	5031
mmu-miR-698-5p	4990
mmu-miR-467d	4966.998
mmu-miR-335-3p	4945
mmu-miR-20a	4870.999
mmu-miR-484	4683
mmu-miR-295	4121
mmu-miR-2143-1	4059.5
mmu-miR-2134-4	2738
mmu-miR-2134-2	2738
mmu-miR-466k	956
mmu-miR-2143-3	675.75
mmu-miR-2143-2	675.75
mmu-miR-210	565
mmu-miR-615-5p	235.9958
mmu-miR-714-3p	105.6667

TABLA 2: GENES SUPERPUESTOS ENTRE DIANAS PREVISTAS DE MIR302 Y HITS-CLIP.

ACCESO DE GENBANK	Nombre	Especies
NM_175550	complejo proteico relacionado con el adaptador AP-4, épsilon 1	Mus musculus
NM_173755	enzima E2O de conjugación de ubiquitina	Mus musculus
NM_008489	proteína de unión a lipopolisacáridos	Mus musculus
NM_010178	gen previsto 5446; similar a la proteína de interacción con FUS (rica en serina-arginina) 1; proteína que interactúa con FUS (rica en serina-arginina) 1	Mus musculus
NM_001079883	Leucemia de células B/linfoma 11B	Mus musculus
NM_026205	proteína 151 de dedo tipo RING	Mus musculus
NM_183417	quinasa 2 dependiente de ciclina	Mus musculus
NM_134163	muscleblind tipo 3 (Drosophila)	Mus musculus
NM_009212	proteína 2 de unión de mu a inmunoglobulina	Mus musculus
NM_144812	repetición de trinucleótidos que contiene 6b	Mus musculus
NM_144810	dominio kelch que contiene 8A	Mus musculus
NM_023755	factor de transcripción CP2 tipo 1	Mus musculus
NM_012042	culina 1	Mus musculus
NM_011717	motivos de dedos de zinc ampliamente espaciados	Mus musculus
NM_008379	carioferina (importina) beta 1	Mus musculus
NM_008997	RAB11B, miembro de la familia del oncogén RAS	Mus musculus
NM_011212	proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo, E	Mus musculus
NM_027514	receptor de poliovirus	Mus musculus
NM_026186	dominio en espiral que contiene 49	Mus musculus
NM_011390	familia 12 del vehículo del soluto, miembro 7	Mus musculus
NM_198022	repetición de trinucleótidos que contiene 6C	Mus musculus
NM_001081176	polipéptido G polimerasa (ARN) III (dirigido por ADN)	Mus musculus

(Continuación)

ACCESO DE GENBANK	Nombre	Especies
NM_001039059	kelch tipo 15 (Drosophila)	Mus musculus
NM_133715	Proteína 27 activadora de Rho GTPasa; Dominio SH3 que contiene 20	Mus musculus
NM_026145	dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene 10	Mus musculus
NM_001031772	lin-28 homólogo B (C. elegans)	Mus musculus
NM_172516	proteína quinasa doble serina/treonina y tirosina	Mus musculus
NM_054097	fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinasa, tipo II, gamma	Mus musculus
NM_021559	proteína 191 de dedo de zinc	Mus musculus
NM_009723	ATPasa 2, que transporta Ca ⁺⁺ , de membrana plasmática	Mus musculus
NM_019535	GRB2 tipo 2 con dominio SH3	Mus musculus
NM_009274	quinasa 2 específica de proteína rica en serina/arginina	Mus musculus
NM_001111099	inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclina (P21)	Mus musculus
NM_177239	similar a la proteína mKIAA1915; dominios 1 de SWIRM y MPN, similares a myb	Mus musculus
NM_207682	miembro 1B de la familia kinesina	Mus musculus
NM_001012330	proteína 238 de dedo de zinc	Mus musculus
NM_007798	cathepsina B	Mus musculus
NM_001013380	dineína citoplasmática 1 cadena ligera 2 intermedia	Mus musculus
NM_007520	homología 1 de CNC y BTB	Mus musculus
NM_021420	quinasa 4 de serina/treonina	Mus musculus
NM_133352	miembro 3 de la superfamilia 9 transmembrana	Mus musculus
NM_007610	caspasa 2	Mus musculus

(Continuación)

ACCESO DE GENBANK	Nombre	Especies
NM_001081196	ribonucleoproteína U nuclear heterogénea tipo 2	Mus musculus
NM_011358	factor de empalme 2, rico en arginina/serina (SC-35)	Mus musculus
NM_010880	nucleolina	Mus musculus
NM_013876	proteína 11 de dedo tipo RING	Mus musculus
NM_010700	receptor de lipoproteínas de baja densidad	Mus musculus
NM_031408	proteína 1 de GYF que interactúa con GRB10	Mus musculus

TABLA 3: DIANAS DE MIR302 IDENTIFICADAS A PARTIR DE HITS-CLIP.

mmu-miR-302b-AGCACTT		mmu-miR-302a-AGCACTT	
Fusip1	NM_010178	Fusip1	NM_010178
Zfp426	NM_001110309	Zfp426	NM_001110309
Casc4	NM_199038	Casc4	NM_199038
Zfp426	NM_146221	Zfp426	NM_146221
Tnrc6c	NM_198022	Tnrc6c	NM_198022
Bach1	NM_007520	Bach1	NM_007520
Wiz	NM_011717	Wiz	NM_011717
Lbp	NM_008489	Lbp	NM_008489
Snx8	NM_172277	Snx8	NM_172277
Casc4	NM_177054	Casc4	NM_177054
Rbbp7	NM_009031	Rbbp7	NM_009031
Ube2b	NM_009458	Ube2b	NM_009458
4632434I11Rik	NM_001080995	4632434I11Rik	NM_001080995
Bcl11b	NM_001079883	Bcl11b	NM_001079883
Glr3	NM_023140	Glr3	NM_023140
Wiz	NM_212438	Wiz	NM_212438
LOC100041128	XM_001475846	LOC100041128	XM_001475846
Kctd10	NM_026145	Kctd10	NM_026145
Bcl11b	NM_021399	Bcl11b	NM_021399
Rab22a	NM_024436	Rab22a	NM_024436
Mbni3	NM_134163	Mbni3	NM_134163
Tnrc6b	NM_144812	Tnrc6b	NM_144812
Eif2s1	NM_026114	Eif2s1	NM_026114
Lpcat3	NM_145130	Lpcat3	NM_145130
Pvr	NM_027514	Pvr	NM_027514
Thex1	NM_026067	Thex1	NM_026067
Pom121	NM_148932	Pom121	NM_148932
Klhl15	NM_153165	Klhl15	NM_153165
Arhgap27	NM_133715	Arhgap27	NM_133715
Svop	NM_026805	Svop	NM_026805
Lman1	NM_027400	Lman1	NM_027400
Dennd2d	NM_028110	Dennd2d	NM_028110
Zbtb4	NM_029348	Zbtb4	NM_029348
Gigyl1	NM_031408	Gigyl1	NM_031408
Mfap1a	NM_026220	Mfap1a	NM_026220
Rnf151	NM_026205	Rnf151	NM_026205
Ccdc49	NM_026186	Ccdc49	NM_026186
Pip4k2c	NM_054097	Pip4k2c	NM_054097
Tm9sf3	NM_133352	Tm9sf3	NM_133352
Cd81	NM_133655	Cd81	NM_133655
Papd1	NM_026157	Papd1	NM_026157
Klhdc8a	NM_144810	Klhdc8a	NM_144810
Bclaf1	NM_153787	Bclaf1	NM_153787
Ripk5	NM_172516	Ripk5	NM_172516
Osp	XM_896350	Osp	XM_896350
LOC677060	XM_001000215	LOC677060	XM_001000215

LOC100045782	XM_001475154	LOC100045782	XM_001475154
LOC100046594	XM_001477687	LOC100046594	XM_001477687
LOC100042306	XM_001478003	LOC100042306	XM_001478003
LOC100047941	XM_001479195	LOC100047941	XM_001479195
LOC100047941	XM_001479195	LOC100047941	XM_001479195
LOC100048076	XM_001479683	LOC100048076	XM_001479683
LOC100048076	XM_001479685	LOC100048076	XM_001479685
LOC100048559	XM_001480897	LOC100048559	XM_001480897
Dsp	XM_001481272	Dsp	XM_001481272
BC051076	XM_144407	BC051076	XM_144407
Fbxo3	NM_212433	Fbxo3	NM_212433
Kif1b	NM_207682	Kif1b	NM_207682
Sfrs1	NM_173374	Sfrs1	NM_173374
Ube2o	NM_173755	Ube2o	NM_173755
Ap4e1	NM_175550	Ap4e1	NM_175550
Tnrc6b	NM_177124	Tnrc6b	NM_177124
Mysm1	NM_177239	Mysm1	NM_177239
Mysm1	NM_177239	Mysm1	NM_177239
Pik3ip1	NM_178149	Pik3ip1	NM_178149
Elmod2	NM_178736	Elmod2	NM_178736
Hisppd2a	NM_178795	Hisppd2a	NM_178795
Cdk2	NM_183417	Cdk2	NM_183417
Prosapip1	NM_197945	Prosapip1	NM_197945
Lrrc47	NM_201226	Lrrc47	NM_201226
Dsp	XM_621314	Dsp	XM_621314
Zfp238	NM_001012330	Zfp238	NM_001012330
Ppp1r3d	NM_001085501	Ppp1r3d	NM_001085501
Ppp1r3d	NM_001085501	Ppp1r3d	NM_001085501
Dennd2d	NM_001093754	Dennd2d	NM_001093754
Cdyl	NM_001123386	Cdyl	NM_001123386
Car8	NM_007592	Car8	NM_007592
Casp2	NM_007610	Casp2	NM_007610
Ctsb	NM_007798	Ctsb	NM_007798
Kpnb1	NM_008379	Kpnb1	NM_008379
Mycn	NM_008709	Mycn	NM_008709
Ntrk2	NM_008745	Ntrk2	NM_008745
Ptbp1	NM_008956	Ptbp1	NM_008956
Ptbp1	NM_008956	Ptbp1	NM_008956
Ptafr	NM_001081211	Ptafr	NM_001081211
Hnrnpul2	NM_001081196	Hnrnpul2	NM_001081196
Polr3g	NM_001081176	Polr3g	NM_001081176
Dync1li2	NM_001013380	Dync1li2	NM_001013380
Bclaf1	NM_001025392	Bclaf1	NM_001025392
Bclaf1	NM_001025393	Bclaf1	NM_001025393
Mex3a	NM_001029890	Mex3a	NM_001029890
Lin28b	NM_001031772	Lin28b	NM_001031772
Gm410	NM_001033349	Gm410	NM_001033349

Atp2b2	NM_001036684	Atp2b2	NM_001036684
Klhl15	NM_001039059	Klhl15	NM_001039059
Klhl15	NM_001039060	Klhl15	NM_001039060
Ptbp1	NM_001077363	Ptbp1	NM_001077363
Ptbp1	NM_001077363	Ptbp1	NM_001077363
Sfrs1	NM_001078167	Sfrs1	NM_001078167
Rab11b	NM_008997	Rab11b	NM_008997
Ighmbp2	NM_009212	Ighmbp2	NM_009212
SrpK2	NM_009274	SrpK2	NM_009274
Rnf11	NM_013876	Rnf11	NM_013876
Zfp238	NM_013915	Zfp238	NM_013915
Abce1	NM_015751	Abce1	NM_015751
Cdk2	NM_016756	Cdk2	NM_016756
Sh3gl2	NM_019535	Sh3gl2	NM_019535
Cdgap	NM_020260	Cdgap	NM_020260
Stk4	NM_021420	Stk4	NM_021420
Stk4	NM_021420	Stk4	NM_021420
Zfp191	NM_021559	Zfp191	NM_021559
Moap1	NM_022323	Moap1	NM_022323
Tcfcp2l1	NM_023755	Tcfcp2l1	NM_023755
Dsp	NM_023842	Dsp	NM_023842
Aoah	NM_012054	Aoah	NM_012054
Cul1	NM_012042	Cul1	NM_012042
Sept3	NM_011889	Sept3	NM_011889
Atp2b2	NM_009723	Atp2b2	NM_009723
Cdyl	NM_009881	Cdyl	NM_009881
Cd47	NM_010581	Cd47	NM_010581
Ldlr	NM_010700	Ldlr	NM_010700
Ncl	NM_010880	Ncl	NM_010880
Neurod1	NM_010894	Neurod1	NM_010894
Pax8	NM_011040	Pax8	NM_011040
Pkm2	NM_011099	Pkm2	NM_011099
Ptpre	NM_011212	Ptpre	NM_011212
Sfrs2	NM_011358	Sfrs2	NM_011358
Slc12a7	NM_011390	Slc12a7	NM_011390
Slc12a7	NM_011390	Slc12a7	NM_011390
Cyb5	NM_025797	Cyb5	NM_025797
Cdkn1a	NM_001111099	Cdkn1a	NM_001111099

TABLA 4: ANÁLISIS DE QRT-PCR DE miARN EN CORAZÓN DE RATÓN.

Valor de CI por análisis de Q-PCR

Genotipo de ratón e ID	miR-302a	miR-302c	miR-302b	miR-302d	miR-367	sn-202
Myh6-MerCreMer-1 (#2630)	35.23037	36.587448	35.117035	34.552624	34.508602	19.487276
	35.093484	36.953339	34.433346	34.427361	34.822618	19.123663
Myh6-MerCreMer-2 (#884)	35.928413	35.569115	34.951195	34.472588	34.922916	19.590122
	35.207722	34.76927	34.99754	34.187965	35.226227	19.71003
Myh6-MerCreMer-3 (#831)	34.501678	36.279041	34.772988	34.370368	34.952359	18.705404
	35.513676	36.732643	34.890965	34.416424	35.549948	18.965477
Myh6-MerCreMer; R26R-miR302-367 Tg-1 (#2625)	18.499952	20.837721	18.094967	17.800104	18.342041	19.420469
	18.511408	21.029299	18.094952	17.000566	18.141062	19.318007
Myh6-MerCreMer; R26R-miR302-367 Tg-2 (#2139)	18.611528	20.643997	18.089294	17.950405	17.973259	19.098368
	18.43908	20.762674	18.261478	16.922874	18.015085	19.148411
Myh6-MerCreMer; R26R-miR302-367 Tg-3 (#2678)	17.948872	19.898573	17.57185	17.44063	17.74843	19.098368
	18.169676	19.9618	17.31517	17.464623	17.786476	19.148411
Myh6-MerCreMer; R26R-miR302-367 Tg-4 (#6360)	18.813837	20.547265	18.047836	17.263132	18.234688	19.181335
	18.851551	20.520567	18.128296	17.116965	18.309748	19.277533

TABLA 5: CEBADORES PARA GENOTIPIFICACIÓN, QRT-PCR, Y ANÁLISIS DE REPORTERO LUCIFERASA

Genotipificación de cebadores		
Alelos de ratón	Directo	Inverso
miR-302-367 floxed allele	CAC AAG GAG AGA CAT AAG ATG GGC	CAC TTT AGCAATGGTGATGGAGC
R26R-miR302-367	AAAGTCGCTCTGAGTTGTAT	TCGCTATTGGCGTTACTATG
Nkx2.5-Cre	CGTTTCTGAGCATACCTGGA	ATTCTCCACCGTCAGTACG
Myh6-MerCreMer	CGTTTCTGAGCATACCTGGA	ATTCTCCACCGTCAGTACG

Cebadores de Q-PCR		
Nombre del gen	Directo	Inverso
Cnd1	GATGTGAGGGAAGAGGTGAAGGT	CAATGAGAATCTGGTCTGAACGT
Nkx2.5	TGACCCAGCCAAAGAACCT	CCATCCGTCTCGGCTTTGT
Gata4	CCGGBCGTGTCATCTCACTATG	TTGAGAGCAGACAGCACTGGAT
Myh6	CCACTTCTCCTTTGGTCCACTATG	ACAAACCCACCAACCGTCA
Myh7	TACCTCATGGGGCTGAACCTC	CCCTTGGTGAAGTACTCGTT
Mob1b	CTGTGATCCAGCTTCAGGAGGAA	TGCCAAGCTCTCGTCTGTCAA
Lats2	TAAAGGTCTCTGCTCTGTGTCT	ACCTCTCATGTGAAGAGGCCCAA
Mst1	CAGGGCCTGCATAACATTTGCTGT	TTCTTGTCTGGCAAAGGCCAAAG
Bcl2	GTGGATGACTGAGTACCTGAAC	GAGACAGCCAGGAGAAATCAA
Brcs2	ATTGAAGGSCCAGCAT	GGCTGGTAAACCTGGAGTAAAG
RacGap1	CAGATCCAGTGACAATGTTCCA	TCCACCATCATGAAGTGAITCC
Nusap1	GAGGAGGAAGAAGCACAAGAC	CTACTATCAGTTCTCTTCATCTCAA
Myh10	GGAAATCGAGAGGCGAGAACAA	AAGGCTCGCTTGGATTTCTC
Cxsz	CAGAGTCTAGGATGGGTTCAITAC	TCGAGCTGCACITTCATTT
Gapk1	GCTGAACATGAGCTGACTT	CAAGGAGGCTCTTGATGACTTC
Slk17B	AATCTGCATGAGGTCTACGAAA	TCGGCTAACTCAGGTAAACAC
c-Kit	CTAGCCAGAGACATCAGGAATG	CTCCAGAGGAAATCCCATAG
Nops	GGTAGGATTSACAGGATGG	CTCCTTGGCTGTATCTTCGG
PparA	AGGGGAGCTGCATAGTTTGTG	TTCTCGCCATACACAAGGT
PparD	ATCTCTGTCTCTCCCTGCC	CTGTGGCTGTTCCATGACTG
Aox1	GAAATATGCCAGGTGAAGC	CAGACTCTGAGCTGCACTTC
Pdk4	TGAACACGCTTCACCCACTA	CAGGCAGGATGTCAATCTCC
Larp7 E12-13	GGATCATGAGCAGAGGTACTG	GACTGGCTTCTGAGTCTTAG
Larp7 E8-9	TCTCAAAGGTCAAGAGGAAGC	TCTTGGACAGCACTCTCAATG
Larp7 E89-10	ATTGAGAGTGTCTTCCAAGAC	TCCTCGCTCACAATCTTCAC
GAPDH	TGCACCCCAACTGCTTACG	GGCATGAGACTGTGGTCAAGAG

Información de donación del ensayo de reportero luciferasa	
Nombre	Secuencia del cebador
Lats2 XhoI fwd	cctcgagg TTCTGGTAAATGGCAACAG
Lats2 EcoRI rev	ggaaftcc TTACATTTGCTTCCGAAG
Mst1 XhoI fwd	cggctggg CAACACCAAGCCAGC
Mst1 BamHI rev	cggcgatcc CTTAGCAGCAATTTATCATC
Mob1b XhoI fwd	cggctggg AGGTTTGGGGCTTGCTTGG
Mob1b EcoRI rev	cgggaattc GGAGTCAGGATGCTTCAACTGC

Aunque se han propuesto varias terapias celulares para la regeneración cardíaca o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, varios ensayos clínicos han indicado una eficacia limitada para tales estrategias. Un enfoque alternativo es

promover la proliferación de cardiomiocitos endógenos para regenerar y reparar el corazón, tanto después de una lesión como en estados de enfermedad crónica. Aunque estudios previos han detectado un nivel muy bajo de proliferación de cardiomiocitos posnatales en el corazón de ratones y seres humanos, es insuficiente para la estimulación de la reparación y regeneración cardíaca después de la lesión en mamíferos. Las vías que pueden aprovecharse para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos son dianas ideales para nuevos enfoques terapéuticos para la regeneración cardíaca en seres humanos. Los miARN han surgido como importantes reguladores y posibles dianas terapéuticas en las enfermedades cardiovasculares.

Aquí, se demuestra que la agrupación miR302-367 promueve la proliferación de cardiomiocitos embrionarios y posnatales, en parte a través de la selección de múltiples quinasas en la vía de transducción de señales de Hippo. El tratamiento transitorio de ratones con miméticos de miR302 de molécula pequeña condujo a una mejor regeneración cardíaca, una mayor proliferación y supervivencia de los cardiomiocitos y una mejor formación de vasos en la región alrededor del infarto, todo acompañado por una disminución de la fibrosis. La cicatrización fibrótica reducida probablemente se debió a la mejora observada de la regeneración miocárdica. En apoyo de este argumento, los experimentos con peces cebra han demostrado que la lesión cardíaca induce un alto nivel de proliferación de cardiomiocitos con una disminución concomitante de la cicatrización fibrótica. Estudios adicionales han indicado que los cardiomiocitos pueden inhibir la fibrosis cardíaca de forma paracrina. Estos estudios proporcionan un marco para explorar más a fondo los tratamientos basados en miARN para la estimulación de la reparación y regeneración del corazón en seres humanos.

La vía de Hippo regula el tamaño adecuado de los órganos al regular la proliferación celular, así como la muerte celular programada. Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la fosforilación de Yap a través de la pérdida de componentes clave en la vía, como Salvador/WW45, o la expresión de una forma de Yap resistente a la fosforilación puede conducir a un aumento profundo en la proliferación de cardiomiocitos de ratones adultos. La pérdida cardíaca específica de Yap conduce a un aumento de la apoptosis de miocitos y a la fibrosis. Aquí, miR302-367 se dirigió a múltiples componentes de la cascada de la quinasa de señalización de Hippo para la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos. Además, la sobreexpresión de miR302-367 promovió la proliferación celular al tiempo que disminuyó la muerte celular programada, lo que es consistente con la inhibición de la señalización de Hippo. Además, la pérdida de miR302-367 condujo a un aumento de fosfo-Yap, pero disminuyó la Yap nuclear, en corazones Nkx2.5^{cre}:miR302-367^{flox/flox} de ratón. Sin embargo, estos experimentos no condujeron a una pérdida completa de Yap o su función, lo que probablemente explica el fenotipo más leve en estos ratones en comparación con una pérdida total de Yap.

miR302-367 se expresa a altos niveles tanto en el corazón como pulmón de ratón en desarrollo así como también en las células ES, donde desempeña una función importante en la estimulación de la pluripotencia. Además se ha demostrado que otros miARN promueven la proliferación de cardiomiocitos murinos, que incluyen miR590 y la familia miR17-92. miR17-92 se expresa en el corazón y pulmón de ratón en desarrollo, y puede promover un estado altamente proliferativo e indiferenciado en el epitelio pulmonar, similar a miR302-367. Como tal, ciertos miARN pueden mantener un estado indiferenciado al promover altos niveles de proliferación celular al tiempo que inhiben la diferenciación. Las estrategias con miméticos de miARN se han mostrado aquí para la estimulación de la regeneración cardíaca *in vivo* de manera transitoria que evita los efectos nocivos de la desdiferenciación persistente de cardiomiocitos.

Estudios previos que describieron la sobreexpresión de miR17-92 o YapS127A en ratones no informaron una disminución de la función cardíaca. Varias razones podrían explicar la diferencia entre los datos aquí y estos informes, lo que incluye un nivel más potente de sobreexpresión aquí y funciones adicionales para miR302-367 que estos otros enfoques no compartieron. Independientemente del mecanismo, mantener un alto nivel persistente de proliferación de cardiomiocitos podría conducir a la desdiferenciación, directa o indirectamente, lo que podría causar contractilidad e insuficiencia cardíaca comprometidas. Los datos aquí proporcionan además una nota de advertencia de que tales terapias deben ser de naturaleza transitoria para evitar la disfunción cardíaca prolongada por la inducción de un estado desdiferenciado en los cardiomiocitos en proliferación.

Este ejemplo presenta un nuevo enfoque en el que un estímulo proliferativo transitorio para el corazón lesionado mediante el uso de una metodología simple basada en miARN y miméticos de miARN. Este enfoque tiene claras ventajas sobre la terapia celular porque no requiere el injerto de células exógenas, lo que ha sido un obstáculo significativo en el campo de la regeneración cardíaca. Además, este enfoque supera el potencial de desdiferenciación persistente de cardiomiocitos debido a su naturaleza transitoria, lo que debería conducir a la función de cardiomiocitos conservada después de una lesión isquémica.

Después de describir las realizaciones preferidas de la invención con referencia a las figuras acompañantes, debe entenderse que la invención no está limitada a las realizaciones precisas, y que los expertos en la técnica pueden efectuar diversos cambios y modificaciones en ellas sin apartarse del ámbito de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> INDUCCIÓN POR MICROARN DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA

<130> P-78049-PC

<140> PCT/US15/999999

5 <141> 2015-05-15

<150> 61/994,250

<151> 2014-05-16

10 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 1

20 UAAGUGCUUC CAUGUUUUAG UAG 23

<210> 2

<211> 23

<212> ARN

25 <213> Homo sapiens

<400> 2

ACUUUAACAU GGAAGUGCUU UCU 23

<210> 3

30 <211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 3

35 UAAGUGCUUC CAUGUUUCAG UGG 23

<210> 4

<211> 22

40 <212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 4

45 UUUUAACAUGG GGGUACCUGC UG 22

<210> 5

<211> 23

<212> ARN

50 <213> Homo sapiens

<400> 5

UAAGUGGUUC CAUGUUUUGG UGA 23

<210> 6

55 <211> 22

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 6

UAAACGUGGA UGUACUUGCU UU 22

60 <210> 7

<211> 23

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 7

65 UAAGUGCUUC CAUGUUUGAG UGU 23

ES 2 769 030 T3

<210> 8
<211> 22
<212> ARN
5 <213> Homo sapiens

<400> 8
AAUUGCACUU UAGCAAUGGU GA 22

10 <210> 9
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

15 <400> 9
ACUGUUGCUA AUAUGCAACU CU 22

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *ex vivo* para la estimulación de la proliferación celular y la desdiferenciación de células de cardiomiocitos en células madre para la regeneración de tejido cardíaco, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto transitoriamente dichas células con una composición que comprende una agrupación de microARN (miR) 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o de dicho mimético de la agrupación de miR, en el que dicho contacto transitorio es suficiente para activar transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no para reactivar el ciclo celular de los cardiomiocitos posnatales.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición comprende ácido valproico.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el miR se une operativamente a una secuencia reguladora, en la que, opcionalmente, dicha secuencia reguladora es un promotor inducible tal como un promotor inducible por doxiciclina.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho miR está codificado por una secuencia de ácido nucleico presente dentro de un vector.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el vector es un vector viral tal como un vector de lentivirus, o en el que el vector es un vector plasmídico.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la agrupación de microARN (miR) 302-367 o el mimético de la agrupación miR 302-367 comprende uno o más de miR302b, miR302c y miR367.
7. Una composición que comprende una agrupación miR 302-367 o un mimético de la agrupación miR 302-367 para su uso en la estimulación de la reparación y la regeneración cardíaca en un sujeto o para su uso en la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos en un sujeto mediante la expresión transitoria de dicha agrupación de miR o dicho mimético de la agrupación de miR en cardiomiocitos, en la que la administración transitoria de la composición a dicho sujeto activa transitoriamente la proliferación de cardiomiocitos, pero no reactiva el ciclo celular de los cardiomiocitos posnatales.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la administración transitoria es la administración sistémica.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la administración transitoria es la administración intravenosa.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la administración transitoria comprende una administración única de la composición al sujeto.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende ácido valproico.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el miR se une operativamente a una secuencia reguladora, en la que, opcionalmente, dicha secuencia reguladora es un promotor inducible tal como un promotor inducible por doxiciclina.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho miR está codificado por una secuencia de ácido nucleico presente dentro de un vector.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el vector es un vector viral tal como un vector de lentivirus, o en el que el vector es un vector plasmídico.
15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-14 en la que la agrupación miR 302-367 o el mimético de la agrupación miR 302-367 comprende uno o más de miR302b, miR302c y miR367.

Figura 1

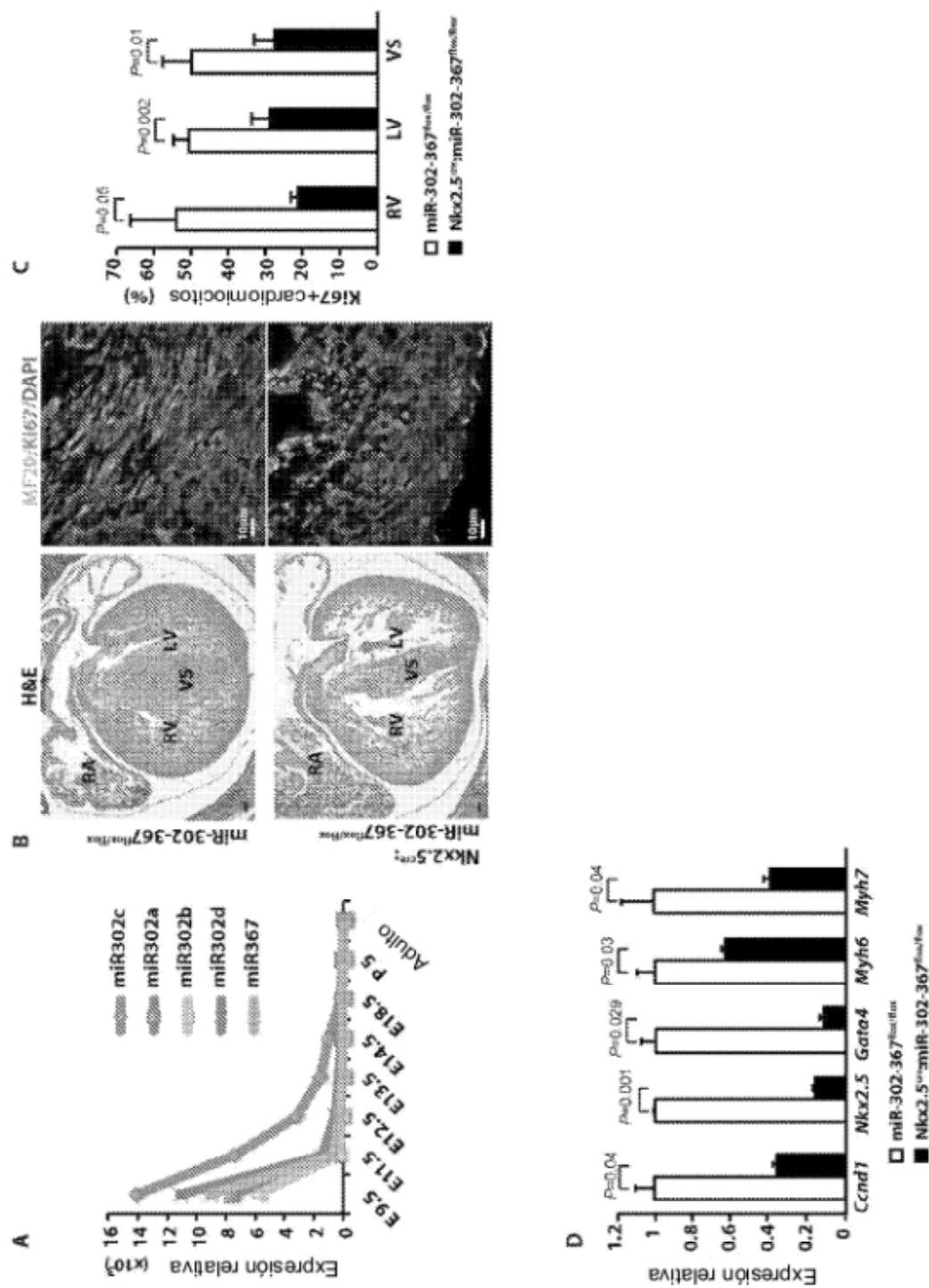


Figura 2

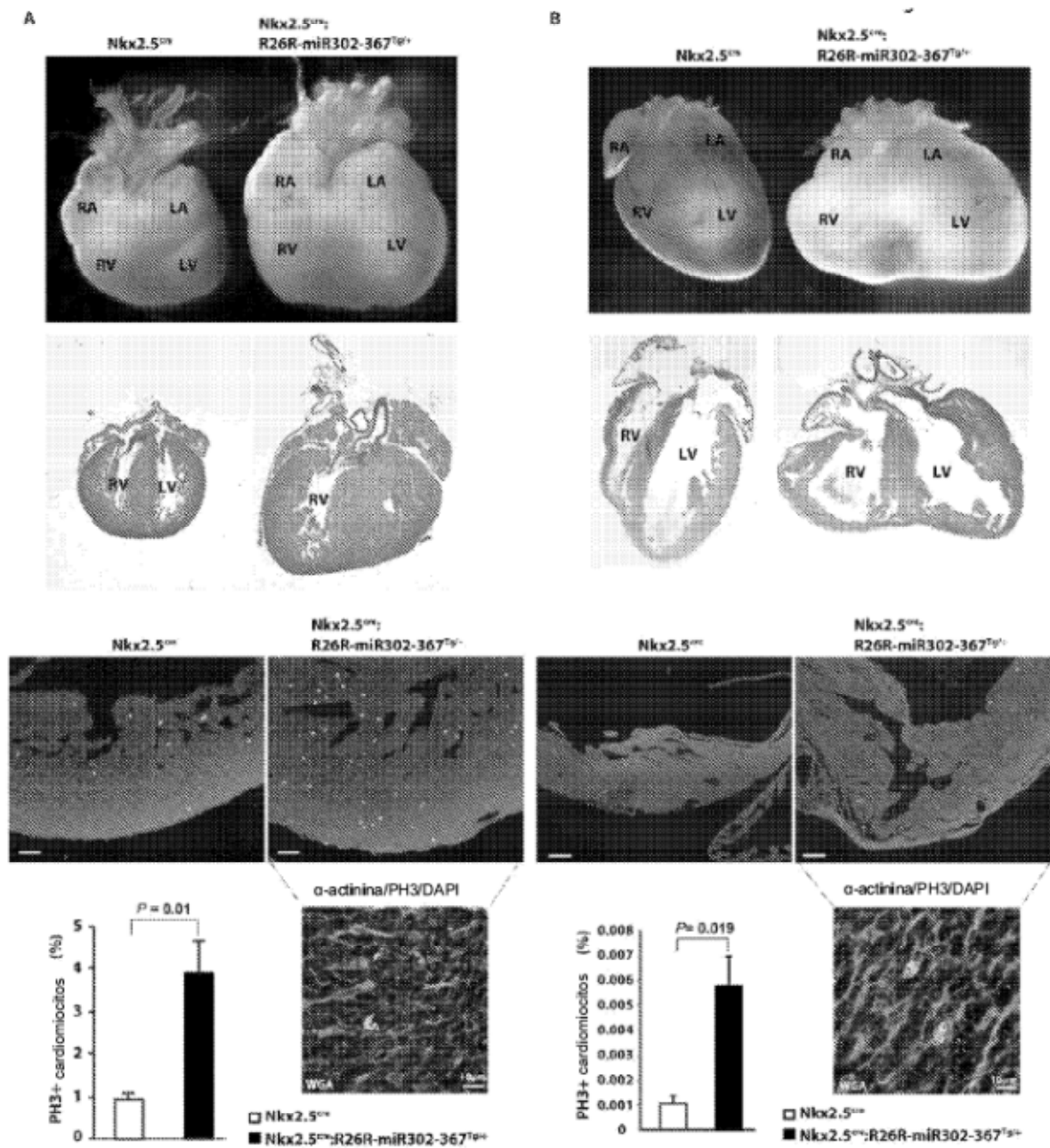


Figura 3

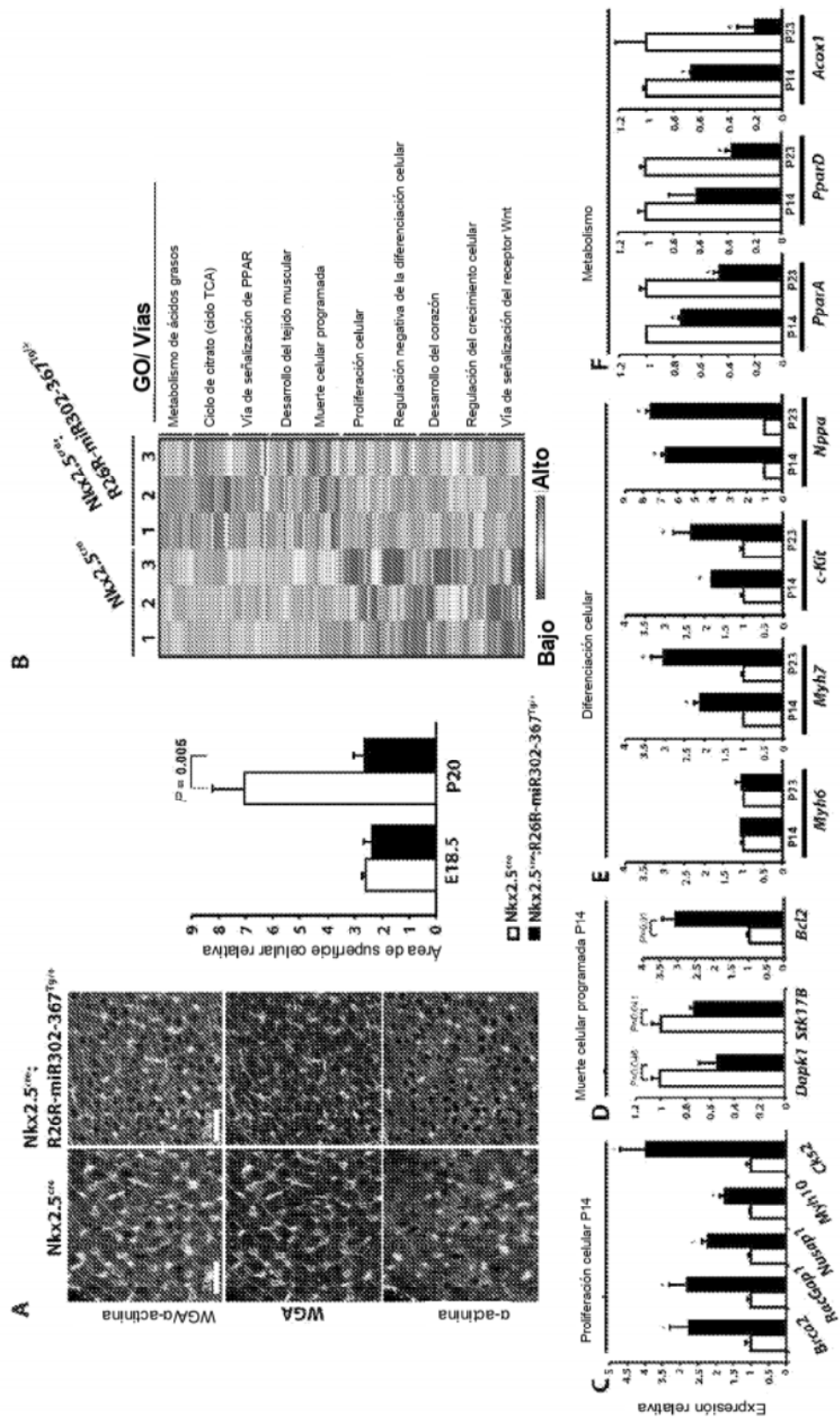


Figura 4

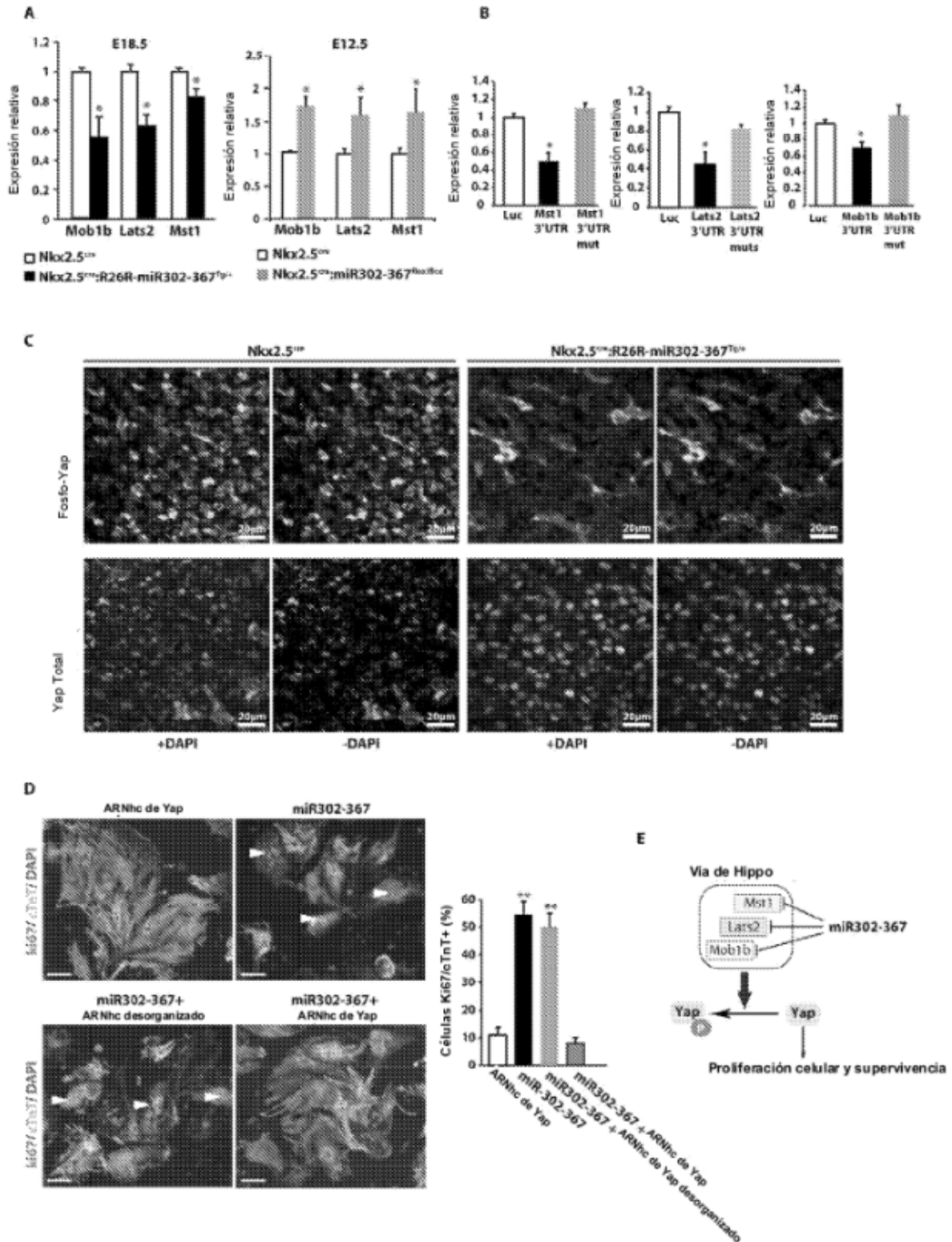


Figura 6

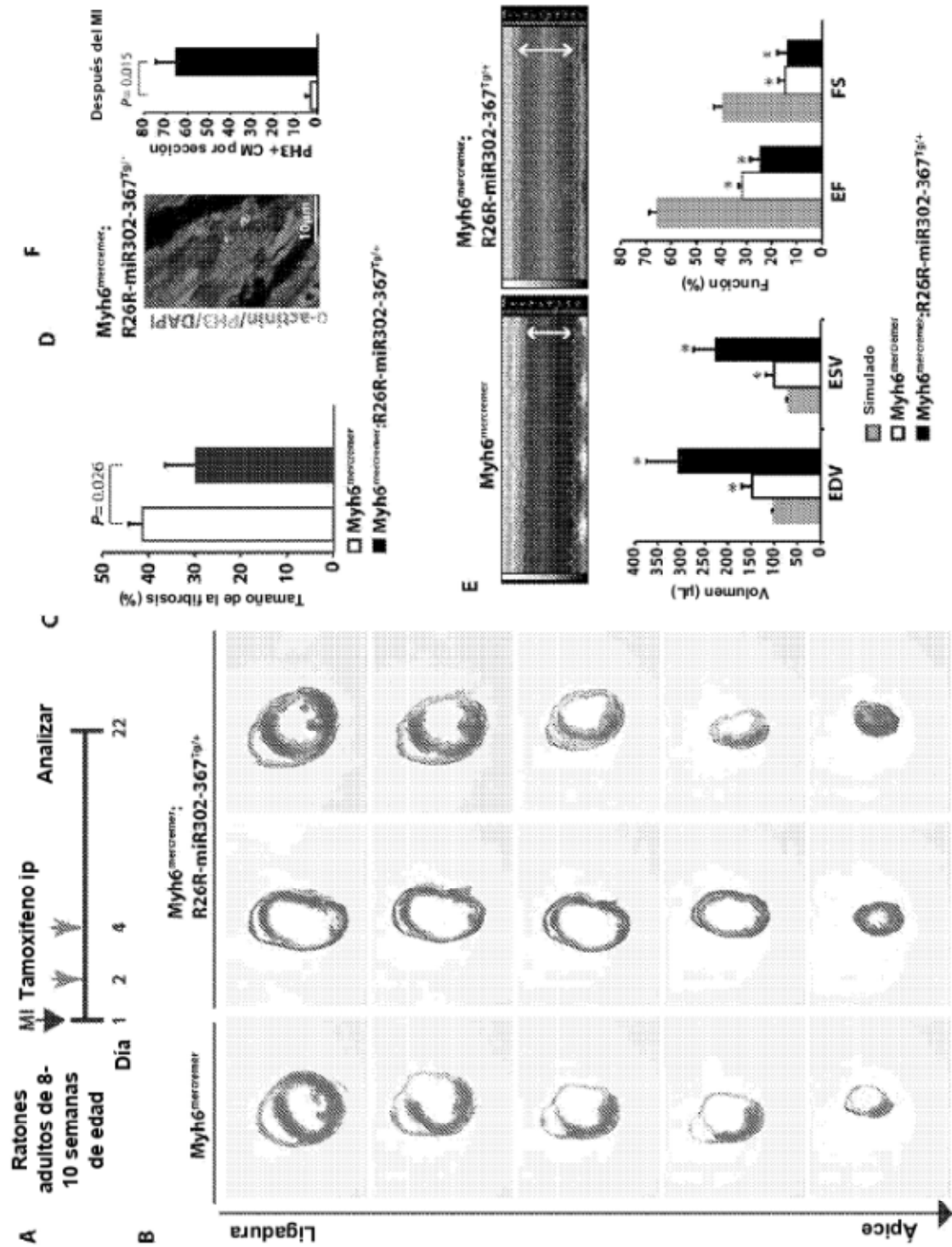


Figura 7

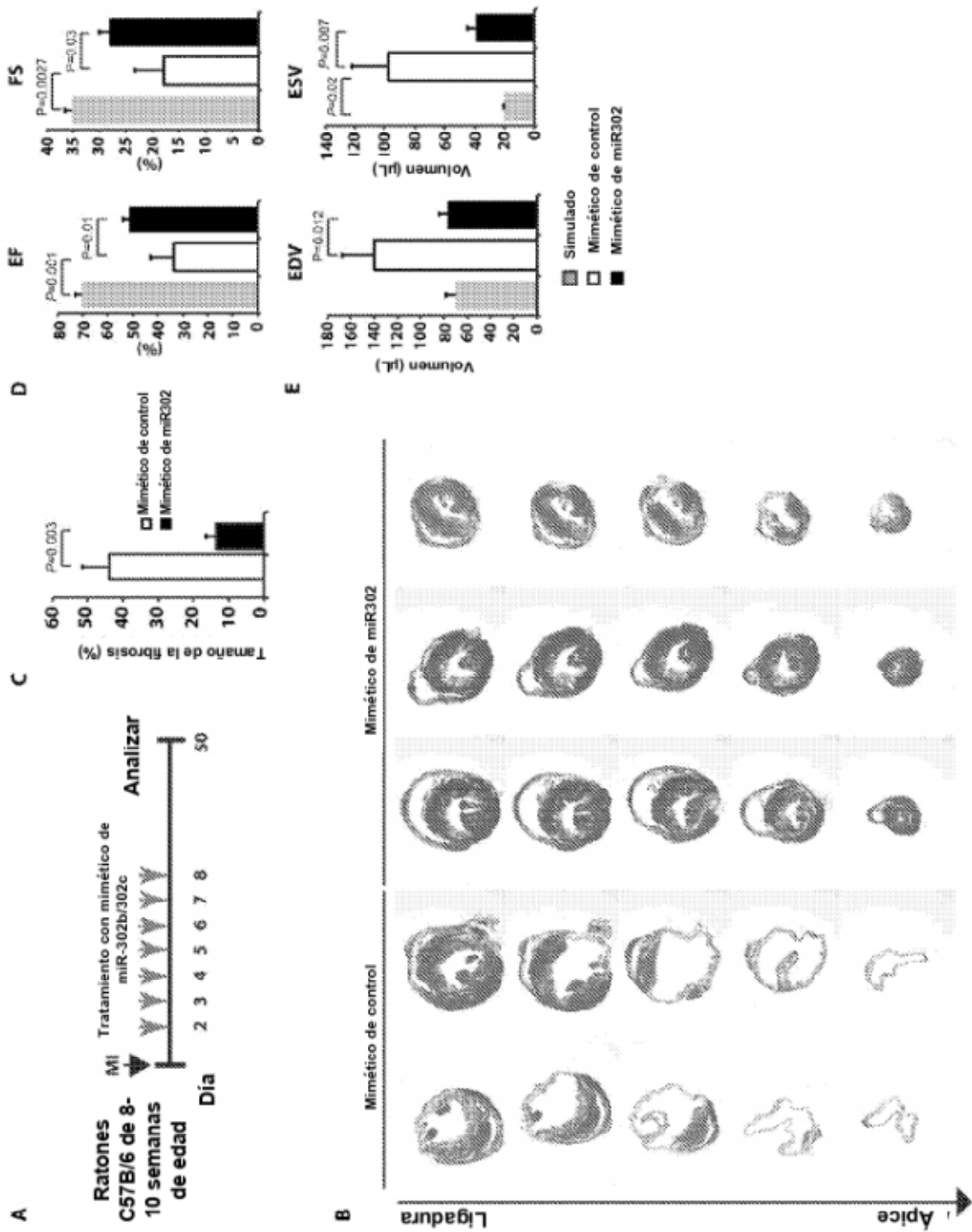


Figura 8

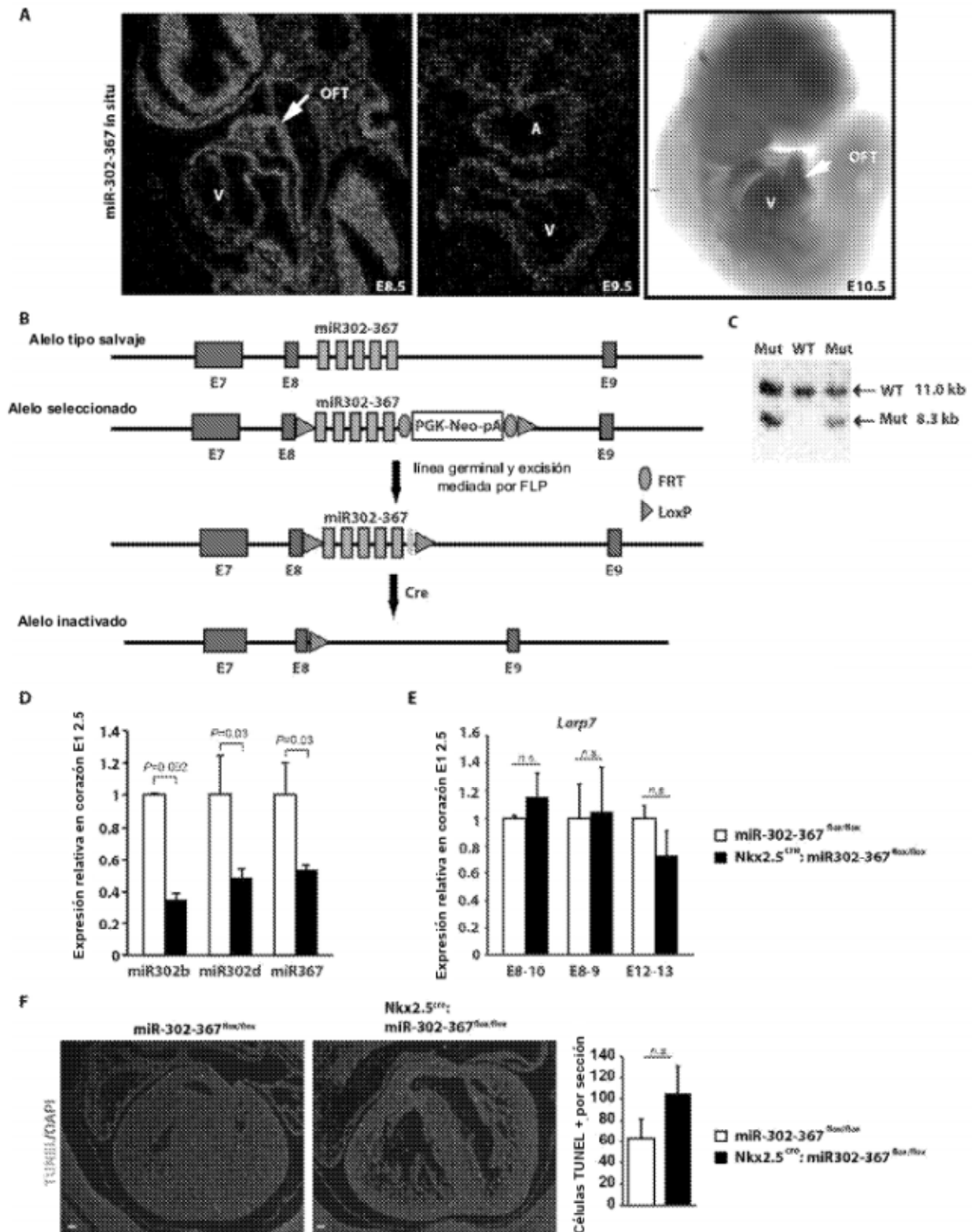


Figura 9

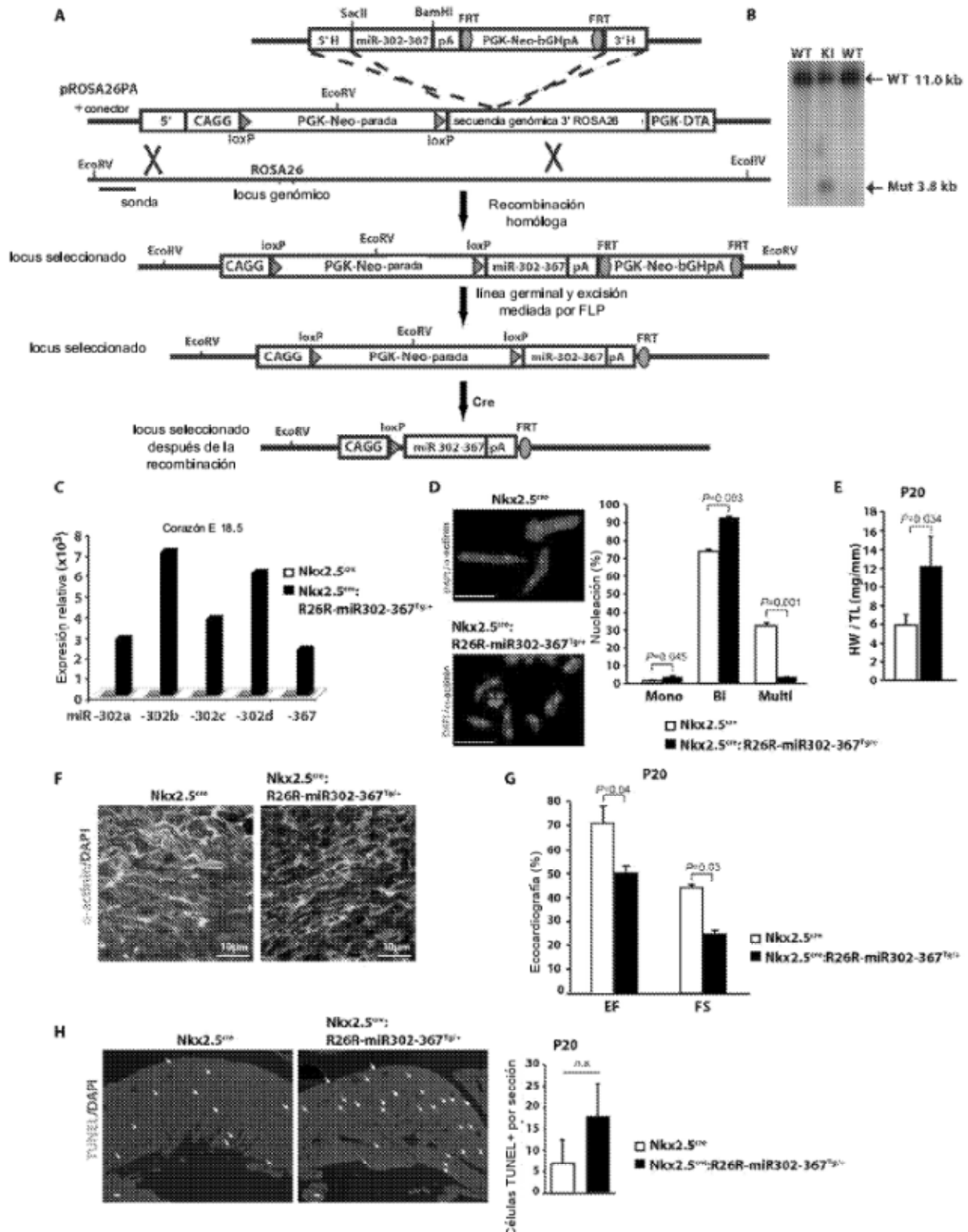


Figura 10

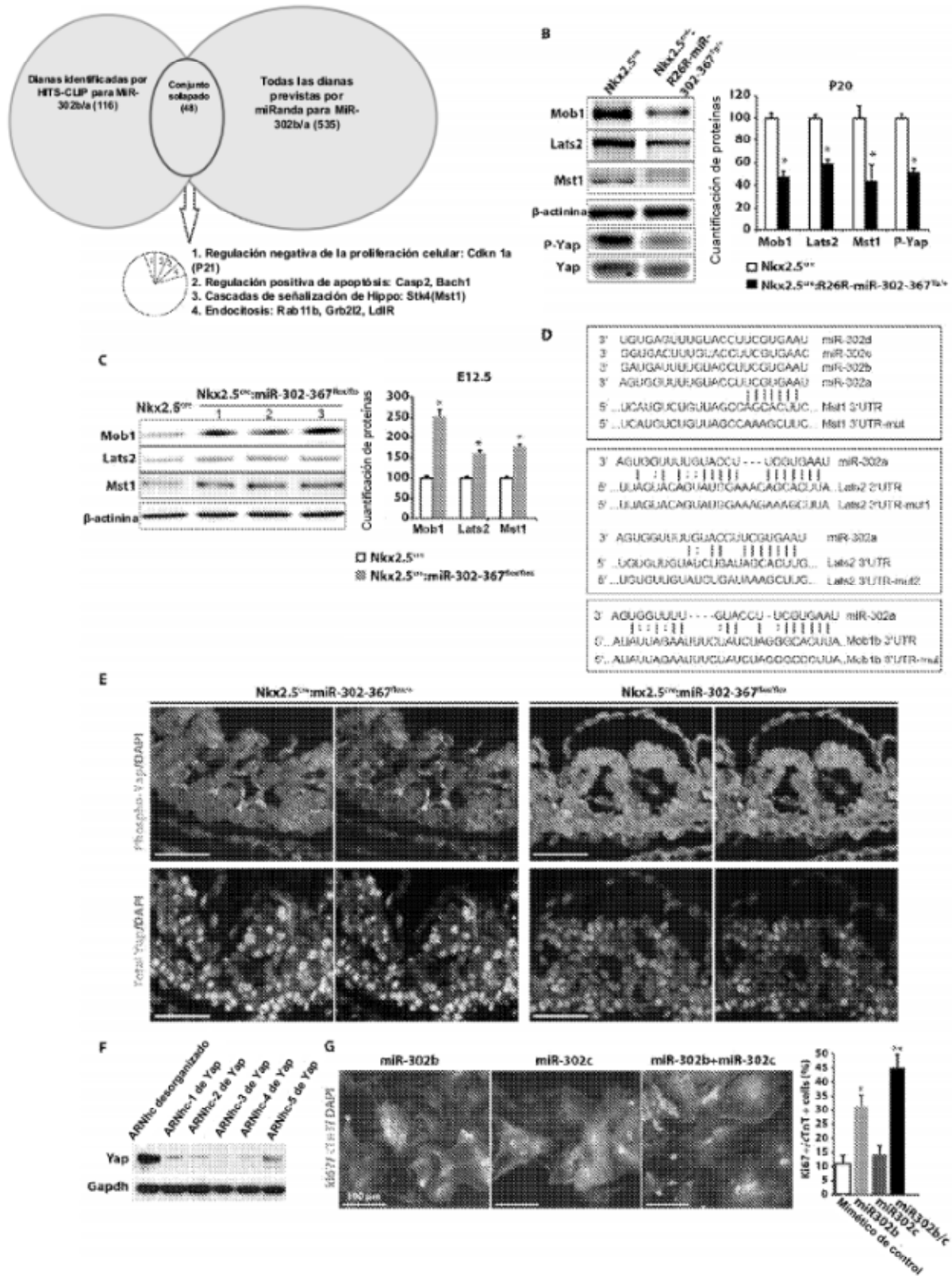


Figura 11

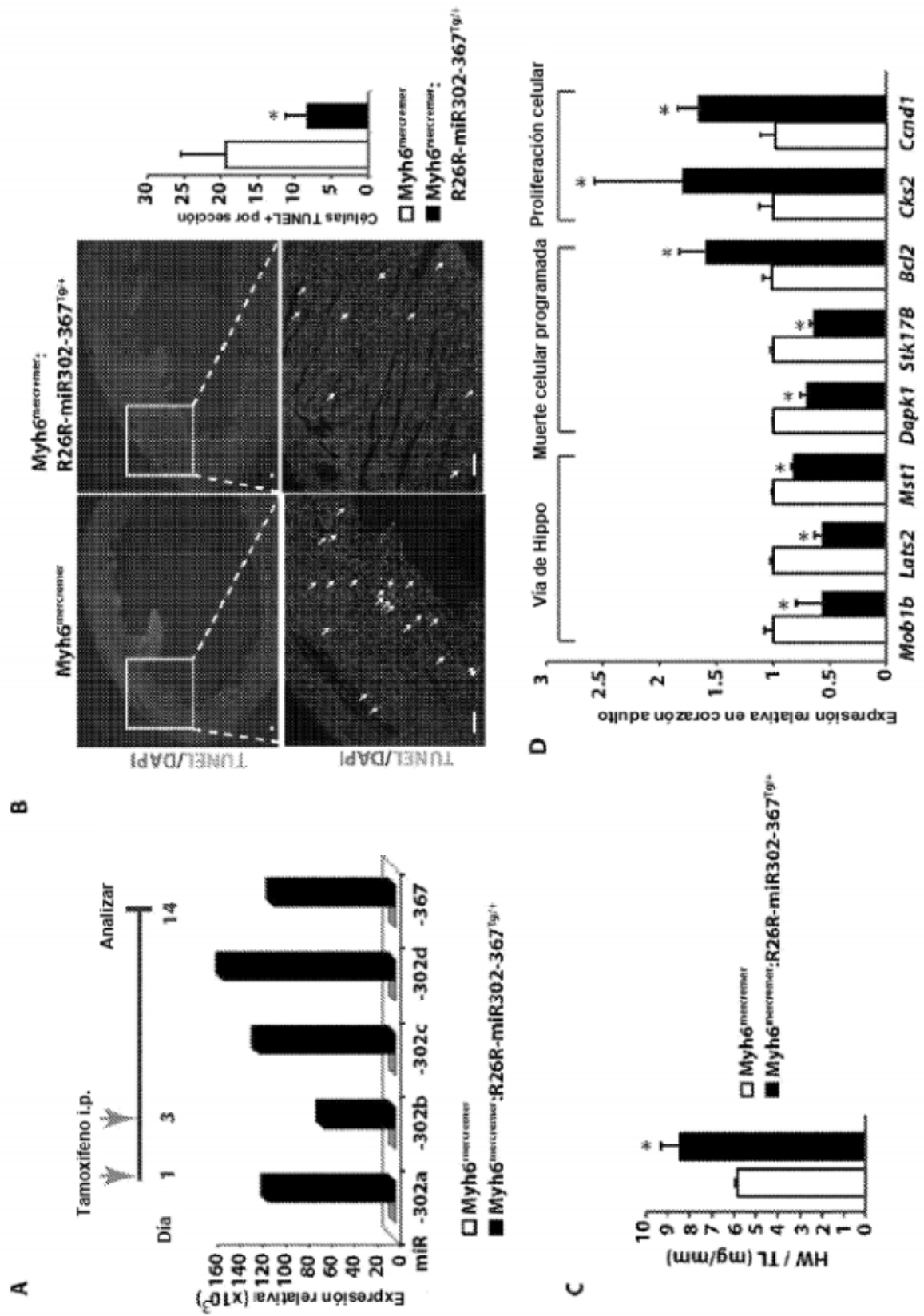


Figura 12

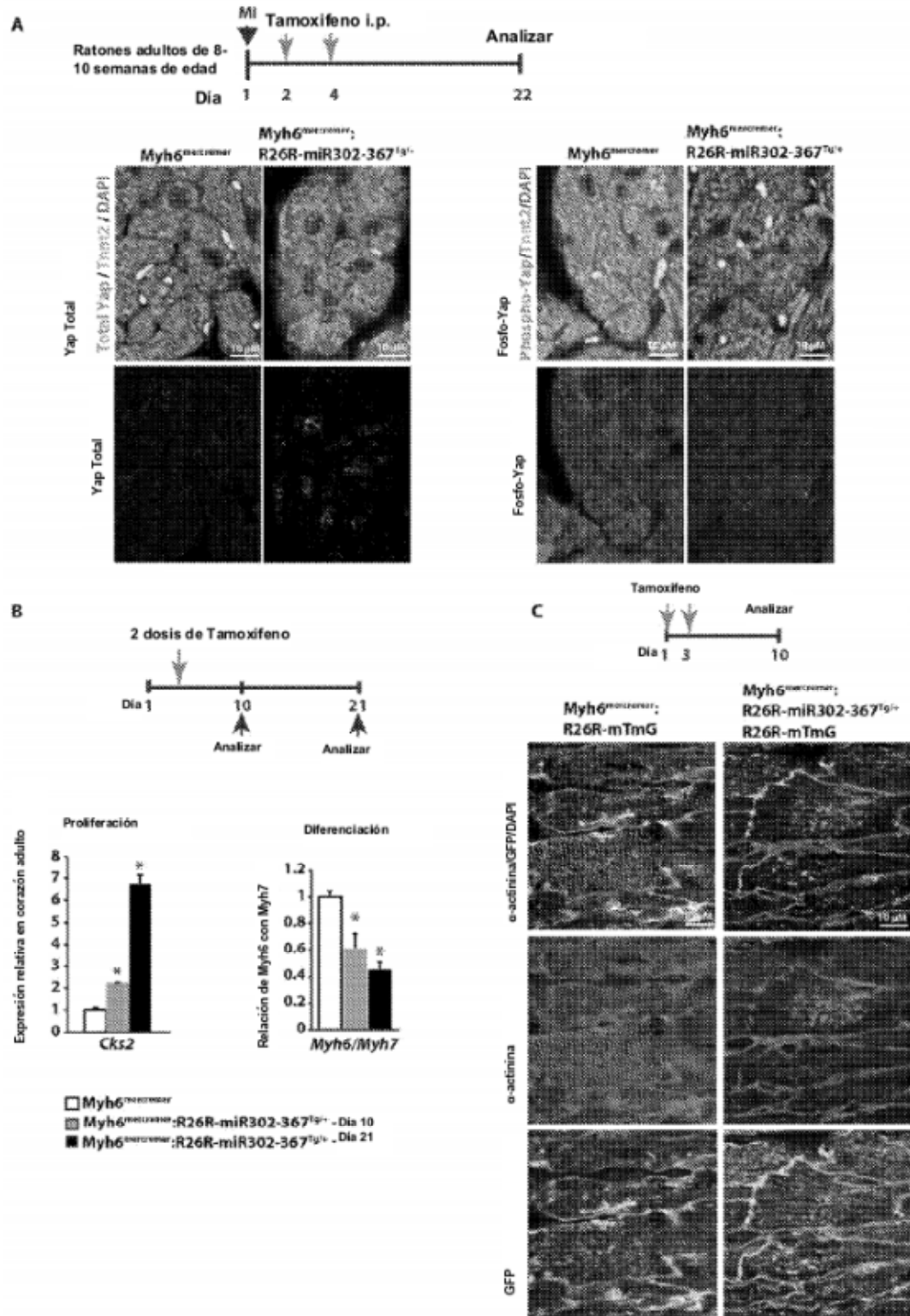


Figura 13

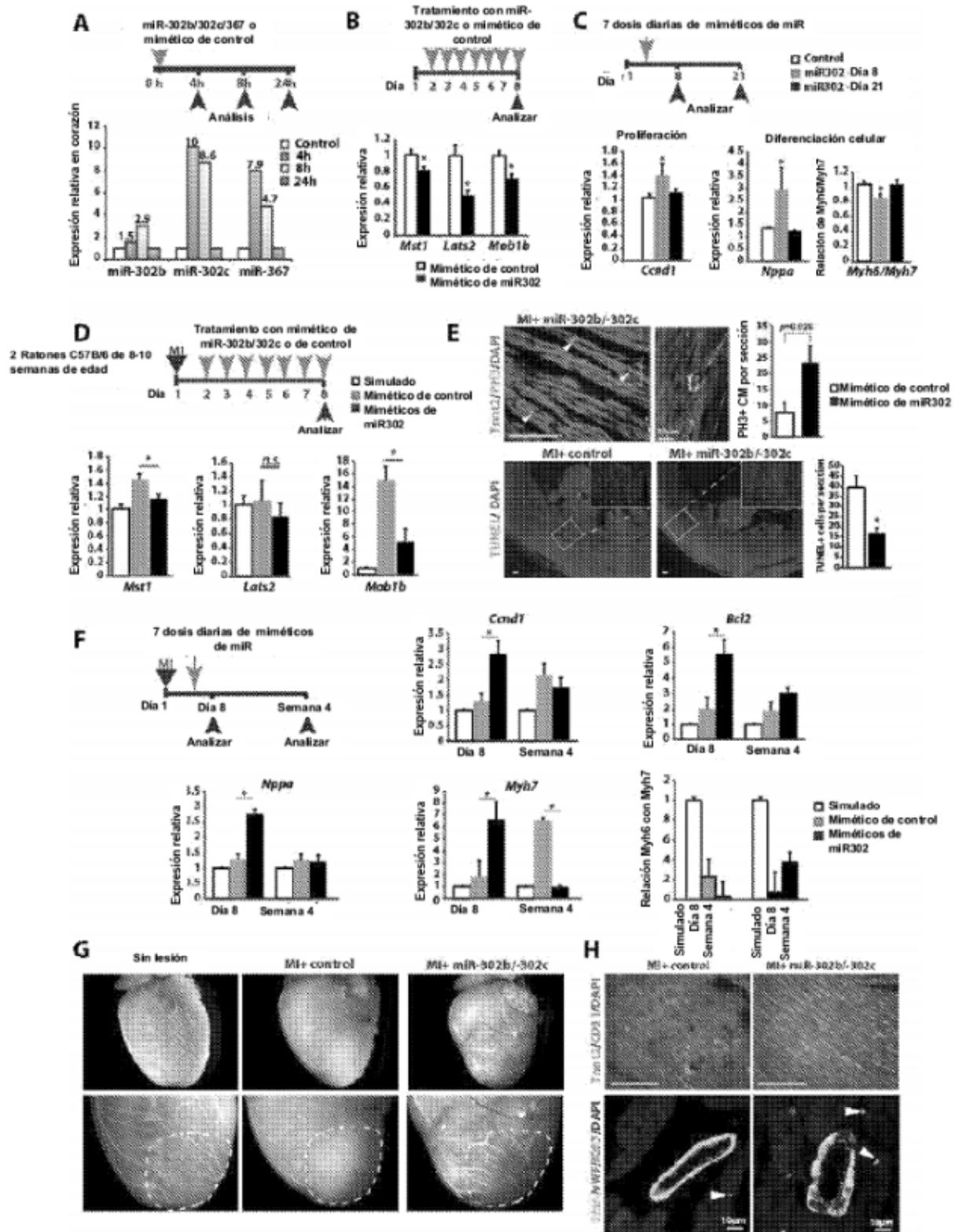


Figura 14

