

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 486**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2016 PCT/EP2016/069636**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17036811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016 E 16753667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3344768**

54 Título: **MicroARN para el tratamiento de enfermedades cardíacas**

30 Prioridad:

**01.09.2015 EP 15183318**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)**

**Minderbroedersberg 4-6**

**6211 LK Maastricht, NL y**

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**WINDT, DE, LEON JOHANNES;**

**DIRKX, ELLEN y**

**GIACCA, MAURO**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 774 486 T3

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

## DESCRIPCIÓN

MicroARN para el tratamiento de enfermedades cardíacas

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al campo de la biología y medicina molecular, más específicamente, la invención se dirige al tratamiento, retraso y mejora de las enfermedades cardíacas. Más en particular, se proporcionan microARN que inducen la regeneración cardíaca mediante la inducción de la proliferación del ciclo celular de los cardiomiocitos, de este modo tratando o mejorando las enfermedades cardíacas asociadas con una pérdida de los cardiomiocitos o de la función de cardiomiocitos. Tales enfermedades incluyen infarto de miocardio, cardiomiopatía de origen isquémico o no isquémico, miocarditis e insuficiencia cardíaca.

**Antecedentes de la invención**

15 Las enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertensión, enfermedad de las arterias coronarias y las formas genéticas de las cardiomiopatías pueden producir insuficiencia cardíaca, que está asociada con la remodelación patológica del miocardio, falla de la bomba y muerte súbita. El análisis epidemiológico en los países occidentales indica que los trastornos cardiovasculares se hallan entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad entre las personas mayores de 60 años. Hay aproximadamente 600.000 muertes por año en Europa por infarto de miocardio y, lo que es aún más relevante, se estima que la insuficiencia cardíaca afecta a más de 15 millones de personas alrededor del mundo, representando una de las principales causas de muerte. Es probable que este número aumente como consecuencia del envejecimiento de la población mundial. Si bien las estrategias convencionales de tratamiento farmacológico (por ejemplo,  $\beta$ -bloqueantes e inhibidores de ACE) han demostrado su eficacia en la prolongación de la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca [1], el pronóstico de los individuos afectados sigue siendo malo, resultando en la necesidad de nuevos conceptos.

25 En los mamíferos, el agrandamiento del corazón durante el desarrollo embrionario depende principalmente del aumento en el número de cardiomiocitos, pero poco después del nacimiento los miocitos cardíacos dejan de proliferar y se produce un mayor crecimiento del miocardio a través del agrandamiento hipertrófico de las células miocárdicas existentes [2]. En los ratones, la detención de la actividad del ciclo celular de las células del músculo cardíaco ocurre poco después del nacimiento; mientras que los cardiomiocitos humanos muestran una reducción notable en la capacidad proliferativa después de los 7 meses de edad. Evidencias recientes obtenidas por la datación del ADN de cardiomiocitos en los seres humanos han indicado que los cardiomiocitos se renuevan fisiológicamente a una tasa de 1% a la edad de 25 y de 0,45% a la edad de 75, y que menos de 50% de los cardiomiocitos se intercambian durante la duración normal de la vida [3].

30 Como consecuencia de esta capacidad de proliferación limitada de los cardiomiocitos adultos, la capacidad del corazón adulto de los mamíferos para repararse a sí mismo después de una lesión es muy restringida [4]. En particular, la pérdida de cardiomiocitos que ocurre después de varios tipos de daño miocárdico, típicamente tras un infarto de miocardio, no se repara mediante la generación de nuevo tejido contráctil, sino mediante la formación de una cicatriz, lo que compromete la función cardíaca y, a menudo, tiende a empeorar con el tiempo, derivando en una insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la identificación de nuevos medios para promover la regeneración del tejido cardíaco contráctil tras la lesión se presenta como obligatoria. Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos que controlan el ciclo celular en el cardiomiocito adulto en gran medida son aún desconocidos.

35 Los microARN (MiR) son una familia de pequeñas moléculas de ARN no codificantes de cadena simple (19-25 nucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. La inhibición de la expresión génica se produce mediante el apareamiento de bases complementarias con secuencias ubicadas principalmente en la región no traducida 3' (3' UTR) del ARNm diana [5], derivando en la represión traduccional o degradación del ARNm. Los elementos de reconocimiento clave comprenden los nucleótidos 2-8 en el extremo 5' del microARN y son conocidos como secuencias semilla [6]. Los microARN a menudo se representan como familias, definidas por la conservación de su región semilla, con conservación de secuencias desde los nematodos hasta los seres humanos, lo que implica la importancia de la función durante la evolución. Entre 10-40% de los ARNm humanos están regulados por microARN, por lo que las especies de microARN individuales pueden regular múltiples dianas de ARNm y los microARN individuales pueden contener varios sitios de reconocimiento de microARN en su 3' UTR [7]. Dichas redes reguladoras complejas pueden controlar funciones biológicas clave y las alteraciones en la expresión de microARN están asociadas con numerosas patologías humanas, incluyendo las enfermedades cardiovasculares [8, 9].

40 En contraste con muchos factores celulares implicados en la enfermedad, que son difíciles de modular terapéuticamente, los niveles de microARN se pueden modular fácilmente *in vivo* mediante el uso de imitadores de microARN que proporcionan una acción de microARN sustituta y antimiR que son moléculas de ARN comprendiendo secuencias complementarias con la secuencia de microARN madura. A través de esta complementariedad, los antimiR se hibridan con los microARN y, por lo tanto, bloquean su actividad. En efecto, el uso eficiente de antimiR se ha demostrado en primates no humanos [10, 11], y estos estudios han promovido ensayos clínicos en seres humanos [12].

A la fecha, solo unos pocos microARN han estado claramente implicados en la proliferación de cardiomiocitos,

incluyendo miR-1, miR-133, miR-199a, miR-590 y miembros de la familia miR-15. Se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-1 en el corazón embrionario inhibe la proliferación de cardiomiocitos, lo que se vincula con la represión de Hand2, un factor de transcripción requerido para el crecimiento cardíaco durante la embriogénesis [13]. miR-133 inhibe la proliferación de cardiomiocitos a través de la represión de SRF y ciclina D2, dos reguladores esenciales de la diferenciación de células musculares [14]. Se ha demostrado que la familia miR-15 regula la detención mitótica posnatal de los cardiomiocitos de ratón, mediante la regulación por disminución de la expresión de Chek1 [15]. Se ha demostrado que la administración exógena de miR-590 y miR-199a) promueve el reingreso al ciclo celular de cardiomiocitos adultos *ex vivo* [16].

A pesar de los avances detallados anteriormente, aún existe en la técnica la necesidad por tratamientos mejores, más eficaces y eficientes de las enfermedades cardíacas.

### **Sumario de la invención**

La invención proporciona una composición comprendiendo microARN 106b para uso en el tratamiento de una enfermedad cardíaca en la que el tratamiento comprende la inducción de la proliferación del ciclo celular de cardiomiocitos y en la que el tratamiento se realiza después de un infarto cardíaco.

### **Leyendas de las figuras**

#### **Figura 1. Localización genómica del grupo de microARN-106b~25.**

Panel (a) El grupo de microARN miR-106b~25 está ubicado dentro del gen 7 (Mcm7) de deficiencia de mantenimiento de minicromosomas en el cromosoma 5.

Panel (b) Gráfico mostrando los niveles de expresión de miembros individuales del grupo de microARN miR-106b~25, miR-106b, miR-93 y miR-25 en corazones de ratones en distintos puntos de tiempo después del nacimiento. P1 indica 1 semana después del nacimiento, P2 dos semanas, etc.

Panel (c) Gráfico mostrando los niveles de expresión de miembros individuales del grupo de microARN miR-106b~25, miR-106b, miR-93 y miR-25 en corazones adultos de ratones en condiciones de control, tras la constricción aórtica transversal (TAC) o de ratones transgénicos con sobreexpresión cardíaca específica de calcineurina (MHC-CnA).

#### **Figura 2. La sobreexpresión del grupo de micro-ARN-106b~25 induce la proliferación de cardiomiocitos *in vitro* e *in vivo*.**

Panel (a) La sobreexpresión del grupo de microARN miR-106b~25 en cardiomiocitos cultivados por transfección con moléculas precursoras para cada miembro del grupo produce la proliferación medida por la incorporación de Edu (5-etinil-2'-desoxiuridina).

Panel (b) Gráfico mostrando la cuantificación del número de cultivos de cardiomiocitos proliferantes.

Panel (c) Gráfico mostrando ajuste del experimento. Diez días antes de su sacrificio, los animales recibieron una inyección con Edu para marcar las células en proliferación *in vivo*. Doce semanas después de la inyección, se extrajeron los corazones adultos para su posterior análisis.

Panel (d) Gráfico mostrando la sobreexpresión del grupo de microARN miR-106b~25 *in vivo* por la terapia génica del virus 9 adenoasociado (AAV9) produciendo la proliferación medida por la incorporación de Edu.

Panel (e) Cuantificación del número de cardiomiocitos proliferantes *in vivo*. Microscopía confocal de la pared del ventrículo izquierdo libre teñida con alfa-actinina para identificar el músculo cardíaco, Hoechst para identificar los núcleos y Edu para la proliferación de miocitos.

Panel (f) Gráfico mostrando que los cardiomiocitos Edu positivos tras la terapia génica AAV9-106b~25 demuestran una duplicación aproximada del número de cardiomiocitos proliferantes adultos en comparación con la terapia AAV9-MCS (Edu + CM%).

#### **Figura 3. La terapia génica de microARN-106b ~25 produce la regeneración del corazón infartado *in vivo*.**

Panel (a) Representación esquemática del ajuste del estudio. Los ratones se aleatorizaron para recibir una cirugía simulada o infarto de miocardio (MI). Inmediatamente tras el infarto, los animales recibieron AAV9 de control (AAV9-MCS) o AAV9-106b~25, diseñado para sobreexpresar los miembros del grupo de microARN-106b~25.

Panel (b) demostración de que AAV9-106b~25 aumenta la expresión miocárdica de miR-106b, miR-93 y miR-25.

Panel (c) Representación esquemática del plano de sección a través del corazón infartado. La tinción roja de

Sirius indica un infarto extenso (tinción roja) en animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-MCS, y un tamaño de infarto sustancialmente reducido en animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25.

5 Panel (d) Los animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25 han aumentado considerablemente la masa del ventrículo izquierdo.

Panel (e) Los animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25 han mantenido el espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo.

Panel (f) Los animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25 han reducido la dimensión interna del ventrículo izquierdo.

10 Panel (g) Los animales infartados que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25 han mantenido la fracción de eyección.

### **Descripción detallada**

15 La invención proporciona una composición comprendiendo microARN 106b para uso en el tratamiento de una enfermedad cardíaca en la que el tratamiento comprende la inducción de la proliferación del ciclo celular de cardiomiocitos y en la que el tratamiento se realiza después de un infarto cardíaco.

También se desvela en la presente memoria una composición comprendiendo un microARN seleccionado del grupo que consiste en microARN 106, microARN 93 o microARN 25 y sus complementos, para uso en el tratamiento, prevención, retraso o mejora de una enfermedad cardíaca.

20 En otros términos, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar, prevenir, retrasar o mejorar una enfermedad cardíaca en el que una composición comprendiendo un microARN seleccionado del grupo que consiste en microARN 106b, microARN 93 o microARN 25 y sus complementos se administra a un sujeto necesitado de dicho tratamiento.

25 En los mamíferos, durante la embriogénesis y poco después del nacimiento, el corazón conserva la capacidad de crecer a través de la proliferación del músculo cardíaco, incluyendo un estallido preadolescente en la proliferación de miocitos, poco antes de la edad adulta. En ratones, la detención de la actividad del ciclo celular de las células del músculo cardíaco ocurre poco después del nacimiento; mientras que los cardiomiocitos humanos muestran una reducción notable en la capacidad proliferativa después de los 7 meses de edad. Evidencias recientes obtenidas por la datación del ADN de cardiomiocitos en seres humanos han indicado que los cardiomiocitos se renuevan fisiológicamente a una tasa de 1% a la edad de 25 y de 0,45% a la edad de 75, y que menos de 50% de los cardiomiocitos se intercambian durante la duración normal de la vida [3]. Como consecuencia de esta capacidad de proliferación limitada de los cardiomiocitos adultos, la capacidad del corazón adulto de los mamíferos para repararse a sí mismo después del infarto de miocardio es muy restringida [4], la lesión del tejido no se repara mediante la generación de tejido contráctil nuevo sino por la formación de una cicatriz, lo que compromete la función cardíaca y que a menudo tiende a empeorar con el tiempo, derivando en una insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la identificación de nuevos medios para promover la reactivación del ciclo celular en miocitos cardíacos adultos puede tener consecuencias regenerativas para el miocardio.

35 Los autores de la presente han descubierto que los microARN 160b, microARN 93 y microARN 25, denominados en conjunto en la presente memoria como grupo de microARN miR-106b~25, exhiben una alta expresión en etapas tempranas después del nacimiento y una baja expresión en el corazón adulto. El grupo intrónico miR-106b~25 es parte del gen 7 de deficiencia de mantenimiento de minicromosomas (Mcm7) y está ubicado en ratones en el cromosoma 5 y en los seres humanos en el cromosoma 7 en la misma organización genética (Figura 1a).

45 El grupo de miR-106b~25 alberga 3 microARN, miR-106b, miR-93 y miR-25 cotranscritos. En primer lugar, se analizó la expresión de miR-106b, miR-93 y miR-25 en 5 corazones de ratones de tipo salvaje sacrificados el día posnatal (P) 1 (P1), P3, P5, P7 (o 1 semana después del nacimiento), P10, P12, P15, P18, P21 (o 3 semanas después del nacimiento) y en P56 (u 8 semanas después del nacimiento; Figura 1b). Los datos muestran que, en comparación con los corazones adultos (P56), miR-106b, miR-93 y miR-25 muestran un nivel de expresión al menos 2 veces mayor que los niveles de expresión de adultos con una elevación adicional característica entre 5-7 veces alrededor de P15. Esta elevación adicional característica corresponde a un breve pero intenso estallido proliferativo, recientemente descrito, de cardiomiocitos predominantemente binucleares en corazones preadolescentes en ratones y seres humanos [19].

50 Finalmente, también se evaluó la expresión de miR-106b, miR-93 y miR-25 en miocardio adulto sano en comparación con miocardio con insuficiencia cardíaca adulta como resultado de una sobrecarga de presión sostenida por constricción aórtica transversal (TAC) o de un transgén expresando una forma activada constitutivamente de fosfatasa calcineurina pro-hipertrofica en el miocardio (MHC-CnA). En línea con la capacidad muy limitada del corazón adulto de los mamíferos para inducir la proliferación de cardiomiocitos y repararse a sí mismo, la expresión de miR-106b, miR-93 y miR-25 fue aún menor en los corazones de ratones con insuficiencia en comparación con el miocardio sano. En conclusión, estos datos muestran que los miembros del grupo de microARN miR-106b~25 tienen una expresión

elevada en el miocardio en puntos de tiempo que se correlacionan con la actividad del ciclo celular y la proliferación de las células musculares cardíacas.

Después, para evaluar si la expresión aumentada del grupo de microARN miR-106b~25 puede producir el reingreso del ciclo celular, se cultivaron cardiomiocitos de ratas neonatales y se estimuló la expresión de miR-106b, miR-93 o miR-25 por transfección de microARN precursor durante 24 h. Después de la fijación, los cultivos se trataron con un anticuerpo para alfa-actinina para detectar miocitos individuales, los núcleos se tiñeron por contraste con la tinción nuclear TOTO-3 y se usó el análogo nucleosídico EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) para la sustitución de timidina para detectar la síntesis cromosómica de ADN característica de la fase del ciclo celular S1.

Solo se consideraron miocitos con positividad EdU en el ensayo de proliferación y se contaron 1500 células en cada afección (Figura 2a). Los datos demuestran que los miocitos cultivados transfectados con un precursor de control para microARN desordenado (pre-scr-miR) demostraron la proliferación de 10% de los miocitos. En contraste, la transfección con miR-106b, miR-93 o miR-25 elevó la tasa de proliferación de miocitos a aproximadamente 30% sin ninguna diferencia aparente entre los miembros individuales del grupo de microARN miR-106b-25 (Figura 2b).

Para verificar estos resultados *in vivo*, se indujo la expresión elevada de miR-106b, miR-93 y miR-25 mediante la construcción de un virus adenoasociado recombinante manipulado genéticamente para sobreexpresar el grupo de microARN miR-106b~25 (AAV9-106b~25). AAV9 tiene la ventaja de que cuenta con un tropismo cardíaco natural para el miocardio produciendo las características de la terapia génica restringida al miocardio cuando se inyecta en animales o seres humanos. Para lograr la terapia génica cardíaca con sobreexpresión de miR-106b, miR-93 y miR-25, se inyectó a los ratones en P1 con partículas  $10^{11}$  de AAV9 de control solo con el sitio de clonación múltiple vacío (AAV9-MCS) o AAV9-106b~25 en la vena de la cola. Diez días antes de su sacrificio, los animales recibieron una inyección con Edu para marcar las células proliferantes *in vivo*. Doce semanas después de la inyección, se extrajeron los corazones adultos para su posterior análisis (Figura 2c). Los datos muestran que miR-106b, miR-93 y miR-25 se elevaron entre 4 y 6 veces en ratones que recibieron terapia génica con AAV9-106b~25 en comparación con la terapia génica con el vector AAV9-MCS de control (Figura 2d). La microscopía confocal de la pared del ventrículo izquierdo libre teñida con alfa-actinina para identificar el músculo cardíaco, Hoechst para identificar núcleos, y Edu para la proliferación de miocitos, demostraron una elevación marcada de la proliferación de miocitos *in vivo* tras la terapia génica con AAV9-106b~25 (Figura 2e). La cuantificación de los cardiomiocitos EdU positivos tras la terapia génica con AAV9-MCS o AAV9-106b~25 demostró una duplicación aproximada del número de cardiomiocitos proliferantes adultos (EdU + CM; Figura 2f).

En conclusión, los datos combinados demuestran que la elevación de miR-106b, miR-93 y miR-25 provoca el reingreso del ciclo celular y la proliferación de cardiomiocitos tanto en cultivos a corto plazo *in vitro* como en la proliferación de cardiomiocitos en el miocardio adulto *in vivo*.

Después, se evaluó si la expresión elevada de miR-106b~25 puede reforzar la reparación miocárdica normalmente ineficaz que tiene lugar tras el infarto de miocardio. Los ratones CD1 adultos (de 8 a 12 semanas de edad) se sometieron a una ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda para inducir el infarto de miocardio (MI) o la operación simulada y se inyectaron, en el área peri-infartada, con vectores AAV9 expresando los tres miARN (AAV9-106b~25) o un vector de control (Figura 3a). En línea con los resultados presentados anteriormente, este tratamiento da como resultado una transducción miocárdica eficiente y una expresión transgénica de un mes de duración con una elevación de 4 a 6 veces de los miembros individuales del grupo de miARN (Figura 3b). La tinción roja de Sirius de las secciones transversales justo debajo de la ligadura indica un infarto extenso y adelgazado en ratones sometidos a MI e inyectados con el vector de control AAV9, mientras que la integridad del miocardio se conservó mucho mejor y el infarto fue mucho más pequeño en ratones sometidos a MI y que recibieron el vector AAV9 diseñado para sobreexpresar el grupo de miR-106b~25. Según lo evaluado por ecocardiografía, la masa del ventrículo izquierdo aumentó en ratones infartados que recibieron AAV9-106b~25, indicando una muscularidad preservada (Figura 3d). Funcionalmente, el espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (LVPW, Figura 3e), el diámetro interno del ventrículo izquierdo (LVID; Figura 3f) y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (EF, Figura 3g) se conservaron significativamente con el transcurso del tiempo en los ratones infartados inyectados con AAV9-106b~25.

En conclusión, estos datos muestran que la expresión de miR-106b~25 después del infarto ejerce un marcado efecto beneficioso en la reducción del tamaño del infarto y la mejora de la función cardíaca, en consonancia con el efecto de estos miARN en la estimulación activa de la proliferación de cardiomiocitos y la capacidad regenerativa del corazón.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1: Cultivos de cardiomiocitos primarios, inmunocitoquímica**

Los cultivos de cardiomiocitos se aislaron por disociación enzimática de corazones de ratas neonatales de 1 a 2 días y se procesaron para detectar inmunofluorescencia como se describió anteriormente [17]. Los cardiomiocitos neonatales se transfectaron con precursores (Ambion) de microARN (10 mM) usando Oligofectamina (Invitrogen). Para la visualización del tamaño de los cardiomiocitos y la organización sarcomérica, las células se tiñeron para  $\alpha$ -actinina con anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -actinina sarcomérica de ratón (Sigma-Aldrich, clon A7811 EA-53, 1: 500) seguido de anticuerpo monoclonal anti-ratón de rata conjugado con verde Oregon (Life Technologies, A-889, 1: 1000).

La tinción nuclear se realizó con medio de montaje VECTASHIELD (Vector Laboratories) con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

#### **Ejemplo 2: Ensayos con indicador 3'-UTR luciferasa**

5 Se obtuvieron constructos portando la 3'-UTR murina de Cdkn1a, Cdkn1c o E2f5 por amplificación por PCR y se subclonaron en el vector psiCHECK2 (Promega). Las células HL-1 se transfectaron con un precursor desordenado o precursor para mmu-miR1-106b, mmu-miR-93 o mmu-miR-25 (Exiqon) a una concentración final de 10 nM en placas de 48 pocillos usando oligofectamina (Invitrogen). Los indicadores de luciferasa se transfectaron usando reactivo Fugene-6 (Roche). Veinticuatro horas después de la transfección de los indicadores y miARN, se midieron las actividades de luciferasa de Luciérnaga y Renilla 48 h después de la transfección del plásmido usando el Sistema de Ensayo de Indicador de Doble Luciferasa (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **Ejemplo 3: Producción y purificación de vectores de AAV recombinantes.**

15 El grupo miR-106b~25 murino más secuencias flanqueantes corriente arriba y corriente abajo (total aproximado de 300 pares de bases) se amplificaron a partir de ADN genómico humano aislado de células HeLa, usando el mini kit de ADN QIAamp (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias amplificadas se clonaron en el vector pZac2.1 (Gene Therapy Program, Penn Vector core, University of Pennsylvania, USA), que se usó para producir vectores de AAV recombinantes. Los vectores de AAV recombinantes se prepararon en la unidad de vectores de AAV en ICGEB Trieste, como se describió anteriormente [18]. Brevemente, se generaron vectores de AAV del serotipo 9 en células HEK293T, usando una cotransfección de plásmidos triples para el empaquetamiento. Se obtuvieron patrones virales por centrifugación en gradiente de CsCl<sub>2</sub>. La titulación de las partículas virales de AAV se realizó mediante cuantificación por PCR en tiempo real del número de genomas virales, como se describió anteriormente; las preparaciones virales tenían títulos entre  $1 \times 10^{13}$  y  $3 \times 10^{13}$  partículas del genoma viral por ml.

#### **Ejemplo 4: Inyección de vectores de AAV en ratones neonatales y adultos**

25 En los experimentos usando vectores de AAV, se inyectó a ratones CD1 neonatales (día 1 postnatal) por vía intraperitoneal AAV9-MCS (AAV9 de control) o AAV9-106b~25 a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  partículas del genoma viral por animal, usando una jeringa de insulina con aguja de calibre 30 incorporada. Los corazones de los ratones inyectados se recogieron 12 semanas después de la inyección de AAV.

30 La inyección intracardiaca en ratones adultos de vectores de AAV (AAV9 de control o AAV9-106b~25), a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  partículas de genoma viral por animal, se realizó como se describe a continuación para los animales que se sometieron a un infarto cardíaco. Los corazones de los animales inyectados se recogieron 12 días después de la inyección de AAV.

#### **Ejemplo 5: Infarto de miocardio**

35 Se produjo infarto de miocardio en ratones CD1 adultos (12 semanas de edad), mediante ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Brevemente, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina y xilazina, se intubaron en forma endotraqueal y se colocaron en un ventilador para roedores. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C en una almohadilla térmica. Se accedió al corazón latiente a través de una toracotomía izquierda. Después de extraer el pericardio, se visualizó una rama descendente de la arteria coronaria LAD con un estereomicroscopio (Leica) y se ocluyó con una sutura de nylon. La ligadura se confirmó mediante el blanqueamiento de una región del ventrículo izquierdo, inmediatamente después de la ligadura. Los vectores de AAV recombinantes, a una dosis de  $1 \times 10^{11}$  partículas del genoma viral por animal, se inyectaron inmediatamente después de la ligadura de LAD en el miocardio limitando la zona del infarto (inyección única), usando una jeringa de insulina con aguja de calibre 30 incorporada.

#### **Ejemplo 6: Análisis por ecocardiografía**

45 Para evaluar la función y las dimensiones del ventrículo izquierdo, se realizó una ecocardiografía bidimensional transtorácica en ratones sedados con isoflurano 5% a los 12, 30 y 60 días después del infarto de miocardio, usando un ultrasonido Visual Sonics Vevo 770 (Visual Sonics) equipado con un transductor de matriz lineal de 30 MHz. Los trazos en modo M en la vista del eje corto paraesternal se usaron para medir el espesor de la pared anterior y posterior del ventrículo izquierdo y el diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole final y diástole final, que se usaron para calcular el acortamiento fraccional y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

#### **Ejemplo 7: Recolección de corazón y análisis histológico**

50 Al final de los estudios, los animales se anestesiaron con isoflurano 5% y después se sacrificaron mediante una inyección de KCl 10%, para detener el corazón en la diástole. El corazón se extirpó, se lavó rápidamente en PBS, se pesó, se fijó en formalina 10% a temperatura ambiente, se incrustó en parafina y se procesó adicionalmente para examinar la histología o inmunofluorescencia. La tinción con hematoxilina-eosina y rojo de Sirius se realizó de acuerdo con procedimientos estándar, y se analizó la morfología regular y el grado de fibrosis.

55

**Referencias**

1. Benjamin IJ, Schneider MD. Learning from failure: congestive heart failure in the postgenomic age. *J Clin Invest.* 2005;115:495-9.
- 5 2. Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 2007;87:521-44.
3. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324:98-102.
- 10 4. Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature.* 2013;493:433-6.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350-5.
6. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:376-85.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136:215-33.
- 15 8. Olson EN. MicroRNAs as Therapeutic Targets and Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Sci Transl Med.* 2014;6:239ps3.
9. Da Costa Martins PA, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2012;93:563-72.
10. Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther.* 2006;13:496-502.
- 20 11. Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008;452:896-9.
12. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med.* 2013;368:1685-94.
- 25 13. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 2005;436:214-20.
14. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008;22:3242-54.
- 30 15. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011; 109:670-9.
16. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Si-nagra G, Zacchigna S, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature.* 2012;492:376-81.
- 35 17. De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T, Molkentin JD. Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000;275:13571-9.
18. Arsic N, Zentilin L, Zacchigna S, Santoro D, Stanta G, Salvi A, et al. Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Mol Ther.* 2003;7:450-9.
- 40 19. Naqvi N, Li M, Calvert JW, Tejada T, Lambert JP, Wu J, Kesteven SH, Holman SR, Matsuda T, Lovelock JD, Howard WW, Iismaa SE, Chan AY, Crawford BH, Wagner MB, Martin DI, Lefer DJ, Graham RM, Husain A. A proliferative burst during pre-adolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell* 2014;157; 795-807.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende microARN 106b para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardíaca en el que el tratamiento comprende la inducción de la proliferación del ciclo celular de cardiomiocitos y en el que el tratamiento se realiza después de un infarto cardíaco.
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la enfermedad cardíaca es enfermedad de la arteria coronaria.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el tratamiento ejerce un efecto beneficioso en la reducción del tamaño del infarto.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en el que el tratamiento mejora la función cardíaca.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 en el que el microARN se administra en un vector de direccionamiento.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el vector de direccionamiento es un vector del virus adenoasociado.
- 15 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el vector del virus adenoasociado es del serotipo AAV1 o AAV9.



Figura 1A

**a** cromosoma 5

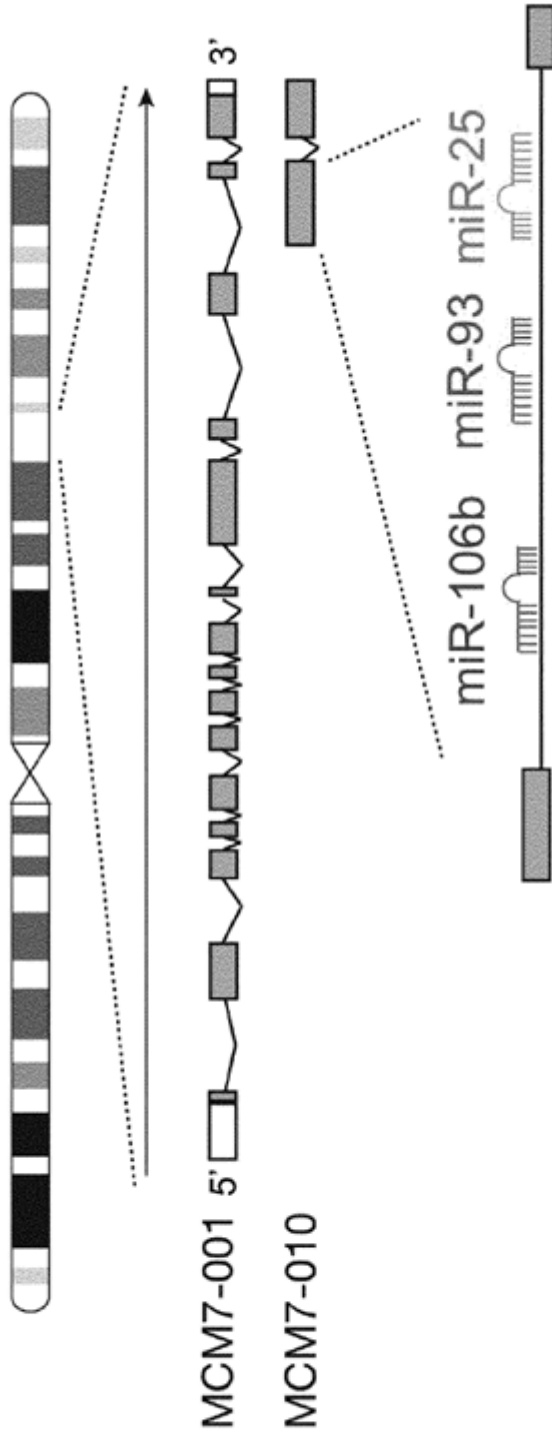


Figura 1B

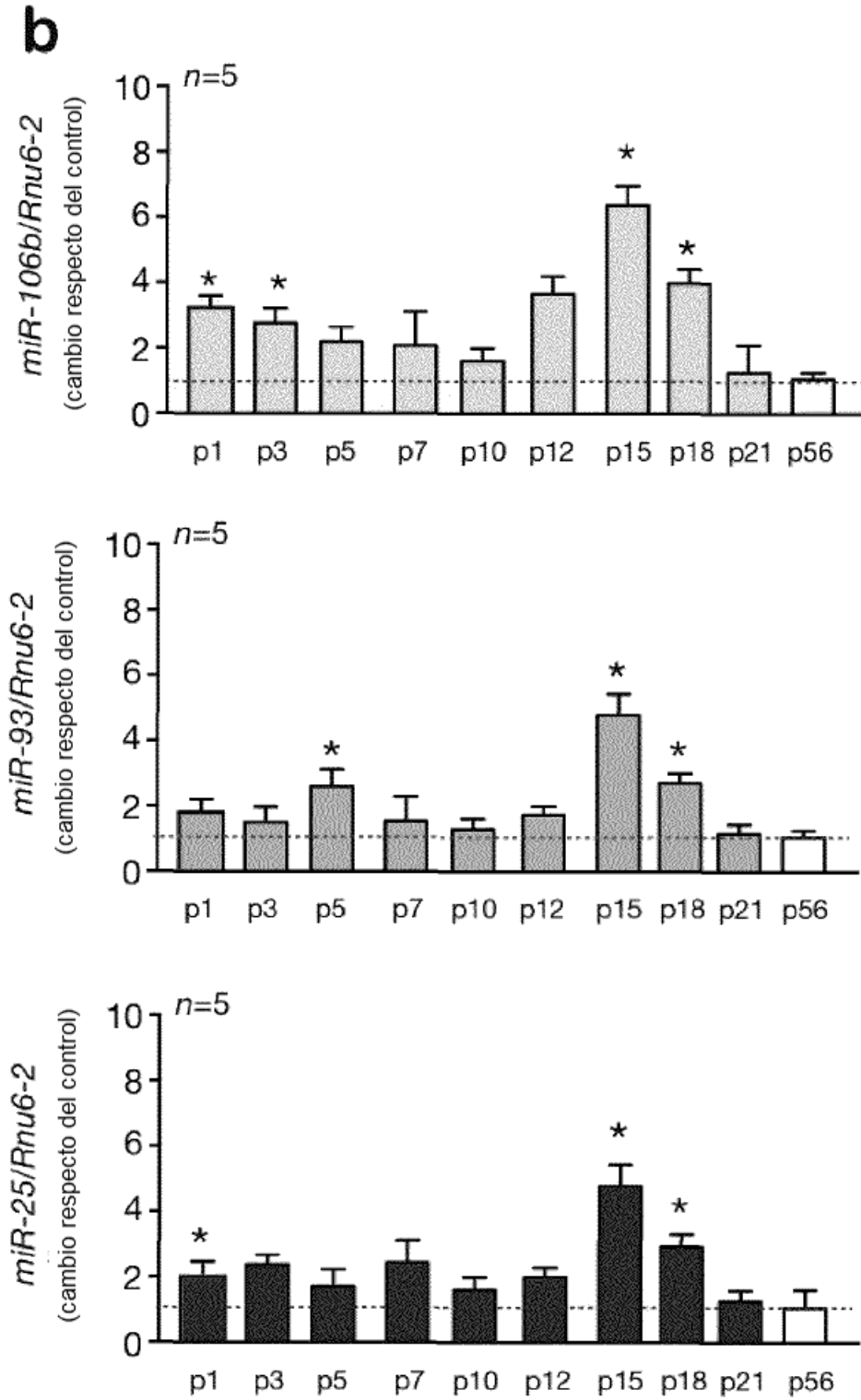


Figura 1C

**C**

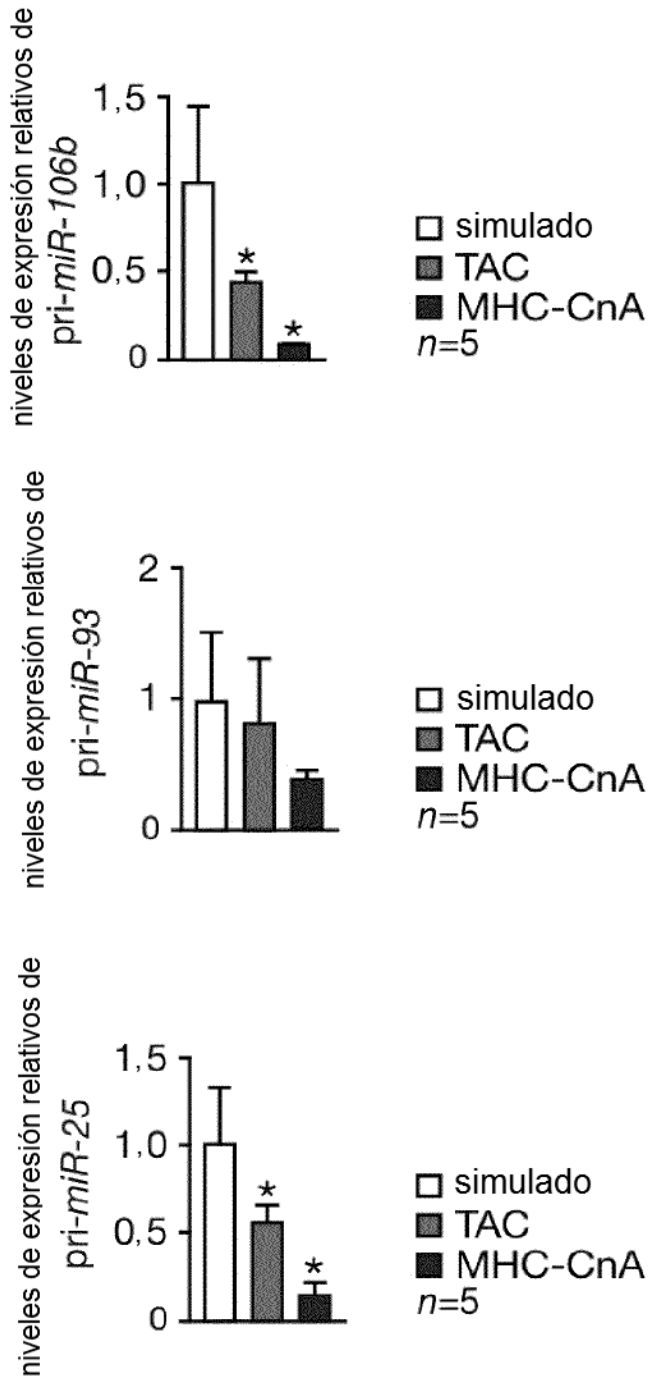


Figura 2A

**a**

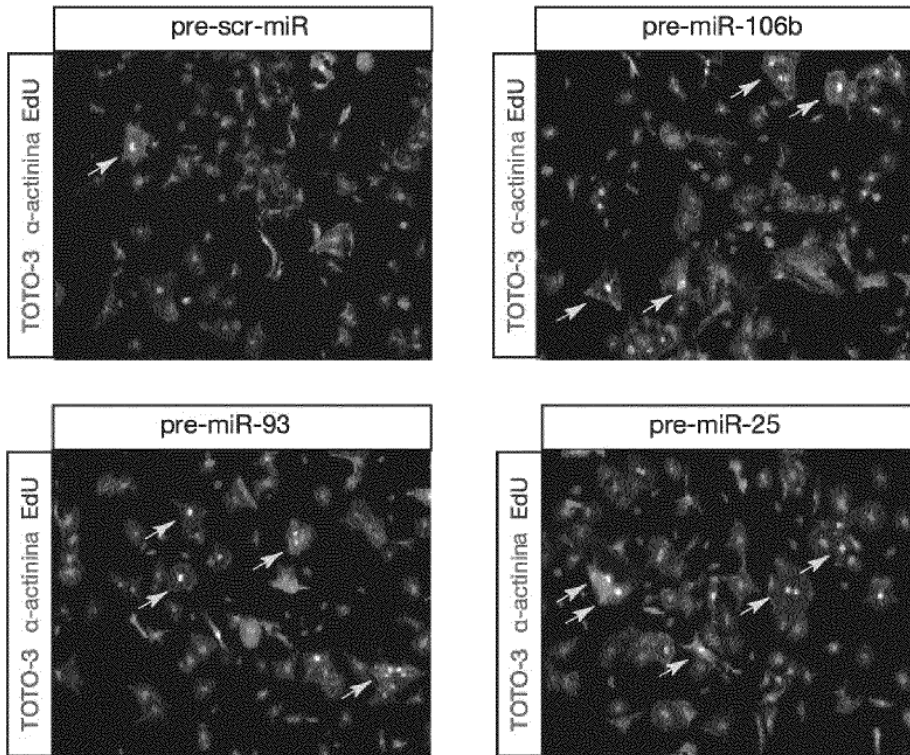


Figura 2B

**b**

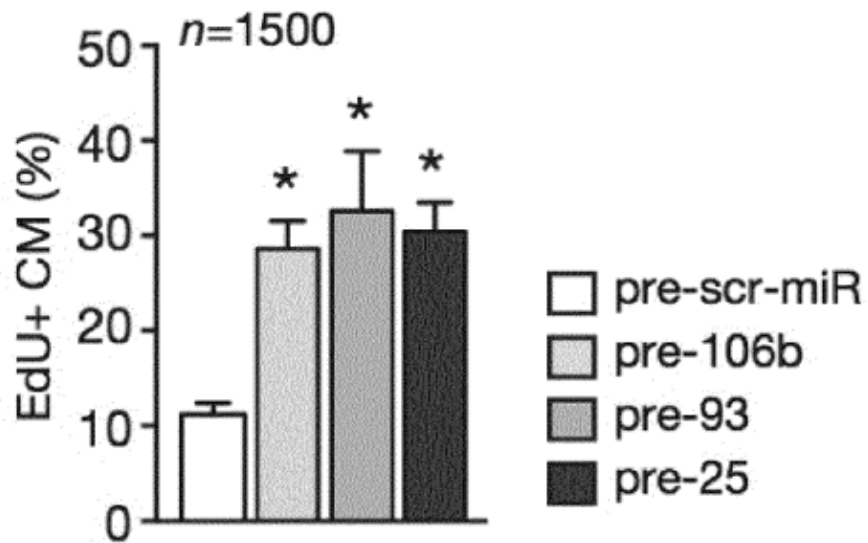


Figura 2C

**c**

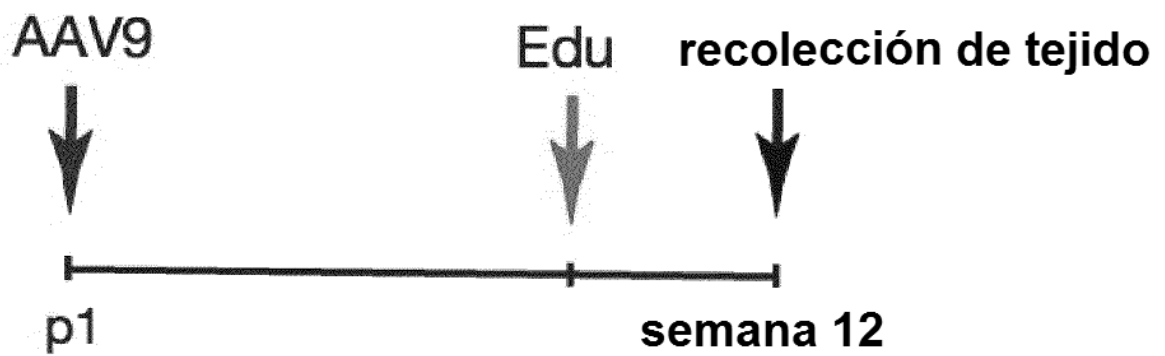


Figura 2D

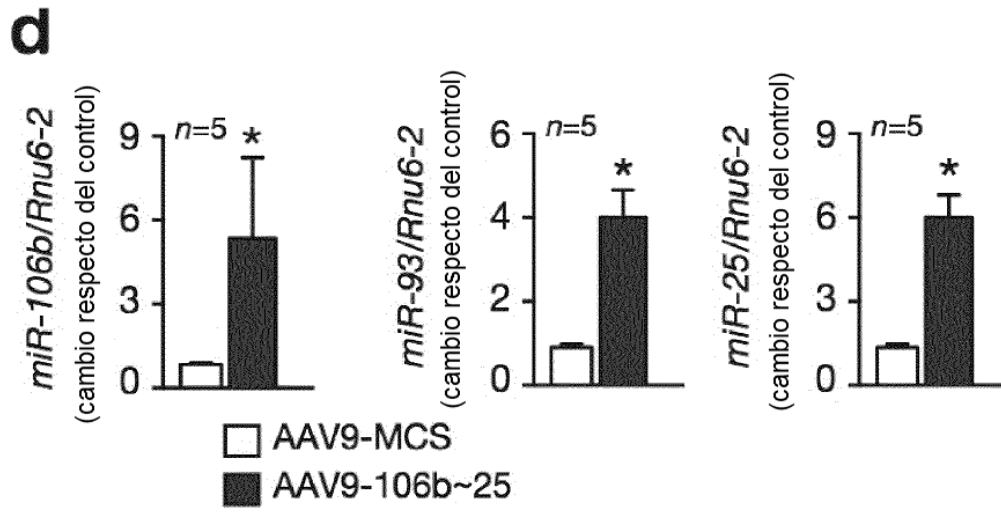


Figura 2E

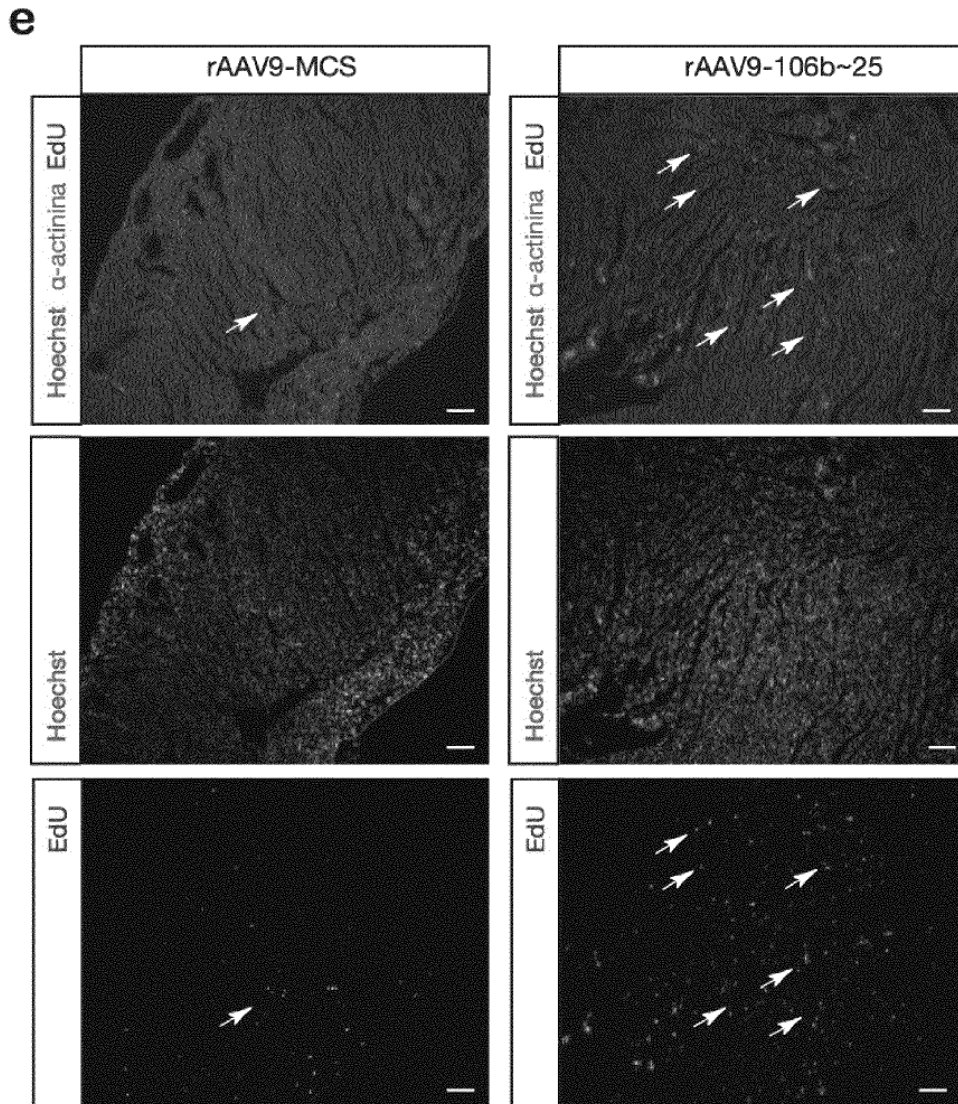


Figura 2F

**f**

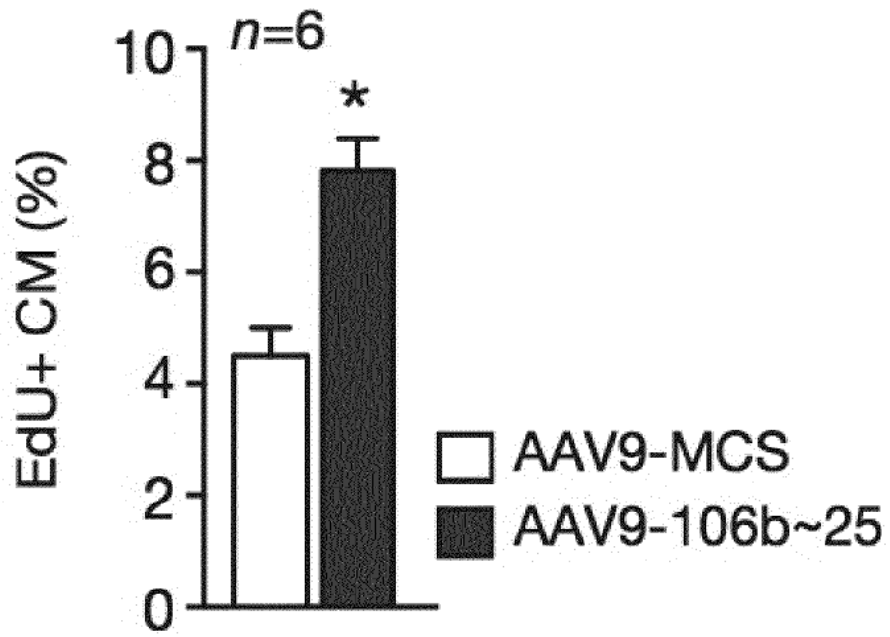
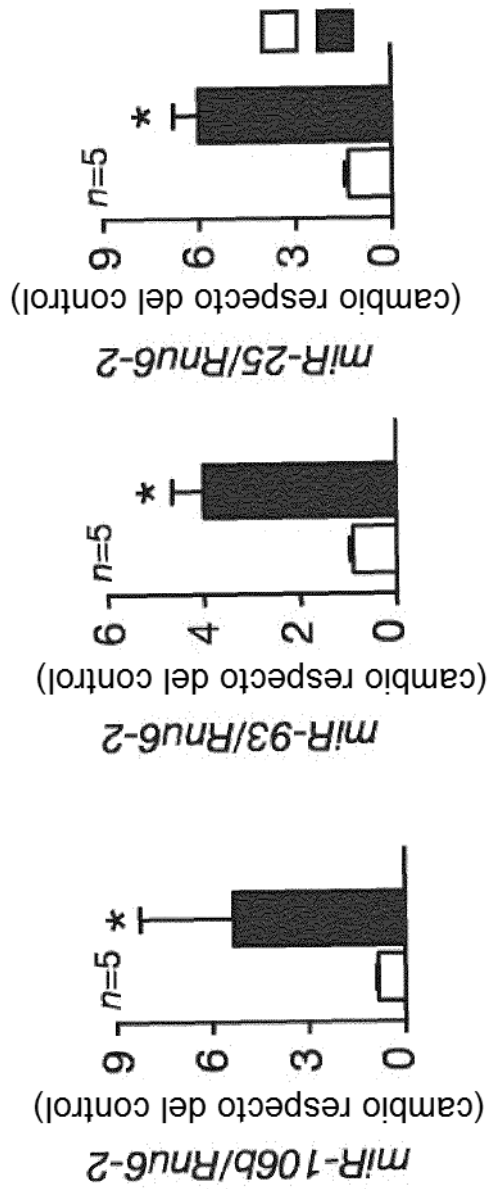




Figura 3A

**a**





**b**

Figura 3B

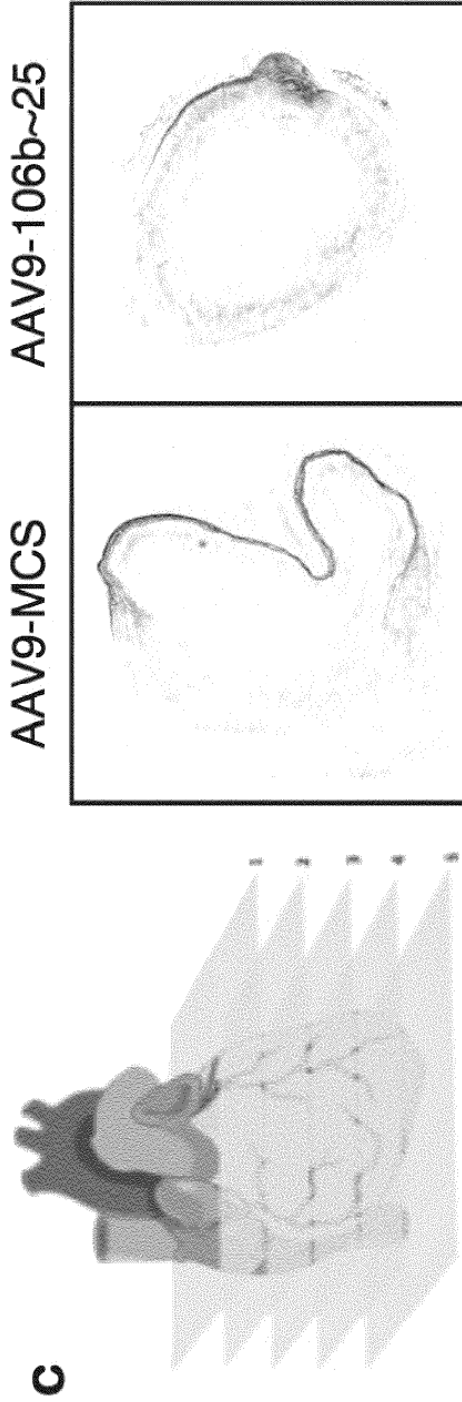


Figura 3C

Figura 3  
Figura 3D

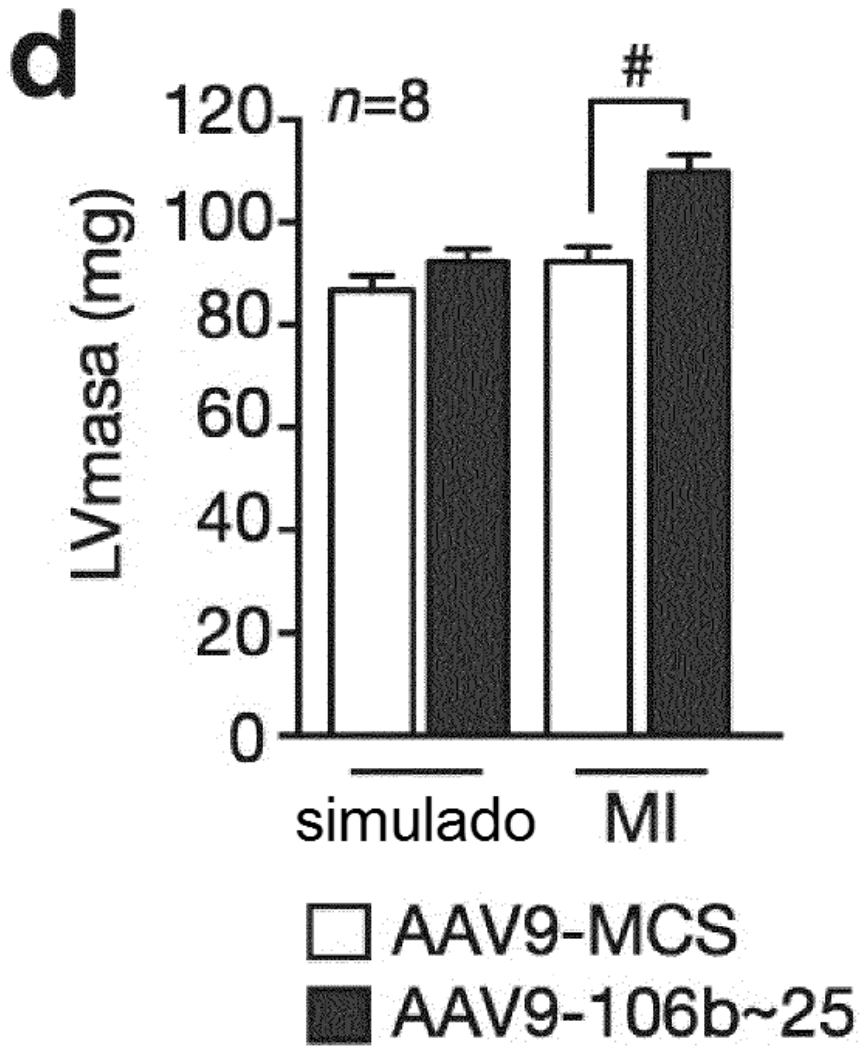


Figura 3E

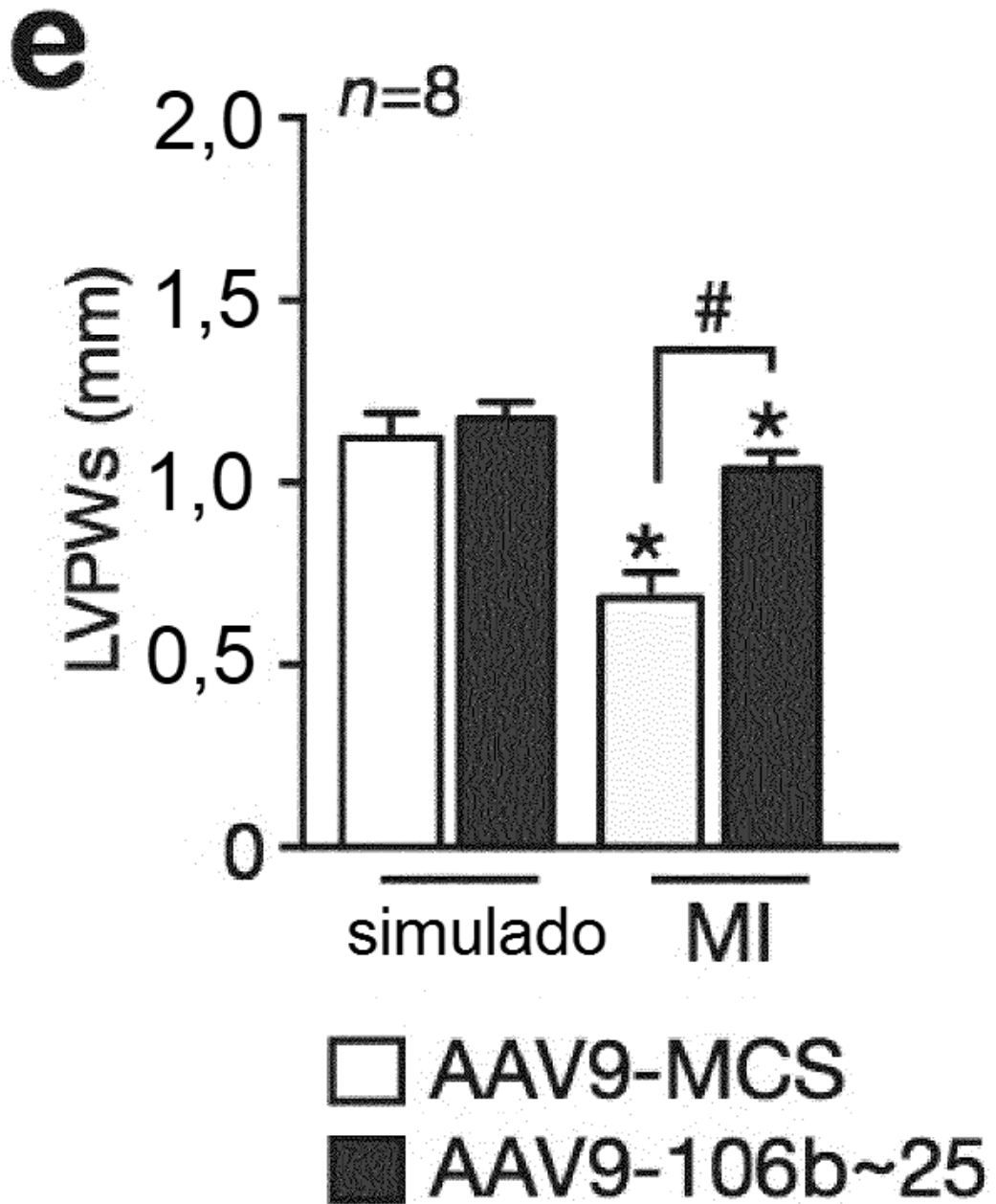


Figura 3F

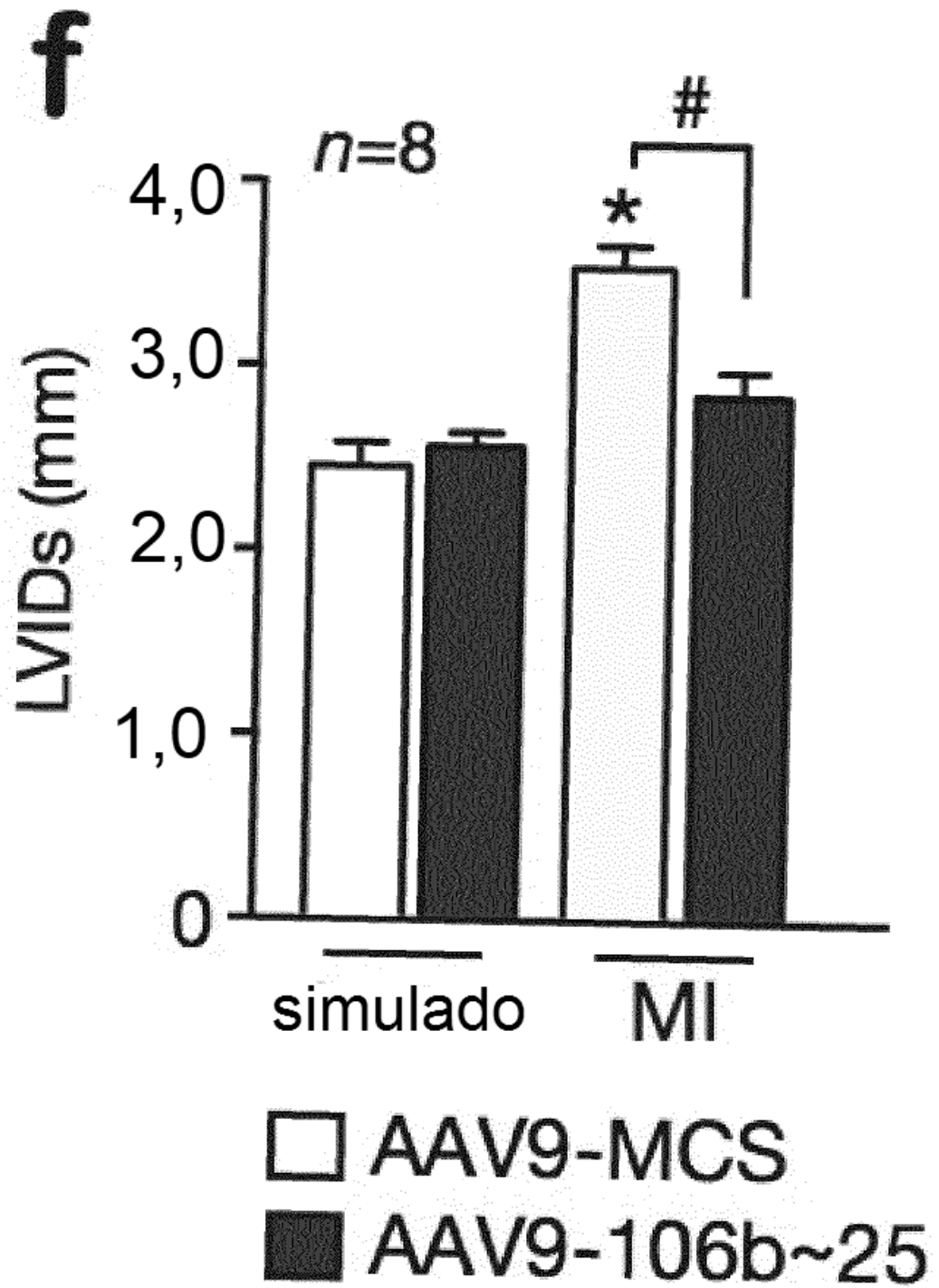


Figura 3G

