

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 735**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2021 PCT/EP2021/065521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2021 WO21250124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2021 E 21730620 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 4162046**

54 Título: **Método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo tras un infarto agudo de miocardio**

30 Prioridad:

09.06.2020 EP 20382498

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

03.03.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.00%)
Campus Universitario de Espinardo, Edif. EISUM
(Facultad de Medicina). 3ª planta.
30072 Murcia, ES**

72 Inventor/es:

**PASCUAL FIGAL, DOMINGO ANDRÉS;
LAX PÉREZ, ANTONIO MANUEL y
ASENSIO LÓPEZ, MARÍA CARMEN**

74 Agente/Representante:

QUIRÓS MARÍN, María

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 000 735 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

Método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo tras un infarto agudo de miocardio

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al campo biomédico, en particular a un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo tras un infarto agudo de miocardio.

10 Antecedentes de la invención

En pacientes que experimentan un infarto agudo de miocardio (IAM), la apertura de la arteria coronaria ocluida es la mejor estrategia para recuperar el suministro de oxígeno y limitar el daño miocárdico isquémico. Sin embargo, la terapia de reperfusión basada en angioplastia primaria y/o fibrinolíticos, es eficaz sólo cuando se realiza en el plazo de las primeras 12 horas después de la aparición de los síntomas [1]. Desafortunadamente, una porción significativa de pacientes no accede a la terapia de reperfusión de manera oportuna, y cada 30 minutos de retraso se asocia con un aumento relativo del 7,5 % del riesgo de muerte al año [2]. Este exceso de mortalidad se explica porque la duración del tiempo de isquemia es un determinante principal del tamaño del infarto, lo que conduce a cambios patológicos en la función y estructura cardíacas. Estos procesos patológicos se conocen como remodelación cardíaca adversa e incluyen disfunción contráctil, dilatación de las cavidades cardíacas y anomalías miocárdicas [3, 4]. La extensión de estos procesos determina la progresión a insuficiencia cardíaca (IC), arritmias ventriculares y muerte en el seguimiento a corto y largo plazo. Por tanto, la búsqueda de nuevas terapias para minimizar la remodelación miocárdica adversa y las complicaciones cardíacas tras un IAM son una prioridad en la medicina cardiovascular.

La supresión soluble de la tumorigénesis 2 (sST2) es un miembro de la familia del receptor de interleucina 1, también conocido como receptor 1 similar a interleucina 1 (IL1RL1) [5] con dos isoformas principales: un receptor unido a la membrana (ligando de ST2 [ST2L]) y una isoforma de ST2 soluble (sST2) [4]. sST2 es un biomarcador único asociado con procesos cardíacos patológicos [6,7]. En particular, en pacientes que experimentan un IAM, las concentraciones circulantes de sST2 han identificado repetidamente un mayor riesgo de muerte y la progresión de la remodelación miocárdica adversa a IC en el seguimiento a corto plazo (30 días) y también a largo plazo [8-13].

La interleucina-33 (IL-33), al interactuar con ST2L [14] desencadena una respuesta cardioprotectora y anti-remodelación [7, 15] que está asociada con el bloqueo tanto de la fosforilación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ como de la activación de la actividad promotora de NF- κB [16]. Las concentraciones aumentadas de sST2 en la circulación pueden unirse directamente a IL-33 y actuar como receptor señuelo, al inhibir su unión a ST2L unido a la membrana, bloqueando así los efectos cardioprotectores de IL-33; tal inhibición produce hipertrofia cardíaca, fibrosis miocárdica, y disfunción ventricular [7, 15]. Varios estudios experimentales han demostrado que la expresión de IL-33 y sST2 tanto en fibroblastos cardíacos como en cardiomiocitos aumentó en respuesta al estrés cardíaco. Weinberg *et al.*, en 2002, determinaron que ST2 era el transcrito más altamente inducido en respuesta al estrés biomecánico, y se indujeron las formas sST2 y ST2L en cardiomiocitos neonatales sometidos a tensión cíclica [10]. Por consiguiente, usando un modelo de infarto de miocardio se ha demostrado que un aumento de los niveles de sST2 en el miocardio después de 4 semanas se correlaciona positivamente con marcadores de remodelación cardíaca, tales como marcadores inflamatorios y de fibrosis [17]. Por tanto, se ha sugerido como opción terapéutica regular favorablemente la ruta de IL-33/ST2L [18].

Aunque se sabe que las formas solubles y de membrana de ST2 se expresan a través de la modulación celular específica de un promotor dual [10], se desconocen los elementos moleculares relacionados con la expresión específica de sST2 tras un IAM. Usando genómica computacional y cardiomiocitos neonatales bajo tensión biomecánica, se identificó Yin yang-1 (Yy1) como un factor de transcripción relacionado con la expresión cardíaca de sST2 [19]. En este estudio *in vitro*, el silenciamiento de la expresión endógena de Yy1 dio como resultado una disminución de la expresión y liberación de sST2 [19]. En conjunto, estos hallazgos respaldan la idea de que la reducción de los niveles de expresión de Yy1 sería una prometedora terapia anti-remodelación cardíaca adversa tras un IAM.

La presente invención proporciona una nueva terapia para mejorar la disfunción cardíaca y la remodelación miocárdica adversa tras un IAM.

Las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción han de interpretarse como referencias a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico *in vivo*).

Bibliografía

- 65 1. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P,

- Widimsky P, Baumbach A, Bugiardini R, Coman IM, Delgado V, Fitzsimons D, Gaemperli O, Gershlick AH, Gielen S, Harjola VP, Katus HA, Knuuti J, *et al.* 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2018;39:119-177.
- 5 2. De Luca G, Suryapranata H, Ottervanger J P. *et al.* Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: every minute of delay counts. *Circulation* 2004;109:1223-1225.
3. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981-2988.
- 10 4. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: Current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4:98-108.
5. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39:1003-18.
- 15 6. Pascual-Figal DA, Januzzi JL. The Biology of ST2: The International ST2 Consensus Panel. *Am. J. Cardiol.* 2015;115:3B-7B.
7. Pascual-Figal DA, Lax A, Perez-Martinez MT, *et al.* Clinical relevance of sST2 in cardiac diseases. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:29-35.
- 20 8. Weir RAP, Miller AM, Murphy GEJ, *et al.* Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:243-50.
- 25 9. Biere L, Garcia G, Guillou S, *et al.* ST2 as a predictor of late ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2018;259:40-42.
10. Weinberg EO, Shimp M, De Keulenaer GW, *et al.* Expression and regulation of ST2, an interleukin-1 receptor family member, in cardiomyocytes and myocardial infarction. *Circulation* 2002;106:2961-6.
- 30 11. Sabatine MS, Morrow DA, Higgins LJ, *et al.* Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:1936-44.
- 35 12. Shimp M, Morrow DA, Weinberg EO, *et al.* Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:2186-90.
13. Jenkins WS, Roger VL, Jaffe AS, *et al.* Prognostic Value of Soluble ST2 After Myocardial Infarction: A Community Perspective. *Am J Med* 2017; 130: 1112. e9-1112.e15.
- 40 14. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479-90.
15. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, *et al.* Interleukin-33 Prevents Apoptosis and Improves Survival After Experimental Myocardial Infarction Through ST2 Signaling. *Circ. Hear. Fail.* 2009;2:684-691.
- 45 16. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.* 2007;117:1538-49.
- 50 17. Sanchez-Mas J, Lax A, Asensio-Lopez M, *et al.* Modulation of IL-33/ST2 system in post infarction heart failure: correlation with cardiac remodeling markers. *Eur. J. Clin. Invest.* 2014;44:643-51.
18. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:827-40.
- 55 19. Asensio-Lopez MC, Lax A, Fernandez del Palacio MJ, *et al.* Yin-Yang 1 transcription factor modulates ST2 expression during adverse cardiac remodeling post-myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2019;130:216-233.
- 60 El documento ES2637032-A1 divulga el uso de composiciones de ARN antisentido para regular por disminución la expresión del gen Yin Yang 1, lo que da como resultado la regulación por disminución de ST2. Esto permite la activación de la cadena de señalización cardioprotectora de IL33/SYT2L. Los modelos experimentales usan metformina para someter a prueba los efectos en la prevención de la remodelación cardiaca después de un infarto de miocardio.
- 65 SUCHAROV CC *et al.*, (2003) JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278 (33), páginas 31233-31239, divulgan que la expresión de Yin Yang 1 está aumentada en la insuficiencia cardiaca humana y reprime la actividad

del promotor de la cadena pesada de la alfa-miosina humana.

TAN CHIA YEE *et al.*, (2019) CIRCULATION RESEARCH, vol. 125 (9), páginas 834-846, divulgan que Yin Yang 1 suprime la cardiomiopatía dilatada y la fibrosis cardiaca a través de la regulación de Bmp7 y Ctgf.

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Aumento de los niveles de expresión de Yy1 en el área del VI infartada. (a) Niveles de ARNm de Yy1; se normalizaron los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH (b) Niveles de ARNm de Yy1 en el área remota del VI; se normalizaron los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. ** p < 0,01, *** p < 0,001 en comparación con el grupo simulado. ns: no significativo.

10

Figura 2.- La terapia con siYy1 previene la regulación por incremento del factor de transcripción Yy1 cardiaco en el área del VI infartada. (a) Esquema representativo del procedimiento experimental. (b) Niveles de ARNm de Yy1; se normalizaron los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. *** p < 0,001 con respecto a sus grupos simulados respectivos; ### p < 0,001 con respecto al grupo de IAM+siCtrl. siCtrl: control de ARN de interferencia; siYy1: ARN de interferencia específico contra el factor de transcripción Yy1; IAM: infarto agudo de miocardio; ns: no significativo; Yy1: factor de transcripción Yin yang-1.

15

Figura 3.- La terapia con siYy1 mejora la función cardiaca tras un IAM. (a-f) FE (a), AF (b), DTdVI (c), DTsVI (d), VTdVI (e) o VTsVI (f) determinados mediante ecocardiografía, respectivamente. *p < 0,05, *** p < 0,001 con respecto a sus grupos simulados respectivos; ### p < 0,001 con respecto al grupo de IAM+siCtrl. FE: fracción de eyección; AF: acortamiento fraccional; DTdVI: dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo; DTsVI: dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo; VTdVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; VTsVI: volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; se mostraron antes otras abreviaturas.

20

25

Figura 4 - La terapia con siYy1 mejora la función cardiaca y la hipertrofia cardiaca inducida por IAM. (a) Razón entre el peso del corazón y la longitud de la tibia (PCo/LT) como medida de la hipertrofia cardiaca. (b, c) Cuantificación por PCR en tiempo real de marcadores de remodelación cardiaca en tejido del ventrículo izquierdo; Myh7/Myh6, razón de ARNm que codifican para la cadena pesada de β y α -miosina. Nppa, péptido natriurético auricular. (d) Área de CM. ns: no significativo; *** p < 0,001 con respecto a su grupo simulado respectivo. ## p < 0,01, ### p < 0,001, con respecto al grupo de IAM+siCtrl. CM: cardiomiocito.

30

Figura 5.- La terapia con siYy1 previene la fibrosis cardiaca tras un IAM. (a-f) Niveles de ARNm de TGF- β , smad-2, smad-3, α -sma, col1a1, y col3a1; se normalizaron los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. (g) Secciones de imágenes representativas de miocardio teñido con rojo sirio y tinción de Masson de los grupos indicados; barra de escala: 0,25 cm. ns: no significativo; *** p < 0,001 con respecto a su grupo simulado respectivo. ### p < 0,001, con respecto al grupo de IAM+siCtrl.

35

Figura 6 - La terapia con siYy1 bloquea la inflamación cardiaca adversa tras un IAM. (a-d) Niveles de ARNm de TNF α , IL-6, PTX3 y CRP; se normalizaron los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. ns: no significativo; *** p < 0,001 con respecto a su grupo simulado respectivo; ### p < 0,001, con respecto al grupo de IAM+siCtrl. TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; PTX: pentraxina; CRP: proteína C reactiva.

40

Figura 7.- La terapia con siYy1 mejora la muerte miocárdica tras un IAM. (a-c) Niveles de ARNm de MyO, H-FABP y BNP; se normalizan los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. *** p < 0,001 con respecto a su grupo simulado respectivo; ### p < 0,001, con respecto al grupo de IAM+siCtrl. MyO: mioglobina; H-FABP: proteína transportadora de ácidos grasos; BNP: péptido natriurético cerebral.

45

Figura 8.- La terapia con siYy1 modula el eje IL-33/ST2L. (a-c) Niveles de ARNm de IL-33, ST2L y sST2; se normalizan los datos con respecto a los niveles de ARNm de GAPDH. *** p < 0,001 con respecto a sus controles respectivos; ### p < 0,001 con respecto al grupo de IAM+siCtrl. IL: interleucina; ST2L: receptor de membrana ST2L; sST2: isoforma soluble de ST2.

50

Figura 9. Diseño experimental representativo de estrategias dependientes del tiempo. Diseño del estudio basado en diferentes momentos de iniciación de siYy1 después de IM. Las flechas negras indican los procedimientos de simulación / IM. Las puntas de flecha indican los puntos temporales de tratamiento. A los 30 minutos tras un IM, se aleatorizaron los animales sobrevivientes en dos grupos globales: IM y simulado. Se aleatorizaron los animales a diferentes subgrupos de tratamiento según los tiempos de iniciación de la terapia con siYy1, o siCtrl o DPBS, después de un IM: 1 hora (=S1h), 24 horas (=S24h), 3 días (=S3d), 7 días (=S7d) o 14 días (=S14d). La terapia con SiYy1 (6 mg/kg i.v.) se repitió cada 7 días hasta completar 3 dosis. Se sacrificaron los animales de los subgrupos S1h, S24h, S3d y S7d a las 4 semanas tras un IM, mientras que se sacrificaron los de S14d a las 8 semanas tras un IM.

55

60

Figura 10. La terapia con SiYy1 indujo una regulación por disminución del factor de transcripción Yy1 después de un IM, independientemente del momento de iniciación. Niveles de ARNm de Yy1 en la región del VI infartada 4

65

semanas después de un IM (de los grupos S1h a S7d) u 8 semanas después de un IM (grupo de S14d). En comparación con los grupos simulados, los niveles de ARNm de Yy1 en el miocardio del VI infartado se elevaron en presencia de IM (IM-siYy1) y se redujeron significativamente con la terapia con siYy1 en todos los grupos de tratamiento (IM+siYy1) ($p < 0,001$, en todos los casos).

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

Figura 11. La terapia con siYy1 protege frente a la hipertrofia cardiaca después de un IM. (a) Imágenes representativas de corazones extraídos 4 semanas (S1h a S7d) u 8 semanas (S14d) después de un IM y tratados o no con siYy1; barra de escala: 0,5 cm. (b) Razón entre el peso del corazón y el peso corporal. (c) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de marcadores moleculares para la hipertrofia de miocitos cardiacos (Myh7/Myh6 y Nppa). PCR realizadas con 2 réplicas cada una. Se notifican todos los datos cuantitativos como medias \pm E.E.M. de los cambios entre IM y simulado (IM - simulado). Las medias calculadas fueron medias marginales para corregir el diferente número de animales en cada grupo. Se realizaron contrastes para comparar las diferencias en los cambios (*diff-in-diffs*) entre tratamientos según cada inicio (pruebas de la t de Student). Mientras que una línea discontinua (triángulo) indica un IM sin terapia, una línea continua (círculo) indica un IM tratado con siYy1. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$. Abreviaturas: PC: peso corporal; DPBS: solución salina equilibrada; PCo: peso del corazón; PI: peso del ventrículo izquierdo; Myh: cadena pesada de miosina; Nppa: péptido natriurético A; ns: no significativo; S1h...S14d: inicio del tratamiento; siCtrl: control de ARN de interferencia; siYy1: composición de ARN de interferencia específica para silenciar Yy1. Otras abreviaturas como antes. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardiaca inducida por IM, en cuanto a hipertrofia cardiaca macroscópica (a), razón PCo/PC (b). La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardiaca inducida por IM, en cuanto a niveles de los genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa (c). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto.

Figura 12. La terapia con siYy1 protege frente a la remodelación adversa del VI después de un IM, evaluada mediante ecocardiografía: disfunción sistólica del VI y dilatación del VI. La terapia basada en interferencia de ARN para silenciar Yy1 protege frente a la disfunción cardiaca después de un IM. (a, b) Análisis ecocardiográfico de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (a) y del acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo (b) en ratones sometidos a cirugía simulada y de IM 4 semanas después de un IM (de los grupos S1h a S7d) u 8 semanas después de un IM (grupo de S14d). (c, d) Análisis ecocardiográfico de las dimensiones telediastólicas del ventrículo izquierdo (c) y de las dimensiones telesistólicas del ventrículo izquierdo (d) en ratones sometidos a cirugía simulada y de IM 4 semanas después de un IM (de los grupos S1h a S7d) u 8 semanas después de un IM (grupo de S14d). (e, f) Análisis ecocardiográfico del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (e) y del volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (f) en ratones sometidos a cirugía simulada y de IM 4 semanas después de un IM (de los grupos S1h a S7d) u 8 semanas después de un IM (grupo de S14d). Se notifican todos los datos cuantitativos como medias \pm E.E.M. de los cambios entre el IM y simulado (IM - simulado). Las medias calculadas fueron medias marginales para corregir el diferente número de animales en cada grupo. Se realizaron contrastes para comparar las diferencias en los cambios (*diff-in-diffs*) entre tratamientos según cada inicio (pruebas de la t de Student). Mientras que una línea discontinua (triángulo) indica un IM sin tratamiento, una línea continua (círculo) indica un IM tratado con siYy1. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$. Abreviaturas: DTdVI: dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo; DTsVI: dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo; VTdVI: volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; VTsVI: volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; ml: mililitro; mm: milímetro. Otras abreviaturas como antes. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una reducción significativamente menor de la fracción de eyección (a) y el acortamiento fraccional (b) del VI; la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente al agrandamiento del VI en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI (c, d), y los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI (e, f). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto.

Figura 13. La terapia con siYy1 previene la fibrosis tras un IM. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la fibrosis en el miocardio infartado, en cuanto a una tinción con rojo sirio significativamente menor (a) (imágenes representativas en el panel b), así como niveles significativamente menores de desregulación de diferentes genes marcadores asociados con fibrosis (c-f). (a) Fotomicrografías representativas (x20) que ilustran la tinción con rojo sirio en los grupos indicados. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la fibrosis intersticial. Barra de escala: 100 μ m. (b-e) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de marcadores moleculares de fibrosis cardiaca (TGF- β , α -sma, col1a1 y col3a1). PCR realizadas con 2 réplicas cada una. Se notifican todos los datos cuantitativos como medias \pm E.E.M. de los cambios entre el IM y el simulado (IM - simulado). Las medias calculadas fueron medias marginales para corregir el diferente número de animales en cada grupo. Se realizaron contrastes para comparar las diferencias en los cambios (*diff-in-diffs*) entre tratamientos según cada inicio (pruebas de la t de Student). Mientras que una línea discontinua (triángulo) indica un IM sin tratamiento, una línea continua (círculo) indica un IM tratado con siYy1. *** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$. Abreviaturas: α -sma: α -actina de músculo liso; TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta; Col: Colágeno. Otras abreviaturas como antes. La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto.

Figura 14. La terapia con siYy1 protege frente a la inflamación cardiaca después de un IM. (a) Fotomicrografías representativas (x20) que ilustran la tinción de CD45 en los grupos indicados. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de tinción positiva de CD45. Barra de escala: 100 μ m. (b, c) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

de marcadores moleculares de inflamación cardiaca (IL-6 y TNF α). PCR realizadas con 2 réplicas cada una. Se notifican todos los datos cuantitativos como medias \pm E.E.M. de los cambios entre el IM y simulado (IM - simulado). Las medias calculadas fueron medias marginales para corregir el diferente número de animales en cada grupo. Se realizaron contrastes para comparar las diferencias en los cambios (*diff-in-diffs*) entre tratamientos según cada inicio (pruebas de la t de Student). Mientras que una línea discontinua (triángulo) indica un IM sin tratamiento, una línea continua (círculo) indica un IM tratado con siYy1. ***p < 0,001. Abreviaturas: IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral. Otras abreviaturas como antes. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la inflamación en el miocardio infartado, en cuanto a menores niveles de tinción positiva de CD45 (a) (imágenes representativas en el panel b) y marcadores específicos asociados con inflamación (c-d). La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto.

Figura 15. La terapia con siYy1 protege frente a la muerte miocárdica tras un IM. (a) Fotomicrografías representativas (x20) que ilustran la tinción de caspasa 3 activa en los grupos indicados. El gráfico muestra el análisis cuantitativo de la caspasa 3 activa. Barra de escala: 100 μ m. (b, c) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de marcadores moleculares de muerte cardiaca (BNP y MyO). PCR realizadas con 2 réplicas cada una. Se notifican todos los datos cuantitativos como medias \pm E.E.M. de los cambios entre el IM y simulado (IM - simulado). Las medias calculadas fueron medias marginales para corregir el diferente número de animales en cada grupo. Se realizaron contrastes para comparar las diferencias en los cambios (*diff-in-diffs*) entre tratamientos según cada inicio (pruebas de la t de Student). Mientras que una línea discontinua (triángulo) indica un IM sin tratamiento, una línea continua (círculo) indica un IM tratado con siYy1. ***p < 0,001. Abreviaturas: MyO: mioglobina; H-FABP: proteína transportadora de ácidos grasos; BNP: péptido natriurético cerebral. Otras abreviaturas como antes. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la muerte celular en cuanto a un aumento significativamente menor de los niveles de proteína caspasa 3 (a), así como de los niveles de ARNm de BNP y MyO (c-d).

Figura 16. La terapia con siYy1 previene la hipertrofia inducida por estiramiento de cardiomiocitos derivados de iPSc humanos. (a) Cuantificación de los niveles de ARNm de Yy1 en CM después del estiramiento evaluado (b, c) Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de marcadores moleculares para la hipertrofia de miocitos cardiacos (Myh7/Myh6 y Nppa). PCR realizadas con 2 réplicas cada una. Se notifican todos los datos cuantitativos como media \pm E.E.M. ***p < 0,001, en comparación con el grupo de control (Scr); ###p < 0,001, en comparación con el grupo de Scr+PMA; determinado por ANOVA bilateral seguido de la prueba de comparaciones múltiples *a posteriori* de Bonferroni. Abreviaturas: Scr: reordenamiento. Otras abreviaturas como antes.

Breve descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto capaz de reducir la expresión del gen Yin Yang-1 (Yy1) en células cardiacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del compuesto en dichas células, en la que el compuesto es un ARN de interferencia (iARN) del gen Yy1, y en la que dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, y en la que dicha composición se administra entre 12 horas y 7 días tras la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.

Preferiblemente, dicha composición se administra entre 1 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.

Más preferiblemente, dicha composición se administra entre 12 horas y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto. Todavía preferiblemente, dicha composición se administra entre 1 y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.

Todavía preferiblemente, dicha composición se administra entre 3 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.

En una realización preferida, cuando la composición se administra entre 12 horas y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, o se administra entre 1 y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la pérdida de la fracción de eyección y/o el acortamiento fraccional del VI y/o mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la hipertrofia cardiaca inducida por infarto de miocardio.

En una realización preferida, cuando la composición se administra entre 1 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, o se administra entre 3 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción del agrandamiento del VI.

En una realización preferida, el ARN de interferencia (iARN) del gen Yy1 es un ARNip seleccionado de la lista que consiste en cualquiera de los siguientes compuestos: el compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6 antisentido, el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido.

En una realización preferida, el compuesto se administra por vía intravenosa.

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNip seleccionado de la lista que consiste en cualquiera de los siguientes compuestos: el compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6 antisentido, el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido, o vectores que expresan estos oligonucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere en general a compuestos que silencian la expresión endógena de Yy1, dando como resultado una disminución de la expresión y liberación de sST2, lo que facilita la respuesta cardioprotectora relacionada con el eje IL-33/ST2L; particularmente a ARN interferentes pequeños (ARNip) que reducen los niveles de expresión de Yy1, y con la administración de estos ARNip en un sujeto que lo necesita de 2 a 48 horas después del IAM, para la prevención o el tratamiento de la remodelación miocárdica adversa, en particular en la prevención o el tratamiento de complicaciones cardíacas tras un IAM, tales como fibrosis miocárdica, inflamación cardíaca, hipertrofia cardíaca y/o deterioro funcional. En conjunto, estos hallazgos resuelven el problema técnico de proporcionar un tratamiento alternativo eficaz a la terapia de reperfusión dos o más horas después del IAM.

Además, la presente invención proporciona adicionalmente de manera general compuestos que silencian la expresión endógena de Yy1, lo que da como resultado una disminución de la expresión y liberación de sST2, lo que facilita la respuesta cardioprotectora relacionada con el eje IL-33/ST2L; en particular, con los ARN interferentes pequeños (ARNip) que reducen los niveles de expresión de Yy1, en una cantidad eficaz para regular por disminución la expresión en una célula del Yy1 endógeno, en un método de terapia de la disfunción del ventrículo izquierdo, administrado entre 12 horas y 7 días después del IAM. En particular, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 3 primeros días después del IAM para tratar o proteger frente a la hipertrofia cardíaca inducida por un IAM, preferiblemente en cuanto a hipertrofia cardíaca macroscópica. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 7 primeros días para tratar o proteger frente a la hipertrofia cardíaca inducida por IAM, preferiblemente en cuanto a los niveles de los genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 3 primeros días para tratar o proteger frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una reducción significativamente menor de la fracción de eyección y/o acortamiento fraccional del VI. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 7 primeros días después del IAM para tratar o proteger frente al agrandamiento del VI, preferiblemente en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI y/o de los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI.

Se observa en el presente documento que Yy1 (Yin Yang-1) es una proteína represora transcripcional en humanos que está codificada por el gen Yy1 (Shi Y *et al.*, Cell. 18 de octubre de 1991; 67(2): 377-88; Zhu W *et al.*, Mamm Genome. Abril de 1994; 5 (4): 234-6)

Más preferiblemente, la presente invención se refiere a compuestos que regulan por disminución la expresión del Yy1 endógeno en células cardíacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del compuesto en dichas células, tales como ARNip, preferiblemente aquellos enumerados como el compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6 antisentido, el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido; y al uso de estos compuestos en la prevención o el tratamiento de la remodelación miocárdica adversa tras un IAM, en particular en la prevención o el tratamiento de complicaciones cardíacas tras un IAM, tales como fibrosis miocárdica, inflamación cardíaca, hipertrofia cardíaca y/o deterioro funcional, en los que estos compuestos se administran a un sujeto que los necesita, de 2 a 48 horas después de la aparición del IAM. Preferiblemente, tales compuestos se administran entre 4 y 48

horas después del IAM. Más preferiblemente, entre 6 y 48 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 12 y 48 horas o entre 24 y 48 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente entre 2, 4, 6 ó 12 y 24 horas después del IAM.

5 Asimismo, la presente invención se refiere al uso de los compuestos mencionados anteriormente en un método de
 10 terapia de la disfunción del ventrículo izquierdo, administrados entre 12 horas y 7 días después del IAM,
 preferiblemente entre 1 y 7 días después del IAM. En particular, en un método de terapia iniciado en el plazo de los
 3 primeros días después del IAM, preferiblemente entre 12 horas y 3 días, más preferiblemente entre 1 y 3 días,
 para tratar o proteger frente a la hipertrofia cardiaca inducida por IAM, preferiblemente en cuanto a hipertrofia
 15 cardiaca macroscópica. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 7 primeros días,
 preferiblemente entre 12 horas y 7 días, más preferiblemente entre 1 y 7 días, para tratar o proteger frente a la
 hipertrofia cardiaca inducida por IAM, preferiblemente en cuanto a niveles de genes marcadores asociados con
 hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de
 20 los 3 primeros días, preferiblemente entre 12 horas y 3 días, más preferiblemente entre 1 y 3 días, para tratar o
 proteger frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una reducción significativamente menor de la fracción de
 eyección y/o acortamiento fraccional del VI. Preferiblemente, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 7
 primeros días, preferiblemente entre 12 horas y 7 días, más preferiblemente entre 1 y 7 días, después del IAM para
 tratar o proteger frente al agrandamiento del VI, preferiblemente en cuanto a un menor aumento de los diámetros
 telediastólico y telesistólico del VI y/o los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI.

La invención proporciona además un uso de una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos que
 regulan por disminución la expresión del Yy1 endógeno, tales como ARNip, preferiblemente los enumerados como el
 compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID
 25 NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6
 antisentido, y el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que
 tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y
 la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el
 compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido; para la preparación de una
 30 composición para fomentar la recuperación en un paciente que experimenta una remodelación miocárdica adversa
 tras un IAM, en particular que experimenta complicaciones cardíacas tras un IAM tales como fibrosis miocárdica,
 inflamación cardiaca, hipertrofia cardiaca y/o deterioro funcional, administrando dicha composición a un paciente que
 lo necesita dentro de cualquiera de los intervalos de tiempo indicados anteriormente después del IAM.

La presente invención proporciona así métodos y composiciones para inhibir la expresión del Yy1 endógeno *in vivo*
 35 en células cardíacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del
 compuesto en dichas células. En general, el método incluye administrar oligorribonucleótidos, tales como ARN
 interferentes pequeños (es decir, ARNip) que seleccionan como diana Yy1 endógeno en las células cardíacas y se
 hibridan con, o interactúan con, dichos ARNm en condiciones biológicas (dentro de la célula cardiaca), en una
 40 cantidad suficiente para regular por disminución la expresión del Yy1 endógeno mediante un mecanismo de
 interferencia de ARN.

Así, según la presente invención, las moléculas de ARNip o inhibidores del Yy1 endógeno pueden usarse como
 fármacos para prevenir, tratar o fomentar la recuperación en un paciente que lo necesite después de un IAM,
 45 mediante la administración de estos fármacos en los intervalos de tiempo indicados previamente tras la aparición del
 IAM. En particular, estos fármacos se administran para prevenir o tratar la remodelación miocárdica adversa tras un
 IAM, en particular para prevenir o tratar complicaciones cardíacas tras un IAM tales como fibrosis miocárdica,
 inflamación cardiaca, hipertrofia cardiaca y/o deterioro funcional. Más particularmente, las moléculas de ARNip o
 inhibidores del Yy1 endógeno se usan en un método de terapia de la disfunción del ventrículo izquierdo,
 50 administradas entre 12 horas y 7 días después del IAM, preferiblemente entre 1 y 7 días después del IAM. En
 particular, en un método de terapia iniciado en el plazo de los 3 primeros días después del IAM, preferiblemente
 entre 12 horas y 3 días, más preferiblemente entre 1 y 3 días, para tratar o proteger frente a la hipertrofia cardiaca
 inducida por IAM, preferiblemente en cuanto a hipertrofia cardiaca macroscópica. Preferiblemente, en un método de
 55 terapia iniciado en el plazo de los 7 primeros días, preferiblemente entre 12 horas y 7 días, más preferiblemente
 entre 1 y 7 días, para tratar o proteger frente a la hipertrofia cardiaca inducida por IAM, preferiblemente en cuanto a
 niveles de genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa. Preferiblemente, en
 un método de terapia iniciado en el plazo de los 3 primeros días, preferiblemente entre 12 horas y 3 días, más
 preferiblemente entre 1 y 3 días, para tratar o proteger frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una
 60 reducción significativamente menor de la fracción de eyección y/o acortamiento fraccional del VI. Preferiblemente, en
 un método de terapia iniciado en el plazo de los 7 primeros días, preferiblemente entre 12 horas y 7 días, más
 preferiblemente entre 1 y 7 días, después del IAM para tratar o proteger frente al agrandamiento del VI,
 preferiblemente en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI y/o los
 volúmenes telediastólico y telesistólico del VI.

La presente invención proporciona así oligorribonucleótidos bicatenarios (ARNip), que regulan por disminución la
 65 expresión del Yy1 endógeno en células cardíacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión
 observada en ausencia del compuesto en dichas células (más adelante en el presente documento "compuesto(s) de

la invención” o “ARNip de la invención”). Un ARNip de la invención o un compuesto de la invención es un oligorribonucleótido dúplex en el que la cadena sentido deriva de la secuencia de ARNm del Yy1 endógeno, y la cadena antisentido es complementaria a la cadena sentido. En general, se tolera cierta desviación de la secuencia de ARNm diana sin comprometer la actividad del ARNip (véase, por ejemplo, Czauderna *et al* 2003 *Nucleic Acids Research* H(H), 2705-2716). Un ARNip de la invención inhibe la expresión génica a nivel postranscripcional con o sin destruir el ARNm. Sin limitarse a ninguna teoría, el ARNip puede seleccionar como diana el ARNm para una escisión y degradación específicas y/o puede inhibir la traducción del mensajero seleccionado como diana.

Generalmente, los ARNip usados en la presente invención comprenden un ácido ribonucleico que comprende una estructura bicatenaria, en el que la estructura bicatenaria comprende una primera cadena y una segunda cadena, en el que la primera cadena comprende un primer tramo de nucleótidos contiguos y en el que dicho primer tramo es al menos parcialmente complementario a un ácido nucleico diana (el Yy1 endógeno), y la segunda cadena comprende un segundo tramo de nucleótidos contiguos y en el que dicho segundo tramo es al menos parcialmente idéntico a un ácido nucleico diana (el Yy1 endógeno). Las cadenas pueden estar modificadas en el azúcar y/o en el fosfato y/o en la base, o alternativamente pueden no estar modificadas. En una realización de la invención, dicha primera cadena y/o dicha segunda cadena comprende(n) una pluralidad de grupos de nucleótidos modificados que tienen una modificación en la posición 2' mediante lo cual dentro de la cadena cada grupo de nucleótidos modificados está flanqueado en uno o ambos lados por un grupo flanqueante de nucleótidos, mediante lo cual los nucleótidos flanqueantes que forman el grupo flanqueante de nucleótidos son o bien un nucleótido no modificado o bien un nucleótido que tiene una modificación diferente de la modificación de los nucleótidos modificados. Además, dicha primera cadena y/o dicha segunda cadena puede(n) comprender dicha pluralidad de nucleótidos modificados y puede(n) comprender dicha pluralidad de grupos de nucleótidos modificados.

El grupo de nucleótidos modificados y/o el grupo de nucleótidos flanqueantes puede(n) comprender un número de nucleótidos, mediante lo cual el número se selecciona del grupo que comprende desde un nucleótido hasta 10 nucleótidos. En relación con cualquier rango especificado en el presente documento, debe entenderse que cada rango divulga cualquier número entero individual entre las cifras respectivas usadas para definir el rango, incluyendo dichas dos cifras que definen dicho rango. En el presente caso, el grupo comprende así un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos, seis nucleótidos, siete nucleótidos, ocho nucleótidos, nueve nucleótidos y diez nucleótidos.

El patrón de nucleótidos modificados de dicha primera cadena puede desplazarse en uno o más nucleótidos con respecto al patrón de nucleótidos modificados de la segunda cadena.

Las modificaciones analizadas anteriormente pueden seleccionarse del grupo que comprende amino, fluoro, metoxilo, alcoxilo, alquilo, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, imidazol, caboxilato, tioato, alquilo inferior C1 a C10, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido, OCF₃, OCN, O, S o N-alquilo; O, S o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂, N₃; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, tal como se describe, entre otros, en las patentes europeas EP 0 586 520 B1 o EP 0 618 925 B1.

La estructura bicatenaria del ARNip puede tener extremos romos, en uno o ambos lados. Más específicamente, la estructura bicatenaria puede tener extremos romos en el lado de la estructura bicatenaria que está definido por el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena, o la estructura bicatenaria puede tener extremos romos en el lado de la estructura bicatenaria que está definido por el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

Adicionalmente, al menos una de las dos cadenas puede tener una proyección de al menos un nucleótido en el extremo 5'; la proyección puede consistir en al menos un desoxirribonucleótido. Al menos una de las cadenas también puede tener opcionalmente una proyección de al menos un nucleótido en el extremo 3'. La longitud de la estructura bicatenaria del ARNip suele ser de aproximadamente 17 a 27 bases y, más preferiblemente, de 19 ó 21. Además, la longitud de dicha primera cadena y/o la longitud de dicha segunda cadena puede(n) seleccionarse independientemente una de otra del grupo que comprende los rangos de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 27 bases, de 17 a 21 bases y 18 ó 19 bases. Un ejemplo particular es el de 27 bases. Adicionalmente, la complementariedad entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana puede ser perfecta, o el dúplex formado entre la primera cadena y el ácido nucleico diana puede comprender al menos 15 nucleótidos en los que hay un apareamiento erróneo o dos apareamientos erróneos entre dicha primera cadena y el ácido nucleico diana que forman dicha estructura bicatenaria.

En algunos casos, tanto la primera cadena como la segunda cadena comprenden, cada una, al menos un grupo de nucleótidos modificados y al menos un grupo flanqueante de nucleótidos, mediante lo cual cada grupo de nucleótidos modificados comprende al menos un nucleótido y mediante lo cual cada grupo flanqueante de nucleótidos comprende al menos un nucleótido con cada grupo de nucleótidos modificados de la primera cadena que está alineado con un grupo flanqueante de nucleótidos en la segunda cadena, mediante lo cual el nucleótido en 5' más terminal de la primera cadena es un nucleótido del grupo de nucleótidos modificados, y el nucleótido en 3' más terminal de la segunda cadena es un nucleótido del grupo flanqueante de nucleótidos. Cada grupo de

nucleótidos modificados puede consistir en un único nucleótido y/o cada grupo flanqueante de nucleótidos puede consistir en un único nucleótido.

5 Adicionalmente, es posible que en la primera cadena el nucleótido que forma el grupo flanqueante de nucleótidos sea un nucleótido no modificado que esté dispuesto en un sentido en 3' con respecto al nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados, y en la segunda cadena el nucleótido que forma el grupo de nucleótidos modificados sea un nucleótido modificado que esté dispuesto en un sentido en 5' con respecto al nucleótido que forma el grupo flanqueante de nucleótidos.

10 Además, la primera cadena del ARNip puede comprender de ocho a doce grupos de nucleótidos modificados, preferiblemente de nueve a once, y la segunda cadena puede comprender de siete a once grupos de nucleótidos modificados, preferiblemente de ocho a diez.

15 La primera cadena y la segunda cadena pueden estar unidas por una estructura de bucle, que puede componerse de un polímero distinto de ácido nucleico tal como, entre otros, polietilenglicol. Alternativamente, la estructura de bucle puede componerse de un ácido nucleico.

20 Además, el extremo 5' de la primera cadena del ARNip puede unirse al extremo 3' de la segunda cadena, o el extremo 3' de la primera cadena puede unirse al extremo 5' de la segunda cadena, siendo dicho ligamiento a través de un ligador de ácido nucleico que tiene normalmente una longitud de entre 10-2000 nucleobases.

25 En particular, y tal como ya se ha indicado previamente, la invención proporciona un compuesto de la invención o un ARNip de la invención seleccionado del grupo que consiste en el compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6 antisentido, y el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido, en los que cualquiera de estos compuestos puede incluir opcionalmente cualquiera de las modificaciones indicadas a lo largo de la presente descripción. Preferiblemente, la invención proporciona un compuesto de la invención o un ARNip de la invención seleccionado del grupo que consiste en el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido, en los que cualquiera de estos compuestos puede incluir opcionalmente cualquiera de las modificaciones indicadas a lo largo de la presente descripción.

40 De ese modo, los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que los compuestos de la presente invención consisten en una pluralidad de nucleótidos, que están unidos a través de uniones covalentes. Cada una de estas uniones covalentes puede ser una unión fosfodiéster, una unión fosfotioato o una combinación de ambas, a lo largo de la secuencia de nucleótidos de la cadena individual. Otras posibles modificaciones de la estructura principal se describen, entre otros, en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.587.361; 6.242.589; 6.277.967; 6.326.358; 5.399.676; 5.489.677; y 5.596.086.

45 La invención proporciona además un vector capaz de expresar cualquiera de los oligorribonucleótidos mencionados anteriormente en forma no modificada en una célula después de lo cual puede realizarse la modificación apropiada.

50 La invención también proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos de la invención o ARNip de la invención en un portador, preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender una mezcla de dos o más ARNip diferentes.

55 Más particularmente, la invención proporciona una composición que comprende un portador y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad eficaz para regular por disminución la expresión en una célula del Yy1 endógeno. En particular, y tal como ya se ha indicado y tal como se explica en el ejemplo 2, los datos experimentales mostrados en la figura 11 indican que la terapia con siYy1, con cualquier composición que comprenda un portador y uno o más de los compuestos de la invención en una cantidad eficaz para regular por disminución la expresión en una célula del Yy1 endógeno, iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardíaca inducida por IM, en cuanto a hipertrofia cardíaca macroscópica (a), razón PCo/PC (b). La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardíaca inducida por IM, en cuanto a niveles de los genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa (c). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 12 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una reducción significativamente menor de la fracción de eyección (a) y el acortamiento fraccional (b) del VI. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente al agrandamiento del VI en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI (c, d), y los diámetros telediastólico y telesistólico del VI (e, f). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 13 muestra que la terapia con siYy1 iniciada

en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la fibrosis en el miocardio infartado, en cuanto a una tinción de rojo sirio significativamente menor (a) (imágenes representativas en el panel b), así como niveles significativamente menores de desregulación de diferentes genes marcadores asociados con fibrosis (TGF- β , α -sma, Col1a1 y Col3a1 (c-f). La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 14 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la inflamación en el miocardio infartado, en cuanto a menores niveles de tinción positiva de CD45 (a) (imágenes representativas en el panel b) y marcadores específicos asociados con inflamación (c-d). La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 15 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la muerte celular en cuanto a un aumento significativamente menor de los niveles de proteína caspasa 3 (a), así como de los niveles de ARNm de BNP y MyO (c-d). La figura 16 muestra que la terapia con siYy1 previene la hipertrofia inducida por estiramiento de cardiomiocitos derivados de iP_s humanos. En comparación con los grupos de control (Scr), los niveles de ARNm de Yy1 en cardiomiocitos humanos derivados de iP_s (hiP_sCM) aumentaron después del estiramiento (PMA+Scr) ($p < 0,001$) y se redujeron significativamente mediante la terapia con siYy1 (siYy1+PMA) ($p < 0,001$) (a). Además, la terapia con siYy1 protegió frente a la hipertrofia cardiaca inducida por estiramiento, en cuanto a los niveles de los genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa (b, c).

La presente invención proporciona así un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto agudo de miocardio, entre 12 horas y 7 días después del IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente. Preferiblemente, el método se administra entre 1 y 7 días después del IAM. Más preferiblemente, entre 12 horas y 3 días después del IAM, preferiblemente entre 1 y 3 días después del IAM. También preferiblemente, entre 3 y 7 días después del IAM.

La presente invención proporciona además un método de tratamiento de remodelación miocárdica adversa tras un IAM, en particular en la prevención o el tratamiento de complicaciones cardiacas tras un IAM tales como fibrosis miocárdica, inflamación cardiaca, hipertrofia cardiaca y/o deterioro funcional, más particularmente en un método de tratamiento de disfunción del ventrículo izquierdo tras un infarto agudo de miocardio, de 2 a 48 horas después del IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente. Preferiblemente, el método se administra entre 4 y 48 horas después del IAM. Más preferiblemente, entre 6 y 48 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 12 y 48 horas o entre 24 y 48 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 2, 4, 6 ó 12 y 24 horas después del IAM.

La presente invención proporciona además un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto agudo de miocardio, de 12 horas a 7 días después del IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente. Preferiblemente, el método se administra entre 1 y 7 días después del IAM. Más preferiblemente, entre 12 horas y 3 días después del IAM, preferiblemente entre 1 y 3 días después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 3 y 7 días después del IAM.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto agudo de miocardio, preferiblemente mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la pérdida de la fracción de eyección y/o el acortamiento fraccional del VI, de 12 a 72 horas después del IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente. Preferiblemente, el método se administra entre 24 y 72 horas después del IAM. Más preferiblemente, entre 36 y 72 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 48 y 72 horas después del IAM.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto agudo de miocardio, preferiblemente mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la hipertrofia cardiaca inducida por IM, preferiblemente en cuanto a hipertrofia cardiaca macroscópica, de 12 a 72 horas después del IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente. Preferiblemente, el método se administra entre 24 y 72 horas después del IAM. Más preferiblemente, entre 36 y 72 horas después del IAM. Todavía más preferiblemente, entre 48 y 72 horas después del IAM.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto agudo de miocardio, preferiblemente mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción del agrandamiento del VI, preferiblemente en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI y/o de los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI, de 3 a 7 días después del IAM después de IAM en un paciente, que comprende administrar al paciente un compuesto o una composición descritos en la invención en una dosis terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente.

Administración: Se han desarrollado sistemas de administración dirigidos específicamente a la administración mejorada y potenciada de ARNip en células de mamíferos, véase, por ejemplo, Shen *et al.* (FEBS letters 539: 111-114 (2003)), Xia *et al.*, Nature Biotechnology 20: 1006-1010 (2002), Reich *et al.*, Molecular Vision 9: 210-216 (2003), Sorensen *et al.* (J. Mol. Biol. 327: 761-766 (2003), Lewis *et al.*, Nature Genetics 32: 107-108 (2002) y Simeoni *et al.*, Nucleic Acids Research 31, 11: 2717-2724 (2003). Los ARNip se han usado satisfactoriamente para la inhibición en primates; para más detalles, véase Tolentino *et al.*, Retina 24(1) febrero de 2004 I 132-138. Se describen formulaciones de respirador para ARNip en la solicitud de patente estadounidense n.º 2004/0063654 de Davis *et al.* Pueden usarse ARNip conjugados con colesterol (y otros ARNip conjugados con esteroides y lípidos) para la administración; véase Soutschek *et al.* Nature 432: 173-177 (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs; y Lorenz *et al.* Bioorg. Med. Chemistry. Lett. 14:4975-4977 (2004) Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells.

Los compuestos, ARNip o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran y dosifican según las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el método de administración, la programación de la administración, la edad, el sexo, el peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los médicos.

La "dosis terapéuticamente eficaz" con los propósitos del presente documento se determina, por tanto, mediante tales consideraciones conocidas en la técnica. La dosis debe ser eficaz para lograr una mejoría que incluya, sin limitarse a, una tasa de supervivencia mejorada o una recuperación más rápida, o una mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores seleccionados como medidas apropiadas por los expertos en la técnica. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por cualquiera de las vías de administración convencionales. Debe tenerse en cuenta que el compuesto puede administrarse como compuesto o como sal farmacéuticamente aceptable y puede administrarse solo o como principio activo en combinación con portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, por vía subcutánea o por vía parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, por vía intraperitoneal, e intranasal, así como técnicas intratecales y de infusión. Preferiblemente, los compuestos, ARNip o composiciones farmacéuticas de la invención se administran por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa.

Los implantes de los compuestos también son útiles. Pueden prepararse formas líquidas para inyección, incluyendo el término las vías de administración subcutánea, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intratecal, y otras vías de administración parenterales. Las composiciones líquidas incluyen disoluciones acuosas, con y sin codisolventes orgánicos, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones con aceites comestibles, así como vehículos farmacéuticos similares. Además, en determinadas circunstancias, las composiciones para su uso en los nuevos tratamientos de la presente invención pueden formarse como aerosoles, para administración intranasal y similares. El paciente que va a tratarse es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos, incluyendo el hombre. Los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los sostenes de implantes, generalmente se refieren a cargas, diluyentes o materiales de encapsulación sólidos o líquidos inertes y no tóxicos que no reaccionan con los principios activos de la invención e incluyen liposomas y microsferas. Los ejemplos de sistemas de administración útiles en la presente invención incluyen las patentes estadounidenses n.ºs 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447.224; 4.439.196; y 4.475.196. Los expertos en la técnica conocen bien muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos similares. En una realización específica de esta invención, se prefieren particularmente las formulaciones tópicas y transdérmicas.

En general, la dosis activa del compuesto para humanos está en el rango de 1 ng/kg a aproximadamente 20-100 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 2-10 mg/kg de peso corporal al día.

El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la administración de una sustancia terapéutica eficaz para mejorar los síntomas asociados con una enfermedad, para disminuir la gravedad o curar la enfermedad, o para prevenir que se produzca la enfermedad. En una realización particular, la administración comprende la administración intravenosa. En otra realización particular la administración comprende la administración tópica o local.

Otro aspecto de la invención es un método de tratamiento en un paciente de fibrosis miocárdica, inflamación cardíaca, hipertrofia cardíaca y/o deterioro funcional dentro de los intervalos de tiempo indicados a lo largo de la presente memoria descriptiva después de un IAM, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar de ese modo de manera profiláctica o terapéutica al paciente.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos 1 a 3 o vectores que expresan estos oligonucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto de la invención es el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los oligorribonucleótidos o vectores anteriores para la preparación de un medicamento para fomentar la recuperación en un paciente que

experimenta fibrosis miocárdica, inflamación cardiaca, hipertrofia cardiaca y/o deterioro funcional dentro de los intervalos de tiempo indicados a lo largo de la presente memoria descriptiva después de un IAM.

5 La presente invención también proporciona un procedimiento de preparar una composición farmacéutica, que comprende mezclar uno o más compuestos de la presente invención con un portador farmacéuticamente aceptable.

10 En una realización preferida, el compuesto usado en la preparación de una composición farmacéutica se mezcla con un portador en una dosis farmacéuticamente eficaz. En una realización particular, el compuesto de la presente invención se conjuga con un esteroide o con un lípido o con otra molécula adecuada, por ejemplo, con colesterol.

15 Pueden introducirse modificaciones o análogos de nucleótidos para mejorar las propiedades terapéuticas de los nucleótidos. Las propiedades mejoradas incluyen una mayor resistencia a las nucleasas y/o una mayor capacidad para penetrar en las membranas celulares.

20 Por consiguiente, la presente invención también incluye todos los análogos de, o modificaciones en, un oligonucleótido de la invención que no afecten sustancialmente a la función del polinucleótido u oligonucleótido. En una realización preferida, tal modificación está relacionada con el resto de base del nucleótido, con el resto de azúcar del nucleótido y/o con el resto de fosfato del nucleótido.

25 En realizaciones de la invención, los nucleótidos pueden seleccionarse de bases que se producen de manera natural o modificadas sintéticamente. Las bases que se producen de manera natural incluyen adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. Las bases modificadas de los oligonucleótidos incluyen inosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil-, 2-propil- y otras alquil-adeninas, 5-halo-uracilo, 5-halo-citosina, 6-aza-citosina y 6-aza-timina, pseudouracilo, 4-tiuracilo, 8-halo-adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol-adenina, 8-tioalquil-adeninas, 8-hidroxiladenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-haloguaninas, 8-aminoguanina, 8-tiolguanina, 8-tioalquilguaninas, 8-hidroxi-guanina y otras guaninas sustituidas, otras aza y desaza-adeninas, otras aza y desaza-guaninas, 5-trifluorometil-uracilo y 5-trifluoro-citosina.

30 Además, pueden prepararse análogos de nucleótidos en los que las estructuras de los nucleótidos se alteran fundamentalmente y son más adecuados como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en el que la cadena principal de fosfato de la desoxirribosa (o ribosa) en el ADN (o ARN) se reemplaza por una cadena principal de poliamida similar a la que se encuentra en los péptidos. Se ha demostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen una vida útil más prolongada *in vivo* e *in vitro*. Además, se ha demostrado que los PNA se unen más fuertemente a una secuencia de ADN complementaria que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la falta de repulsión de cargas entre la cadena de PNA y la cadena de ADN. Otras modificaciones que pueden realizarse a los oligonucleótidos incluyen cadenas principales poliméricas, cadenas principales cíclicas, o cadenas principales acíclicas.

40 En una realización, la modificación es una modificación del resto de fosfato, mediante lo cual el resto de fosfato modificado se selecciona del grupo que comprende fosforiato.

45 Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquiera de los métodos que se conocen bien en la técnica para la síntesis de oligonucleótidos ribonucleicos (o desoxirribonucleicos). Tal síntesis se describe, entre otros, en Beaucage S.L. e Iyer R.P., *Tetrahedron* 1992; 48: 2223-2311, Beaucage S.X. e Iyer R.P., *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 y Caruthers M.H. *et al.*, *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313, la síntesis de tioatos se describe, entre otros, en Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, la síntesis de moléculas de ARN se describe en Sproat B., en *Humana Press* 2005 editado por Herdewijn P.; cap. 2: 17-31 y los procesos posteriores respectivos se describen, entre otros, en Pingoud A. *et al.*, en *IRL Press* 1989 editado por Oliver R.W.A.; cap. 7: 183-208 y Sproat B., en *Humana Press* 2005 editado por Herdewijn P.; cap. 2: 17-31 (citado anteriormente).

50 Se conocen otros procedimientos de síntesis en la técnica, por ejemplo, los procedimientos descritos en Usman *et al.*, 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7845; Scaringe *et al.*, 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433; Wincott *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; y Wincott *et al.*, 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, y estos procedimientos pueden hacer uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Se incorporan los nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'-O-metilados y nucleótidos no modificados según se desee).

60 Los oligonucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse por separado y unirse entre sí de manera posterior a la síntesis, por ejemplo, mediante ligamiento (Moore *et al.*, 1992, *Science* 256, 9923; Draper *et al.*, publicación PCT internacional n.º W093/23569; Shabarova *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon *et al.*, 1997, *Nucleosides Sc Nucleotides*, 16, 951; Bellon *et al.*, 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204), o mediante hibridación tras la síntesis y/o desprotección.

65 Se observa que puede usarse una máquina disponible comercialmente (disponible, entre otros, de Applied Biosystems); los oligonucleótidos se preparan según las secuencias divulgadas en el presente documento. Pueden

ligarse pares superpuestos de fragmentos sintetizados químicamente usando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la patente estadounidense n.º 6.121.426). Las cadenas se sintetizan por separado y luego se aparean entre sí en el tubo. Luego, los ARNip bicatenarios se separan de los oligonucleótidos monocatenarios que no se han apareado (por ejemplo, debido al exceso de uno de ellos) mediante HPLC. En relación con los ARNip o fragmentos de ARNip de la presente invención, pueden sintetizarse dos o más de tales secuencias y ligarse entre sí para su uso en la presente invención.

Los compuestos de la invención también pueden sintetizarse a través de una metodología de síntesis en tándem, tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2004/0019001 (McSwiggen), en la que se sintetizan ambas cadenas de ARNip como un único fragmento o cadena de oligonucleótidos contiguos separado por un ligador escindible que posteriormente se escinde para proporcionar fragmentos o cadenas de ARNip independientes que se hibridan y permiten la purificación del dúplex de ARNip. El ligador puede ser un ligador polinucleotídico o un ligador no nucleotídico.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse o bien directamente o bien con vectores virales o no virales. Cuando se administran directamente, las secuencias generalmente se vuelven resistentes a nucleasas. Alternativamente, las secuencias pueden incorporarse en casetes o constructos de expresión de tal manera que la secuencia se exprese en la célula tal como se analiza a continuación en el presente documento. Generalmente, el constructo contiene la secuencia reguladora o promotor adecuado para permitir que la secuencia se exprese en la célula seleccionada como diana. Los vectores usados opcionalmente para la administración de los compuestos de la presente invención están disponibles comercialmente, y pueden modificarse con el propósito de administrar los compuestos de la presente invención mediante métodos conocidos por un experto en la materia.

Los siguientes ejemplos ilustran pero no limitan la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuidado de animales y aspectos éticos. Se adquirieron ratones macho C57B1/6J (que pesaban entre 25 y 30 g) de Jackson Laboratory. Se alojaron los ratones en un entorno libre de patógenos específicos con una humedad relativa del $50 \pm 5\%$ a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ con ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Los ratones tenían libre acceso a alimento y agua. Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Revisión Ética para uso de animales de la Universidad de Murcia (número de permiso: A13150105). Después de 7 días de adaptación, se sometieron los animales a una intervención quirúrgica para inducir IAM antes del silenciamiento genético de Yy1 sistémico. Se dividieron los animales aleatoriamente en seis grupos (véase grupos y diseño experimental).

Inducción de IAM experimental en ratones. Antes de las intervenciones quirúrgicas, se anestesiaron los animales por vía intraperitoneal con ketamina (75 mg/kg) y medetomidina (0,5 mg/kg), antes de intubarse y someterse a respiración artificial con un catéter intravenoso de calibre 18 y colocarse en decúbito supino sobre una almohadilla de control de temperatura. Se monitorizaron los animales mediante electrodos de electrocardiograma (ECG) conectados a las extremidades a través de pequeñas agujas insertadas de manera subcutánea. Se realizó toracotomía del lado izquierdo mediante una pequeña incisión entre el tercer y cuarto espacios intercostales. Se ensanchó la incisión mediante un retractor de punta roma de tal manera que se evitaron los pulmones en el área de retracción. Se abrió el pericardio que rodea el corazón, pero no se exteriorizó el corazón. Se determinó el sitio de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) a 4 mm del origen. Usando una aguja atraumática cónica, se hizo pasar una ligadura de seda 8-0 por debajo de la arteria coronaria izquierda y se ató con tres nudos. El blanqueamiento y la cianosis visibles de la pared anterior del ventrículo izquierdo y el hinchamiento de la aurícula izquierda se consideraron indicativos de una ligadura satisfactoria. Se consideró satisfactoria la intervención si el ECG mostraba elevación del segmento ST y se blanqueaba la pared anterior del ventrículo izquierdo. Se cerraron las costillas y los músculos con suturas reabsorbibles de Vicryl 6-0, dejando un pequeño espacio para aspirar el aire que quedase en la cavidad torácica. Se aspiró el aire mediante un tubo interno (2 mm de diámetro), de nuevo sin tocar los pulmones. En el momento del cierre, se aplicó polvo de neomicina y Betadine a los sitios de punto de sutura de músculo y piel, respectivamente. Se vendó la incisión quirúrgica diariamente para evitar cualquier infección y vigilar cualquier dehiscencia del sitio de punto de sutura. Se realizó toda la intervención en el plazo de los 20 minutos siguientes a la inducción de la anestesia. Las ratas operadas de manera simulada se sometieron a la misma intervención sin ninguna ligadura. Después de la cirugía, los animales recibieron cuatro dosis de buprenorfina (0,05 mg/kg, por vía subcutánea) a intervalos de 8 h. Se sometieron los grupos simulados a la misma intervención quirúrgica, excepto que no se ocluyó la arteria coronaria DAI. Se usó monitorización electrocardiográfica para confirmar la elevación del segmento ST después de la inducción del IAM. Para evaluar la evolución del daño cardíaco, se realizó un estudio ecocardiográfico en cada ratón antes de la cirugía, y a las 24 h, 1 y 4 semanas tras el IAM (16).

Diseño experimental y protocolo del estudio. A los 24 días tras un IAM, se aleatorizaron los animales supervivientes en seis grupos experimentales: (1) grupo simulado tratado con PBS por vía intravenosa (grupo simulado, PBS, n = 10); (2) grupo simulado tratado con siControl (siCtrl, véase la tabla 3) por vía intravenosa (grupos simulados, siCtrl, n = 10); (3) grupo simulado tratado con siYy1 (el término “siYy1” se entenderá en el presente documento como una reserva formada por cuatro secuencias de ARNip específicas para silenciar los niveles de Yy1 endógeno (compuestos 1 a 4 de la tabla 3) por vía intravenosa (grupo simulado, siYy1, n=10); (4) grupo infartado tratado con placebo (PBS) por vía intravenosa (grupo de IAM, PBS, n=10); (5) grupo infartado tratado con siControl (siCtrl) por vía intravenosa (grupo de IAM, siCtrl, n=10); (6) grupo infartado tratado con siYy1 por vía intravenosa (grupo de IAM, siYy1, n=10). Se mantuvieron los animales en las condiciones descritas anteriormente hasta su sacrificio (4 semanas después del IAM).

Silenciamiento del factor de transcripción Yin-Yang 1 endógeno en ratones. Para generar un modelo experimental en el que se silencien los niveles de expresión del factor Yy1 endógeno, se transfectaron ratones con una mezcla de 4 secuencias de ARN de interferencia específicas (compuestos 1 a 4 de la tabla 3). Se realizó la infusión por vía intravenosa, a través de la vena de la cola del animal, después de 24 h del IAM. Las secuencias de ARNip contra el factor de transcripción Yy1 (ARNip personalizado, HPLC Accell *in vivo*) se adquirieron de Dharmacon (A-050273-13, -14, -15 y -16) y se administraron conjuntamente en tres dosis independientes de 6 mg/kg los días 1, 7 y 14 después del IAM, lo que conduce a una concentración final acumulada de 18 mg/kg. En la figura 2a, se muestra un esquema del procedimiento experimental. En resumen, justo antes de su uso, se mezclaron 75 µg de cada uno de los cuatro ARNip usando el medio de administración de ARNip Accell de GE Healthcare (B-005000). Las secuencias diana tanto para el factor de transcripción Yy1 específico de ratón así como para las secuencias de ARNip de Accell no diana (siCtrl) se muestran en la tabla 3 a continuación.

Estructura y función del VI. Se realizó ecocardiografía transtorácica (ecocardiografía 2D y en modo M) en ratones anestesiados (isoflurano al 1,8 %, inhalación) usando una máquina Vevo y una sonda de 13 MHz (MJFP), antes de la cirugía (línea base), 24 h tras el IAM y 4 semanas tras el IAM. A partir de las vistas de eje largo y de cuatro cámaras, se determinaron los volúmenes telesistólico (VTsVI) y telediastólico (VTdVI) del ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson y se determinó automáticamente la fracción de eyección (FE) como $FE (\%) = \frac{VTdVI - VTsVI}{VTdVI} \times 100$. A nivel de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, se realizaron mediciones de las dimensiones telediastólica (DTdVI) y telesistólica (DTsVI) del ventrículo izquierdo mediante el modo M. Se enumeran los datos en la tabla 1. Los investigadores que analizaron los datos no tenían conocimiento de la asignación de los grupos experimentales.

Tabla 1. Mediciones ecocardiográficas de ratones de control con IAM y simulados y tratados con siYy1 a las 4 semanas tras un IAM

Parámetros ecocardiográficos obtenidos del estudio

Tratamiento	Simulado +PBS	Simulado +siCtrl	Simulado +siYy1	IAM +PBS	IAM +siCtrl	IAM +siYy1
Número N	12	10	10	10	10	9
PC (g)	24,03±0,13	24,1±0,32	24,62±0,41	25,1±0,12	25,20±0,15	25,20±0,14
FC, lpm	457,08±8,32	452±6,96	458,3±10,01	447,8±9,69	445,36±8,09	463±4,63***
DTDVI (mm)	4,82±0,08	4,61±0,15	4,89±0,12	4,74±0,54	4,81±0,04	4,43±0,22*
DTSVI (mm)	2,64±0,06	2,59±0,09	2,76±0,08	3,29±0,17	3,38±0,06###	2,63±0,04***
VTDVI (ml)	71,01±0,35	71,15±0,41	71,41±3,31	110,22±3,54	105,45±5,22###	93,53±3,46***
VTSVI (ml)	35,12±0,74	36,14±0,52	31,87±0,33	68,58±0,69	68,58±0,88##	51,45±3,33***
FE (%)	50,54±0,98	49,20±0,67	55,37±0,96	37,78±2,10	35,08±1,39###	44,99±0,86***
AF (%)	45,22±1,25	43,82±0,65	43,56±1,54	30,59±2,32	29,73±1,56###	40,63±1,56***

PC, peso corporal; FC, frecuencia cardiaca; VI, ventrículo izquierdo; VTDVI, volumen telediastólico del ventrículo izquierdo; VTSVI, volumen telesistólico del ventrículo izquierdo; VTDVI, dimensiones del ventrículo izquierdo al final de la diástole; VTSVI, dimensiones del ventrículo izquierdo al final de la sístole; AF, acortamiento fraccional; FE, fracción de eyección. ###P < 0,001 frente a simulado+siCtrl, *p < 0,05 y *** p < 0,001 frente a IAM+siCtrl. Se calcularon los valores de p usando pruebas de la t de Student bilaterales para datos independientes. Los datos representan medias ± E.E.M.

Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa

Se lavaron ventrículos recién infartados (~20 mg) con DPBS frío. Luego, se pusieron muestras en una placa Petri de vidrio enfriada previamente y se cortaron en un baño de hielo con tijeras afiladas. Se realizaron el aislamiento de ARN y la PCR cuantitativa en tiempo real según el protocolo del fabricante con modificaciones menores (15). Las secuencias de cebadores usadas para el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores usadas para el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

Cebador	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')
BNP	CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC	GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA
Col1a1	CTGGCAAGAAGGGAGATGA	CACCATCCAAACCACTGAAA
Col3a1	ACAGCAAATTCACCTACACAGTTC	CTCATTGCCTTGCGTGTTT
CRP	GAACCTTCAGCCGAATACATCTTTT	CCTTCCTCGACATGTCTGTCT
IL-33	CAGAATCATCGAGAAAAGGCGG	GCCGGGGAAATCTTGAGATT
IL-6	CACTTCACAAGTCGGAGGCT	TGCCATTGCACAACCTTTTTCT
Myh6	ACCAACCTGTCCAAGTTCCG	GTCGTGCATCTTCTTGGCAC
Myh7	CGCATCAAGGAGCTCACCTA	CTTGGACAGGTTGGTGTTGG
MyO	CATGGTTGCACCGTGCTCACAG	GAGCCCATGGCTCAGCCCTG
Nppa	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT
PTX3	CAGGATGCACGCTTCCAAAA	TGCCCGCAGGTTGTGAAAC
Smad2	AAGCCATCACCACTCAGAATTG	CACTGATCTACCGTATTTGCTGT
Smad3	GAGGAGAAGTGGTGCAGAGAAG	ATGCACTTGGTGTTCACGTTT
sST2	GCTAGGACCTCTGGCTAATGTATC	ATGGTGTGTTCACTAGGCGG
ST2L	TGGGCAAGGTAAACCGACTG	CACCCCTCCTCACTACCTA
TGF-β	CAACCCAGGTCCTTCTCTAAA	GGAGAGCCCTGGATACCAAC
TNF-α	AGTTCTATGGCCAGACCCT	GGTGGTTTGCTACGACGTG
Yy1	TGAGAAAGCATCTGCACACC	CGCAAATTGAAGTCCAGTGA
α-SMA	GTGCTGTCCCTCTATGCCTCTGG	GGCACGTTGTGAGTCACACCATC

5 *Análisis estadístico.*

Se expresaron los datos como media \pm error estándar de la media. Se sometió a prueba la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se sometieron a prueba las diferencias entre todos los grupos con una prueba de Kruskal-Wallis. Para comparaciones múltiples con el grupo simulado, se usó la prueba de Siegel-Castellan. Se estudiaron las correlaciones no paramétricas sólo en animales infartados siguiendo el método de Kendall. Se supuso significación estadística en $p < 0,05$. Se analizaron los datos estadísticamente usando el programa SPSS Statistics 22 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.). Se realizó la obtención de gráficos usando el software SigmaPlot 11.0. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

15 Resultados

El IAM induce una regulación por incremento del factor de transcripción Yin yang-1 (Yy1)

En primer lugar, se cuantificaron los niveles de Yy1 en el ARN total extraído del ventrículo izquierdo (VI) de ratones con infarto y sin infarto (figura 1). Tal como se muestra en la figura 1a, los niveles de ARNm de Yy1 en el área infartada del VI aumentaron significativamente después de una semana desde el IAM ($p < 0,01$); un aumento que fue mayor cuando se prolongó el periodo de tiempo hasta 4 semanas ($p < 0,001$) (figura 1a). El aumento del ARNm de Yy1 no se produjo en el área remota del VI (figura 1b).

La deficiencia genética del factor de transcripción Yy1 previene la remodelación cardiaca adversa tras un IAM

A continuación, partiendo de la observación de que la disminución de los niveles de Yy1 y la actividad de ARNip específicos prevenían la hipertrofia de los cardiomiocitos neonatales *in vitro* (15), se planteó si una delección genética global de Yy1 previene la remodelación cardiaca patológica tras un IAM. Tal como se muestra en la figura 2a, y tal como se describió anteriormente, se inició la terapia con Yy1 después de la inducción del IAM; inmediatamente después de la elevación del segmento ST. Cuando se evaluaron los niveles de ARNm de Yy1 en el área infartada del VI (grupo de IAM+siCtrl), en comparación con los niveles de ARNm obtenidos en el grupo simulado (grupo

simulado+siCtrl), se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) que se previno cuando se trataron los animales con siYy1 (IAM+siYy1 frente a IAM+siCtrl; $p < 0,001$) (figura 2b).

5 Es importante destacar que los ratones con infarto tratados con siYy1 estuvieron protegidos frente a la hipertrofia cardiaca y el deterioro funcional inducidos por el IAM. Los animales tratados mostraron una mejor función cardiaca (figura 3) ($p < 0,001$), menor hipertrofia cardiaca macroscópica (es decir, peso del corazón) ($p < 0,001$) (figura 4a), menores niveles de genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (en relación con Myh6) y Nppa ($p < 0,001$, en ambos casos) (figura 4, b-c), y menor hipertrofia de los miocitos cardiacos ($p < 0,01$) (figura 4d).

10 Notablemente, también se redujo la fibrosis miocárdica en estos ratones deficientes en siYy1, tal como se determinó mediante una desregulación de genes marcadores asociados con la fibrosis (figura 5, a-f). La tinción de Masson y rojo sirio confirmaron estos resultados protectores (figura 5g).

15 Se obtuvieron efectos similares cuando se evaluó el efecto de la terapia con siYy1 sobre la inflamación cardiaca tras un IAM. De nuevo, la terapia con siYy1 previno la inflamación adversa tras un IAM en cuanto a una desregulación de genes marcadores asociados con inflamación (figura 6).

20 A continuación, se llevaron a cabo experimentos relacionados con la muerte miocárdica. Tal como se muestra en la figura 7, el IAM induce la muerte celular del miocardio infartado del VI, que se caracteriza por un aumento significativo de los niveles de MyO ($p < 0,001$), H-FABP ($p < 0,001$) y los niveles de ARNm de BNP ($p < 0,001$) (figura 7). La terapia con siYy1 previno este aumento ($p < 0,001$, en todos los casos).

El efecto cardiaco protector de la terapia con siYy1 está relacionado con la modulación del eje IL-33/ST2.

25 A continuación, para confirmar si el efecto beneficioso de la terapia con siYy1 durante la remodelación cardiaca *in vivo* está relacionado con el eje IL33/ST2L, se evaluaron los niveles de ARNm de IL-33, ST2L y sST2 en el área infartada del VI de ratones mediante RT-PCR cuantitativa (figura 8). El IAM se asoció con un aumento de la expresión de ARNm de IL-33 ($p < 0,001$), ST2L ($p < 0,001$) y sST2 ($p < 0,01$). Curiosamente, la falta del Yy1 endógeno no tuvo ningún efecto sobre los niveles de ARNm de IL-33 y ST2L y previno la regulación por incremento del nivel de ARNm de sST2 del miocardio. El silenciamiento de Yy1 en ausencia de daño o el uso de PBS, no tuvo ningún efecto sobre la expresión de IL33, ST2L y sST2 en comparación con sus controles respectivos.

Ejemplo 2.

35 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuidado de animales y aspectos éticos. Se adquirieron ratones macho C57B1/6J (que pesaban entre 25 y 30 g) de Jackson Laboratory. Se alojaron los ratones en un entorno libre de patógenos específicos con una humedad relativa del $50 \pm 5\%$ a $23 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ con ciclos de luz y oscuridad de 12 h. Los ratones tenían libre acceso a alimento y agua. 40 Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Revisión Ética para el uso de animales de la Universidad de Murcia (número de permiso: A13150105). Después de 7 días de adaptación, se sometieron los animales a una intervención quirúrgica para inducir IM antes del silenciamiento genético de Yy1 sistémico.

45 Inducción de IM experimental en ratones. Antes de las intervenciones quirúrgicas, se anestesiaron los animales por vía intraperitoneal con ketamina (75 mg/kg) y medetomidina (0,5 mg/kg), antes de intubarse y someterse a respiración artificial con un catéter intravenoso calibre 18 y colocarse en decúbito supino sobre una almohadilla de control de temperatura. Se monitorizaron los animales mediante electrodos de electrocardiograma (ECG) conectados a las extremidades a través de pequeñas agujas insertadas de manera subcutánea. Se realizó toracotomía del lado izquierdo mediante una pequeña incisión entre el tercer y cuarto espacios intercostales. Se ensanchó la incisión mediante un retractor de punta roma de tal manera que se evitaron los pulmones en el área de retracción. Se abrió el pericardio que rodea el corazón, pero no se exteriorizó el corazón. Se determinó el sitio de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) a 4 mm del origen. Usando una aguja atraumática cónica, se hizo pasar una ligadura de seda 8-0 por debajo de la arteria DAI y se ató con tres nudos. El blanqueamiento y la cianosis visibles de la pared anterior del ventrículo izquierdo y el hinchamiento de la aurícula izquierda se consideraron indicativos de una ligadura satisfactoria. Se consideró satisfactoria la intervención si el ECG mostraba elevación del segmento ST y se blanqueaba la pared anterior del ventrículo izquierdo. Se cerraron las costillas y los músculos con suturas reabsorbibles de Vicryl 6-0, dejando un pequeño espacio para aspirar el aire que quedase en la cavidad torácica. Se aspiró el aire mediante un tubo interno (2 mm de diámetro), de nuevo sin tocar los pulmones. En el momento del cierre, se aplicó polvo de neomicina y Betadine en los sitios de punto de sutura de músculo y piel, respectivamente. Se vendó la incisión quirúrgica diariamente para evitar cualquier infección y monitorizar cualquier dehiscencia del sitio de punto de sutura. Se realizó toda la intervención en el plazo de los 20 minutos siguientes a la inducción de la anestesia. Las ratas operadas de manera simulada se sometieron a la misma intervención sin ninguna ligadura. Después de la cirugía, los animales recibieron cuatro dosis de buprenorfina (0,05 mg/kg, por vía subcutánea) en intervalos de 8 h. Se sometieron los grupos simulados a la misma intervención quirúrgica, excepto que no se ocluyó la arteria coronaria DAI. Se usó monitorización electrocardiográfica para confirmar la elevación del segmento ST después de la inducción del IM. Después de un IM inducido por cirugía, los 65

ratones con infarto muestran cambios significativos en el electrocardiograma en comparación con los del grupo simulado (paneles superiores de la figura 9). Para evaluar la evolución del daño cardiaco, se realizó un estudio ecocardiográfico en cada ratón en el momento del sacrificio (4 u 8 semanas tras un IM) (Sacks D. *et al.*, *Int J Stroke*. agosto de 2018; 13(6):612-632).

5 Diseño experimental y protocolo de estudio en ratones. A los 30 minutos tras un IM, se aleatorizaron los animales sobrevivientes en dos grupos globales: IM y simulado. En cada caso, se reagruparon los animales basándose en la iniciación de la terapia con siYy1 (6 mg/kg, i.v.), que comenzó 1 hora (S1h), 24 horas (S24h), 3 días (S3d), 7 días (S7d) o 14 días (S14d) tras un IM. La terapia con SiYy1 se repitió cada 7 días hasta completar un total de 3 ciclos cada uno (figura 9). Se sacrificaron los animales pertenecientes a los grupos S1h, S24h, S3d y S7d a las 4 semanas tras el IM, mientras que se sacrificaron los pertenecientes a S14d a las 8 semanas tras el IM (esquema de la figura 9).

15 Preparación y tensión biomecánica de cardiomiocitos humanos derivados de iPSC (hiPsCM). Se adquirieron células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) de Phenocell (PCi-CAU); se proporcionaron ~0,5 x 10⁵ células viables en crioviales. Inicialmente, sobre una matriz adecuada para permitir la unión de agregados celulares (Matrigel®), se hicieron crecer las hiPSC hasta el 80 % de confluencia usando medio mTeSR™ plus y se mantuvieron en una atmósfera humidificada del 5 % de CO₂ y el 95 % de aire a 37 °C. En el pase 20, se inició el procedimiento de reprogramación usando un protocolo normalizado en este laboratorio. En resumen, se retiró el medio de cultivo y se cambió a RPMI-1640 con complemento B27 sin insulina (complemento de diferenciación basal) con CHIR99021 4 μM (día 0). El día 3, se cambió el medio a complemento de diferenciación basal e IWR-1 3 μM. El día 5, se renovó el medio con complemento de diferenciación basal. Se cambió el medio el día 8 a RPMI 1640 con complemento B27 (citado anteriormente como RPMI/B27). El día 11, se cambió el medio a RPMI 1640 sin glucosa con B27 sin insulina. El día 14, se cambió el medio a RPMI/B27. Se mantuvieron los cultivos para la diferenciación en un entorno con el 5 % de CO₂ y el 95 % de aire a 37 °C. Durante la diferenciación, se reemplazó el medio cada 3 días. Se observaron agrupaciones con latido espontáneo después de 20 días. Se dejó que los HiPsCM se recuperasen durante 12 días en medio de mantenimiento iCell (Cellular Dynamics International) antes de la experimentación. Se obtuvieron perfiles de expresión genética normalizados (RT-qPCR) tanto de hiPSC como de hiPsCM en cada clon humano aislado, antes de comenzar los ensayos. Se usaron los niveles de ARNm de OCT4 y NANOG como marcadores específicos de hiPSC y los niveles de ARNm para cTnT y NKX 2-5, como marcadores específicos de iPSC. Se realizó tensión biomecánica usando una adaptación del diseño experimental descrito por Asensio-López MC. *et al.* (*Sci Rep* 16 de febrero de 2021; 11(1):3915). En este caso, se coestimularon los hiPsCM con PMA 0,2 μM y A23187 0,4 μM durante 6 h, lo que indujo así un estiramiento celular sostenido.

35 Silenciamiento del factor de transcripción Yin-Yang 1 endógeno. Para generar un modelo experimental en el que se regulen por disminución los niveles de expresión de Yy1, se trataron los ratones con una mezcla de cuatro secuencias de ARN de interferencia específicas (los compuestos 1 a 4) y se transfectaron hiPsCM con una mezcla equivalente (los compuestos 5 a 8), diseñada específicamente para la secuencia de ARNm de Yy1 humano.

40 Tabla 3. Secuencias de ARN interferentes cortas específicas para silenciar los niveles de Yy1.

Compuesto 1 (ARNip 1):

Secuencia sentido: CUGUUGUCCAGAAUACUUAUU (SEQ ID NO 1)

45 Secuencia antisentido: 5'-PUAAGUAUUCUGGACAACAGUU (SEQ ID NO 2)

Compuesto 2 (ARNip 2):

50 Secuencia sentido: CAUGUAGAAUCAAAUAUUAUU (SEQ ID NO 3)

Secuencia antisentido: 5'-PUAAUAUUUGAUUCUACAUGUU (SEQ ID NO 4)

Compuesto 3 (ARNip 3):

55 Secuencia sentido: GCUCCAAGAACAUAAGCUUUU (SEQ ID NO 5)

Secuencia antisentido: 5'-PAAGCUAUUGUUCUUGGAGCUU (SEQ ID NO 6)

60 Compuesto 4 (ARNip 4):

Secuencia sentido: CAACUAACCUGAAAUCUCAUU (SEQ ID NO 7)

Secuencia antisentido: 5'-PUGAGAUUUCAGGUUAGUUGUU (SEQ ID NO 8)

5 Compuesto 5 (ARNip 5):

Secuencia sentido: CAU GUA GUA UCA AAU AUU A (SEQ ID NO 49)

Secuencia antisentido: 5'- UAA UAU UUG AUA CUA CAU G (SEQ ID NO 50)

10 Compuesto 6 (ARNip 6):

Secuencia sentido: GGG AUA UGC UUA GUA AUG C (SEQ ID NO 51)

15 Secuencia antisentido: 5'- UAA UAU UUG AUA CUA CAU G (SEQ ID NO 52)

Compuesto 7 (ARNip 7):

Secuencia sentido: CUC AGU UGU AGA AUG UAU U (SEQ ID NO 53)

20 Secuencia antisentido: 5'- UAA UAU UUG AUA CUA CAU G (SEQ ID NO 54)

Compuesto 8 (ARNip 8):

25 Secuencia sentido: CAA CUA ACC UGA AAU CUC A (SEQ ID NO 55)

Secuencia antisentido: 5'- UAA UAU UUG AUA CUA CAU G (SEQ ID NO 56)

Secuencias de ARNip de Accell no diana (siCtrl/Scr):

30 Sentido: UAGCGACUAAACACAUCAAUU (SEQ ID NO 9)

Antisentido: 5'-PUUGAUGUGUUUAGUCGCUAAU (SEQ ID NO 10)

35 En ratones, se realizó la infusión por vía intravenosa a través de la vena de la cola del animal después de 1 h, 24 h, 3 d, 7 d o 14 d después de un IM. Se adquirieron Las secuencias de ARNip contra el factor de transcripción Yy1 (ARNip personalizado, HPLC Accell *in vivo*) de Dharmacon (A-050273-13, -14, -15 y -16) y se administraron conjuntamente en tres dosis independientes de 6 mg/kg a la semana después del IM. En la figura 9 se muestra un esquema del procedimiento experimental. En resumen, justo antes de su uso, se mezclaron 75 µg de cada uno de los cuatro ARNip usando el medio de administración de ARNip Accell de GE Healthcare (B-005000). Las secuencias diana tanto para el factor de transcripción Yy1 específico de ratón así como para las secuencias de ARNip de Accell no diana (siCtrl) se muestran en la tabla 3 anterior (citadas como los compuestos 1 a 4 y secuencias de ARNip Accell no diana (siCtrl).

45 En los hiPsCM, se transfectaron células con ARNip específico de Yy1 o ARNip de control (Dharmacon, Lafayette, CO) usando Lipofectamine RNAiMAX. Para evitar efectos fuera de la diana provocados tanto por las cadenas con sentido como por las antisentido, se usó una mezcla comercial de cuatro dúplex individuales diseñados para seleccionar como diana un gen (los compuestos 5 a 8 y Scr; tabla 3). En resumen, se sembraron hiPsCM (~20 x 10³ células) en una placa de seis pocillos y se hicieron a 37 °C en medio completo durante 2 días. A continuación, se sometieron las células a transfección usando Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La concentración de transfección fue de 25 nM. Se mantuvieron las células durante 24 h después de añadir la mezcla de transfección. Entonces, se lavaron las células transfectadas dos veces con DPBS a 37 °C y luego se coestimularon con PMA y A23187 durante 6 h, tal como se indicó anteriormente.

55 Estructura del VI y función cardíaca. Se realizó ecocardiografía transtorácica (ecocardiografía 2D y en modo M) en ratones anestesiados (isoflurano al 1,8 %, inhalación) usando una máquina VEVO y una sonda de 13 MHz, después de 4 u 8 semanas tras un IM. A partir de las vistas de eje largo y de cuatro cámaras, se determinaron los volúmenes telesistólico (VTsVI) y telediastólico (VTdVI) del ventrículo izquierdo mediante el método de Simpson y se determinó

automáticamente la fracción de eyección (FE) como $FE (\%) = \frac{VTdVI - VTsVI}{VTdVI} \times 100$. A nivel de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral, se realizaron mediciones de las dimensiones telediastólica (DTdVI) y telesistólica (DTsVI) del ventrículo izquierdo mediante el modo M. Los investigadores que analizaron los datos no tenían conocimiento de la asignación de los grupos experimentales.

5 Muestras de tejido e histología. Cuatro semanas (grupos S1h, S24h, S3d y S7d) u 8 semanas (grupos S14d) después de la ligadura de la arteria DAI, se sacrificaron los animales y se detuvieron sus corazones en diástole mediante una inyección intravenosa de 0,2 ml de cloruro de potasio al 10 % (p/v) (MERCK, EE.UU.). Luego se extirparon los corazones y se enjuagaron con DPBS enfriado con hielo antes de extraer el ventrículo derecho y las aurículas. Para los análisis histopatológicos, se fijaron cortes papilares medios del ventrículo izquierdo de siete ratones de cada grupo de tratamiento, en formaldehído al 4 % hasta 24 h antes de la inclusión en parafina. Se realizó tinción con rojo sirio para evaluar la fibrosis. Para su cuantificación, se tomaron al menos seis fotografías aleatorias de la zona infartada limítrofe de cada corte con un aumento de 20x. Se usó la deposición de colágeno (color rojo) para definir la fibrosis, que se expresa como un porcentaje de píxeles de color rojo con respecto a píxeles de color rojo cuantificados usando el software DIGITAL IMAGE HUB versión 4.0.6. Para otros estudios biológicos moleculares-celulares, se recogió el área infartada y se almacenó a -80 °C para la extracción de ARN. Los observadores que realizaron los análisis de imágenes y los experimentos biológicos moleculares y celulares no tenían conocimiento de la asignación los grupos experimentales.

20 Inmunohistoquímica. El siguiente procedimiento experimental se realizó tal como se describió previamente, con algunas modificaciones (Asensio-López MC. *et al.*, Sci Rep. 16 de febrero de 2021; 11(1):3915). En resumen, se colocaron las secciones (3 µm) de cortes papilares medios del VI incluidos en parafina en portaobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina. Luego, se desparafinaron las secciones y se pretrataron en DAKO PT Link durante 20 min a 97 °C. Para la tinción de CD45 o caspasa 3, se incubaron las secciones rehidratadas durante la noche con un anticuerpo anti-CD45 policlonal de conejo (dilución de trabajo 1:500, ABCAM [ab10558]) o con un anticuerpo anti-caspasa 3 policlonal de conejo (dilución de trabajo 1:300, CELL SIGNALING [9661]). A continuación, se incubaron las secciones con anticuerpo anti-polímero marcado biotinilado de conejo (DAKO ENVISION) según las instrucciones del fabricante y se revelaron con 2,2'-diaminobencidina (DAB). Un precipitado citoplasmático de color marrón oscuro indicó una inmunotinción positiva. Se capturaron las imágenes usando un microscopio Zeiss Axio Scope A10 (CARL ZEISS, Madrid, España). Se tomaron seis fotografías aleatorias de cada preparación con un aumento de 20x (n = 7 preparaciones/cada grupo tratado).

35 Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa. Se aisló el ARN total de las muestras de tejido miocárdico infartado, así como de los hiPsCM con estiramiento. Se purificó el ARN con el minikit RNeasy (QIAGEN) y se preparó ADNc con el kit de síntesis de ADNc iScript (BIORAD LAB. INC., Madrid) según la recomendación del fabricante. Se realizó reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con la mezcla maestra TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) (TAKARA BIO INC., Europa). Se usó la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de mantenimiento. Las secuencias de los cebadores usados (MERCK, EE.UU.) se enumeran en la tabla 4 adicional.

40 **Tabla 4. Secuencias de cebadores usadas para el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real**

	Cebador	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')
Ratones	BNP	CGTCTTGGCCTTTTGGCTTC	GGTGGTCTAGCAGGTTCTTGAAA
	Col1a1	CTGGCAAGAAGGGAGATGA	CACCATCCAAACCACTGAAA
	Col3a1	ACAGCAAATTCACCTACACAGTTC	CTCATTGCCTTGC GTGTTT
	GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTGAACG	TCGTTGATGGCAACAATCTC
	IL-33	CAGAATCATCGAGAAAAGGCGG	GCCGGGGAAATCTTGGAGTT
	IL-6	CACTTCAACAAGTCGGAGGCT	TGCCATTGCACAACCTCTTTTCT
	Myh6	ACCAACCTGTCCAAGTTCCG	GTCGTGCATCTTCTTGGCAC
	Myh7	CGCATCAAGGAGCTCACCTA	CTTGGACAGGTTGGTGTGG
	MyO	CATGGTTGCACCGTGCTCACAG	GAGCCCATGGCTCAGCCCTG
	Nppa	GCTTCCAGGCCATATTGGAG	GGGGGCATGACCTCATCTT
	sST2	GCTAGGACCTCTGGCTAATGTATC	ATGGTGTGTTCACTAGGCGG
	ST2L	TGGGCAAGGTAACCGACTG	CACCCCTCCTCACTACCTA
	TGF-β	CAACCCAGGTCCTTCTAAA	GGAGAGCCCTGGATACCAAC
	TNF-α	AGTTCTATGCCCAGACCCT	GGTGGTTTGTACGACGTG
	Yy1	TGAGAAAGCATCTGCACACC	CGCAAATTGAAGTCCAAGTGA
α-sma	GTGCTGTCCCTCTATGCCTCTGG	GGCACGTTGTGAGTCACACCATC	
Humanos	GAPDH	<u>TCAACGACCACCTTTGTCAAGCTCA</u>	<u>GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT</u>
	Myh6	<u>CAAGCCAACACCAACCTGTCC</u>	<u>TTGGCAAGAGTGAGGTTCC</u>
	Myh7	<u>CTGCCAGAATGGAGTACAAA</u>	<u>CTTCATGCCAGGGCCAATTCT</u>
	Nppa	<u>CCCCGGTTCAGCCTCGGACT</u>	<u>ACGGATCCCTCGGTGGCTA</u>
	Yy1	<u>ACATCTGCACACCCACGGT</u>	<u>GCGTTTCCACAGCCTTCG</u>

Análisis estadístico. Se realizaron modelos de regresión lineal con efectos de interacciones entre infarto (IM frente a simulado), tratamiento (siYy1 frente al control) y el momento del inicio del tratamiento para estimar medias y error estándar (E.E.). Debido al desequilibrio de animales en cada grupo, se usaron medias marginales (MME, medias marginales estimadas). Se estimó el efecto del infarto (cambios entre IM y simulado, IM - simulado) y se notificó en tablas y figuras. También se estimaron las diferencias en estos cambios (*diff-in-diff*) para la comparación y los cálculos de valores p entre tratamientos según cada momento de inicio de la terapia. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se realizaron todos los análisis usando el software estadístico R (v.4.0) y el paquete Emmeans (v.1.5.4).

10 Resultados

Los resultados de este ejemplo se ilustran en las figuras 9 a 16. En este sentido, se observa en el presente documento que la figura 11 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardíaca inducida por IM, en cuanto a hipertrofia cardíaca macroscópica (a), relación PCo/PC (b). La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la hipertrofia cardíaca inducida por IM, en cuanto a los niveles de genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa (c). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 12 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 3 primeros días protegió frente a la disfunción sistólica del VI en cuanto a una reducción significativamente menor de la fracción de eyección (a) y del acortamiento fraccional (b) del VI. La terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente al agrandamiento del VI en cuanto a un menor aumento de los diámetros telediastólico y telesistólico del VI (c, d), y de los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI (e, f). La terapia con siYy1 iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. Además, y tal como se muestra en la figura 13, la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la fibrosis en el miocardio infartado, en cuanto a una tinción con rojo Sirius significativamente menor (a) (imágenes representativas en el panel b), así como niveles significativamente menores de desregulación de diferentes genes marcadores asociados con fibrosis (TGF- β , α -sma, Col1a1 y Col3a1 (c-f)). La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 14 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la inflamación en el miocardio infartado, en cuanto a menores niveles de tinción positiva de CD45 (a) (imágenes representativas en el panel b) y marcadores específicos asociados con inflamación (c-d). La terapia iniciada a los 14 días no tuvo ningún efecto. La figura 15 muestra que la terapia con siYy1 iniciada en el plazo de los 7 primeros días protegió frente a la muerte celular en cuanto a un aumento significativamente menor de los niveles de proteína caspasa 3 (a), así como de los niveles de ARNm de BNP y MyO (c-d). Tal como se muestra en la figura 16, la terapia con siYy1 previno la hipertrofia inducida por estiramiento de cardiomiocitos derivados de iPps humanos. En comparación con los grupos de control (Scr), los niveles de ARNm de Yy1 en cardiomiocitos humanos derivados de iPps (hiPpsCM) estaban elevados después del estiramiento (PMA+Scr) ($p < 0,001$) y se redujeron significativamente mediante la terapia con siYy1 (siYy1+PMA) ($p < 0,001$) (a). La terapia con siYy1 protegió frente a la hipertrofia cardíaca inducida por estiramiento, en cuanto a niveles de genes marcadores asociados con hipertrofia Myh7 (relacionados con Myh6) y Nppa (b, c).

40

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto capaz de reducir la expresión del gen Yin Yang-1 (Yy1) en células cardíacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del compuesto en dichas células, en la que el compuesto es una interferencia de ARN (iARN) del gen Yy1, y en la que dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) después de un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto, y en la que dicha composición se administra entre 12 horas y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra entre 1 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.
3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra entre 12 horas y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.
4. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra entre 1 y 3 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.
5. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra entre 3 y 7 días después de la aparición del infarto de miocardio (IAM) en el sujeto.
6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en la que dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) tras un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la pérdida de la fracción de eyección y/o el acortamiento fraccional del VI.
7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en la que dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) después de un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción de la hipertrofia cardíaca inducida por IM.
8. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha composición es para su uso en un método de tratamiento de la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) después de un infarto de miocardio (IAM) en el sujeto mediante la prevención, el tratamiento, la mitigación, o la reducción del agrandamiento del VI.
9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el ARN de interferencia (iARN) del gen Yy1 es un ARNip seleccionado de la lista que consiste en cualquiera de los siguientes compuestos: el compuesto 1 que tiene la SEQ ID NO 1 sentido y la SEQ ID NO 2 antisentido, el compuesto 2 que tiene la SEQ ID NO 3 sentido y la SEQ ID NO 4 antisentido, el compuesto 3 que tiene la SEQ ID NO 5 sentido y la SEQ ID NO 6 antisentido, el compuesto 4 que tiene la SEQ ID NO 7 sentido y la SEQ ID NO 8 antisentido, el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido.
10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el ARN de interferencia (iARN) del gen Yy1 es un ARNip seleccionado de la lista que consiste en cualquiera de los siguientes compuestos: el compuesto 5 que tiene la SEQ ID NO 49 sentido y la SEQ ID NO 50 antisentido, el compuesto 6 que tiene la SEQ ID NO 51 sentido y la SEQ ID NO 52 antisentido, el compuesto 7 que tiene la SEQ ID NO 53 sentido y la SEQ ID NO 54 antisentido, y el compuesto 8 que tiene la SEQ ID NO 55 sentido y la SEQ ID NO 56 antisentido.
11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el compuesto se administra por vía intravenosa.
12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNip tal como se define en las reivindicaciones 9 ó 10 o vectores que expresan estos oligonucleótidos y un portador farmacéuticamente aceptable.

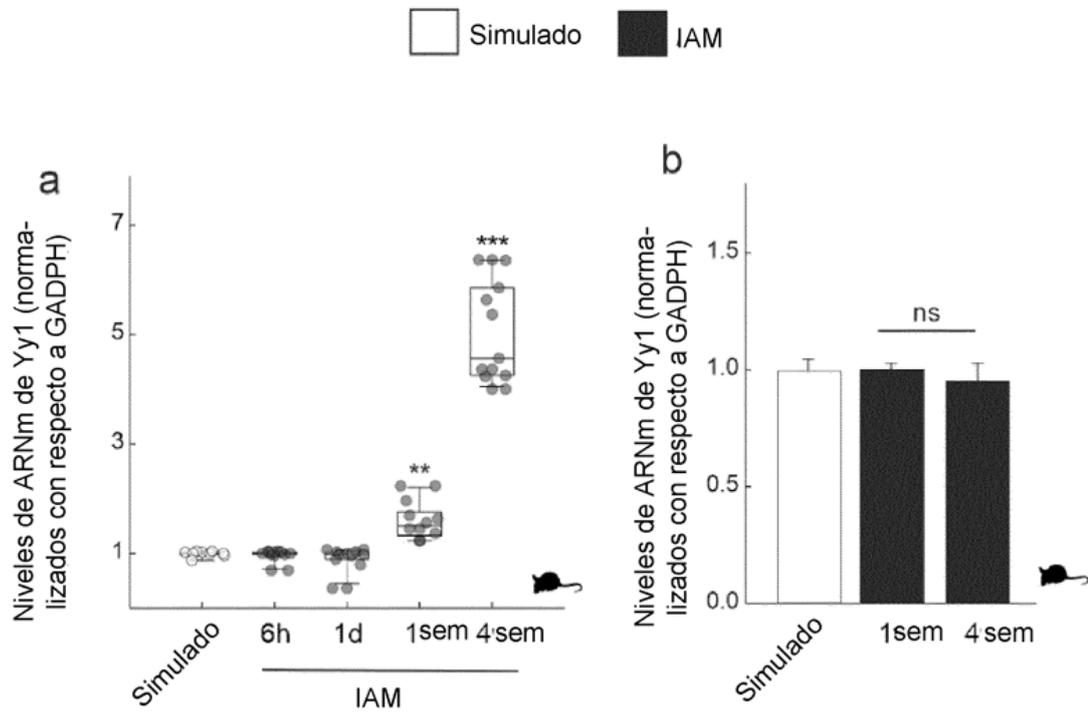


Fig. 1

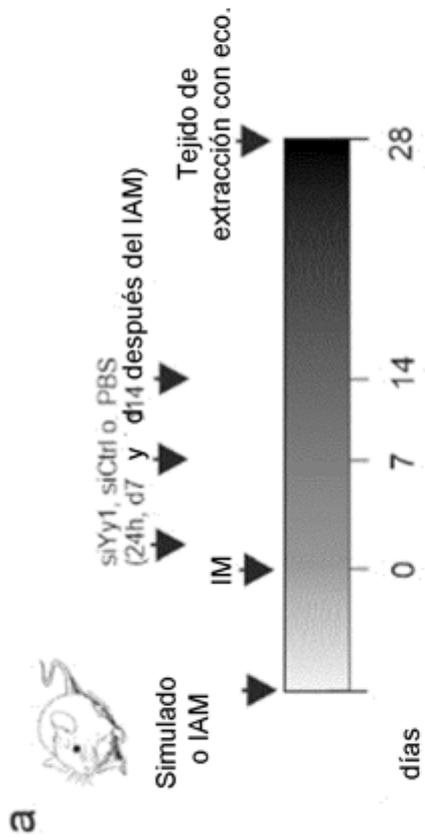
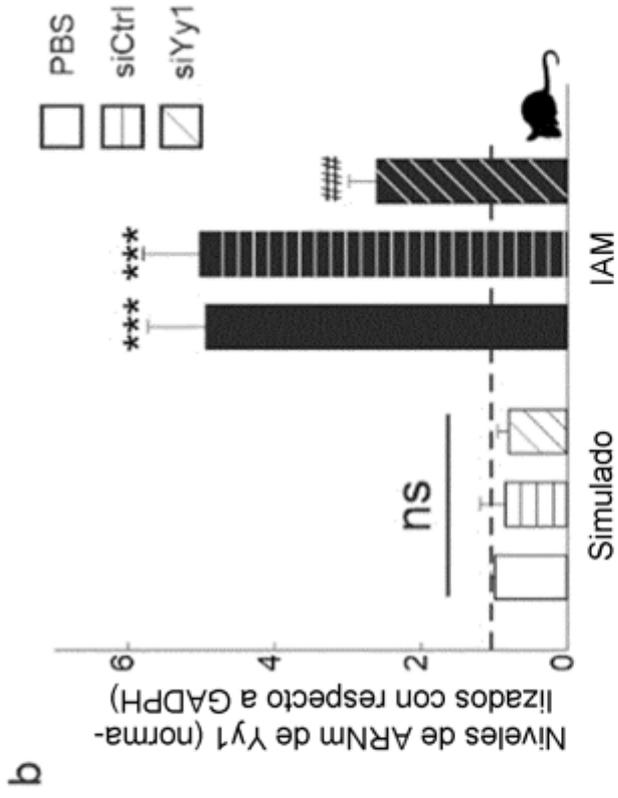


Fig. 2

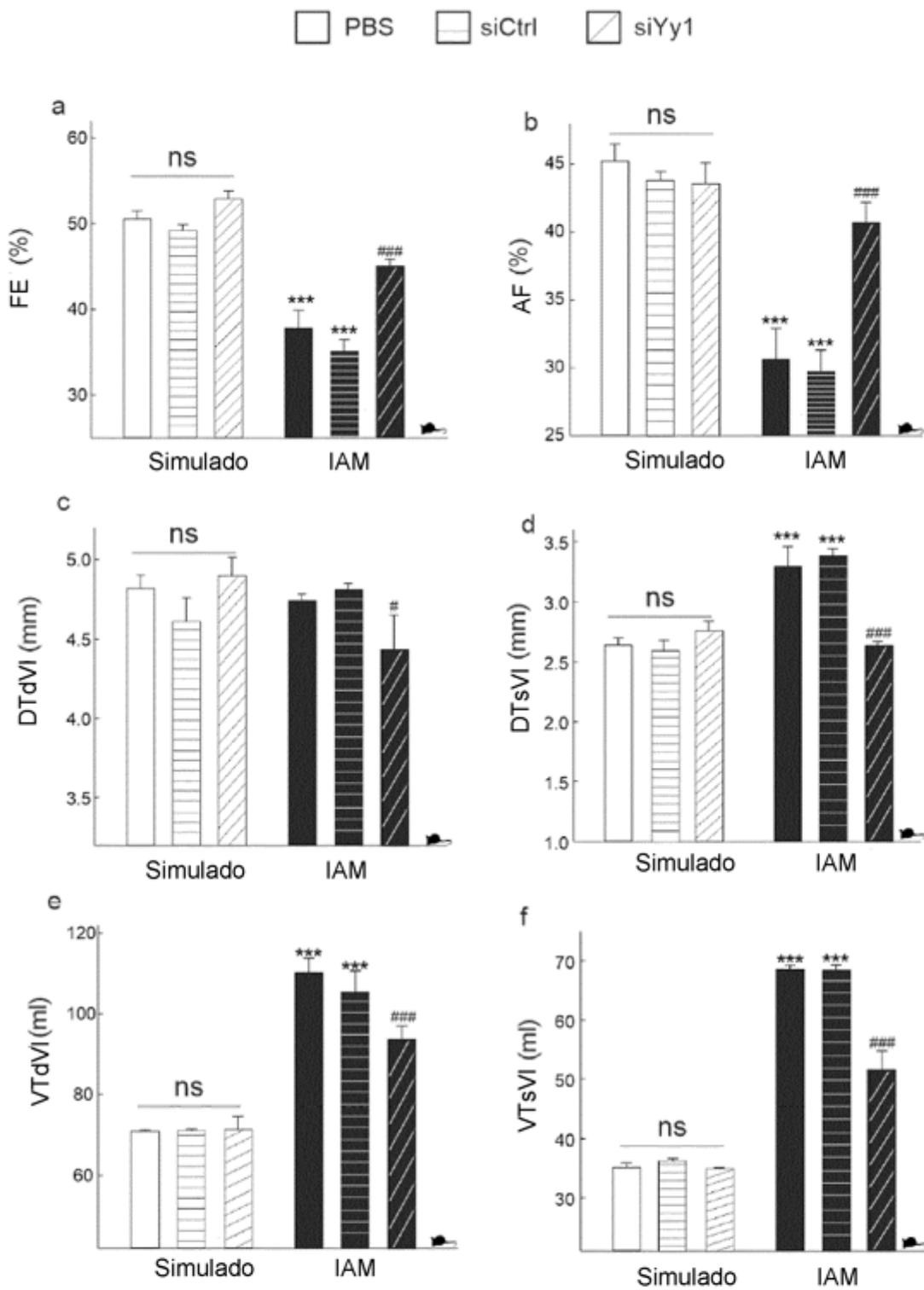


Fig. 3

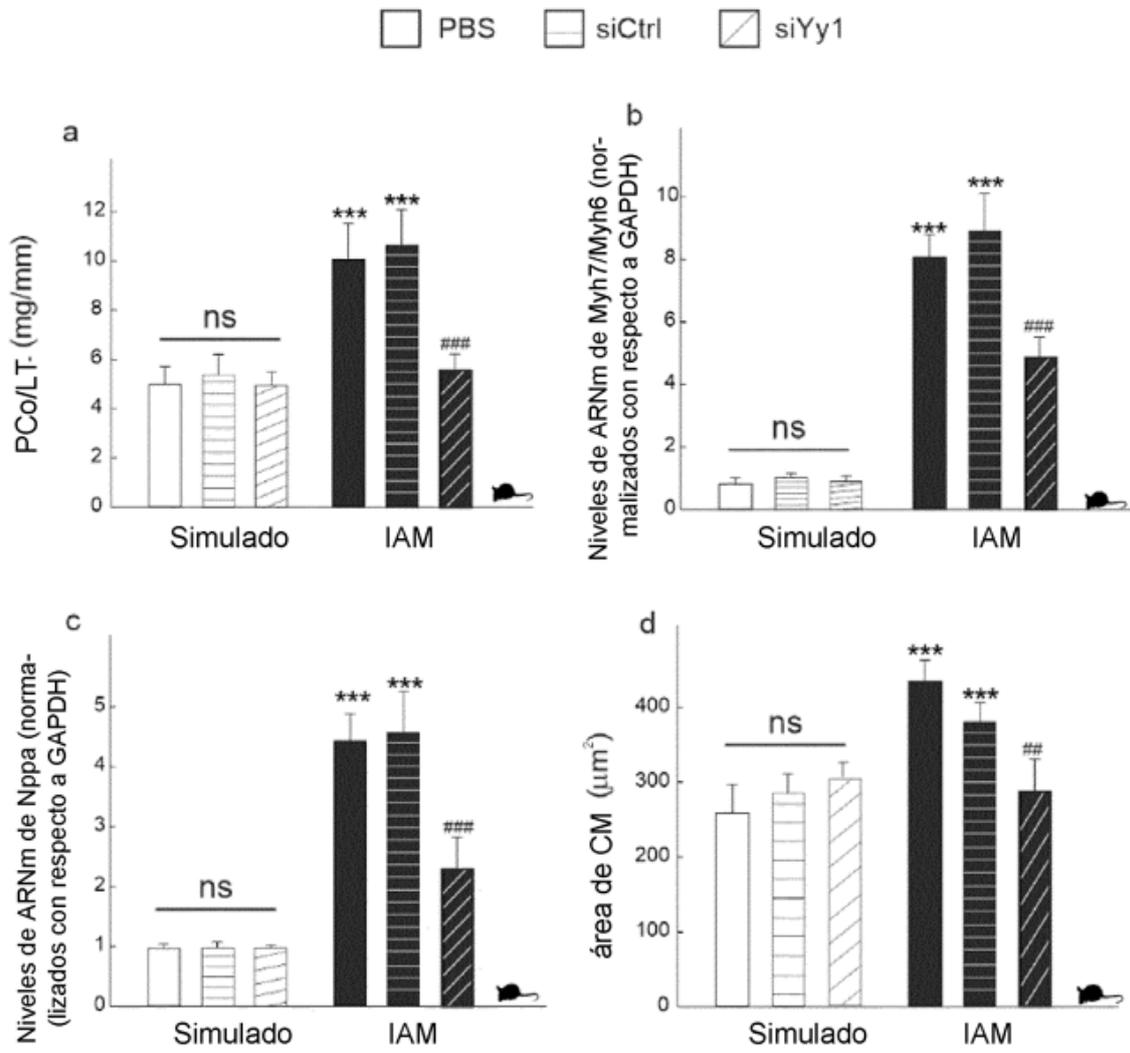


Fig. 4

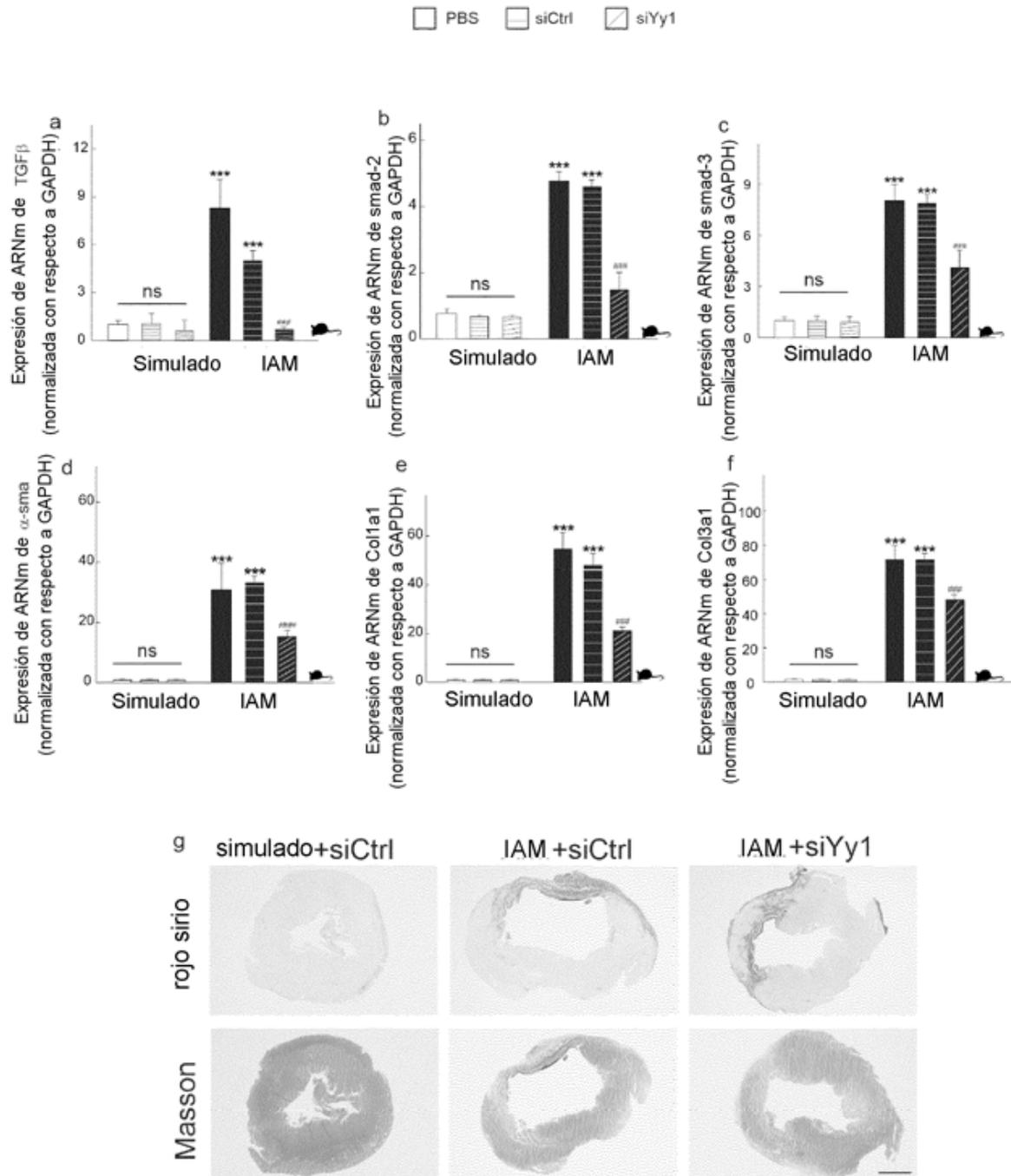


Fig. 5

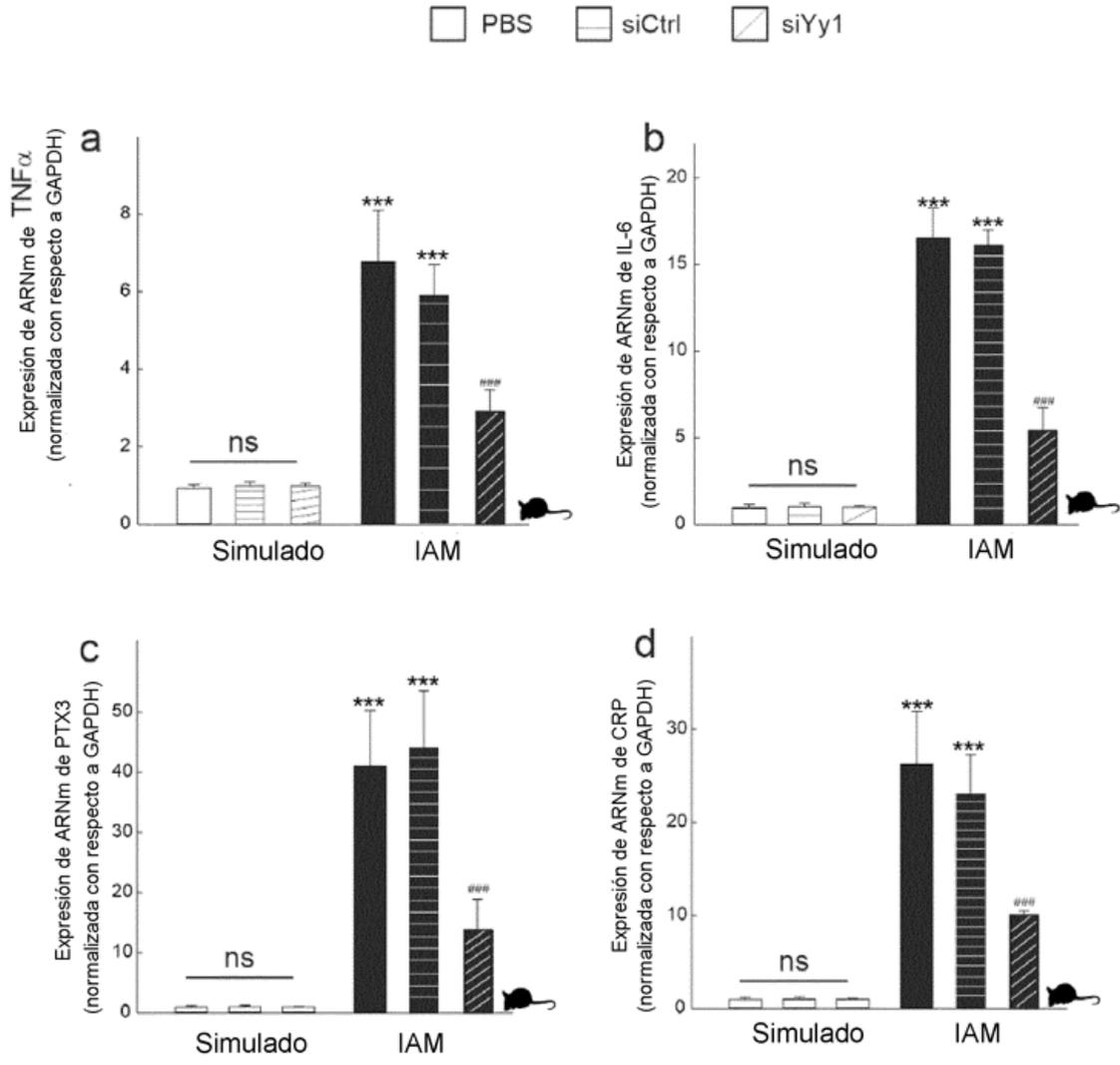


Fig. 6

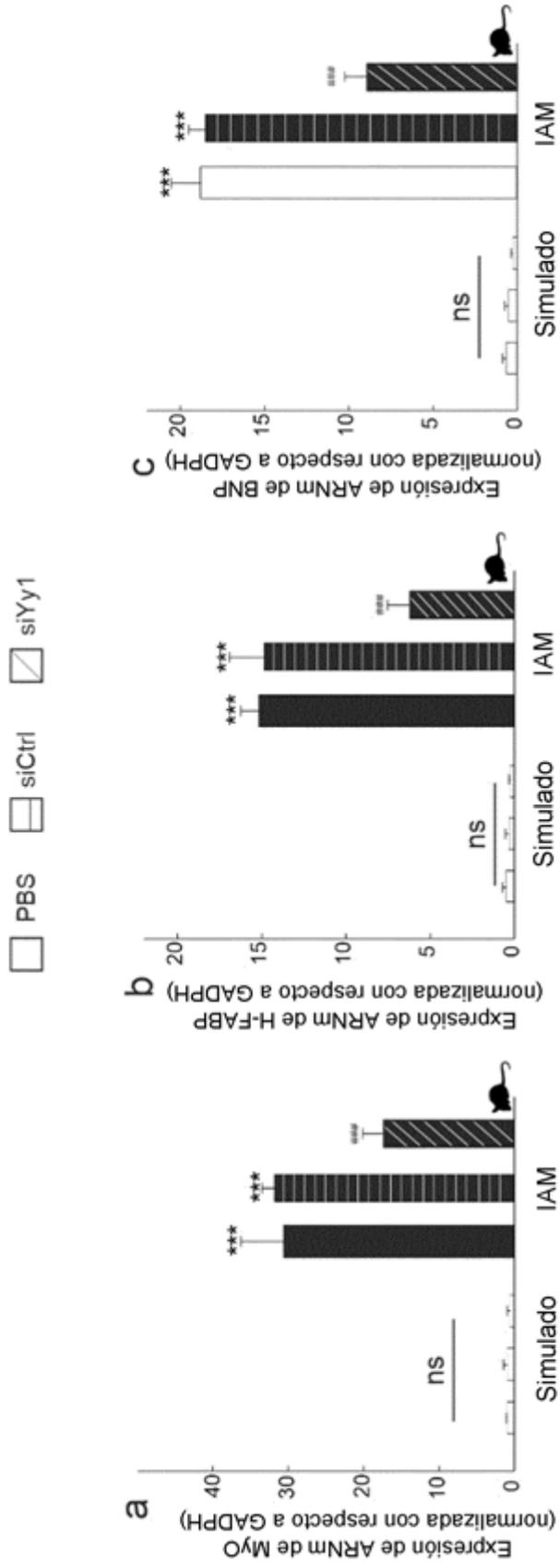


Fig. 7

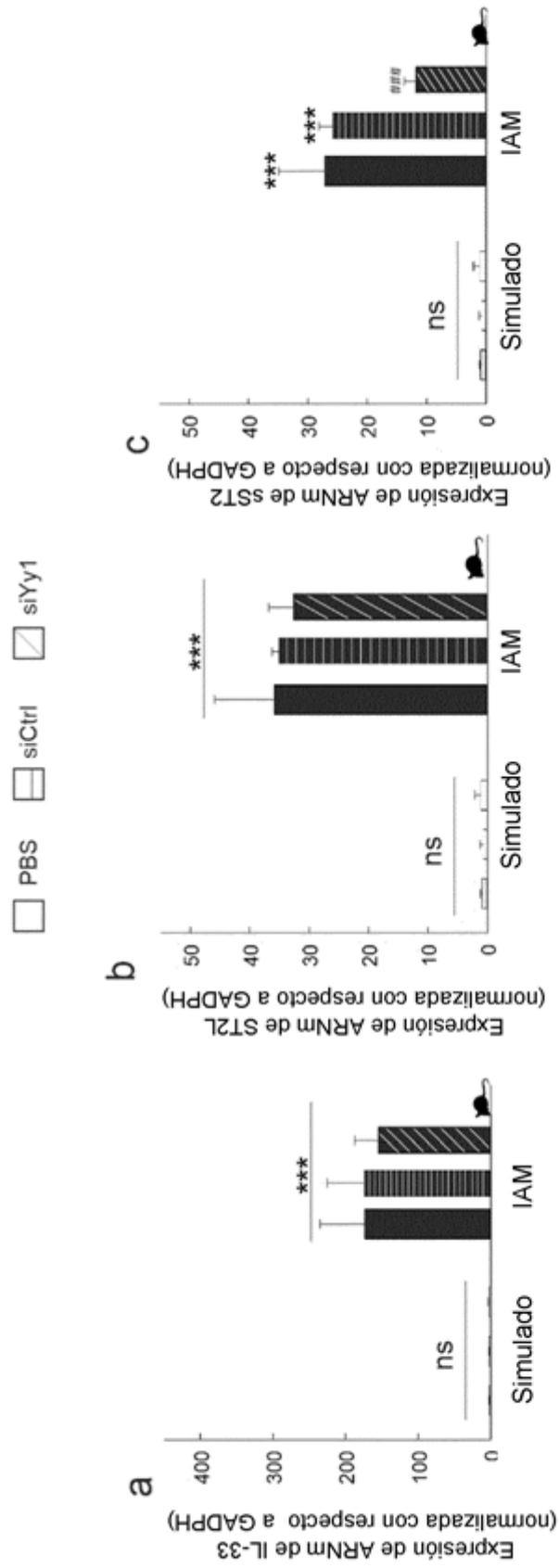


Fig. 8

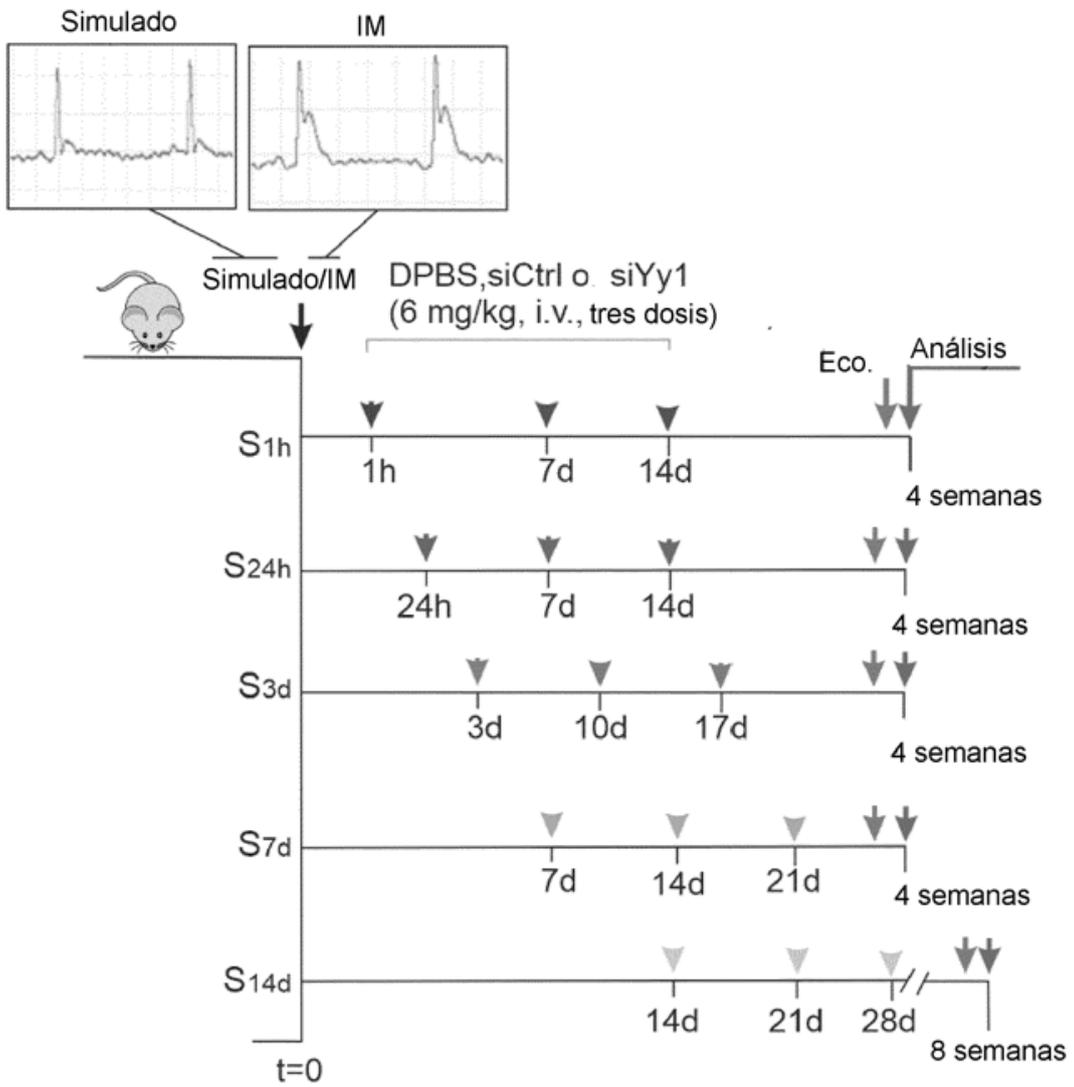


Fig. 9

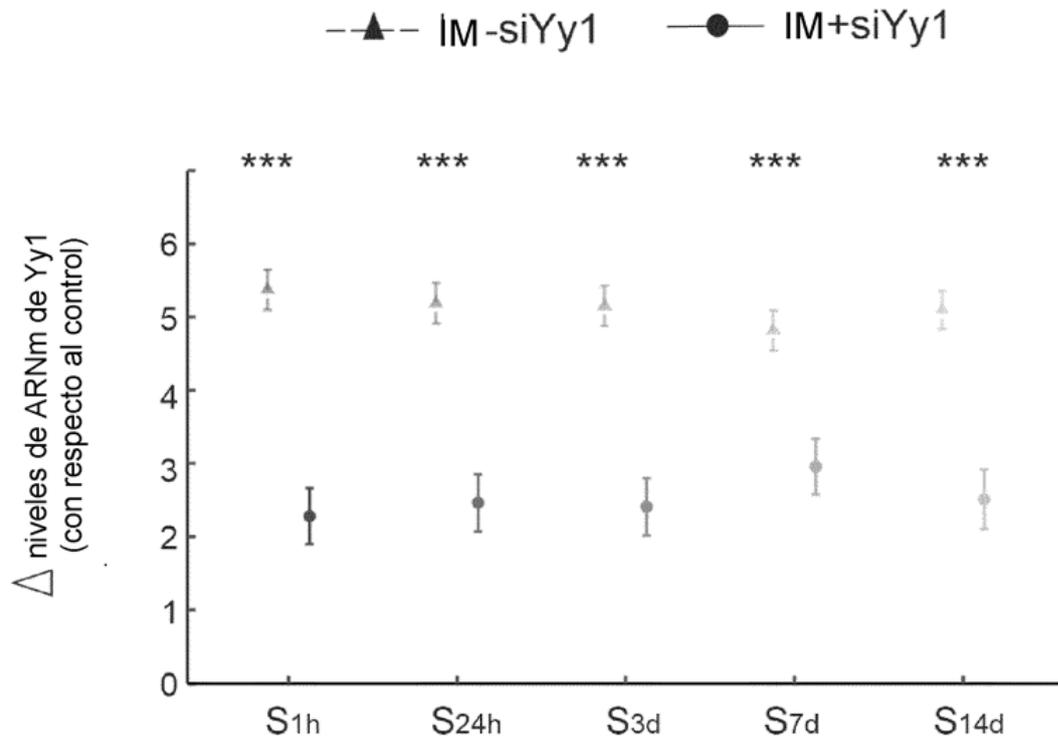


Fig. 10

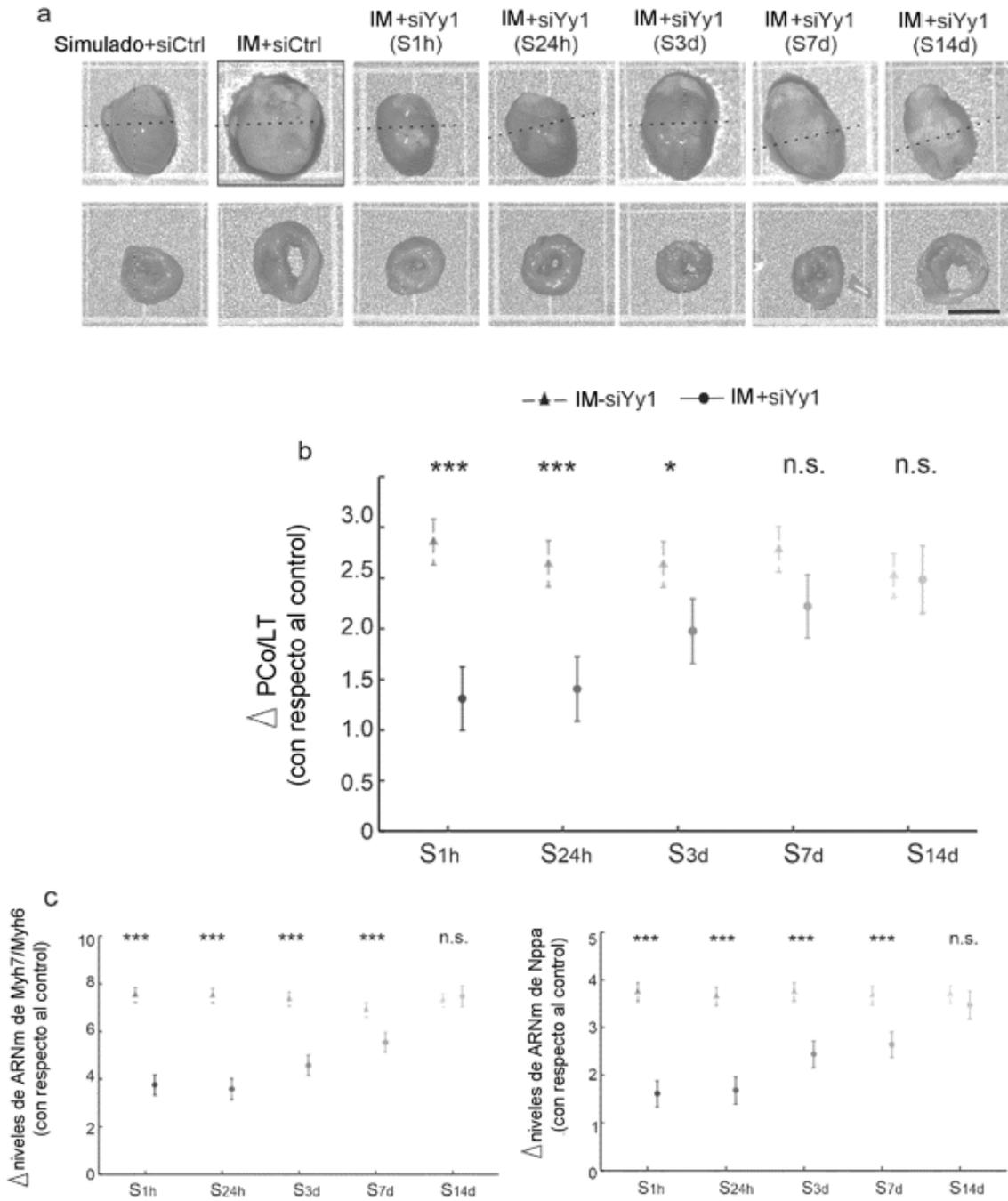


Fig. 11

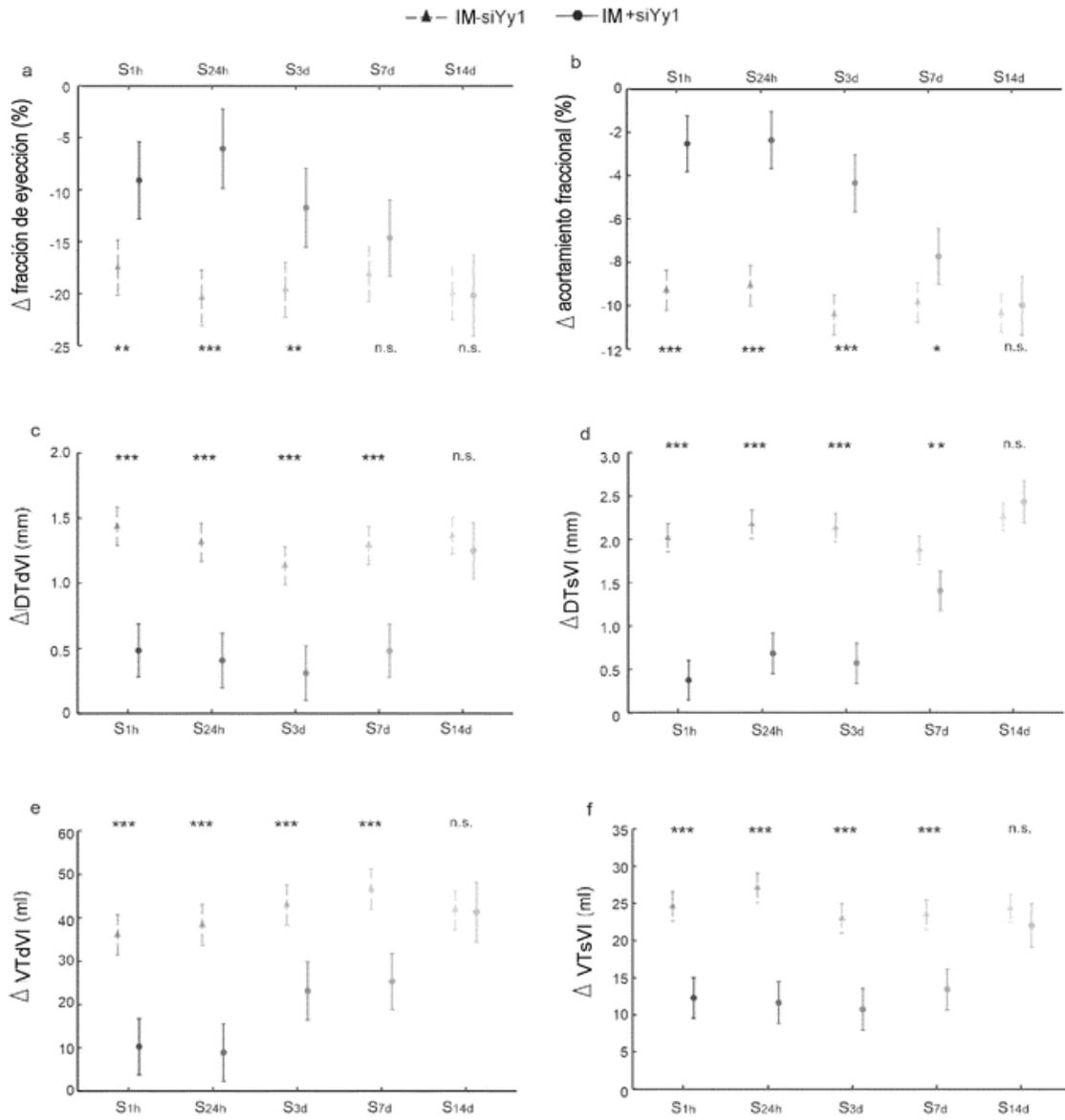


Fig. 12

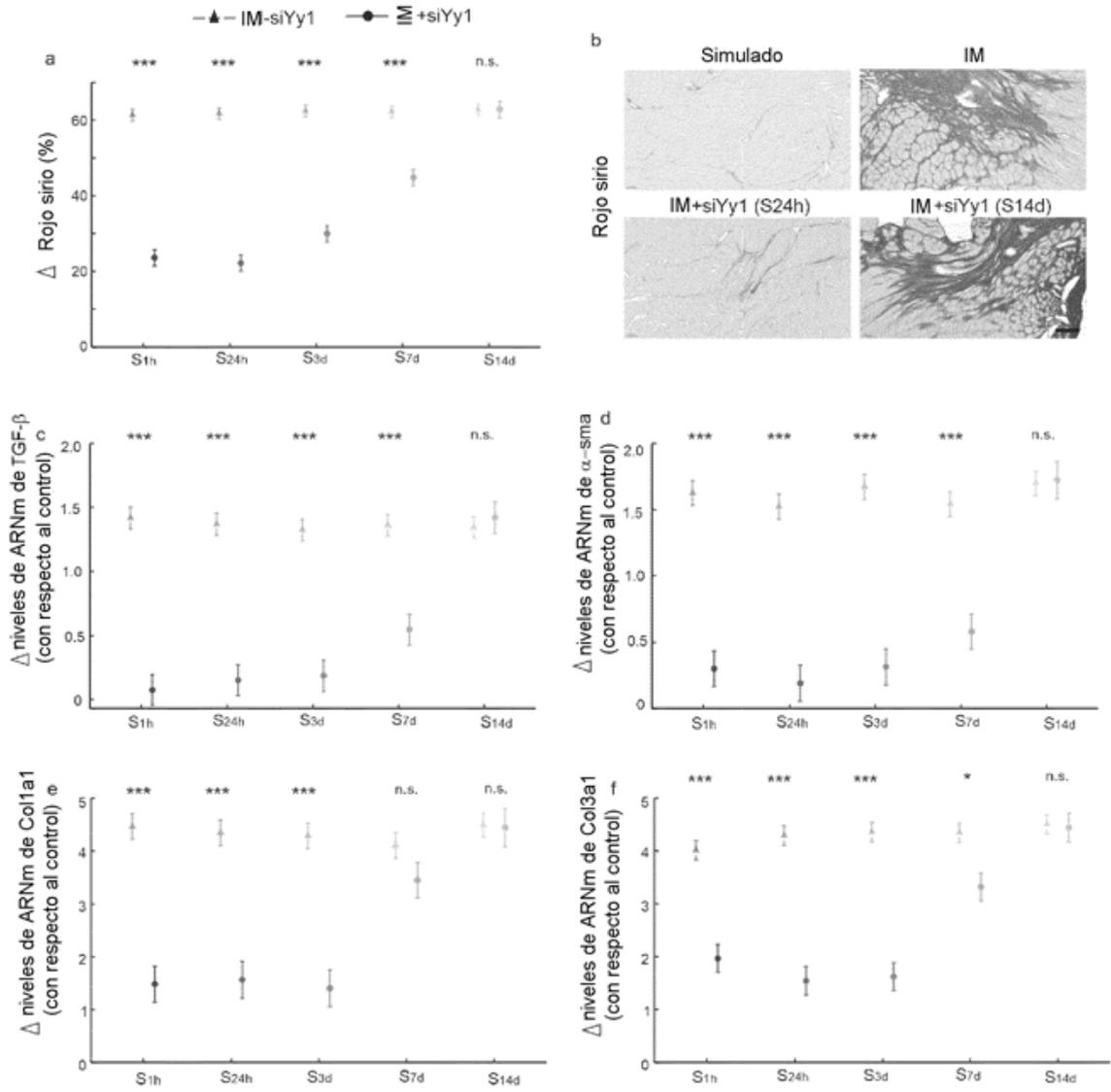


Fig. 13

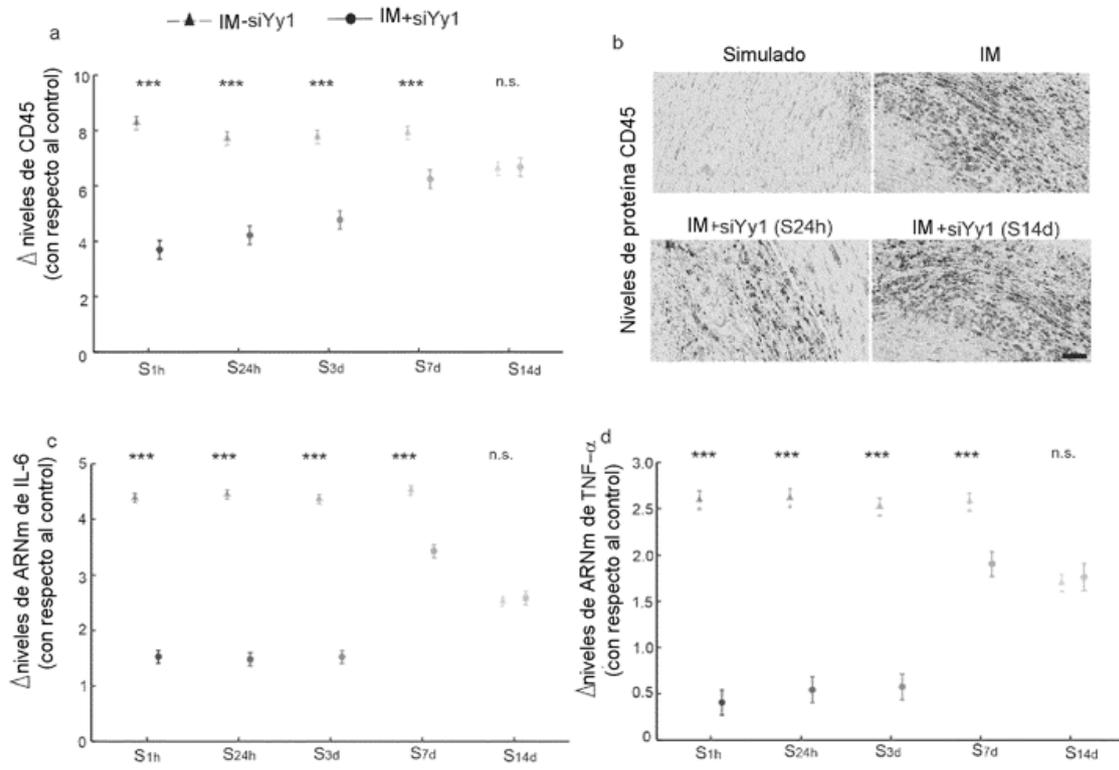


Fig. 14

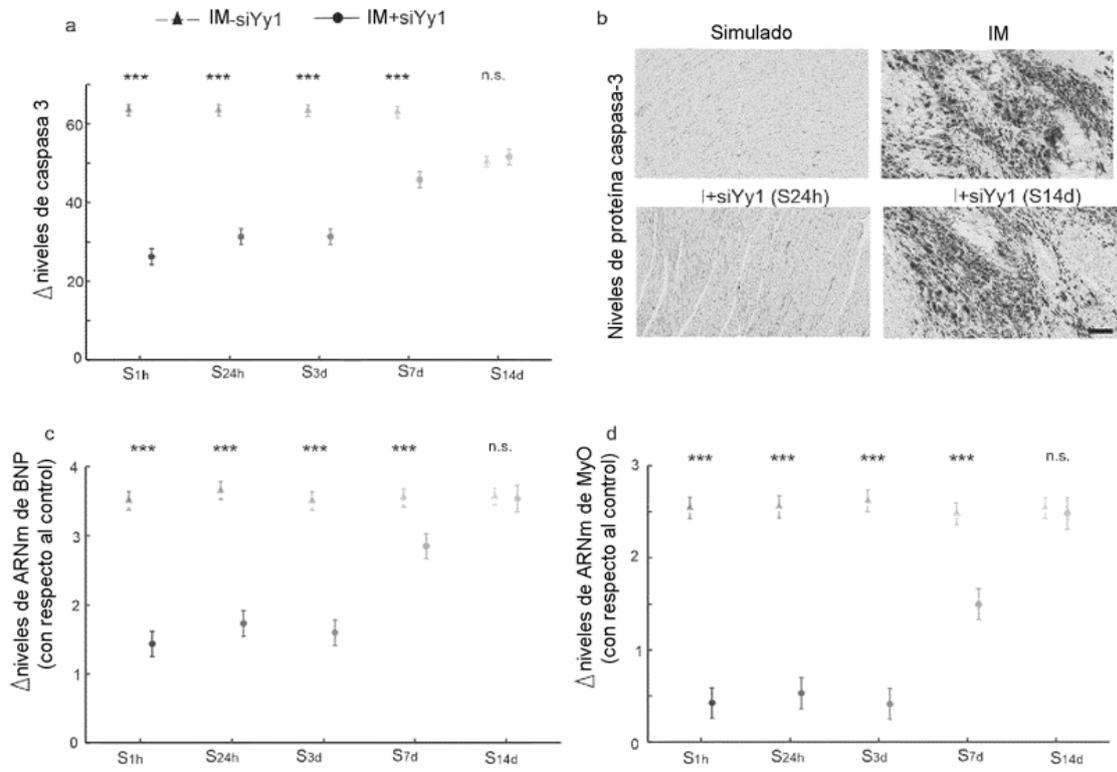


Fig. 15

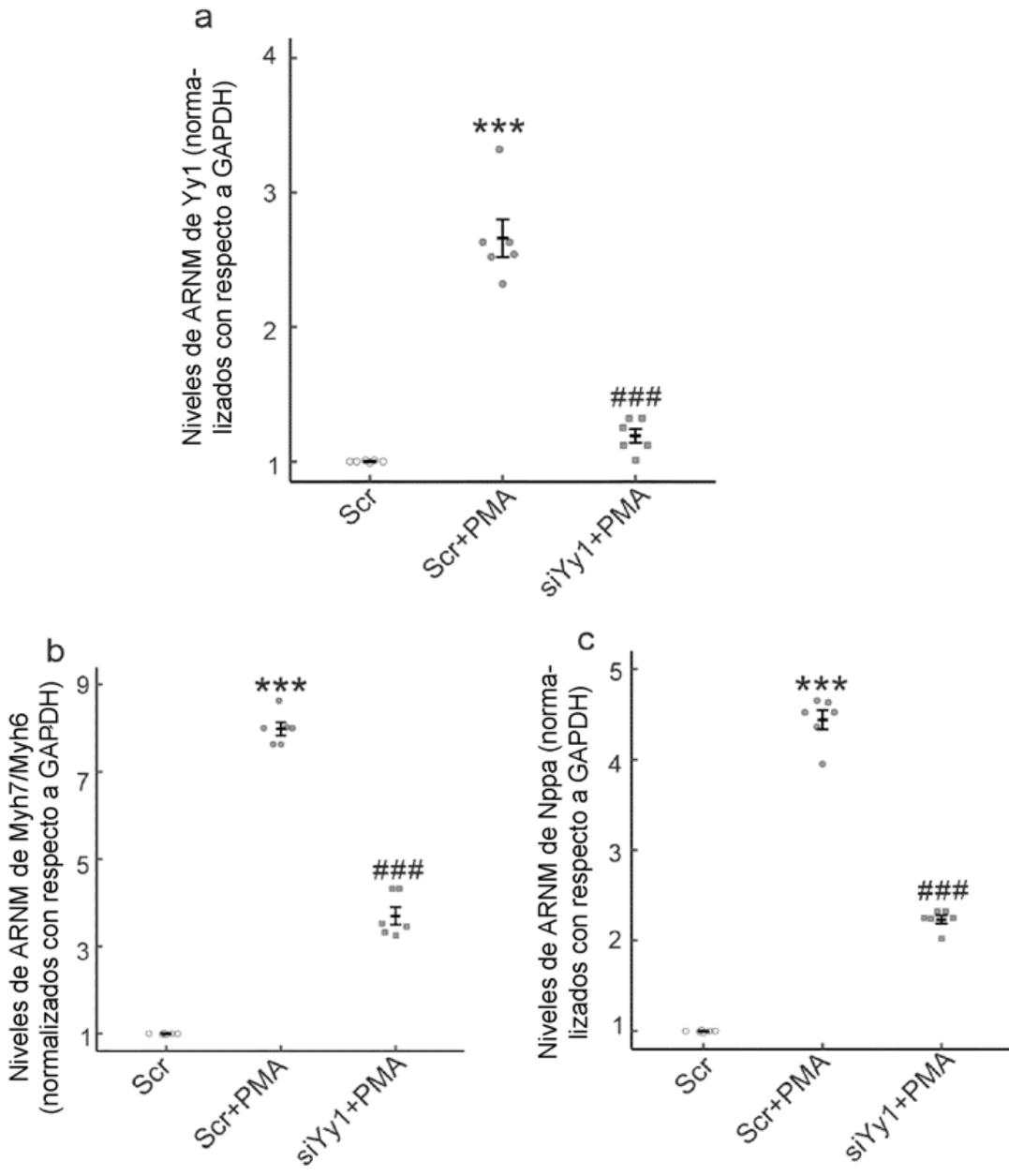


Fig. 16