

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 557**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2014 PCT/EP2014/060853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14191364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2014 E 14731558 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3003376**

54 Título: **Terapias para cardiomiopatía**

30 Prioridad:

25.05.2013 GB 201309444

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

20.07.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE DUBLIN, NATIONAL
UNIVERSITY OF IRELAND DUBLIN (100.0%)
Belfield
Dublin 4, IE**

72 Inventor/es:

**WATSON, CHRIS;
BAUGH, JOHN;
LEDWIDGE, MARK y
MCDONALD, KEN**

74 Agente/Representante:

DURÁN BENEJAM, María Del Carmen

ES 2 676 557 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

Terapias para cardiomiopatía

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a terapias y agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cardiomiopatías. En particular, la invención se refiere, pero no se limita, a terapias y agentes terapéuticos para uso en el tratamiento de cardiomiopatía hipertrófica.

10

Antecedentes de la invención

La definición estricta de cardiomiopatía es un trastorno del miocardio en el que el músculo cardíaco es estructural y funcionalmente anómalo. La gran mayoría de la cardiomiopatía es extrínseca (causas externas) y de éstas, la forma isquémica es la más común. La expresión "cardiomiopatía isquémica" por lo general se refiere a un miocardio remodelado e hipertrófico como resultado de una administración inadecuada de oxígeno al miocardio, siendo la enfermedad arterial coronaria la causa más común. Por lo tanto, la cardiomiopatía isquémica se puede contemplar como un primer subtipo de cardiomiopatía.

15

20

El término "cardiomiopatía" también se usa en ocasiones para describir de forma específica formas no isquémicas de cardiomiopatía, a menudo con causas intrínsecas/idiopáticas. Por lo tanto estas cardiomiopatías no isquémicas se pueden contemplar como un segundo subtipo de cardiomiopatía. Aunque estas enfermedades se pueden clasificar como no isquémicas, con las enfermedades de este tipo se puede producir sin embargo una hipoxia miocárdica relativa. La clasificación de estas formas a menudo es funcional/estructural. Muchas de las formas de cardiomiopatía no isquémica se asocian con anomalías de los genes que codifican las proteínas sarcoméricas, cuyos tipos más comunes son cardiomiopatía hipertrófica y cardiomiopatía dilatada, y en estas enfermedades se producen combinaciones de hipertrofia miocárdica y/o fibrosis ocurren. Otros tipos de cardiomiopatía no isquémica incluyen cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica y fibrosis endomiocárdica. Un breve resumen de estas enfermedades es el que sigue a continuación.

25

30

A menudo la cardiomiopatía hipertrófica (HCM) es hereditaria y se discute con más detalle a continuación. Los pacientes presentan disnea debido a disfunción diastólica, dolor de pecho, alteración diastólica de miocardio con hipertrofia, arritmias y presíncope/síncope debido a un rendimiento cardíaco inadecuado. La HCM se caracteriza por miocitos cardíacos desorganizados e hipertrofia del ventrículo izquierdo no explicada, a menudo debido a mutaciones en los genes que codifican proteínas sarcoméricas, tales como el gen de la cadena pesada de beta-miosina cardíaca, proteína C3 de unión a miosina, troponina y alfa-tropomiosina. Los pacientes con HCM se someten a una clasificación de riesgo usando pruebas de ejercicio regulares y monitorización de Holter, identificación sistemática familiar y tratamiento farmacológico, a menudo evitando el esfuerzo físico. Los indicadores de un alto riesgo de resultado precario tal como muerte súbita cardíaca incluyen diagnóstico a la edad < 30 años, síncope no explicado, antecedentes familiares de muerte cardíaca súbita temprana, paro cardíaco, arritmias ventriculares espontáneas, grosor del LV > 3 cm y respuesta anómala de BP en prueba de ejercicio. Los betabloqueantes y los bloqueadores de los canales de calcio no dihidropiridínicos tales como verapamilo se usan en el tratamiento para disminuir la frecuencia cardíaca, aunque el uso de bloqueadores de canales de calcio en pacientes con Cardiomiopatía Obstruktiva Hipertrófica ("HOOCM", un subtipo severo de HCM), insuficiencia cardíaca (HF) y bajas presiones arterial se debería hacer con precaución. Los agentes para la arritmia se pueden considerar para un alivio adicional de los síntomas. Los diuréticos se pueden considerar para pacientes con evidencia de sobrecarga de líquidos - pero con precaución, especialmente en pacientes con HOOCM. Hasta el momento no se han realizado ensayos aleatorios a gran escala que comparen la ablación septal con alcohol con la miectomía quirúrgica para alivio de síntomas en pacientes resistentes a fármacos con HCM y las directrices del Colegio Americano de Cardiología y la Sociedad Europea de Cardiología (ACC/ESC) recomiendan la miectomía quirúrgica como la opción de tratamiento primario, y la ablación con alcohol en pacientes con altos riesgos quirúrgicos.

35

40

45

50

La cardiomiopatía dilatada (DCM) se caracteriza por una fracción de eyección del LV < 45 por ciento con un aumento de la dimensión del ventrículo izquierdo (dilatado) del ventrículo izquierdo (LV). La DCM se presenta disnea, ortopnea, edema de tobillo y aumento de peso. Un pródromo viral puede estar presente. La DCM es hereditaria en un tercio de los casos (normalmente dominante autosómica); sin embargo, puede estar causada por miocarditis vírica aguda (normalmente enterovirus/adenovirus) que conduce a inflamación crónica, remodelación y disfunción ventricular. La supervivencia a cinco años para pacientes con DCM es de aproximadamente un 30 por ciento y características tales como regurgitación mitral o disfunción diastólica son marcadores de mal pronóstico.

55

60

Muchos factores predictivos de muerte súbita en disfunción del LV isquémica no son predictivos de DCM no isquémica. Un meta-análisis de cinco ensayos (1.854 pacientes con cardiomiopatía no isquémica) sugirió que la terapia con ICD reduce la mortalidad por todas las causas en comparación con la terapia médica (reducción relativa de riesgo - 31 por ciento, reducción absoluta del riesgo 2 por ciento al año).

65

Otras causas más raras de cardiomiopatía son arritmogénicas, restrictivas o no clasificadas. Algunos investigadores subclasifican la cardiomiopatía restrictiva (RCM) en primaria (endocarditis de Loeffler, fibrosis endomiocárdica) y secundaria (por ejemplo, causas infiltrantes: amiloidosis, sarcoidosis; trastornos de almacenamiento: hemocromatosis, trastorno por almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Fabry; post-radiación). La endocarditis de Loeffler está causada por miocarditis eosinofílica aguda con trombosis mural y engrosamiento fibrótico en el vértice de uno o ambos ventrículos. La fibrosis endomiocárdica es la forma crónica. El pronóstico depende de la etiología, pero generalmente no es bueno.

La cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica (ARVC) está causada por la sustitución fibro-grasa de miocitos del ventrículo derecho debido a apoptosis, inflamación o una causa genética (familiar hasta en la mitad normalmente con herencia dominante autosómica). Aunque la ARVC es poco común (1 en 5.000), se informa que tiene agrupaciones regionales en lugares tales como el norte de Italia y Grecia.

La cardiomiopatía no clasificada incluye no compactación del ventrículo izquierdo (LVNC) y cardiomiopatía de Takotsubo. La LVNC está causada por la detención embriogénica de la maduración normal del miocardio dando como resultado fibras miocárdicas no compactadas que se comunican con la cavidad del LV. La cardiomiopatía de Takotsubo afecta predominantemente a mujeres y surge de aumentos repentinos de catecolamina que causan vasoespasmo coronario y disfunción apical severa, en la parte media del LV.

Para completar la información, las cardiomiopatías secundarias que se pueden solapar con las formas de cardiomiopatía que se han descrito anteriormente incluyen causas de enfermedades de almacenamiento metabólico (por ejemplo, amiloidosis, hemocromatosis), causas inflamatorias (por ejemplo, enfermedad de Chagas), causas endocrinas (por ejemplo, cardiomiopatía diabética, hipertiroidismo, acromegalia), causas de toxicidad (por ejemplo, quimioterapia con antraciclina, alcohol), neuromuscular (por ejemplo, distrofia muscular) y enfermedades nutricionales (relacionadas con la obesidad). Estas pueden ser isquémicas o no isquémicas, heredadas o adquiridas (secundarias) en diversas combinaciones.

Como se observará fácilmente, la ontología de clasificación mencionada anteriormente no es más que una forma en la que se pueden ordenar las cardiomiopatías. Este es particularmente el caso en vista del hecho de que muchas cardiomiopatías tienen una naturaleza multifactorial, que hace difícil colocar cada cardiomiopatía en una clase separada. Las cardiomiopatías reconocidas de forma específica que se pueden solapar y/o pueden ser sinónimas con las formas de cardiomiopatía que se han descrito anteriormente incluyen: Displasia del ventrículo derecho arritmogénica (cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica); Parálisis auricular (cardiomiopatía auricular con bloqueo cardíaco); Cardiomiopatía cirrótica; Catarata congénita - cardiomiopatía hipertrófica - miopatía mitocondrial; Cardiomiopatía dilatada; Cardiomiopatía dilatada - hipogonadismo hipergonadotrópico; Cardiomiopatía dilatada con ataxia; Miopatía de inicio temprano con cardiomiopatía mortal; Encefalopatía - cardiomiopatía hipertrófica - enfermedad tubular renal; Cardiomiopatía dilatada familiar; Cardiomiopatía familiar dilatada con defecto de conducción debido a la mutación LMNA; Cardiomiopatía hipertrófica familiar; Cardiomiopatía hipertrófica familiar (Cardiomiopatía obstructiva hipertrófica familiar) displasia del ventrículo derecho arritmogénica familiar aislada (Cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica familiar aislada); Displasia del ventrículo derecho arritmogénica familiar aislada (Cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica familiar aislada); Displasia ventricular arritmogénica familiar aislada, forma biventricular (Cardiomiopatía ventricular arritmogénica familiar aislada, forma biventricular); Displasia ventricular arritmogénica familiar aislada, forma dominante parte izquierda (Cardiomiopatía ventricular arritmogénica familiar aislada, forma dominante parte izquierda); Displasia ventricular arritmogénica familiar aislada, forma dominante parte derecha (Cardiomiopatía ventricular arritmogénica familiar aislada, forma clásica); Displasia ventricular arritmogénica familiar aislada, forma dominante parte derecha (Cardiomiopatía ventricular arritmogénica familiar aislada, forma dominante parte derecha); Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada; Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada (Cardiomiopatía dilatada familiar o idiopática); Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada; Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada (Cardiomiopatía obstructiva hipertrófica familiar o idiopática); Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada (Cardiomiopatía obstructiva hipertrófica); Cardiomiopatía hipertrófica familiar aislada (Cardiomiopatía obstructiva hipertrófica primitiva); Cardiomiopatía restrictiva aislada familiar; Cardiomiopatía restrictiva aislada familiar (Cardiomiopatía restrictiva familiar o idiopática); Cardiomiopatía restrictiva familiar; Cardiomiopatía restrictiva familiar de tipo 1; Cardiomiopatía restrictiva familiar de tipo 2; Cardiomiopatía restrictiva familiar de tipo 3; Cardiomiopatía hipertrófica infantil mortal debida a deficiencia del complejo I mitocondrial; Cardiomiopatía hipertrófica infantil mortal debida a deficiencia del complejo I mitocondrial (Cardiomiopatía hipertrófica infantil mortal debida a deficiencia de NADH-CoQ reductasa); Cardiomiopatía hipertrófica infantil mortal debida a deficiencia del complejo I mitocondrial (Cardiomiopatía hipertrófica infantil mortal debida a deficiencia de NADH-CoQ reductasa); Trastorno de oxidación de ácidos grasos y cetogénesis con cardiomiopatía dilatada; Trastorno de oxidación de ácidos grasos y cetogénesis con cardiomiopatía hipertrófica; Enfermedad por almacenamiento de glucógeno con cardiomiopatía hipertrófica; Enfermedad por almacenamiento de glucógeno con cardiomiopatía hipertrófica (GSD con cardiomiopatía hipertrófica); Enfermedad por almacenamiento de glucógeno con cardiomiopatía hipertrófica (Glucogénesis con cardiomiopatía hipertrófica); Síndrome de corazón-mano, tipo esloveno (Enfermedad de conducción cardíaca - cardiomiopatía dilatada - braquidactilia); Cardiomiopatía histiocitoide; Cardiomiopatía histiocitoide (Cardiomiopatía infantil con cambio histiocitoide); Cardiomiopatía histiocitoide (Cardiomiopatía xantomatosa infantil); Cardiomiopatía histiocitoide (Cardiomiopatía oncocítica);

Cardiomiopatía hipertrófica; Cardiomiopatía hipertrófica (Cardiomiopatía hipertrófica obstructiva); Cardiomiopatía hipertrófica y enfermedad tubular renal debida a mutación de ADN mitocondrial; Cardiomiopatía hipertrófica y enfermedad tubular renal debida a mutación de ADN mitocondrial (Cardiomiopatía hipertrófica y enfermedad tubular renal debida a mutación de ADNmt); Cardiomiopatía hipertrófica debida a entrenamiento atlético intensivo; Síndrome de Leigh con cardiomiopatía; Síndrome de Leigh con cardiomiopatía (Cardiomiopatía con hipotonía debida a deficiencia de citocromo C oxidasa); Síndrome de Leigh con cardiomiopatía (Cardiomiopatía con miopatía debida a deficiencia de COX); Lipoatrofia con diabetes, pápulas leucomelanodérmicas, esteatosis hepática, y cardiomiopatía hipertrófica; Enfermedad lisosómica con cardiomiopatía hipertrófica; Enfermedad lisosómica con cardiomiopatía restrictiva; Cardiomiopatía y pérdida de audición heredada por vía materna; Cardiomiopatía y pérdida de audición heredada por vía materna (Cardiomiopatía heredada por vía materna y sordera); Cardiomiopatía y pérdida de audición heredada por vía materna (cardiomiopatía - pérdida de audición relacionada con ARNT-LYS); Cardiomiopatía hipertrófica mitocondrial heredada por vía materna; Microcefalia - cardiomiopatía; Enfermedad mitocondrial con cardiomiopatía dilatada; Enfermedad mitocondrial con cardiomiopatía hipertrófica; Cardiomiopatía hipertrófica mitocondrial con acidosis láctica debida deficiencia de MTO1; Enfermedad de Naxos (Queratosis palmoplantar con cardiomiopatía arritmogénica); Enfermedad de Naxos (Hiperqueratosis palmoplantar con cardiomiopatía arritmogénica); Enfermedad de Naxos (Queratodermia palmoplantar con cardiomiopatía arritmogénica); Enfermedad neuromuscular con cardiomiopatía dilatada; Cardiomiopatía dilatada no familiar; Cardiomiopatía hipertrófica no familiar; Enfermedad rara no familiar con cardiomiopatía dilatada; Cardiomiopatía restrictiva no familiar; Cardiomiopatía periparto; Cardiomiopatía periparto (Cardiomiopatía postparto); Pérdida de audición neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica; Pérdida de audición neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica (Sordera neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica); Pérdida de audición neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica (Pérdida de audición neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica); Pérdida de audición neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica (Sordera neurosensorial progresiva - cardiomiopatía hipertrófica); Cardiomiopatía restrictiva; Sordera neurosensorial con cardiomiopatía dilatada; Sordera neurosensorial con cardiomiopatía dilatada (Sordera neurosensorial con cardiomiopatía dilatada); Sordera neurosensorial con cardiomiopatía dilatada (Pérdida de audición neurosensorial con cardiomiopatía dilatada); Sordera neurosensorial con cardiomiopatía dilatada (Pérdida de audición neurosensorial con cardiomiopatía dilatada); Cardiomiopatía dilatada severa debido a mutación de lamina A/C; Cardiomiopatía dilatada grave debida a mutación de lamina A/C (Cardiomiopatía dilatada severa con o sin miopatía); Síndrome asociado con cardiomiopatía dilatada; Síndrome asociado con cardiomiopatía hipertrófica; Cardiomiopatía de Tako-Tsubo; Cardiomiopatía de Tako-Tsubo (Cardiomiopatía ampular); Cardiomiopatía de Tako-Tsubo (Cardiomiopatía del balonamiento); Cardiomiopatía de Tako-Tsubo (Cardiomiopatía inducida por estrés); Cardiomiopatía de Tako-Tsubo (Cardiomiopatía de Takotsubo); Cardiomiopatía amiloide familiar relacionada con transtirretina; Cardiomiopatía amiloide familiar relacionada con transtirretina (Cardiomiopatía ATTR); Cardiomiopatía amiloide familiar relacionada con transtirretina (Cardiomiopatía amiloide relacionada con TTR); Enfermedad renal tubular - cardiomiopatía; Cardiomiopatía sin clasificar; Síndrome de pelo lanoso-queratodermia palmoplantar-cardiomiopatía dilatada; Síndrome de pelo lanoso-queratodermia palmoplantar-cardiomiopatía dilatada (Síndrome de pelo lanoso-queratodermia palmoplantar-cardiomiopatía dilatada); Síndrome de pelo lanoso-queratodermia palmoplantar-cardiomiopatía dilatada (pelo lanoso - queratodermia palmoplantar - cardiomiopatía dilatada); y Síndrome de pelo lanoso-queratodermia palmoplantar-cardiomiopatía dilatada (Síndrome de pelo lanoso-hiperqueratosis palmoplantar-cardiomiopatía dilatada).

Volviendo ahora a la HCM con más detalle, esta enfermedad tiene una prevalencia de 1 de 500, que la hace más prevalente en general que una enfermedad huérfana. Sin embargo, es muy heterogénea no al menos en vista del hecho de que se puede describir como idiopática, familiar o adquirida.

Se acepta ampliamente que la mayoría de las formas de HCM están causadas por mutaciones en uno de los genes que en la actualidad se sabe que codifican diferentes componentes del sarcómero. Normalmente se caracteriza por hipertrofia del ventrículo izquierdo (LVH) en ausencia de predisposición a afecciones cardíacas (por ejemplo, estenosis aórtica) o afecciones cardiovasculares (por ejemplo, hipertensión de larga evolución). Las manifestaciones clínicas de la HCM varían de HF asintomática a progresiva hasta muerte súbita cardíaca y varían de individuo a individuo, incluso dentro de la misma familia. Los síntomas comunes incluyen dificultad para respirar (en particular con esfuerzo), dolor de pecho, palpitaciones, ortostasis, presíncope y síncope. Con mucha frecuencia, la LVH de la HCM se hace aparente durante la adolescencia o la adultez temprana, aunque también se puede desarrollar de forma tardía en la vida, en la infancia o en la infancia.

El diagnóstico de HCM se establece con la mayor frecuencia cuando la ecocardiografía en dos dimensiones detecta LVH en un ventrículo no dilatado; también se puede establecer mediante hallazgos histopatológicos patognomónicos en tejido cardíaco. La HCM familiar (FHCM) sin afectación multisistémica se diagnostica mediante antecedentes familiares y ensayos genéticos moleculares de cualquiera de los 14 genes que en la actualidad se sabe que codifican diferentes componentes del sarcómero para los que el ensayo está clínicamente disponible. La FHCM causada por mutación en al menos uno de los genes que en la actualidad se sabe que codifica diferentes componentes del sarcómero se hereda de manera dominante autosómica.

La HCM ha sido revisada ampliamente por Cirino y Ho (2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1768/>) y lo siguiente se ha adaptado a partir de su trabajo. Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento médico de la

disfunción diastólica con beta bloqueadores y bloqueadores de los canales de calcio no dihidropiridínicos se usa junto con el tratamiento médico o quirúrgico de la obstrucción del flujo ventricular, si existe; también es importante el logro y mantenimiento del ritmo sinusal en los pacientes con fibrilación auricular; los desfibriladores cardioversores implantables (ICD) se usan en supervivientes de paro cardíaco y en aquellos con alto riesgo de paro cardíaco; si se desarrolla HF, puede ser necesario un tratamiento médico para la HF y la consideración del trasplante cardíaco. La prevención de complicaciones secundarias puede implicar anticoagulación en aquellos con fibrilación auricular persistente o paroxística para reducir el riesgo de tromboembolia y profilaxis con antibióticos cuando sea necesario. Durante el embarazo de una mujer con HCM, se requiere la atención de un cardiólogo experimentado y un obstetra especialista.

La supervisión y el tratamiento en desarrollo también implican una nueva evaluación del riesgo de muerte súbita cardíaca (SCD) aproximadamente una vez al año o con más frecuencia en función de los hallazgos clínicos. Se aconseja a los pacientes que eviten el entrenamiento competitivo de resistencia, actividades de estallido (por ejemplo, carreras de velocidad), ejercicio isométrico intenso (por ejemplo, levantamiento de pesas con mucho peso), deshidratación, hipovolemia (es decir, uso de diuréticos con precaución) y medicamentos que disminuyen la postcarga (por ejemplo, inhibidores de ACE, bloqueadores de receptores de angiotensina y otros vasodilatadores directos).

Hasta la fecha, se sabe que la HCM está causada por una mutación en uno de los 14 genes (véase la Tabla 1) que codifican diferentes componentes del sarcómero. Se han identificado más de 900 mutaciones individuales.

Tabla 1 - genes implicados en FHCM (Cirino and Ho (2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1768/>)

Nombre del Locus	Símbolo del Gen	Nombre de la Proteína	% de HCM Causada por Mutaciones en Este Gen	Otros fenotipos de trastorno causados por mutación en el mismo gen
CMH1	<i>MYH7</i>	Cadena pesada de miosina, isoforma beta de músculo cardíaco	40 %	Cardiomiopatía Dilatada (DCM),
CMH4	<i>MYBPC3</i>	Proteína C de unión a miosina, tipo cardíaco	40 %	DCM
CMH2	<i>TNNT2</i>	Troponina T, músculo cardíaco	5 %	DCM
CMH7	<i>TNNI3</i>	Troponina I, músculo cardíaco	5 %	DCM, cardiomiopatía
CMH3	<i>TPM1</i>	Cadena alfa de Tropomiosina 1	2 %	DCM
CMH10	<i>MYL2</i>	Cadena ligera 2 reguladora de miosina, isoforma de músculo ventricular/cardíaco	Desconocido	
CMH8	<i>MYL3</i>	Polipéptido 3 ligero de miosina,	1 %	
	<i>ACTC1</i>	Actina, músculo cardíaco alfa 1	Desconocido	DCM
	<i>CSRP3</i>	Proteína 3 rica en cisteína y glicina, proteína LIM muscular	Desconocido	
CMH9	<i>TTN</i>	Titina		DCM, miopatía distal Udd DCM
	<i>ACTN2</i>	Alfa-actinina-2	Desconocido	
	<i>MYH6</i>	Cadena pesada de miosina, isoforma alfa de músculo cardíaco		DCM
	<i>TCAP</i>	Telotonina		distrofia muscular de extremidades-cintura, DCM
Otros genes potencialmente implicados en HCM				
	<i>TNNC1</i>	Troponina C, músculos esquelético lento y cardíaco	Desconocido	DCM

Cirino y Ho describen el sarcómero como la unidad de contracción básica del miocito cardiaco. La contracción cardíaca se produce cuando el calcio se une al complejo de troponina (subunidades I, C, y T) y α -tropomiosina y libera la inhibición de interacciones de miosina-actina por la troponina I. La actividad de ATPasa y la unión de la actina por la dirección de la miosina globular da como resultado cambios conformacionales que doblan el cuello (también denominado brazo de palanca) y dan como resultado el deslizamiento de filamentos gruesos en relación a filamentos delgados (flechas sólidas) para generar el golpe de fuerza.

Como se ha indicado anteriormente, la HCM es la enfermedad cardiaca hereditaria más común con una prevalencia estimada en 1 de 500. Los informes sugieren que está causada por mutaciones dominantes autosómicas en las proteínas sarcoméricas cardíacas (FHCM) en un 60 % de los casos. Dentro de la FHCM, los genes que están implicados con más frecuencia son la isoforma beta de músculo cardiaco de cadena pesada de miosina (MYH7) y la proteína C de unión a miosina cardiaca (MYBPC3). Varios estudios sugieren que las mutaciones MYBPC3 están asociadas con hasta un 40 % de los casos de FHCM (véase la Tabla 1). Por consiguiente, la prevalencia de FHCM relacionada con MYBPC3 se puede mantener en > 1 de 2000.

De acuerdo con estudios recientes que examinan la FHCM asociada con MYBPC3, hay una presentación clínica muy variada. Esta enfermedad tiende a producirse en edades avanzadas y tiene un pronóstico más benigno en comparación con la FHCM asociada con otras mutaciones de proteína sarcomérica tales como MYH7. Esto se ha usado para sugerir la identificación sistemática y periódica de familias con anomalías de MYBPC3. Mediante la determinación de la expresión clínica, penetrancia y resultados de enfermedad en una gran población base de pacientes y parientes con mutaciones en MYBPC3, estos estudios demostraron una heterogeneidad notable con penetrancia incompleta, relacionada con la edad y específica de género (Cardiac Myosin Binding Protein-C Mutations in Families With Hypertrophic Cardiomyopathy: Disease Expression in Relation to Age, Gender, and Long Term Outcome Stephen P. Page, Stavros Kounas, *et al.*, *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5; 156-166). Estos estudios concluyeron que la expresión de la enfermedad (clínica) es heterogénea y no está relacionada con el tipo de mutación o mutación específica, que la penetrancia de la enfermedad es incompleta en promedio durante la vida del portador y que la penetrancia de la enfermedad es mayor en hombres que en mujeres. Por consiguiente, dado que ni el tipo de mutación (por ejemplo, sin sentido, con cambio de sentido, etc.) ni la mutación específica parecían predecir un fenotipo clínico particular en estos estudios, y dado que se observó diversidad fenotípica notable en familias que compartían mutaciones idénticas, se puede sugerir que los mecanismos epigenéticos (que se producen con frecuencia en genes con alta capacidad de mutación) pueden desempeñar un papel en el fenotipo adquirido de FHCM asociada con MYBPC3.

Existen más de 1.000 mutaciones causantes identificadas en 20 sarcómeros y genes relacionados con miofilamentos asociados con HCM y - como se ha indicado anteriormente - más de 900 asociadas con 14 genes en el sarcómero. Las mutaciones genéticas que se producen con más frecuencia están asociadas con MYBPC3. La densidad elevada de mutaciones encontradas en genes asociados con HCM puede sugerir que los mecanismos que estimulan el aumento de mutabilidad desempeñan un papel en la prevalencia de la enfermedad.

La metilación de ADN es una modificación epigenética que implica la adición de grupos metilo a los restos de cisteína ya incorporados en secuencias de ADN, formando 5-metilcitosina (5MeC). Esto puede prevenir por vía física la unión al factor de transcripción o puede reducir el acceso a través de condensación de cromatina local, con ambos procesos dando como resultado represión genética. La metilación de ADN está regulada por una familia de enzimas ADN metiltransferasa (DNMT), una de las cuales, DNMT1, metila preferentemente el ADN hemimetilado y es necesaria para mantener el patrón de metilación del genoma en células hijas durante la división celular. Tanto DNMT3A como DNMT3B son enzimas de metilación *de novo*, y son responsables del establecimiento de los patrones de metilación inicial del genoma durante el desarrollo, y su expresión vuelve a emerger en patologías. La desregulación de este proceso se ha estudiado ampliamente en cáncer.

La metilación de ADN diferencial de sitios de CpG en dos isoformas de MYBPC se ha evaluado en estudios que también evaluaron si el nivel de metilación es específico del gen y está posiblemente implicado con la mutabilidad genética (Meurs y Kuan (Differential methylation of CpG sites in two isoforms of myosin binding protein C, an important hypertrophic cardiomyopathy gene. *Environ Mol Mutagen.* Mar de 2011; 52 (2): 161-4). Estos estudios también evaluaron la Metilación de CpG dentro de las regiones exónicas de las isoformas de músculo cardiaco (MYBPC3) y esquelético (MYBPC2) del gen de proteína C de unión a miosina. En el caso de MYBPC2, no hay mutaciones conocidas que conduzcan al desarrollo de FHCM. Se demostró que aún que el número medio de CpGs era similar en las dos proteínas, el nivel de metilación medio de CpG era significativamente más elevado en MYBPC3 que en MYBPC2 ($P < 0,0001$) lo que sugiere que puede haber una implicación epigenética en el aumento de la mutabilidad genética.

Esta hipótesis ha sido apoyada por otros estudios. Por ejemplo, en un estudio, un aumento significativo del número de islas CpG metiladas se identificó en hipertrofia cardiaca fisiológica murina (37626500 con respecto a 24996299, $P = 0,02$) asociado con 741 promotores ventilados de forma diferente. De estos, 634 estaban hipermetilados y 107 estaban hipometilados. Los datos de metilación de ADN del promotor se integraron con los perfiles de expresión genética, y se descubrió que 142 presentaban alteración tanto de los patrones de metilación de ADN niveles de expresión. El análisis de ontología genética de estos genes desde la una sobrerrepresentación de las categorías

genéticas implicadas en el proceso basado en filamento de actina, organización del citoesqueleto y muerte celular programada (todos con $P < 0,001$). Otro estudio indicaba que había metilación en todos los restos de citosina dentro de dinucleótidos de CpG encontrados en los exones 8, 9, y en el intrón 8 del gen de troponina T cardiaca (cTNT) en sujetos con FHCM. En trabajo que reconoce que los mecanismos epigenéticos tales como microARN y modificación de histona son crucialmente responsables de la expresión genética desregulada en HF, un estudio adicional evaluó la metilación de ADN en este entorno. Se estudiaron explantes del ventrículo izquierdo (LV) cardiomiopático en estadio terminal isquémico e idiopática o de pacientes que se habían sometido a trasplante cardiaco de los que se formaron perfiles en comparación con un control normal. Usando un análisis preliminar con chip de inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP-chip), a continuación se validaron los loci de metilación diferencial con PCR de bisulfito-(BS) y secuenciación de alto rendimiento. Se encontró que una gran población de islas CpG (CGIs) y promotores genéticos están hipometilados de forma más significativa corazones cardiomiopáticos en estadio terminal. Este estudio también identificó 3 loci genéticos relacionados con la angiogénesis que estaban metilados de forma diferencial (ARHGAP24, PECAM y AMOTL2). La hipometilación del gen 2 similar a angiomotina (AMOTL2) y la hipermetilación de la región promotora en la posición 5' en el gen de la molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales (PECAM1) condujo a una disminución de la expresión de ambos, mientras que la hipermetilación dentro del cuerpo genético de la proteína 24 activante de Rho GTPasa (ARHGAP24) favorecía su expresión. La RT-PCR, cuantitativa encontró que la expresión de estos genes se diferenciaba de forma significativa entre corazones con CM y de control normales ($p < 0,01$). Había una correlación entre metilación y expresión diferencial del gen correspondiente. Se ha observado que esto proporciona la primera evidencia de una diferencia en el estado de metilación entre corazones cardiomiopáticos humanos y controles.

Un estudio posterior demostró perfiles epigenómicos globales en cardiomiopatía humana. La metilación de ADN y los mapas de H3K36me3 se generaron a partir de corazones humanos, sus perfiles se caracterizaron y se encontró que la metilación de ADN se diferencia entre los corazones con cardiomiopatía en estadio terminal y los de control en islas CpG y en regiones de cuerpos genéticos. Una disminución significativa de la metilación del promotor genético global también se correlacionaron con genes que estaban regulados de forma positiva en cardiomiopatía pero no con genes que estaban regulados de forma negativa, lo que sugiere que la desmetilación conduce a un aumento de la expresión del gen correspondiente y la regulación negativa de genes en cardiomiopatía se produce independientemente de la metilación del promotor.

De posible relevancia para este estudio es otro estudio en el que los hallazgos combinados de cardiomiocitos de aurícula de murino HL1 tratados con TNF- α que presentaban una disminución de la expresión de Atp2a2, aumento de la metilación de CpG del promotor de los genes, y niveles elevados de la ADN (citosina-5-)-metiltransferasa 1 (Dnmt1) - sugieren que la metilación desempeña un papel importante en la regulación de la transcripción negativa de Atp2a2.

Se sabe que MYBPC3 está hipermetilado, tiene mutaciones asociadas con HCM y cuando su expresión disminuye la hipertrofia empeora. Sin embargo, para otro gen implicado en HCM, ACTA1, el aumento de la expresión está asociado con HCM (no se conocen mutaciones de ACTA1 que estén asociadas con HCM, pero si se conocen están variaciones en su nivel de expresión).

La fibrosis de miocardio puede ser un elemento distintivo característico de HCM y se cree que contribuye al riesgo más elevado de muerte cardiaca súbita, arritmias y disfunción cardiaca. El patrón de fibrosis está asociado con un aumento de los patrones de fibrosis intersticial y focal y se puede visualizar usando formación de imágenes cardiacas por resonancia magnética (MRI) con aumento de gadolinio.

Sin embargo, la fibrosis y la hipertrofia son procesos separados pero relacionados en el síndrome de HCM. Por ejemplo, se ha mostrado que un tercio de los pacientes con HCM presentan solamente hipertrofia y no tienen evidencia de fibrosis en la MRI cardiaca con aumento de gadolinio tardío. Sin embargo, el mismo estudio también mostró que la HCM con fibrosis está asociada con un aumento > 3 veces en muerte cardiovascular, admisión cardiovascular no planificada, taquicardia ventricular sostenida o fibrilación ventricular, o descarga de cardioversor-desfibrilador implantable apropiado. Además, dentro de la población base de pacientes con fibrosis, un alcance de fibrosis más elevado estaba asociado con peores resultados.

La causa de la fibrosis miocárdica en HCM no es clara. Algunos informes la atribuyen a la muerte prematura de miocitos y a la expansión de la matriz intersticial como resultado del estrés creado por mutaciones de sarcómero dando como resultado fibrosis que recaen corazones con HCM. Otro trabajo ha asociado las mutaciones con otros cambios patológicos tales como isquemia - por ejemplo flujo coronario comprometido debido a hipertrofia, disfunción microvascular, aumento del estrés oxidativo, y aumento de las demandas metabólicas impuestas por propiedades bien físicas anómalas de sarcómeros mutantes dando como resultado un desequilibrio de la demanda y suministro de oxígeno. Esto puede crear un medio isquémico que contribuya adicionalmente al ciclo de la muerte prematura de miocitos y a la aparición de fibrosis focal en HCM.

Los datos recientes en modelos de ratón de HCM han mostrado que las mutaciones de gen de sarcómero activan señales proliferativas y profibróticas en células no miocíticas de corazones de ratón con HCM dando como resultado un aumento de los niveles de proteínas profibróticas que incluyen TGF β que da como resultado fibrosis.

Sin embargo, algunos trabajos con animales también han mostrado que un estado profibrótico ya está presente en modelos animales cuando posteriormente desarrollan hipertrofia cardiaca antes de que los hallazgos histológicos cardiacos sean anómalos. Este trabajo está apoyado en la actualidad en pacientes humanos por trabajos recientes que han confirmado la frecuente coexistencia de fibrosis e hipertrofia y señales tempranas de fibrosis miocárdica antes de que la hipertrofia clínica sea evidente. Concluyen que los niveles elevados de PICP en suero indicaron un aumento de la síntesis de colágeno miocárdico en vehículos de mutación de sarcómero sin enfermedad manifiesta y que este estado profibrótico precedió al desarrollo de hipertrofia o fibrosis del ventrículo izquierdo visible en la MRI. Además, mientras que los estudios de MRI mostraron una potenciación tardía de gadolinio, que indica fibrosis miocárdica, en un 71 % de los sujetos con cardiomiopatía hipertrófica manifiesta, por el contrario no había ninguna en los vehículos de mutación sin hipertrofia del ventrículo izquierdo.

Por último, este trabajo reciente muestra que el patrón y la historia natural de fibrosis y la disfunción cardiaca asociada con las dos mutaciones más frecuentes asociadas con HCM (MYBPC3 y MYH7) son diferentes. En este trabajo que compara pacientes con mutaciones de MYBPC3 y mutaciones de MYH7, pero sin evidencia de HCM, los marcadores de fibrosis miocárdica, (niveles de PICP) y función diastólica (velocidades diastólicas) fueron peores en los pacientes con mutación de MYH7. Además, en aquellos pacientes con mutaciones de MYBPC3 con HCM, la edad de inicio de la hipertrofia fue posterior, el LVMI fue menor, y la función diastólica fue mejor que la de los pacientes con mutaciones de MYH7. Estos datos sugieren que las mutaciones de MYH7 desencadenan una fibrosis y una remodelación miocárdica más temprana/más extensa que las mutaciones de MYBPC3.

En conclusión: [1] aunque la fibrosis miocárdica y la hipertrofia a menudo coexisten en pacientes con HCM, son características fisiopatológicas distintivas de la enfermedad y en un tercio de pacientes consecutivos en una gran población base de HCM, la hipertrofia es evidente sin fibrosis; [2] esto subraya la coexistencia pero la naturaleza distinta de la hipertrofia y la fibrosis y el trabajo reciente en ratones con HCM demuestra que la expresión de miocitos de mutaciones de proteína de sarcómero altera la transcripción genética en células no miocíticas, induciendo la proliferación y expresión de moléculas profibróticas que producen remodelación patológica y fibrosis en HCM que depende de TGF β ; [3] la respuesta fibrótica a las mutaciones/anomalías del sarcómero parece que se produce temprano en la historia natural de la HCM y esto a menudo precede al desarrollo de la hipertrofia clínica; [4] aunque las mutaciones De MYBPC3 se asocian con HCM, incluyendo hipertrofia y fibrosis, existe una marcada heterogeneidad en la respuesta fenotípica a las mutaciones de este gen incluso dentro de las familias y esto se podría explicar por factores epigenéticos tales como hipermetilación; [5] basándose en ciertos estudios, se sabe que MYBPC3 se asocia con hipermetilación y esto es coherente con una alta frecuencia de mutaciones genéticas asociadas con HCM; [6] el miocardio hipertrófico en HCM se encuentra en un estado de hipoxia relativa y esto puede tener implicaciones importantes para la fisiopatología y la historia natural de la enfermedad.

Con respecto a las terapias epigenéticas, existen fármacos epigenéticos desarrollados con éxito, pero en su mayoría se aplican al cáncer y a enfermedades hematológicas. Estas incluyen (pero no se limitan a): agentes de hipometilación, tales como 5-azacitidina (denominada 5-aza o azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (denominada 2'desoxi, 5azaDC, o dectiabina) zebularina; inhibidores de histona desacetilasa tales como ácido hidroxámico suberoilánilida; e inhibidores de metilación de histona tales como 3-Desazanoplanocino.

Un agente de hipometilación es uno que inhibe la metilación de ADN, y a menudo se hace referencia a él como un agente de desmetilación o un inhibidor de metilación de ADN. Aunque los términos se usan indistintamente en la técnica, al menos teóricamente es posible que la hipometilación/desmetilación también pueda tener lugar por mecanismos distintos a la inhibición por metilación de ADN. Los inhibidores de la metilación de ADN (por ejemplo, pero no limitados a, 5-aza, 2'desoxi y zebularina) funcionan impidiendo el establecimiento de nuevos patrones de metilación en el ADN recién sintetizado durante el ciclo celular. Con cada división celular, el patrón de metilación de la hebra precursora se copia a la nueva hebra hija sintetizadora durante la fase S de la célula en división. Las enzimas que regulan este proceso son las ADN metiltransferasas (DNMT). Las DNMT mantienen la integridad del patrón de metilación del genoma dentro de cada célula. Los inhibidores de la metilación de ADN previenen o inhiben este proceso, de modo que a medida que las células se dividen, gradualmente pierden su patrón de metilación porque no se copian al ADN recién formado. Los inhibidores de metilación de ADN interactúan con las enzimas DNMT para conseguir este efecto. Por lo tanto, con continuas rondas de división celular, los genes se hipometilan gradualmente. Se pueden producir mecanismos de hipometilación adicionales mediante los cuales la desmetilación del ADN se produce fuera del ciclo celular.

Otros agentes de hipometilación que se deben indicar incluyen clofarabina y hidralazina. La clofarabina es un análogo de nucleósido de purina citotóxico que funciona principalmente induciendo apoptosis. Sin embargo, el compuesto se encuentran investigación en ensayos clínicos para su potencial efecto de hipometilación, y para uso en combinación con otros fármacos epigenéticos. Por lo tanto la clofarabina presenta de forma potenciar un modo doble de acción, y puede ser el primero de otros fármacos que se puede encontrar que ejercen un modo de acción epigenético secundario además de su efecto primario. En ensayos clínicos, este fármaco ha provocado respuestas en pacientes con (rr-)ALL con recaída y/o refractario tratado previamente, rr-AML, y síndrome de mielodisplasia de alto riesgo (MDS).

La hidralazina se desarrolló originalmente como un fármaco oral antihipertensivo. En la actualidad se está usando para tratar la hipertensión asociada con el embarazo y también se usa en combinación con nitratos en la gestión de HF. La hidralazina ha mostrado la capacidad de reactivar la expresión genética sucesora de tumores que se ha silenciado mediante hipermetilación, tanto *in vitro* como *in vivo*. El amplio uso previo de la hidralazina como un agente hipertensivo proporcionó datos de seguridad y tolerabilidad que conducen a probar ensayos en Fase I con pacientes con cáncer, confirmando su capacidad de desmetilación. En la actualidad se está evaluando en terapias de combinación con inhibidores de HDAC, quimioterapia, o radiación en ensayos en Fase III para tumores hematológicos y sólidos.

10 Bacanamwo *et al.*, *Circulation* (2007) vol 116, p 124 describe efectos de desmetilación de 5aza en genes asociados con hipertensión en un modelo de enfermedad hipertensiva por Angiotensina II, en el que se informa de un efecto antihipertensivo de 5aza por supuestos efectos de desmetilación en genes asociados con hipertensión tales como 11 β -HSD2 que se metiló en las arterias y riñones. Los autores llegan a la conclusión de que los datos "sugieren que la metilación de ADN desempeña un papel fundamental en la regulación coordinada de genes implicados en la patogénesis de hipertensión y remodelación vascular". Sin embargo, se sabe que la hipertensión aumenta la hipertrofia y la fibrosis y se sabe que algunas terapias antihipertensivas reducen la hipertrofia y la fibrosis. Los efectos que se describen en la presente invención no dependen de la hipertensión. Todos los genes se pueden metilar y no hay forma de predecirlo debido a los efectos antihipertensivos descritos en 11 β -HSD2, podría haber un efecto antihipertrófico de la 5aza independiente de hipertensión, ni un efecto beneficioso sobre, por ejemplo, la expresión de MYBPC3. Taylor *et al.*, *New England Journal of Medicine* (2004) vol 351 pp 2049 - 2057, describe los efectos antihipertróficos del dinitrato de isosorbida e hidralazina en combinación. La hidralazina es un agente antihipertensivo y los agentes antihipertensivos pueden reducir la hipertrofia y la fibrosis. El dinitrato de isosorbida tiene efectos farmacológicos independientes que contribuyen y que estimulan la reducción de BP y protegen con respecto a la isquemia miocárdica. No hay evidencias de que el efecto observado sobre la hipertrofia cardíaca esté relacionado con la hidralazina sola y también con efectos epigenéticos. El documento US A 2011/0319466 describe el uso de un inhibidor de HDAC (fenilbutirato) en combinación con un inhibidor de ACE para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, hipertrofia cardíaca y disfunción cardíaca. Esha *et al.*, *FASEB Journal* (2002) vol 16, pA491 describe un inhibidor de DNMT (5azaDC) para controlar la lesión isquémica en perros y una mejora en la función miocárdica después de la isquemia y "formación de cicatrices". No hay divulgación de un impacto en la hipertrofia. Además, la hipertrofia se puede producir en ausencia de isquemia y en el caso de hipertrofias cardíacas familiar, el controlador fisiopatológico no es la isquemia.

El documento US A 2012/0014962 describe los efectos antifibróticos de inhibidores de DNMT en modelos de fibrosis hepática y efectos antifibróticos del fármaco en fibrosis cardíaca y fibrosis endomiocárdica. Se conocen los efectos antifibróticos de los inhibidores de DNMT 5aza y 5azaDC, pero esto es bastante distinto de los efectos antihipertróficos que se describen en la presente solicitud. Kao *et al.*, *Laboratory Investigation* (2011) vol 91, pp 1291-1297 describe los efectos inhibidores de DNMT de la hidralazina en SERCa2. No hay evidencia de un efecto antihipertrófico independiente de SERCa2 y por lo tanto no es posible atribuir la reducción en hipertrofia cardíaca a la desmetilación del ADN, ni se podrían anticipar los efectos de 5aza en MYBPC3. El documento UA A 2009/0105168 describe el uso de un inhibidor de DNMT para la lesión isquémica y el tratamiento de hipertrofia y lesión después de isquémica, incluyendo cirugía cardíaca, apoplejía e infarto de miocardio. Como se ha mencionado anteriormente, la hipertrofia se puede producir en ausencia de isquemia. En el caso de hipertrofias cardíacas familiares, el controlador fisiopatológico a menudo no es la isquemia.

A menudo la fibrosis está implicada en la cardiomiopatía hipertrófica, pero hay un número sustancial de casos de HCM en los que no hay evidencia de fibrosis. Por lo tanto, lo que se puede usar para tratar la fibrosis no necesariamente se puede usar para tratar todos los casos de HCM.

Existe una necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de acción de las cardiomiopatías, y las posibles terapias que se pueden desarrollar para tratar las cardiomiopatías a la vista de los mecanismos de acción de ese tipo. También existe una necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de hipertrofia y/o fibrosis y cómo se pueden desarrollar posibles terapias a la vista de los mecanismos de acción de ese tipo.

Sumario de la Invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un agente de hipometilación para uso en la prevención o tratamiento de cardiomiopatía en el que el agente comprende 5-Azacidina o 5-Aza-2'-Desoxicidina. En un aspecto, el agente de hipometilación puede ser para uso en la prevención o tratamiento de cardiomiopatía no isquémica. En un aspecto el agente de hipometilación puede ser para uso en la prevención o tratamiento de una cardiomiopatía seleccionada entre el grupo que consiste en cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía restrictiva, cardiomiopatía del ventrículo derecho arritmogénica y fibrosis endomiocárdica. En un aspecto más la invención proporciona un agente de hipometilación para uso en la prevención o tratamiento de cardiomiopatía que es independiente de hipertensión.

En un aspecto, el agente de hipometilación puede tener el efecto de inhibir la expresión de la ADN metiltransferasa 3B.

5 En otro aspecto, se desvela un método para identificar un agente terapéutico capaz de prevenir o tratar la cardiomiopatía que comprende el ensayo de la capacidad de los supuestos agentes terapéuticos para hipometilar uno o más de los 14 genes que codifican componentes del sarcómero. En un aspecto, el método puede comprender el ensayo de la capacidad de los supuestos agentes terapéuticos para hipometilar la proteína C de unión a miosina cardiaca genética.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un agente capaz de reducir la expresión de, silenciar o degradar proteína HIF o ARNm de HIF para uso en la prevención o tratamiento de cardiomiopatía o fibrosis miocárdica, en la que el agente comprende el ARNsi de SEQ ID 31. Se desvela que un agente puede comprender un anticuerpo monoclonal, un péptido o una molécula pequeña capaz de interactuar con proteína HIF y prevenir su unión a elementos sensibles a hipoxia dentro de las regiones promotoras de genes de ADN metiltransferasa. Un agente también puede comprender un anticuerpo monoclonal, un péptido, un oligonucleótido o una molécula pequeña capaz de unirse a elementos sensibles a hipoxia dentro de las regiones promotoras de genes de ADN metiltransferasa, evitando de ese modo la unión de HIF a dichos elementos.

15 Un aspecto de la invención comprende profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los agentes comprendidos en la invención, o composiciones que comprenden cualquiera de dichos agentes y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Se desvela un método para identificar un agente terapéutico capaz de prevenir o tratar cardiomiopatía o fibrosis que comprende: someter a ensayo la capacidad de los supuestos agentes terapéuticos para reducir la expresión, degradar o silenciar proteína HIF o ARNm de HIF; y/o someter a ensayo la capacidad de los supuestos agentes terapéuticos para prevenir la unión de la proteína HIF a elementos sensibles a hipoxia dentro de las regiones promotoras de genes de ADN metiltransferasa.

25 Se desvela un método para prevenir o tratar cardiomiopatía o fibrosis miocárdica que comprende el uso de un agente de hipometilación como se ha descrito anteriormente.

30 En otro aspecto, la invención comprende el uso de un agente de hipometilación como se ha descrito anteriormente en un método para tratar o prevenir cardiomiopatía o fibrosis miocárdica.

35 Se desvela un método para prevenir o tratar hipertrofia cardiaca o fibrosis miocárdica que comprende el uso de un agente capaz de reducir la expresión de, silenciar o degradar proteína HIF o ARNm de HIF, o que comprende el uso de un agente capaz de prevenir la unión de la proteína HIF a elementos sensibles a hipoxia dentro de las regiones promotoras de genes de ADN metiltransferasa. Un aspecto adicional comprende el uso de un agente en un método de ese tipo. Los agentes de ese tipo pueden incluir, pero no son exclusivos para, anticuerpos monoclonales, péptidos (ya sea sintéticos o del reino animal), o inhibidores de molécula pequeña, que pueden interactuar con la proteína HIF evitando su unión a elementos sensibles a hipoxia (HRE) dentro de regiones promotoras de ADN metiltransferasa (DNMT). Los agentes adicionales de ese tipo pueden incluir, pero no son exclusivos para, agentes que se pueden unir a sitios de HRE en las regiones promotoras de DNMT evitando la unión de HIF. Los agentes de ese tipo pueden comprender anticuerpos monoclonales, péptidos (ya sea sintéticos o del reino animal), inhibidores de molécula pequeña, u oligonucleótidos.

45 Un aspecto adicional de la invención comprende un agente de acuerdo con cualquier aspecto de la invención para uso en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de cardiomiopatía, fibrosis miocárdica, u otras formas de fibrosis. Un aspecto de la invención comprende adicionalmente el método para preparar un medicamento de ese tipo, y el uso de un agente de este tipo en la preparación de un medicamento de ese tipo.

50 Previamente no se ha demostrado que 5-aza y 2'desoxi puedan modular la hipertrofia cardiaca en modelos de cardiomiopatía afectados, algo que los inventores han realizado en la actualidad. Aunque la fibrosis y la hipertrofia pueden coexistir, existen entidades de enfermedad separada y a menudo responden a estímulos comunes que explican la coexistencia. Además, se sabe que la fibrosis se produce como una consecuencia de la expresión anómala de la proteína sarcomérica y que este proceso anuncia un mal pronóstico.

55 Por lo tanto, la presente invención propone, en un aspecto, que la cardiomiopatía asociada con la expresión genética anómala de MYBPC3 que sucede mutaciones genéticas e hipermetilación da como resultado de hipertrofia, fibrosis y un entorno hipóxico. Por primera vez se demuestra que la desmetilación usando agentes tales como 5-aza y 2'desoxi aumenta la expresión de MYBPC3, y reduce la hipertrofia y la fibrosis en al menos uno de los siguientes cuatro mecanismos, o una combinación de los mismos:

- 60 (i) inhibición directa de hipermetilación de genes implicados en hipertrofia y/o miofibrosis;
- (ii) mejora de la respuesta de hipoxia relativa en el miocardio hipertrofico dando como resultado una reducción de la activación inducida de enzimas ADN metiltransferasa que pueden estimular una hipermetilación adicional y una activación de hipertrofia y/o fibrosis;
- 65 (iii) regulación positiva directa o indirecta de la expresión genética de MYBPC3, dando como resultado una reducción de la activación de una respuesta pro-fibrótica en células que no son miocitos;

(iv) alteración del estado de fosforilación de MYBPC3.

Aunque la hipertrofia y la fibrosis son procesos de enfermedad separados, la expresión anómala de genes sarcoméricos en el miocardio da como resultado hipertrofia, activa la fibrosis a través de mecanismos que se han descrito anteriormente y da como resultado un fenotipo de enfermedad más agresiva y peor pronóstico. Una intervención terapéutica que podría inhibir tanto la hipertrofia como/o la fibrosis mediante uno o una combinación de los mecanismos que se han descrito anteriormente podría tener un valor de importancia clínica y podría presentar oportunidades para gestionar e incluso quizá prevenir la morbilidad y la mortalidad debido a cardiomiopatía. Además, la implicación de la expresión de MYBPC3 y/o otras proteínas implicadas en la cardiomiopatía se extiende más allá de la hipertrofia y la fibrosis de miocardio. Las intervenciones terapéuticas que podrían inhibir enfermedades con patrones de metilación anómalos podrían tener un uso importante en un número de enfermedades crónicas de otros órganos tales como el ojo, tracto gastrointestinal, hígado, riñón y pulmón y enfermedades que también están asociadas con afecciones autoinmunes inflamatorias. La evidencia emergente es un ejemplo de este potencial particularmente en modelos de fibrosis pulmonar idiopática, lo que sugiere que los cambios de hipermetilación del ADN son reversibles con agentes de hipometilación tales como 5-aza y 2'desoxi dando como resultado supresión de enfermedad *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención prevé 5-aza, 2'desoxi y otros agentes de hipometilación para uso en la prevención y tratamiento de cardiomiopatías que se describen y se enumeran en la sección de antecedentes de la presente solicitud mencionada anteriormente. La presente invención también prevé los agentes de hipometilación de ese tipo para uso en la prevención y tratamiento de fibrosis miocárdica y otras formas de fibrosis. La presente invención prevé adicionalmente agentes terapéuticos capaces de tener un impacto en el mecanismo de interacción entre proteína HIF y el promotor del gen DNMT3b, que influye en los niveles de proteína HIF y/o que influye en los niveles de proteína DNMT3b para uso en el tratamiento de cardiomiopatías, fibrosis miocárdica y otras formas de fibrosis. Además adicionalmente, se desvela un método para tratar cardiomiopatía, fibrosis miocárdica u otra afección fibrótica usando cualquier agente comprendido en la presente invención. La identificación sistemática de posibles agentes terapéuticos basándose en la capacidad de los agentes para influir en la ruta de HIF-DNMT3b/HRE, o en su capacidad para influir en los niveles de metilación o patrones de expresión de genes implicados en HCM.

Breve descripción de las figuras

Las realizaciones de la invención se describirán, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La **Figura 1** representa resultados que ilustran que la hipoxia tisular está asociada con un aumento del perfil de expresión fibrótica.

La **Figura 2** representa los resultados de estudios de hipoxia *in vitro* utilizando una línea de células de fibroblastos cardíacos primarios humanos (HCF)

La **Figura 3** representa los resultados de estudios de metilación de ADN llevados a cabo para determinar si los efectos pro-fibróticos de la hipoxia estaban asociados con cambios epigenéticos dentro de las células.

La **Figura 4** representa los resultados de una investigación en el mecanismo por el que la hipoxia regula la expresión de DNMT3B.

La **Figura 5** representa los resultados del tratamiento de células HCF con el compuesto de estabilización de HIF-1 α DMOG en normoxia

La **Figura 6** representa resultados que ilustran que la reducción mediada por ARNsi en DNMT3B (siDNMT3B) dio como resultado una reducción de los niveles de expresión de las proteínas pro-fibróticas ASMA y Colágeno 1.

La **Figura 7** representa resultados que ilustran que el tratamiento con 5aza invierte el impacto pro-fibrótico de la hipoxia.

Las **Figuras 8-11** representan el efecto del tratamiento con 5AZA en parámetros ecocardiográficos. La fracción de eyección (EF) estaba aumentada de forma significativa en SHR-5AZA en comparación con SHR-V. Se observó una significativa reducción de la hipertrofia cardíaca. En tratamiento con 5AZA redujo el índice de demás del ventrículo izquierdo (LVMI) y el diámetro del tabique interventricular. En SHR-V se observó disfunción diastólica, tal como se mide mediante E primo (E') y ésta aumentaba de forma significativa con tratamiento con 5AZA. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

La **Figura 12** representa el efecto del tratamiento con 5AZA en el contenido de colágeno dentro del corazón. El análisis de hidroxiprolina se realizó para evaluar el colágeno total dentro del miocardio de animales SHR-V y SHR-5AZA. En animales SHR-5AZA se detectó una reducción significativa de la deposición de colágeno. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. * p < 0,05.

Las **Figuras 13-15** representan el efecto del tratamiento con 5AZA en el colágeno perivascular. El análisis digital de los cortes desveló una disminución significativa del colágeno perivascular en SHR-5AZA en comparación con SHR-V. Se muestran las imágenes representativas de tejido teñido con rojo Picrosirius de un animal. La tinción de colágeno aparece en color rosa/rojo. Se genera una imagen aumentada después de cuantificación digital de píxel positivo, destacando los píxeles negativos como píxeles de color azul y píxel positivo como cualquiera de color amarillo, naranja o rojo. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. * p < 0,05.

La **Figura 16** representa el efecto del tratamiento con 5AZA en área de miocitos *in vivo*. El análisis digital del área de miocitos de secciones de tejido cardíaco tenido con el hematoxilina y eosina desveló una disminución

significativa en el área celular animales SHR tratados con 5AZA en comparación con los animales SHR-V de control. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. *** $p < 0,001$

Las **Figuras 17 y 18** representan el efecto del tratamiento con 5AZA en niveles de expresión cardiaca de MYBP-C y ACTA1. Los niveles de expresión genética de MYBP-C y ACTA1 se evaluaron usando PCR en tiempo real cuantitativa en el tejido cardiaco de SHR-V y SHR-AZA. El análisis desvela que el tratamiento de animales SHR con 5AZA dio como resultado un aumento significativo de 4 veces en MYBP-C y ACTA1. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Las **Figuras 19-22** representan el efecto del tratamiento con 5AZA y 5AZA_DC en los niveles de expresión de mioblastos cardiacos de MYBP-C y ACTA1 *in vitro*. Los niveles de expresión genética de MYBP-C y ACTA1 se evaluaron usando PCR en tiempo real cuantitativa después de un tratamiento de 4 días con los agentes de desmetilación de ADN 5AZA y 5AZA_DC. El análisis desvela que el tratamiento con estos compuestos dio como resultado un aumento significativo tanto en MYBP-C como en ACTA1 cuando se usaba cualquiera de los dos inhibidores de metilación de ADN. Los resultados representan la media y el error estándar de la media. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La **Figura 23** es una ilustración del promotor de tipo silvestre de DNMT1 que muestra posiciones de cebador directo e inverso y un supuesto elemento de respuesta a hipoxia en las que se une la proteína HIF.

La **Figura 24** es una ilustración del promotor de DNMT1 que muestra posiciones de cebador directo e inverso y un supuesto elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en las que se une la proteína HIF, que porta mutaciones dirigidas al sitio en el HRE.

La **Figura 25** es una ilustración del promotor de tipo silvestre de DNMT3b que muestra posiciones de cebador directo e inverso y un supuesto elemento de respuesta a hipoxia en las que se une la proteína HIF.

La **Figura 26** es una ilustración del promotor de DNMT3b que muestra posiciones de cebador directo e inverso y un supuesto elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en las que se une la proteína HIF, que porta mutaciones dirigidas al sitio en el HRE.

Descripción detallada de las figuras

Ejemplo 1 - La hipoxia altera el perfil de metilación de ADN de fibroblastos cardiacos a través de regulación de HIF-1 α de DNMT3b

Métodos

Recogida y manipulación de tejido cardiaco humano

Las muestras de tejido humano se recogieron de los corazones de 26 pacientes estables sometidos a cirugía de derivación cardiaca opcional. De forma específica, se obtuvieron apéndices de la aurícula derecha adyacentes al sitio de canulación venosa en pacientes con injerto mediante derivación de la arteria coronaria ($n = 18$) o pacientes de reparación/sustitución de válvula ($n = 8$). Todos los sujetos dieron el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. El protocolo de estudio se realizó de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y recibió aprobación del comité ético local. Las muestras de tejido se recogieron al inicio de la cirugía y se dividieron inmediatamente en dos partes y se almacenaron en Reactivo de Estabilización de Tejido Allprotect (Qiagen) para posterior extracción de ARN, o se fijaron con formalina para tinción histológica.

Análisis de tejido cardiaco

Para análisis de expresión genética dentro de las muestras de miocardio, el tejido se interrumpió en primer lugar de forma individual y se homogeneizó usando un Instrumento de Dispersión Ultra Turrax T25 (IKA) antes de extraer el ARN usando el kit de extracción de ADN/ARN AllPrep (Qiagen), de acuerdo con las inserciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó usando SuperScript II RT (Invitrogen). Los cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) se diseñaron de modo que uno de cada par cebador estaba atravesando el límite de exón/exón para asegurar que solamente se amplificaba el ARNm maduro. Las secuencias de los cebadores específicos de genes usadas son las que siguen a continuación; ASMA, 5'-CGTTACTACTGCTGAGCGTGA-3' (directo) (SEQ ID 13), 5'-AACGTTTCATTTCCGATGGTG-3' (inverso) (SEQ ID 14); colágeno 1 α 1 (COL1A1), 5'-GAACGCGTGTCATCCCTGT-3' (directo) (SEQ ID 15), 5'-GAACGAGGTAGTCTTTTCAGCAACA-3' (inverso) (SEQ ID 16); colágeno 3 α 1 (COL3A1), 5'-AACACGCAAGGCTGTGAGACT-3' (directo) (SEQ ID 17), 5'-GAACGAGGTAGTCTTTTCAGCAACA-3' (inverso) (SEQ ID 18); anhidrasa carbónica IX (CAIX), 5'-AGGTCCCAGGACTGGACATA-3' (directo) (SEQ ID 19), 5'-GAGGGTGTGGAGCTGCTTAG-3' (inverso) (SEQ ID 20); DNMT1, 5'-TATCCGAGGAGGGCTACCTG-3' (directo) (SEQ ID 21), 5'-CACTTCCCGTTGTAAGCAT-3' (inverso) (SEQ ID 22); DNMT3A, 5'-AGCCCAAGGTCAAGGAGATT-3' (directo) (SEQ ID 23), 5'-GTTCTTGCAGTTTTGGCACA-3' (inverso) (SEQ ID 24); DNMT3B, 5'-TCAGGATGGGAAGGAGTTTG-3' (directo) (SEQ ID 25), 5'-CTGCAGAGACCTCGGAGAAC-3' (inverso) (SEQ ID 26). Las reacciones de QPCR se normalizaron mediante la amplificación del mismo ADNc con cebadores de beta-2-microglobulina (B2M), 5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3' (directo) (SEQ ID 27), 5'-CCAGTCCTTGCTGAAAGACA-3' (inverso) (SEQ ID 28).

La QPCR se realizó usando Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). La amplificación y la detección se realizaron usando el Sistema Mx3000P (Stratagene). El programa de ciclado de PCR consistía en 40

ciclos de tres etapas de 15 segundos/95 °C, 30 segundos/TA y 30 segundos/72 °C. Cada muestra se amplificó por duplicado. Para confirmar la especificidad de la señal, se realizó un programa de fusión después de completar los ciclos de PCR.

- 5 Para análisis de colágeno intersticial dentro de la muestra de miocardio, el tejido fijado con formalina se embebió en parafina y se tiñó usando un Kit de Tinción de tricromo de Masson (MTC) (Dako) optimizado para uso un sistema de tinción Artisan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Puntuación manual de biopsias cardiacas teñidas con MTC

- 10 Los portaobjetos del microscopio que contenían secciones con un grosor de 8 µM de tejido de miocardio teñido con MTC fueron examinadas por un patólogo (OSE) y se evaluaron de forma manual para el grado de fibrosis De una forma con ocultación. El MTC Para detección de colágeno de tipo I (fibrosis) se clasificó de 1 a 5, en el que 1 es la fibrosis intersticial menos severa y 5 es la fibrosis intersticial más severa. Solamente se tuvo en cuenta la fibrosis intersticial, en la que la fibrosis invasiva con reemplazo o comprensión láser podría haber tenido en cuenta. La fibrosis subendocárdica o epicárdica se excluyeron.

Análisis de imágenes automatizado de biopsias cardiacas teñidas con MTC

- 20 El sistema de Escáner de Cortes Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies) se usó para capturar las imágenes digitales de todo el corte con un objetivo de 20x. El análisis de imágenes automatizado se realizó usando Imagescope (Aperio). Un algoritmo de recuento de píxel positivo se usó para cuantificar de forma automática el área ocupada por colores de tinción dentro de cada imagen del corte escaneado. La calibración de los patrones de tinción individuales se realizó especificando el color necesario (intervalo de tonos y saturación) y límites para el intervalo de intensidad deseado. Los parámetros de entrada necesarios para cada dilución se basaron en el modelo de color de HSI (Tono, Saturación e Intensidad). Para detectar el color azul del colágeno con tinción de MTC, se especificó un valor de tono de 0,66. El valor equivalente para la detección de los miocitos teñidos de color rojo fue 0,0. El valor de la amplitud del tono por defecto de 0,5 se usó para permitir la inclusión de un intervalo moderado de sombras de color. Una fracción del volumen de colágeno se calculó basándose en el porcentaje de tinción de colágeno de color azul cuantificado dentro de una sección de tejido.

Cultivo de células primarias

- 35 Las células de fibroblastos cardiacos humanos primarios del ventrículo adulto (HCF) se adquirieron en ScienCell Research Laboratories. Las células primarias se obtuvieron a partir de una sola donante hembra de 20 años de edad. Hasta que se necesitaron para los experimentos, las células se cultivaron y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con un 10 % de Suero Bovino Fetal (Gibco) y antibióticos penicilina-estreptomina (Gibco) en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % mantenida a 37 °C.

Tratamientos de cultivo celular

- 40 Cuando estaba indicado, las células HCF se expusieron a un entorno de oxígeno al 1 % hasta 8 días usando una cámara hipóxica (Coy Laboratories). Los efectos de tratamiento con 10 ng/ml de TGFβ1 recombinante (R&D Systems) en estas condiciones se investigaron. Cuando era necesario, las células se trataron durante 24 horas con 45 1 mM del inhibidor de prolil hidroxilasa DMOG (Sigma) para simular hipoxia a través de la inducción de HIF en condiciones normóxicas.

Citometría de Flujo Cuantitativa

- 50 El impacto de la hipoxia en el perfil de metilación global de células HCF se investigó usando un anticuerpo específico para el ADN metilado y se cuantificó usando citometría de flujo. En resumen, las células HCF expuestas a cualquiera de normoxia (oxígeno al 21 %) o hipoxia (oxígeno al 1 %) se fijaron en solución de Carnoy antes de hidrólisis ácida de 60 minutos en HCl 1 M a 37 °C. Después de esta etapa de desnaturalización de ADN, las células se 55 inmunotifieron usando anticuerpo monoclonal anti-5'-metilcitosina (5MeC) (Eurogentec). Los controles negativos para IgG1 se usaron a la misma concentración que el anticuerpo primario. La inmunotinción secundaria se realizó usando un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con FITC (Dako). El análisis se realizó en un citómetro de flujo CYAN y los resultados se evaluaron usando el software SUMMIT (Dako).

Análisis de PCR en tiempo real cuantitativa de células HCF primarias

- 60 Los cambios en la expresión genética se midieron en células HCF usando QPCR como se ha descrito en la sección de métodos de análisis del tejido cardiaco humano. El aislamiento del ARN de las células se consiguió usando el Kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). Los datos de QPCR se analizaron usando el método delta delta CT.

65

Transferencia de Western

Se generaron lisados de proteína de célula completa usando Tampón de Lisis RIPA (Millipore), que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (Roche). Los extractos de proteína nuclear se obtuvieron usando los Reactivos de extracción Nuclear y Citoplasmática Ne-PeR, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce Biotechnology). Las concentraciones de proteína se determinaron usando el Kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce). Se desnaturalizaron 10-20 µg de lisados de proteína, se redujeron y se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida mediante SDS-PAGE antes de transferencia de transferencia sobre membranas (Millipore) de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P de 0,45 µm de tamaño de poro.

Las membranas se incubaron con tampón de bloqueo (TBS, Tween-20 al 0,25 %, suero al 0,1 % de especies en las que se produjo el anticuerpo secundario, y leche desnatada sin grasa al 5 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se sondearon durante una noche con cualquiera de factor 1α inducible (HIF-1 α) (Novus Biologicals) anti-ASMA (Sigma), anti-colágeno 1, anti-DNMT3B (Imgenex), o anti-hipoxia. La detección de la unión específica del anticuerpo primario se consiguió usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP, seguido de detección de señales con sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para verificar la carga igual se usó anti-alfa tubulina (Sigma).

Generación de una construcción de luciferasa de DNMT3B funcional y mutada

Un fragmento de 250 pb del promotor DNMT3B que contenía un supuesto elemento de respuesta a hipoxia (HRE) se clonó y se insertó en una construcción de luciferasa pGL3 (Promega), generando pDNMT3B-Luc. Además, una versión dotada de esta construcción se creó mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el Kit de Mutagénesis Dirigida al Sitio QuikChange II (Stratagene) para mutar supuesto HRE dentro del promotor DNMT3B. De forma específica, 2 bases de citosina dentro del supuesto HRE se sustituyeron con bases de adenina, generando pDNMT3B-ΔHRE-Luc. La secuenciación de ADN se usó para confirmar la presencia de la mutación. Cualquiera de pDNMT3B-Luc, pDNMT3B-ΔHRE-Luc, o vector vacío se transfectó posteriormente de forma transitoria en células Hela cells usando FUGENE HD (Promega). 24 horas después de la transfección, las células se expusieron a oxígeno al 1 % durante 24 horas, o se dejaron en normoxia (oxígeno al 21 %). El grado de actividad del promotor DNMT3B se cuantificó usando el ensayo de bioluminiscencia de luciferina/luciferasa después de lisis celular con Tampón de Lisis Pasivo (Promega) e incubando con Reactivo de Ensayo de Luciferasa (Promega), con actividad de luciferasa medida en un Luminómetro GloMax 20/20 (Promega).

Atenuación genética de DNMT3B dirigida por ARNsi

Las células HCF se transfectar un con cualquiera de siDNMT3B 20 nM de la secuencia 5'-AGAUGACGGAUGCCUAGAGUU-3' (SEQ ID 31), o ARNsi de control usando el reactivo de transfección DharmaFect4 (Dharmacon). Las células transfectadas se incubaron durante 12 horas antes de la exposición hipóxica de oxígeno al 1 % durante 4 días, o se dejaron en normoxia (oxígeno al 21 %). Para asegurar que los niveles de DNMT3B permanecían bajos durante el transcurso del tiempo, el ARNsi se suministró el día 2. El impacto de 10 ng/ml de TGFβ en estas condiciones experimentales también se investigó.

Desmetilación de ADN con 5-aza-2'-desoxicitidina

Para el análisis de desmetilación, las células se trataron con 1-5 µM de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-azadc; Sigma) hasta ocho días. El efecto de la inhibición de la metilación de ADN global en la expresión de proteína pro-fibrótica se evaluó usando transferencia de Western.

Resultados

La hipoxia de tejido de miocardio está asociada con un aumento del perfil de la expresión genética fibrótica

Después de la aprobación ética y el consentimiento informado del paciente, las muestras de tejido de la aurícula derecha humana se recogieron de los corazones de 26 pacientes sometidos a cirugía de derivación cardiaca opcional. El ARN se extrajo de este tejido y se usó para observar la relación entre hipoxia y producción de colágeno usando PCR en tiempo real cuantitativa. El grado de expresión de anhidrasa carbónica IX (CAIX) se usó como un marcador título validado para hipoxia tisular cardiaca (Holotnakova 2008). Se detectó una correlación positiva significativa entre la expresión del gen del colágeno 1 con CAIX ($r = 0,50$, $p < 0,01$), tal como se destaca en la Figura 1B. Los niveles de expresión genética relativa de CAIX también se correlacionaron de forma positiva con ASMA ($r = 0,42$, $p < 0,05$), Figura 1A. La expresión del gen del colágeno 3 no estaba asociada de forma significativa con cambios en la expresión de CAIX, aunque se observó una tendencia positiva ($r = 0,35$, $p = 0,07$).

La hipoxia tisular está asociada con un aumento de la deposición de colágeno

El grado de deposición de colágeno dentro de muestras de tejido de aurícula derecha se evaluó usando tinción con tricromo de Masson (MTC). Los ejemplos de tejido de miocardio teñido con MTC se pueden observar en la Figura

1D, con una tinción de color azul positiva para colágeno que es evidente, y miocitos que se tiñen de color rojo. Esta figura destaca ejemplos de fibrosis tanto intersticial como perivascular. Para analizar el contenido de colágeno dentro de los cortes teñidos con MTC se usaron dos métodos, en particular, cuantificación digital de píxel positivo (Figura 1E, un ejemplo en el que se ha aplicado el algoritmo de píxel positivo a un corte teñido con MTC generando una imagen ampliada que detalla los píxeles de color azul positivos que representan el colágeno) y puntuación manual con ocultación por un Patólogo (OSE) (Figura 1F, ejemplos de imágenes de puntuación manual que clasifican la deposición de colágeno entre 0-5).

La relación entre deposición de colágeno e hipoxia se evaluó dividiendo los cortes de MTC en dos grupos basándose en la mediana de los niveles de expresión genética de CAIX. Los resultados indican que el aumento de hipoxia tisular (expresión de CAIX más elevada) estaba asociado con un aumento significativo del colágeno ($p < 0,05$). Esto se observó en tanto en la cuantificación de píxel positivo analizados de forma digital automatizada del colágeno (Figura 1G) como en la puntuación manual con ocultación de tinción con MTC (Figura 1H).

Estos resultados indican que el grado de hipoxia dentro de tejido de miocardio está asociado con aumento de la expresión de los genes pro-fibróticos de ASMA y colágeno 1, así como un aumento de la deposición de la proteína de colágeno fibrilar. Dado que la fuente más probable del aumento del colágeno dentro del miocardio es el fibroblasto cardiaco, los inventores comenzaron estudios de hipoxia *in vitro* utilizando una línea de células de fibroblastos cardiacos primarios humanos (HCF). Las células HCF se cultivaron en cualquiera de oxígeno al 21 % u oxígeno al 1 % hasta 8 días. El cultivo de las células en oxígeno al 1 % estabilizó el HIF-1 α nuclear, lo que indica que las células estaban experimentando un entorno hipóxico, Figura 2A. En estas condiciones, se observó un aumento de la proliferación celular, otra característica patológica de fibrosis, Figura 2B. Usando PCR en tiempo real cuantitativa, un aumento significativo en la expresión genética tanto de ASMA como de colágeno 1 se detectó a los 4 y 8 días después de la hipoxia, en comparación con las células cultivadas en normoxia, Figura 2C y 2D. De forma interesante, los efectos pro-fibróticos del tratamiento con TGF β 1 aumentó en hipoxia. El tratamiento con TGF β 1 de HCF aumentó de forma significativa la expresión genética de ASMA y colágeno 1, y esto aumentaba adicionalmente si las células se exponían a 8 días de hipoxia, Figura 2E y 2F, respectivamente.

Para determinar si los efectos pro-fibróticos de la hipoxia estaban asociados con cambios epigenéticos dentro de las células HCF, se realizaron estudios de metilación de ADN. La metilación de ADN global se analizó en células expuestas a cualquiera de oxígeno al 21 %, oxígeno al 1 % durante 4 días, u oxígeno al 1 % durante 8 días. La aplicación del antibiótico dirigido al ADN metilado (anti-5MeC) y cuantificación usando citometría de flujo desveló una hipermetilación de ADN significativa en células hipóxicas ($p < 0,001$), Figura 3A. La confirmación de la tinción nuclear específica se consiguió usando microscopía de inmunofluorescencia, como se destaca en Figura 3B, con positividad anti-5MeC nuclear específica con respecto a un fondo de la contratinción nuclear de color azul DAPI. Para investigar los posibles mecanismos de hipermetilación de ADN inducida por hipoxia, las enzimas que catalizan este proceso se cuantificaron, en particular las ADN metiltransferasas (DNMT). Los niveles de expresión genética de DNMT1, la enzima principalmente responsable del mantenimiento del estado de metilación de las células hijas durante el ciclo celular, y la enzima de metilación *de novo*, DNMT3B, ambas estaban reguladas de forma positiva significativamente en un periodo tan temprano como 24 horas después de exposición a un entorno hipóxico al 1 % ($p < 0,001$), Figura 3C y 3E. Los niveles de la enzima de metilación *de novo*, DNMT3A no cambiaron, Figura 3D. El análisis de transferencia de Western de extractos nucleares hipóxicos que la proteína DNMT3B estaba regulada de forma positiva significativamente en hipoxia, lo que sugiere un posible papel en la regulación de los cambios globales en la metilación de ADN en hipoxia. De forma interesante, cuando se examinan las muestras de tejido cardiaco humano, los niveles de expresión genética de DNMT3B se correlacionaban de forma significativa con los niveles de CAIX ($r = 0,50$, $p < 0,001$), Figura 3F.

El mecanismo por el que la hipoxia regula la expresión de DNMT3B se exploró debido a la importancia potencial de esta enzima de metilación *de novo* dirigiendo cambios epigenéticos y susceptibilidad a fibrosis inducida por hipoxia. Después del análisis del promotor DNMT3B, se identificó una secuencia consenso para un sitio de unión a HIF-1 α , denominado elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Por consiguiente, este factor de transcripción mediado por hipoxia se planteaba como un candidato probable para la regulación de la expresión de DNMT3B. Para investigar esto adicionalmente, se generó una construcción de expresión de luciferasa que contenía el promotor DNMT3B humano (pDNMT3B-Luc). Se generó una construcción adicional en el que el sitio de unión a HIF-1 α estaba mutado (pDNMT3B- Δ HRE-Luc). Las células Hela se seleccionaron como un vehículo adecuado para investigar la regulación de hipoxia de DNMT3B ya que posee una ruta sensible a HIF-1 α funcional cuando se expone a un 1 % de hipoxia, tal como se indica mediante estabilización de proteína nuclear, Figura 4A. Las células Hela se utilizaron y se transfector con cualquiera de una construcción de luciferasa con una secuencia de promotor DNMT3B funcional o mutado con HRE. Las células se cultivaron en normoxia o un 1 % de hipoxia durante 24 horas, antes del análisis de actividades de luciferasa. Los resultados indican que la actividad del promotor DNMT3B aumenta 3 veces en hipoxia ($p < 0,05$), Figura 4B. La actividad del promotor DNMT3B mediada por hipoxia se atenuó de forma significativa cuando el sitio de unión a HIF-1 α se mutaba ($p < 0,001$), Figura 4C.

Como una evidencia de apoyo para un papel de HIF-1 α en la regulación de la expresión de DNMT3B en hipoxia, las células HCF se trataron con el compuesto DMOG para estabilización de HIF-1 α en normoxia. Como se destaca en la Figura 5A, el tratamiento con DMOG estabiliza la expresión de la proteína HIF-1 α nuclear, y también da como

resultado un aumento de la expresión de DNMT3B.

De forma colectiva, estos datos indican que la expresión de DNMT3B inducida por hipoxia en células de fibroblastos cardiacos está regulada al menos en parte por el factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1 α .

5 Basándose en estos resultados, se investigó el impacto anti-fibrótico potencial del bloqueo de cualquiera de la expresión de HIF-1 α o la expresión de DNMT3B inducida por hipoxia en los efectos pro-fibróticos de hipoxia en HCF. Estos experimentos se llevaron a cabo usando ARNs para prevenir/reducir la expresión de DNMT3B. Las células de fibroblastos cardiacos humanos se transfectaron usando cualquiera de siDNMT3B o ARNs de control. Las células
10 transfectadas se analizaron cuatro días después usando transferencia de Western para cuantificar los niveles celulares de colágeno 1 y actina alfa de músculo liso (ASMA). La atenuación de DNMT3B dirigida por ARNs dio como resultado una reducción significativa de la expresión de proteínas pro-fibróticas incluyendo ASMA y colágeno 1. La atenuación del ARNs de DNMT3B satisfactoria se confirmó por transferencia de Western (figura 6). Como un control de carga se utilizó la alfa tubulina.

15 El tratamiento de fibroblastos hipóxicos con el inhibidor de DNMT, 5-aza2dC, inhibió los efectos pro-fibróticos de TGF β , uno de los agonistas pro-fibróticos más potentes. 5-aza2dC redujo de forma significativa la expresión de ASMA, colágeno 1 y colágeno 3.

20 **Discusión**

El impacto perjudicial de la isquemia en la estructura y función del miocardio está bien reconocido. Las respuestas cardiacas iniciales a la hipoxia regional, normalmente después de infarto de miocardio o después de enfermedad arterial coronaria prolongada son protectores de órganos. Sin embargo, las lesiones o maladaptación crónicas para
25 los procesos pato fisiológicos pueden conducir a fibrosis cardiaca reactiva y con el tiempo puede conducir potencialmente a insuficiencia cardiaca 1, 3. La importancia de esto llevó a los investigadores a investigar la relación entre el tejido de miocardio hipóxico y la fibrosis, y a determinar si la hipoxia puede regular el fenotipo fibrótico en células de fibroblastos cardiacos. Los investigadores también buscaron examinar si cualquier respuesta pro-fibrótica inducida por hipoxia estaba relacionada con cambios en el perfil epigenético de las células de fibroblastos cardiacos

30 Después de la aprobación ética, los inventores tomaron muestras de tejido de la aurícula de 26 pacientes sometidos a cirugía de derivación cardiaca opcional, para cualquiera de injerto de derivación de la arteria coronaria o reparación/sustitución de la válvula mitral. Con esta cuestión, los inventores fueron capaces de observar la relación entre el grado de hipoxia tisular y fibrosis. El alcance de la hipoxia tisular del miocardio se evaluó mediante la
35 cuantificación de los niveles de expresión genética de la anhidrasa carbónica IX (CAIX). La CAIX está implicada en la adhesión celular y la regulación del pH con su expresión siendo controlada por el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1). La importancia de la CAIX dentro del miocardio hipóxico se ha mostrado en 8. Aunque HIF-1 es el mediador principal de las respuestas hipóxicas, su estabilidad fluctuante y su rápida degradación podrían haber mostrado que era difícil su estudio en muestras de tejidos recogidas en el momento de la cirugía, por lo tanto la CAIX se adoptó
40 con un marcador sustituto de hipoxia 9, 10. El análisis del tejido de miocardio destacó una correlación positiva significativa entre los niveles de expresión genética de CAIX tanto con colágeno 1 como con el marcador de diferenciación de miofibroblastos actina de músculo liso alfa (ASMA). La expresión genética del colágeno 3 no se correlacionaba de forma significativa, sin embargo se observó una relación estrecha. Para investigar esto adicionalmente, las muestras de tejido cardíaco se tiñeron con azul de tricromo de Masson (MTC) para cuantificar la
45 deposición de proteína de colágeno 1 fibrilar. La tinción de colágeno, con apariencia de color azul, se cuantificó usando dos enfoques, en particular análisis digital ha automatizado que implicaba la aplicación de un algoritmo de píxel positivo para cuantificar los píxeles de color azul dentro de secciones teñidas digitalizadas, y un método de puntuación con ocultación manual llevado a cabo mediante un patólogo clínico con experiencia (OSE). Usando el nivel de expresión media de CAIX, la población base de tejido se dividió en elementos de expresión de CAIX
50 elevados y bajos, que significan hipoxia tisular baja y elevada. Usando esta división, al grado de deposición de colágeno se comparó. Usando cuantificación automatizada, un nivel de expresión de colágeno significativamente más elevado se detectó en el tejido más hipóxico (CAIX elevada) y estos hallazgos se confirmaron mediante la puntuación manual con ocultación manual. Teniendo en cuenta los trabajos publicados anteriormente, estos hallazgos apoyan otros estudios exploran el impacto de hipoxia y fibrosis.

55 Dado que la fuente principal de aumento de ASMA y colágeno con el grado de hipoxia en tejido cardiaco es el fibroblasto, los inventores llevaron a cabo estudios *in vitro* utilizando la línea de células de fibroblasto cardiaco humano primarias (HCF) y sometiéndolas a hipoxia. Como apoyo a los hallazgos de tejido de miocardio, los inventores expusieron las células HCF a oxígeno al 1 % hasta 8 días. De manera importante, la proteína se estabilizó HIF-1 α por hipoxia en estas condiciones lo que demuestra que las células estaban experimentando un
60 entorno hipóxico. De manera interesante, los inventores también observaron un aumento de la proliferación celular en hipoxia, un proceso que podría contribuir a la carga fibrótica global *in vivo*. Además de un aumento en los números de fibroblastos dentro de enfermedades fibróticas (aumento de la proliferación o reducción de la apoptosis), un fenotipo profibrótico aumentado es un contribuyente importante a la enfermedad con diferenciación de niofibroblastos y aumento de la deposición de matriz extracelular. En el presente documento en la expresión del
65 colágeno 1 y ASMA en fibroblastos expuestos hipoxia a crónica (1 %, 8 días). De importante con estas células

también son más sensibles al tratamiento con TGFβ1 exógeno, presentando niveles más elevados de inducción de colágeno 1 y ASMA. Aunque estos resultados se limitan al estudio de colágeno, ASMA, y proliferación como indicadores de hipoxia crónica que generan un fenotipo pro-fibrótico, es probable que estas respuestas celulares impliquen múltiples atracciones en los perfiles de expresión genética. Como tal, los inventores buscaron determinar si estos hallazgos se producirán en un fondo de cambios epigenéticos, y de ese modo proporcionando una plataforma potencial para apoyar la fibrogénesis.

La importancia de la epigenética en la enfermedad cardiovascular cada vez está siendo más evidente, con algunos estudios que exploran el impacto de modificaciones de histona en la expresión genética en enfermedades. Sin embargo, los estudios sobre el impacto de las modificaciones epigenéticas en fibroblastos cardiacos son limitados, en particular las investigaciones en cambios de metilación de ADN y fenotipos pro-fibróticos posteriores. Dada la importancia de este fenómeno epigenético, y la bibliografía publicada anteriormente que destaca que la hipoxia puede influir en la maquinaria epigenética, incluyendo la metilación de ADN en cáncer este estudio pretendía examinar si la hipoxia puede alterar el perfil de metilación de ADN de células de fibroblastos cardiacos. Como se destaca en la Figura 3A, se encontró que la hipoxia crónica aumentaba de forma significativa la metilación de ADN global dentro del genoma de células de fibroblastos cardiacos. El análisis posterior de las enzimas ADN metiltransferasa (DNMT) desde lo que los genes tanto DNMT1 como DNMT3B y la expresión de proteínas aumentaban, lo que destaca un mecanismo potencial mediante el cual la hipoxia puede hipermetilar el ADN de células de fibroblastos cardiacos. De manera interesante, los niveles de expresión genética de DNMT1 y DNMT3B dentro del tejido cardiaco se correlacionaban de forma significativa con los niveles de CAIX, lo que destaca que la relación *in vitro* entre hipoxia y las DNMT también es evidente *in vivo*.

Durante la embriogénesis, los niveles de expresión de la enzima de metilación *de novo*, DNMT3B, son elevados cuando el patrón de metilación del genoma se está estableciendo. Aunque en el tejido adulto sano normal la expresión de DNMT3B normalmente es baja, sin embargo, un aumento de la expresión se ha visto implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer. Por lo tanto, su reaparición en patologías está causada probablemente por la metilación de ADN patológica y el silenciamiento genético anómalo. Por lo tanto se examinó si DNMT3B desempeñaba un papel directo en la mediada fibrosis cardiaca por hipoxia. Después del examen del promotor DNMT3B, se descubrió un supuesto elemento de respuesta a hipoxia (HRE), que proporciona un mecanismo mediante el cual la hipoxia puede dirigir su expresión a través del factor de transcripción HIF-1α. Para confirmar esta teoría se iniciaron tres enfoques; (I) un estudio que genera construcciones de luciferasa dirigidas por el promotor DNMT3B con cualquiera de un sitio de HRE funcional (pDNMT3B-Luc) o mutado (pDNMT3B-ΔHRE-Luc), (II) un estudio que examina el impacto de siHIF-1α, e (III) un estudio que usa el compuesto DMOG para estabilizar HIF-1α en normoxia. Tal como se muestra en la Figura 4, que las células Hela transfectadas con pDNMT3B-Luc presentan un aumento significativo de la expresión de luciferasa en comparación con células mantenidas en normoxia. De manera importante, cuando el sitio de HRE está mutado, hay un truncamiento significativo en la actividad de luciferasa. De manera importante, la regulación positiva de DNMT3B no está completamente anulada, lo que sugiere la posibilidad de que los factores de transcripción mediados por hipoxia pueden contribuir a la regulación de DNMT3B. Un papel para HIF-1α en la regulación de DNMT3B está apoyado adicionalmente por experimentos de ARNsi y DMOG, tal como se muestra en la Figura 5.

De forma colectiva, los tres enfoques confirman que la regulación positiva de DNMT3B mediada por hipoxia está regulada por el factor de transcripción inducible de hipoxia, HIF-1α. La importancia de esto se deriva mucho más allá del alcance de la fibrosis cardiaca y en el ámbito de otras enfermedades, incluida la biología del cáncer, y otras entidades fibróticas

Habiendo mostrado que la hipoxia está asociada con un fenotipo pro-fibrótico, que se produce frente a un fondo de cambios epigenéticos, incluyendo la regulación positiva de DNMT3B mediada por HIF-1α, se buscó determinar si la desmetilación global o un enfoque dirigido a DNMT3B podrían ser potencialmente anti-fibróticos. En primer lugar se investigó el impacto de la inversión de la metilación de ADN en respuestas celulares a la citoquina pro-fibrótica TGFβ. Usando el fármaco de desmetilación de ADN 5-aza-2-desoxicidina, se mostró que las respuestas a TGFβ se reducían de forma significativa. De forma específica se observó la reducción de la expresión de ASMA, colágeno 1 y colágeno 3. El impacto de la dirección directa de DNMT3B también se investigó usando ARNsi. Los resultados muestran que mediante la reducción o la supresión de la expresión de DNMT3B, los niveles de proteína de expresión de ASMA y colágeno 1 se reducen de forma significativa. De manera colectiva estos nuevos datos destacan el uso potencial de terapias mediadas por epigenética, de forma específica las que se dirigen a la metilación de ADN, para reducir, prevenir o revertir la fibrosis cardiaca.

Las características de los pacientes de los que se obtuvo el tejido cardiaco se resumen en la Tabla 2. La hipoxia tisular relativa se determinó basándose en los niveles de expresión genética media por arriba y por abajo del marcador hipoxico CA9.

Tabla 2 - Características de los pacientes de los que se obtuvo el tejido cardíaco. Los valores son la media \pm DT, mediana (percentiles 25°:75°) o n (%). SBP/DBP, presión sanguínea sistólica y diastólica; BMI, índice de masa corporal; Inhibidor de RAAS, inhibidor del sistema de renina angiotensina; BNP, péptido natriurético de tipo b; LVEF, fracción de eyección del ventrículo izquierdo; LVIDd, dimensión diastólica del extremo del ventrículo izquierdo; IVS, tabique intraventricular; PW, pared posterior; E/e', proporción de velocidad del flujo diastólico temprano mitral con respecto a la velocidad de alargamiento valvular mitral lateral con Doppler; LAVI, índice del volumen de la aurícula izquierda.

Demografía	Población Total	Tejido hipóxico	Tejido Normóxico (CAIX
		(CAIX Elevada)	Baja)
N	26	13	13
Edad, años	72 \pm 10	72 \pm 9	72 \pm 11
Género, masculino	18 (69 %)	9 (69 %)	9 (69 %)
SBP, mm Hg	134 \pm 6	134 \pm 6	132 \pm 7
DBP, mm Hg	78 \pm 7	76 \pm 6	80 \pm 7
BMI, kg/m ²	27 \pm 3	27 \pm 3	27 \pm 3
Fibrilación Auricular	5 (19 %)	2 (15 %)	3 (23 %)
Diabetes Mellitus	5 (19 %)	3 (23 %)	2 (15 %)
Historia de Tabaquismo	10 (38 %)	7 (54 %)	3 (23 %)
Hipercolesterolemia	9 (35 %)	6 (46 %)	3 (23 %)
Enfermedad Arterial Coronaria	20 (77 %)	10 (77 %)	10 (77 %)
Enfermedad Cardíaca Valvular	12 (46 %)	5 (38 %)	7 (54 %)
Hipertensión	9 (35 %)	4 (31 %)	5 (38 %)
Inhibidor de RAAS	12 (41 %)	6 (46 %)	6 (46 %)
Beta-Bloqueador	16 (55 %)	9 (69 %)	7 (54 %)
Estatina	16 (55 %)	11 (85 %)*	5 (38 %)
Creatinina, μ mol/l	90 \pm 13	90 \pm 4	90 \pm 17
BNP, pg/ml	104 (17:127)	84 (15:116)	135 (26:171)
LVEF, %	60 \pm 7	60 \pm 7	60 \pm 8
LVIDd, mm	53,0 \pm 5,0	53,0 \pm 4,8	55,0 \pm 5,2
IVS, mm	9,7 \pm 1,5	9,6 \pm 1,3	9,9 \pm 1,7
PW, mm	10,7 \pm 1,6	10,5 \pm 2,0	11,0 \pm 1,1
E/e'	8,7 \pm 2,8	8,7 \pm 3,0	8,6 \pm 2,6
LAVI, ml/m ²	28,4 \pm 4,4	28,1 \pm 5,2	28,6 \pm 3,4

Ejemplo 2 - Terapia epigenética para el tratamiento de fibrosis cardíaca e hipertrofia

Métodos

Cultivo y tratamientos de células primarias

Las células de fibroblastos cardíacos humanos primarios del ventrículo adulto (HCF) se adquirieron en ScienCell Research Laboratories. Las células se cultivaron y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco), suplementado con un 10 % de Suero Bovino Fetal (Gibco) y antibióticos penicilina-estreptomina (Gibco) en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % mantenida a 37 °C. Cuando era necesario, las células HCF se trataron hasta 8 días con cualquiera de 10 ng/ml de factor beta 1 transformante recombinante humano (TGF β 1) (R&D Systems), 5-azacitidina (5-aza) 1 μ M (Sigma), o con ambos compuestos de forma simultánea.

PCR en tiempo real cuantitativa

El aislamiento del ARN de células HCF se consiguió usando el Kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó usando SuperScript II RT (Invitrogen). Los cebadores para PCR cuantitativa

en tiempo real (QPCR) se diseñaron de modo que uno de cada par cebador estaba atravesando el límite de exón/exón para asegurar que solamente se amplificaba el ARNm maduro. Las secuencias de los cebadores específicos de genes usadas son las que siguen a continuación; ASMA, 5'-CGTTACTACTGCTGAGCGTGA-3' (directo), 5'-AACGTTTCATTTCCGATGGTG-3' (inverso); colágeno 1 α 1 (COL1A1), 5'-GAACGCGTGTCATCCCTTGT-3' (directo), 5'-GAACGAGGTAGTCTTTTCAGCAACA-3' (inverso); colágeno 3 α 1 (COL3A1), 5'-AACACGCAAGGCTGTGAGACT-3' (directo), 5'-GAACGAGGTAGTCTTTTCAGCAACA-3' (inverso). Las reacciones de QPCR se normalizaron mediante la amplificación del mismo ADNc con cebadores de beta-2-microglobulina (B2M), 5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3' (directo), 5'-CCAGTCCTTGCTGAAAGACA-3' (inverso).

La QPCR se realizó usando Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). La amplificación y la detección se realizaron usando el Sistema Mx3000P (Stratagene). El programa de ciclado de PCR consistía en 40 ciclos de tres etapas de 15 segundos/95 °C, 30 segundos/TA y 30 segundos/72 °C. Cada muestra se amplificó por duplicado. Para confirmar la especificidad de la señal, se realizó un programa de fusión después de completar los ciclos de PCR. Los factores de cambio relativo en la expresión genética se calcularon usando el método de delta delta CT.

Transferencia de Western

Se generaron lisados de proteína de célula completa usando Tampón de Lisis RIPA (Millipore), que contenía un cóctel de inhibidor de proteasa (Roche). Las concentraciones de proteína se determinaron usando el Kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce). Los lisados de proteína se desnaturalizaron, se redujeron y se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida mediante SDS-PAGE antes de transferencia sobre membranas (Millipore) de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-P de 0,45 μ m de tamaño de poro.

Las membranas se incubaron con tampón de bloqueo (TBS, Tween-20 al 0,25 %, suero al 0,1 % de especies en las que se produjo el anticuerpo secundario, y leche desnatada sin grasa al 5 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se sondearon durante una noche con anti-ASMA (Sigma). La detección de la unión específica del anticuerpo primario se consiguió usando anticuerpos secundarios conjugados con HRP, seguido de detección de señales con sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para verificar la carga igual se usó anti-alfa tubulina (Sigma).

Tratamiento con 5-azacitidina de un modelo de rata de enfermedad cardiaca hipertensiva

Se buscó la aprobación del Comité de Ética de Investigación Animal local y se obtuvo para investigar el impacto anti-fibrótico de 5-aza en la función y fibrosis cardiaca. Las ratas macho espontáneamente hipertensivas (SHR) y sus homólogas normotensivas, ratas Wistar Kyote (WKY) se adquirieron en Charles River y se utilizaron para el estudio. A partir de las 10 semanas de edad, los animales recibieron de forma alternativa una inyección intraperitoneal al día de cualquiera de PBS (vehículo) o 5-aza (10 mg/kg) durante 12 semanas. La 5-aza se adquirió en Sigma, se diluyó en PBS estéril y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. Las alícuotas se almacenaron a -20 °C y se usaron en los 5 días de su reconstitución. El diseño del estudio consistió en tres grupos de 10 animales; el grupo 1 incluía 10 ratas SHR que recibieron 5-aza (SHR-5-aza); el grupo 2 incluía 10 ratas SHR que recibieron vehículo de PBS (SHR-V); el grupo 3 incluía 10 ratas WKY que recibieron vehículo de PBS (WKY-V). todas las ratas se alojaron en la instalación para animales en condiciones idénticas, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Mediciones de presión sanguínea sistólica

La presión sanguínea sistólica se midió usando el método no invasivo de anillo en la cola (Letica Scientific Instruments LE 5001). Los valores de la presión sanguínea se registraron mientras que los animales estaban con anestesia inhalada (isoflurano al 2 %). El promedio de tres mediciones consecutivas se obtuvo para cada animal en el punto medio del estudio (6 semanas) y al final del estudio (12 semanas).

Ecocardiografía Doppler

La estructura y la función cardiaca se evaluaron en el período inicial y al final del estudio (12 semanas) usando Ecocardiografía. Durante el procedimiento, los animales se mantuvieron con anestesia inhalada (isoflurano al 2 %) ir a temperatura corporal se mantuvo usando una esterilla caliente. La evaluación de la ecocardiografía se realizó usando un Sistema de Formación de Micro imágenes In Vivo de Alta Resolución Vevo 770 High (Visualsonics) con un transductor a 10 MHz. Las imágenes en modo M y en 2 dimensiones (2D) se obtuvieron en las pistas del eje largo y corto paraesternal. El grosor de los tabiques interventricular es, grosor de la pared posterior, y diámetro del LV se midieron en sístole y diástole en las puntas del músculo papilar. Las mediciones se realizaron durante tres ciclos cardiacos consecutivos y se hizo el promedio. La masa del ventrículo izquierdo (LVM) se calculó de acuerdo con la fórmula de Devereux y se hizo un índice con respecto a la longitud tibial (LVMI). El análisis con ocultación fue realizado por dos observadores independientes.

65

Recogida de suero y análisis de BNP

La sangre se recogió en el periodo inicial a través del método de la vena de la cola y al final del estudio (12 semanas) durante la extracción de sangre terminal (aorta abdominal). El aislamiento del suero se consiguió usando tubos de suero Microvette (Sarstedt) con centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los niveles de suero del péptido natriurético de tipo B (BNP) de hormona de estrés cardiaco se cuantificaron usando un inmunoensayo ultra-sensible con detección de electroquimioluminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Meso Scale Discovery). La sensibilidad del ensayo fue de 1,5 pg/ml.

10 Recogida y preparación de tejido de miocardio de rata

Al finalizar el estudio de rata *in vivo*, los animales se sacrificaron (sangría terminal a la vez que inhalaban anestesia de isoflurano al 4 %), y el corazón se retiró en bloque para estudiar el impacto de la 5-aza en la deposición de colágeno dentro del miocardio. Dos enfoques metodológicos se usaron para cuantificar la deposición de colágeno, en particular, la inmunotinción de secciones de tejido cardiaco usando rojo Picrosirius, y el ensayo de hidroxiprolina usando lisados tisulares.

Para la tinción con rojo Picrosirius, las secciones de la parte media del ventrículo izquierdo (nivel papilar) del corazón se diseccionaron inmediatamente después del sacrificio, se aclararon en PBS, y se fijaron con formalina al 10 % (Sigma). El tejido fijado con formalina se embebió en parafina y se crearon secciones de tejido con un grosor de 5 µm para análisis de colágeno usando rojo Picrosirius.

Para cuantificación de hidroxiprolina, la base del ventrículo izquierdo del corazón se diseccionó inmediatamente después del sacrificio, se aclaró en PBS, se congelaron de forma instantánea en nitrógeno líquido hasta que fueron necesarias para el análisis. Los corazones congelados se descongelaron en hielo y se interrumpieron de forma individual y se homogeneizaron usando un Instrumento de Dispersión Ultra Turrax T25 (IKA). La proteína total dentro de los lisados de tejido se cuantificó usando el método de BCA y 10 µg de homogenado se usaron para determinar el contenido de hidroxiprolina. El tejido cardiaco se homogeneizó en PBS a una proporción de 100 mg de tejido con respecto a 1 ml de PBS.

30

Tinción con rojo Picrosirius y cuantificación digital automatizada

Las secciones de tejido se desparafinizaron y se volvieron a hidratar antes de su incubación con ácido fosfomolibdico al 0,2 % (PMA) durante 2 minutos. Después de aclarar en agua destilada, los cortes se tiñeron con rojo Picrosirius (Direct Red 80 disuelto en ácido pícrico, Sigma) durante 90 minutos. Por último, los cortes se colocaron en ácido clorhídrico (HCl) al 0,4 % durante 2 minutos, etanol al 70 % durante 45 segundos, se deshidrataron y se cubrieron para análisis.

El grado de deposición de colágeno se cuantificó mediante análisis de imagen digital automatizada. El sistema de Escáner de Cortes Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies) se usó para capturar imágenes digitales del corte completas con un objetivo de 20x. El análisis de imagen automatizada se realizó usando Imagescope (Aperio). Un algoritmo de recuento de píxel positivo se usó para cuantificar de forma automática el área ocupada por los colores de tinción rosa oscuro que representan colágeno dentro de cada imagen del corte escaneado. La calibración de los patrones de tinción individuales se realizó especificando el color necesario (intervalo de tonos y saturación) y límites para el intervalo de intensidad deseado. Los parámetros de entrada necesarios para cada dilución se basaron en el modelo de color de HSI (Tono, Saturación e Intensidad). Para detectar el color rosa oscuro del colágeno con tinción de rojo Picrosirius, se especificó un valor de tono de 0,8. El valor de la amplitud del tono por defecto de 0,5 se usó para permitir la inclusión de un intervalo moderado de sombras de color. Una fracción del volumen de colágeno se calculó basándose en el porcentaje de tinción de colágeno de color rosa oscuro cuantificado dentro de una sección de tejido.

Ensayo de hidroxiprolina

En resumen, 500 µl de muestra de tejido cardiaco homogeneizado (proporción de 100 mg de tejido homogeneizado en 1 ml de PBS) se incubaron a 37 °C en un horno de vacío durante una noche en 1 ml de HCl 6 N. Cinco microlitros de tampón de citrato/acetato (acetato sódico al 7,24 %, ácido cítrico al 5 %, hidróxido sódico al 3,4 %, ácido acético glacial al 1,2 %, pH 6,0) y 100 µl de solución de cloramina T (282 mg de cloramina T, 2 ml de n-propanol, 2 ml de H₂O, 16 ml de tampón de citrato/acetato) se añadieron a 5 µl de la muestra de tejido cardiaco digerido, y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 100 µl de solución de Ehrlich (2,5 g de 4-[dimetilamino] benzaldehído [4-DMAB], 9,3 ml de N-propanol, 3,9 ml de ácido perclórico al 70 %) a cada muestra y se incubó durante 20 minutos a 65 °C. Las muestras enfriaron posteriormente durante 10 minutos y se hizo una lectura a 550 nm usando un lector de placas SpectraMax M2 (Molecular Devices) con el software SoftMax Pro software (Molecular Devices, versión 4.7.1). En paralelo, se creó una curva patrón de hidroxiprolina para generar datos cuantificables. Las concentraciones de hidroxiprolina (Sigma) de 0-200 µg/ml se usaron y se manipularon de una manera similar a la de las muestras de tejido cardiaco homogeneizado digerido.

65

Resultados

Datos de ecocardiografía

- 5 Efecto de 5-aza en hipertrofia del ventrículo izquierdo y disfunción diastólica

Como se puede observar a partir de las Figuras 8-11, el análisis de ecocardiografía desveló una reducción significativa del diámetro del tabique interventricular en diástole y en el índice de masa del ventrículo izquierdo (LVMI) en el grupo de SHR-5AZA en comparación con el grupo de SHR-V. El grupo de control de WKY-V presentaba significativamente menos LVH que ambos grupos de SHR. La fracción de eyección era significativamente menor en el grupo de SHR-V en comparación con el grupo de WKY-V. El tratamiento con 5AZA aumentó de forma significativa la fracción de eyección en animales SHR. E primo (E'), una medida ecocardiográfica sólida y establecida de disfunción diastólica, estará reducida de forma significativa en SHR-V en comparación con el control de WKY-V normotensivo. De manera importante, este marcador ecocardiográfico de función diastólica estaba aprobado de forma significativa con el tratamiento de 5AZA, equivalente al del control de WKY-V normotensivo.

Análisis de tejido cardíaco:

Efecto de 5AZA en enfermedad intersticial miocárdica

20 El contenido de colágeno total dentro del miocardio se calculó usando el ensayo de hidroxiprolina. Como se destaca en la Figura 12, una reducción significativa en el colágeno total se observó en ratas SHR tratadas con 5AZA en comparación con controles de vehículo de SHR.

25 Como indicación de distribución y localización de colágeno, las secciones de tejido se tiñeron usando rojo picrosirius. El grado de deposición de colágeno (área ocupada por los colores de tinción rosa oscuro) se cuantificó mediante análisis de imágenes digitales automatizado a través de la aplicación de un algoritmo de recuento de píxel positivo modificado. La aplicación del algoritmo generó una imagen ampliada resaltando los píxeles positivos como colores amarillo, naranja o rojo, y los píxeles negativos como color azul. Una fracción del volumen de colágeno se calculó basándose en el porcentaje de tinción de colágeno de color rosa oscuro cuantificado dentro de una sección del tejido. Los resultados destacan que el colágeno perivascular estaba reducido de forma significativa en animales SHR-5AZA en comparación con animales SHR-V (Figuras 13-15).

Efecto de 5AZA en miocitos cardíacos *in vivo*

35 Dentro del tejido cardíaco, el área de miocitos se cuantificó para evaluar la capacidad de 5AZA para reducir la hipertrofia de miocitos. En este sentido, la Figura 16 destaca que el área de miocitos promedio dentro de los animales SHR-5AZA es significativamente más pequeña que la de sus controles homólogos de SHR-V.

40 Un mecanismo potencial mediante el que 5AZA mejora la función cardíaca, incluyendo hipertrofia y diastología, es a través de la regulación positiva de la proteína C de unión a miosina cardíaca (MYBP-C). Previamente se ha mostrado que la disminución de la expresión de MYBP-C en el corazón da como resultado una función contráctil anómala al nivel del miofilamento, contribuyendo de este modo al desarrollo de cardiomiopatía hipertrófica en seres humanos. Esta reducción se puede relacionar con mutaciones genéticas así como a través de Otros mecanismos potenciales. Un mecanismo que todavía se tiene que explorar son los cambios epigenéticos, incluyendo la metilación de ADN. Recientemente se ha mostrado que la reexpresión o el aumento de los niveles de expresión de MYBP-C a través de transferencia genética *in vivo* aumenta la función contráctil tanto sistólica como diastólica así como que reduce el grosor de la pared del ventrículo izquierdo (Merkulov *et al.*, 2012 Circ HF; PMID: 22855556). Los nuevos datos de los inventores han mostrado que la administración del agente de desmetilación 5AZA a un modelo de murino *in vivo* de enfermedad cardíaca hipertensiva dio como resultado un aumento significativo de la expresión de MYBP-C dentro del miocardio (Figura 17). Esto destaca un nuevo mecanismo mediante el cual la expresión de MYBP-C puede aumentar, y por lo tanto tiene el potencial de mejorar la disfunción cardíaca. El tratamiento con inhibidores de metilación de ADN, tales como 5-azacitidina y 5-aza-2-desoxicitidina también podría influir en el estado de fosforilación de MYBP-C.

55 Además de un aumento en la expresión genética de MYBP-C, el tratamiento con 5AZA de animales SHR dio como resultado de forma sorprendente un aumento significativo de Actina, Alfa 1, Músculo Esquelético (ACTA1), Figura 18. La regulación positiva de la expresión de MYBP-C y ACTA1 se asociaron con una reducción de la hipertrofia y la disfunción diastólica, tal como se indica mediante LVMI, E primo, y cambios en el diámetro del tabique inter ventricular.

Datos de mioblasto cardíaco:

65 La confirmación del impacto de inhibidores de metilación de ADN puede regular de forma positiva los niveles de expresión de MYBP-C y ACTA1 tal como se evalúa *in vitro* usando células de mioblasto cardíaco. Las células crecieron en cultivo durante 4 días ya fuera en presencia o ausencia de 5-azacitidina (5AZA) o 5-aza-2-desoxicitidina

(5AZA_DC). La expresión genética se cuantificó usando PCR en tiempo real. El tratamiento con 5AZA_DC dio como resultado un aumento significativo tanto de MYBP-C como de ACTA1, tal como se indica en las Figuras 19-22.

La presente invención ilustra la posible utilidad de agentes de hipometilación tales como 5-aza y 2'desoxi en la prevención o tratamiento de cardiomiopatías. En particular, los agentes de este tipo han mostrado potencial para su uso en el tratamiento de HCM y fibrosis miocárdica. Esto es particularmente sorprendente, porque se ha mostrado que 5-aza y 2'desoxi aumentan la expresión de ACTA1, cuyos niveles elevados están implicados en la hipertrofia exacerbada. A pesar de esto, los datos actuales muestran que estos agentes sin embargo son capaces de revertir los efectos de la hipertrofia y también del impacto pro-fibrótico de la hipoxia.

10 El término "oligonucleótido" pretende incluir oligorribonucleótidos, oligodesoxirribonucleótidos y análogos tanto convencionales como modificados o combinaciones de los mismos. Los ejemplos son ADN, ARN, convencionales y modificados, y combinaciones de los mismos.

15 El término "o" pretende ser usado como listado de un número de alternativas no mutuamente exclusivas. Como tal, se debería interpretar que el término "o" hace referencia a "y/o". Por ejemplo, se debe entender que una declaración de que un aspecto de la invención comprende un método para tratar hipertrofia cardiaca o fibrosis miocárdica, hace referencia a un método para el tratamiento de una cualquiera tomada entre el conjunto de: hipertrofia cardiaca sola; fibrosis miocárdica sola; y tanto hipertrofia cardiaca como fibrosis miocárdica juntas.

20 Los términos "comprende/que comprende" y las expresiones "que tiene barra que incluye" cuando se usan en el presente documento por referencia a la presente invención se usan para especificar la presencia de características, números enteros, etapas o componentes indicados Pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

25 Se observa que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden preparar por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Colegio Universitario de Dublín Universidad Nacional de Irlanda

<120> Terapias para cardiomiopatía

<130> PT628PCT

35 <160> 31

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 725

<212> ADN

40 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> fuente

<222> 1..725

45 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"

/organismo = "*Homo sapiens*"

<220>

<221> cebador_unión

<222> 1..24

50 <223> /nota = "Cebador Directo sin Xhol"

<220>

<221> proteína_unión

<222> 97..113

<223> /función = "Elemento de respuesta a hipoxia (HRE)"

<220>

55 <221> cebador_unión

<222> 700..717

<223> /nota = "Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)"

<400> 1

ES 2 676 557 T3

gagatgcagt ttctctatgt tacctaggct ggtclaaaac tctggggctc aagcgatcct 60
cccaccctgg cctcccaaag tgctgggatg acaggcgtga gccacgtggt gcttaaaaaa 120
ggcaacaaaa aacccccac aactgggta tagaagtggc atgggcctct atacactgtg 180
agattcttgg tactagctac aaattctgtg tatactcaag attttctaga gtaggtgcaa 240
ttaccccggt ttacagatga ggacacagag gctgagccgt agtgaccac ctaaggctgt 300
atagccagca aatagatgga ggttgattg gaactgagga cttactcaa gggctctcac 360
aaacccttgg gggcttctcg ctgcttctc cccatcacac ctgaaagaat gaatgaatga 420
atgcctcggg caccgtgcc acctcccagc aaaccgtgga gcttgacga gccactgct 480
ccgcgtgggg ggggtgtgtg cccgccttgc gcatgcgtgt tccctgggca tggccggctc 540
cgttccatcc ttctgcacag ggtatgcct ctctccgttt ggtacatcc ctctcccc 600
acgcccggac tggggtgta gacgccgct ccgctcatg cccctccca tcggttccg 660

cgcgaaaagc cggggcgct gcgctgccg cgccgcgtct gctgaagcct ccgagatgcc 720
ggcgc 725

5 <210> 2
<211>30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..30
10 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
/nota = "Cebador Directo con XhoI"
/organismo = "Secuencia Artificial"
<220>
<221> misc_feature
15 <222> 1..6
<223> /función = "Sitio de restricción de XhoI"
<400> 2
ctcgaggaga tgcagttct ctatgtacc 30
20 <210> 3
<211>24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
25 <222> 1..24
<223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
/nota = "Cebador inverso DNAMT1 con Hind III"
/organismo = "Secuencia Artificial"
<220>
30 <221> misc_feature
<222> 1..6
<223> /función = "Sitio de restricción de HindIII"
<400> 3
aagcttatct cggaggcttc agca 24
35 <210> 4
<211>725
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <221> fuente
<222> 1..725
<223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"

ES 2 676 557 T3

/nota = "V\$HIF de Sitio Mutante de DNMT1 (97-113)"
/organismo = "Secuencia Artificial"
<220>
5 <221> cebador_unión
<222> 1..24
<223> /nota = "Cebador Directo sin XhoI"
<220>
<221> proteína_unión
10 <222> 97..113
<223> /función = "Elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (sitio de unión a HIF)"
<220>
<221> variación
<222> 104..105
15 <223> /nota = "Mutagénesis Dirigida al Sitio/Bases Cambiadas"
<220>
<221> cebador_unión
<222> 700..717
<223> /nota = "Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)"
20 <400> 4

gagatgcagt ttctctatgt tacctaggct ggtctaaaac tctgggctc aagcgatcct 60
cccaccctgg cctcccaaag tgctgggatg acaggcgtga gcctagtggg gcttaaaaaa 120
ggcaacaaaa aacccccac aactgggta tagaagtggc atgggcctct atacactgtg 180
agattctgg tactagctac aaattctgtg tatactcaag atttctaga gtaggtgcaa 240
ttaccccggt ttacagatga ggacacagag gctgagccgt agtgaccac ctaaggctgt 300
atagccagca aatagatgga ggttgattg gaactgagga cttactcaa gggctctcac 360
aaaccctgg gggcttctcg ctgcttalc ccatcacac ctgaaagaat gaatgaatga 420
atgcctcggg caccgtgcc acctccagc aaaccgtgga gcttgacga gccactgct 480
ccgcgtgggg ggggtgtgtg cccgcctgc gcatgcgtgt tcctgggca tggccggctc 540
cgttccatcc ttctgcacag ggtatgcct ctctcgttt ggtacatccc ctctcccc 600

acgcccggac tggggtgta gacgccgct ccgctcatcg ccctccca tcggttccg 660
cgcgaaaagc cggggcgct gcgctccgc cggcgcgtct gctgaagcct ccgagatgcc 720
ggcgc 725

<210> 5
<211>38
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..38
30 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar" /nota = "Cebador Directo" /organismo = "Secuencia Artificial"
<400> 5
ggatgacagg cgtgaccta gtggtgctta aaaaaggc 38
<210> 6
<211>38
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> fuente
<222> 1..38
40 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
/nota = "Cebador Inverso de Mutante DNMT1"

/organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 6
 gccttttta agcaccacta ggctcagcc tgcatcc 38
 <210> 7
 5 <211> 246
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..246
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /note = "Promotor DNMT3b de Tipo Silvestre" /organismo = "*Homo sapiens*"
 <220>
 <221> cebador_unión
 15 <222> 1..22
 <223> /nota = "Cebador Directo sin XhoI"
 <220>
 <221> proteína_unión
 <222> 108..124
 20 <223> /función = "Elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (sitio de unión a HIF)"
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> 223..246
 <223> /nota = "Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)"
 25 <400> 7

gggccggggc tacaagggga gtcggcaccg cccctccc accactccc gctgccccgt 60
 ccggcccgcg ccgcttctc gcagcagctg ctccggctc cgcggccgca gcccgcggtg 120
 acgctccgag cgcccccca cggacgggac cggctccctg gcggtcgggc gagcgggagg 180
 caacgctgcc cggccggcag cgctgggggt aagtggcca agtaaaccta gctcggcgat 240
 cggcgc 246

<210> 8
 30 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 35 <222> 1..28
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador directo DNMT3b sin XhoI"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> 1..6
 <223> /función = "Sitio de restricción de XhoI"
 <400> 8
 45 ctcgaggggc cggggctaca aggggagt 28
 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso con HindIII"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 1..6
 <223> /función = "Sitio de restricción de HindIII"

<400> 9
 aagcttgccg cgatcgccga gctaggttta 30
 <210> 10
 <211> 246
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..246
 10 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /note = "V\$HIF de Sitio Mutante de DNMT3b (108-124)"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <220>
 <221> cebador_unión
 15 <222> 223..246
 <223> /nota = "Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)"
 <220>
 <221> cebador_unión
 <222> 1..22
 20 <223> /nota = "Cebador Directo sin XhoI"
 <220>
 <221> proteína_unión
 <222> 108..124
 <223> /función = "Elemento de respuesta a hipoxia (HRE) (sitio de unión a HIF)"
 25 <220>
 <221> variación
 <222> 112..116
 <223> /nota = "Mutagénesis Dirigida al Sitio/Bases Cambiadas"
 <400> 10

30
 gggccggggc tacaagggga gtcggcaccg cccctcccc acccactccc gctgccccgt 60
 cggcccgcg cgccttctc gcagcagctg ctccggctc cgccggcgca gaccgagtg 120
 acgctccgag cgccccca cggacgggac cggctccctg gcggtcgggc gagcggggcg 180
 caacgctgcc cggccggcag cgctggggtt aagtggccca agtaaaccta gctcggcgat 240
 cggcgc 246

<210> 11
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 40 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Directo de Mutante DNMT3b"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 11
 gctccgcg cgcagaccga gtggacgctc cgagc 35
 45 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso de Mutante DNMT3b"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 55 <400> 12
 gctcggagc tccactcggg ctgcggccgc ggagc 35
 <210> 13

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Directo de Actina de Músculo Liso Alfa"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 10 <400> 13
 cgttactact gctgagcgtg a 21
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 20 /nota = "Actina de músculo liso alfa"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 14
 aacggtcatt tccgatggtg 20
 <210> 15
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Colágeno 1 ?1 Cebador Directo"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 15
 35 gaacgcgtgt catccctgt 20
 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 45 /nota = "Colágeno 1 ?1 Cebador Inverso"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 16
 gaacgaggta gtcttcagc aaca 24
 <210> 17
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 55 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Colágeno 3 ?1 Cebador Directo"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 17
 60 aacacgcaag gctgtgagact 21
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <221> fuente
 <222> 1..24

<223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Colágeno 3 ?1 Cebador Inverso"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 18
 5 gaacgaggta gtcttcagc aaca 24
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Anhidrasa carbónica IX"
 15 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 19
 aggtcccagg actggacata 20
 <210> 20
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 25 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso de Anhidrasa carbónica IX"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 20
 30 gaggggtgg agctgcttag 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Directo de ADN metiltransferasa 1"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 40 <400> 21
 tatccgagga gggctacctg 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 50 /nota = "Cebador Inverso de ADN metiltransferasa 1"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 22
 cactcccgg ttgtaagcat 20
 <210> 23
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 60 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "ADN metiltransferasa 3A"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 23
 65 agcccaaggt caaggagatt 20
 <210> 24

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso de ADN metiltransferasa 3A"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 10 <400> 24
 gttctgcag tttggcaca 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 20 /nota = "Cebador Directo de ADN metiltransferasa 3B"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 25
 tcaggatggg aaggagttg 20
 <210> 26
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 30 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso de ADN metiltransferasa 3B"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 26
 35 ctgcagagac ctggagaac 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 45 /nota = "Cebador Directo de Beta-2-microglobulina"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 27
 aggctatcca gcgtactcca 20
 <210> 28
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 55 /nota = "Cebador Inverso de Beta-2-microglobulina"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 28
 ccagtccttg ctgaaagaca 20
 60 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <221> fuente
 <222> 1..20

<223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Directo de proteína C de unión a miosina"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 29
 5 ctggagacct ggacctcaga 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo = "ADN sin asignar"
 /nota = "Cebador Inverso de proteína C de unión a miosina"
 15 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 30
 ccggaaactg ctcttctca 20
 <210> 31
 <211> 21
 20 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 25 <223> /mol_tipo = "otro ARN"
 /nota = "ARNsi de DNMT3B"
 /organismo = "Secuencia Artificial"
 <400> 31
 30 agaugacgga ugccuagagu u 21

REIVINDICACIONES

1. Un agente de hipometilación para uso en la prevención o tratamiento de cardiopatía en el que el agente comprende 5-Azacitidina o 5-Aza-2'-Desoxicitidina.
5
2. El agente de hipometilación de la reivindicación 1 para uso en la prevención o tratamiento de cardiopatía isquémica o no isquémica.
3. El agente de hipometilación de la reivindicación 1 para uso en la prevención o tratamiento de una cardiopatía seleccionada entre el grupo que consiste en cardiopatía hipertrófica, cardiopatía dilatada, cardiopatía restrictiva, cardiopatía del ventrículo derecho arritmogénica y fibrosis endomiocárdica.
10
4. El agente de hipometilación de la reivindicación 1 para uso en la prevención o tratamiento de cardiopatía hipertrófica.
15
5. El agente de hipometilación de la reivindicación 1 para uso en la prevención o tratamiento de cardiopatía, que es independiente de hipertensión.
6. El agente de hipometilación de la reivindicación 4 en la que el agente tiene el efecto de inhibir la expresión o acción de ADN metiltransferasa 1, ADN metiltransferasa 3A, o ADN metiltransferasa 3B.
20
7. Un agente capaz de reducir la expresión de, silenciar o degradar proteína HIF o ARNm de HIF para uso en la prevención o tratamiento de cardiopatía o fibrosis miocárdica en el que el agente comprende el ARNsi de SEQ ID 31.
25

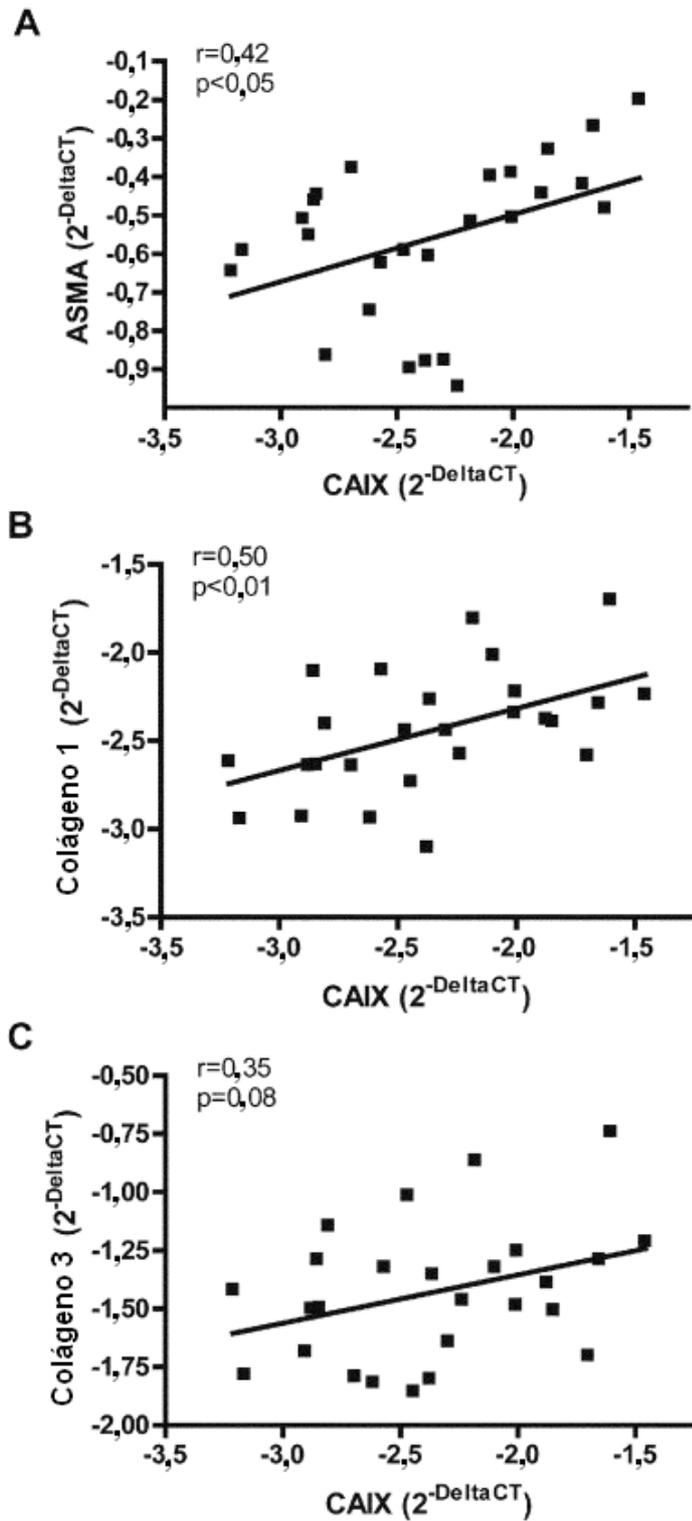
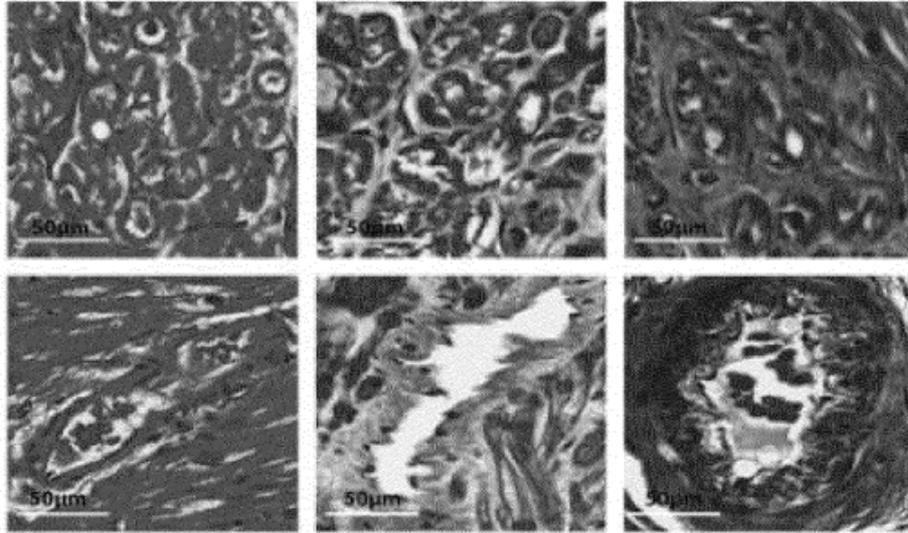


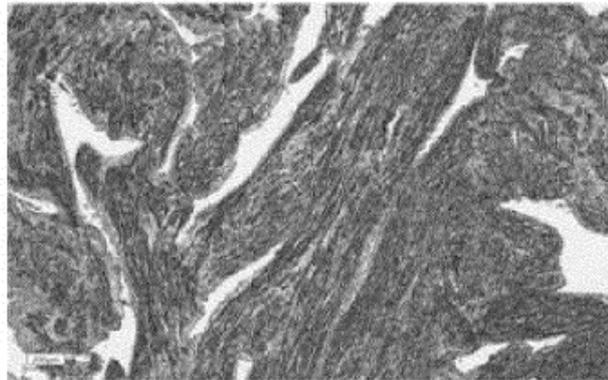
Figura 1a-c

D



E

Tejido cardiaco teñido con MTC



Salida de imagen ampliada digital a partir de algoritmo de píxel positivo

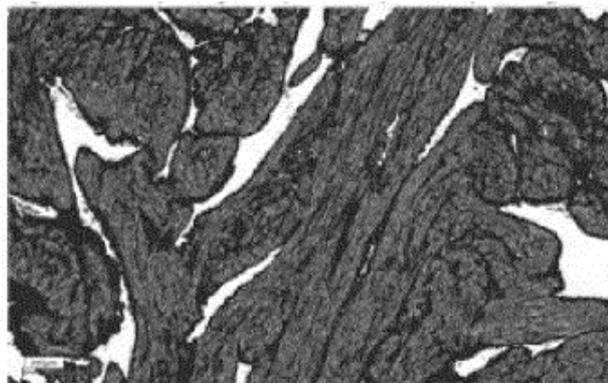
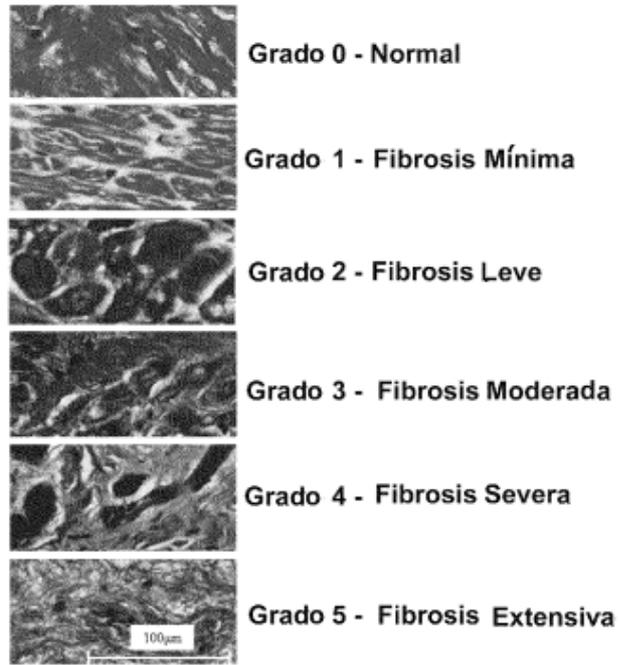


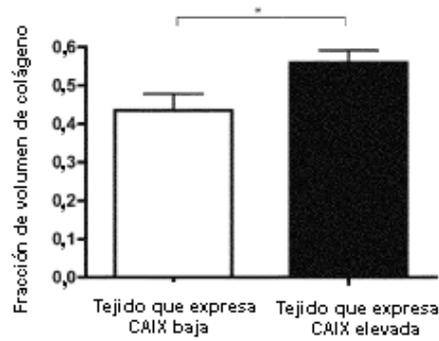
Figura 1 d-e

F



G

Deposición de colágeno en relación con hipoxia tal como se cuantifica con un algoritmo de píxel positivo



H

Deposición de colágeno en relación con hipoxia tal como se cuantifica mediante puntuación manual

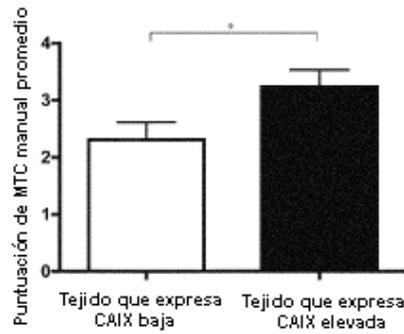


Figura 1 f-h

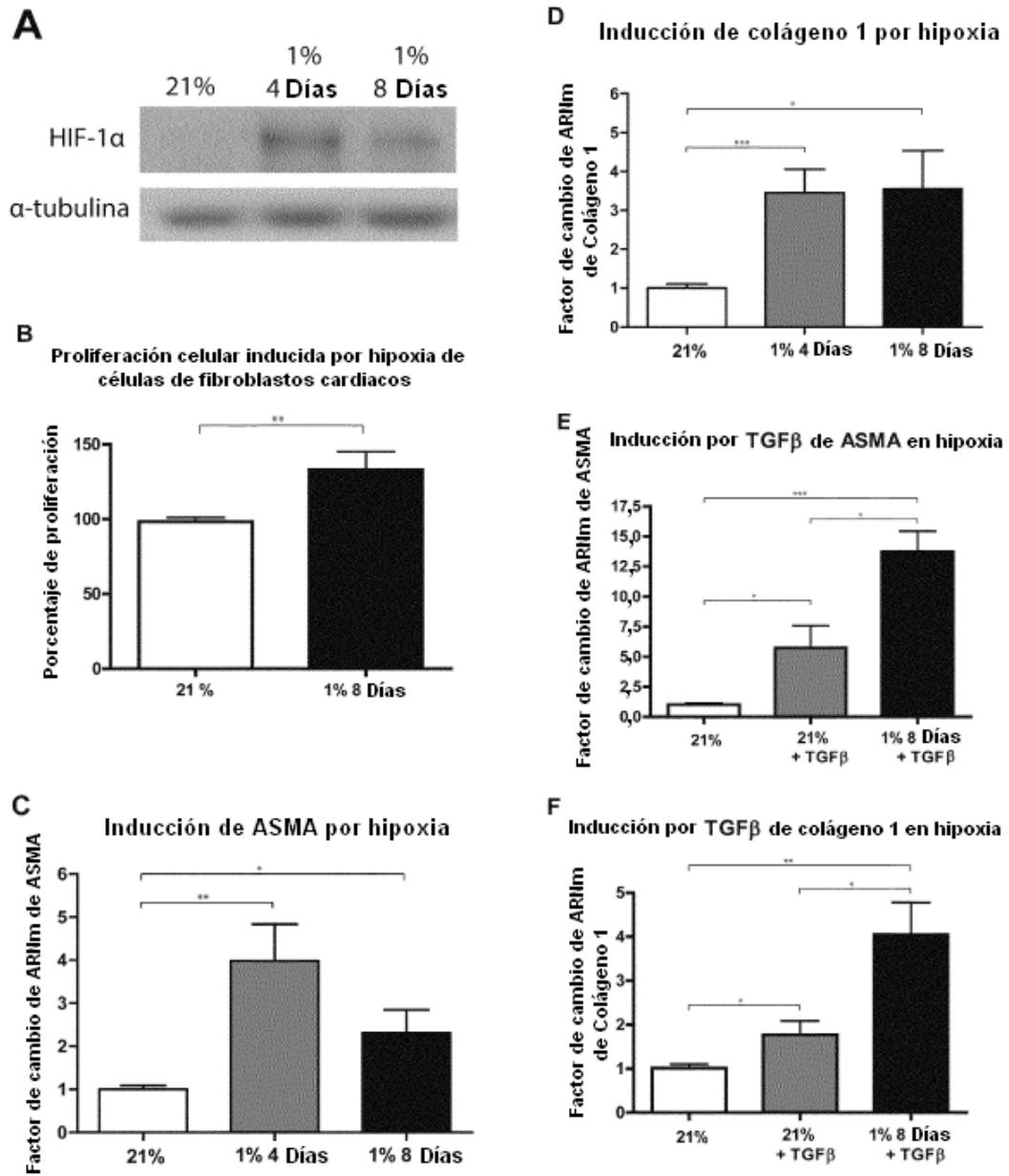
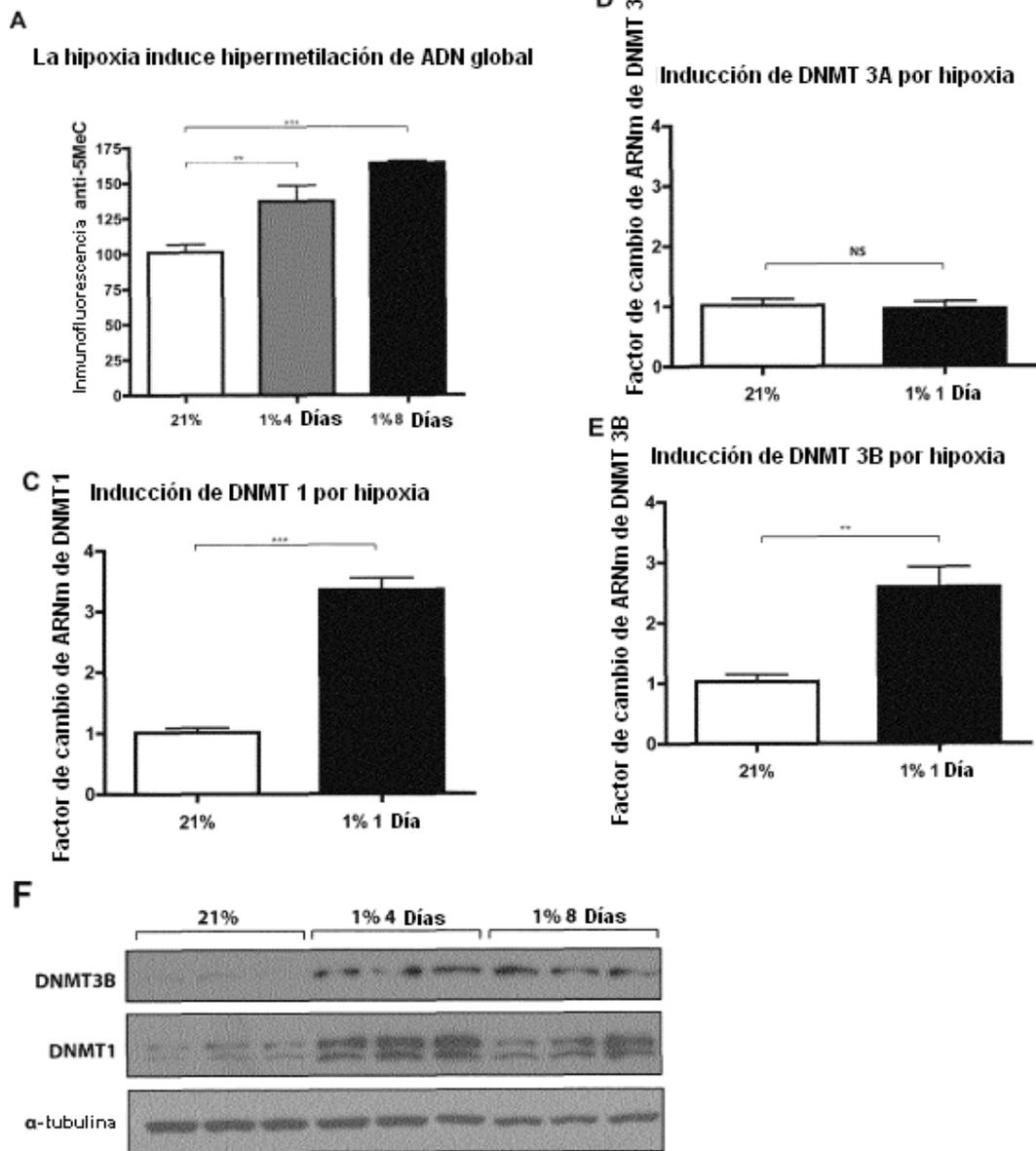


Figura 2a-f



Figuras 3a, 3c-f

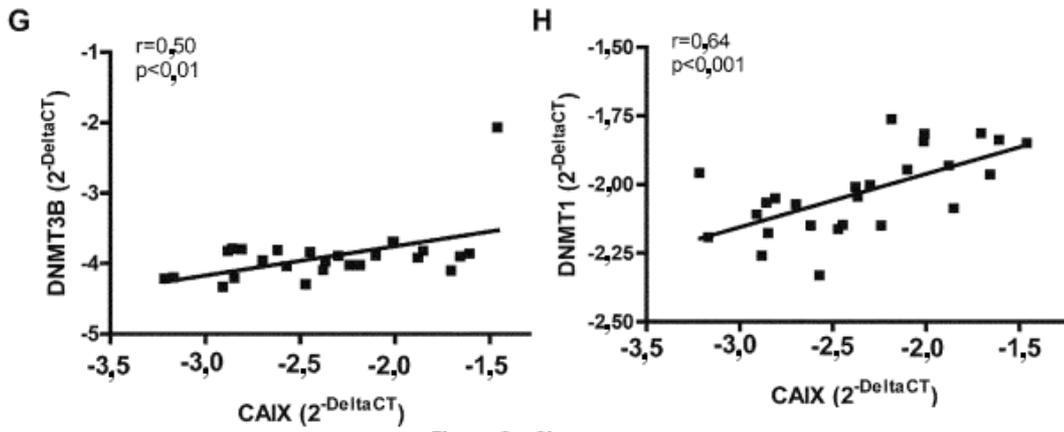


Figura 3a, 3h

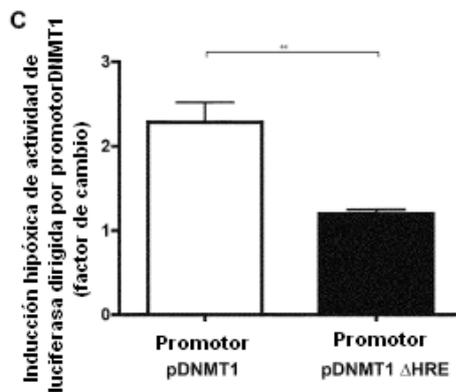
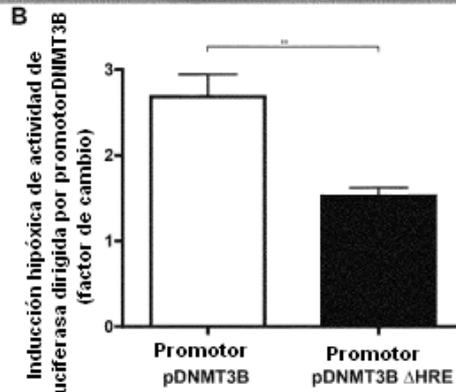
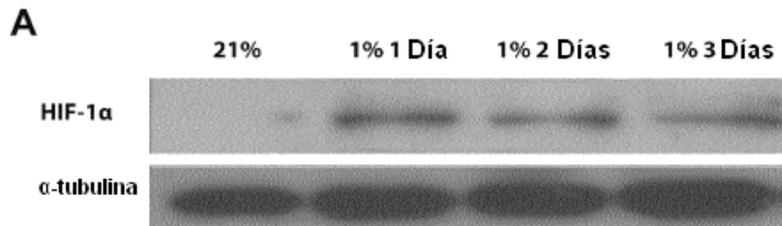


Figura 4a-c

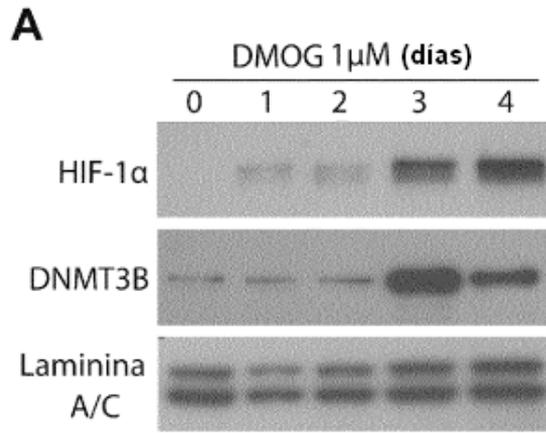


Figura 5a

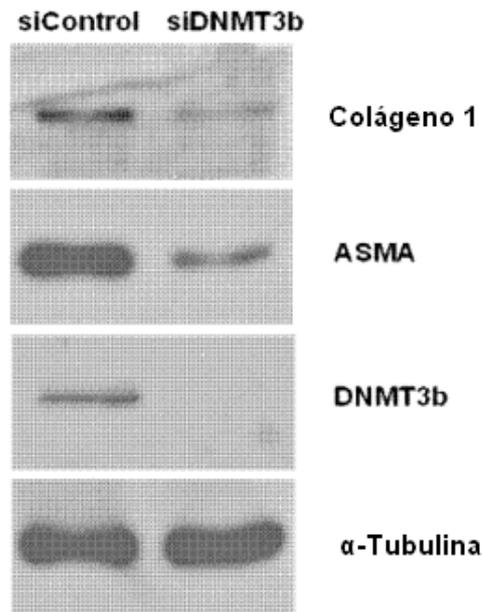
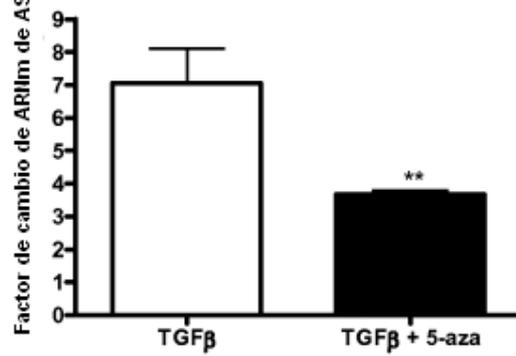
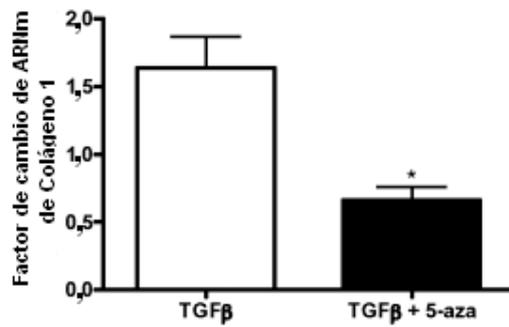


Figura 6

La inducción por TGF de ASMA en hipoxia se inhibe con 5-aza



La inducción por TGF de colágeno 1 en hipoxia se inhibe con 5-aza



La inducción por TGF de colágeno 3 en hipoxia se inhibe con 5-aza

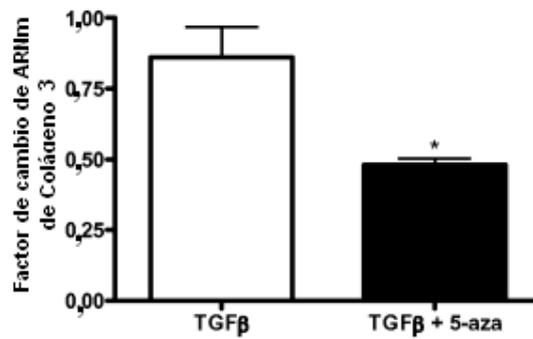


Figura 7a-c

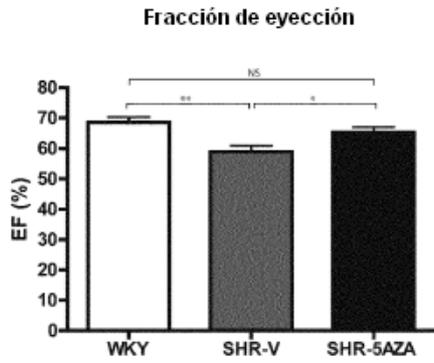


Figura 8

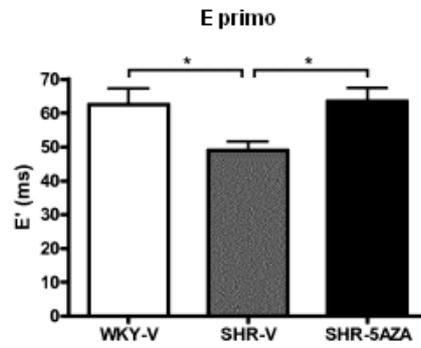


Figura 11

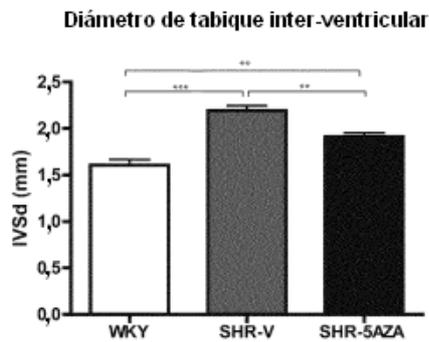


Figura 9

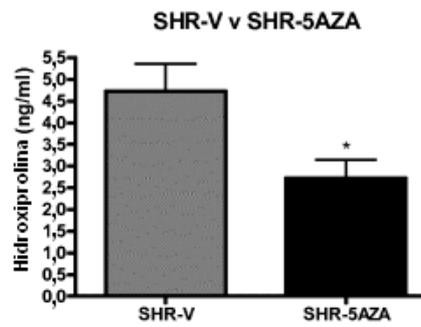


Figura 12

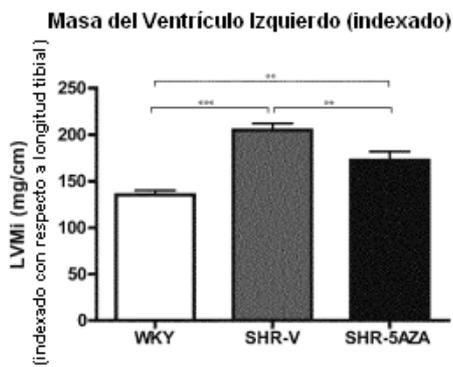


Figura 10

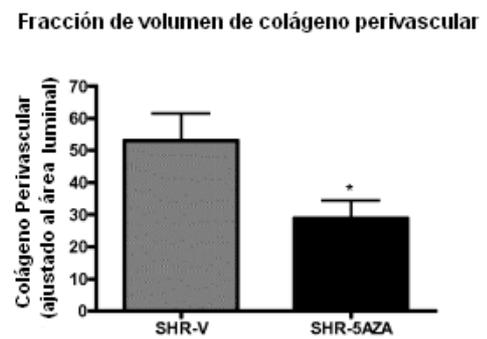


Figura 13

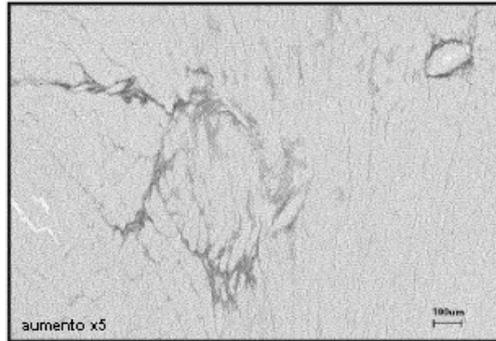


Figura 14

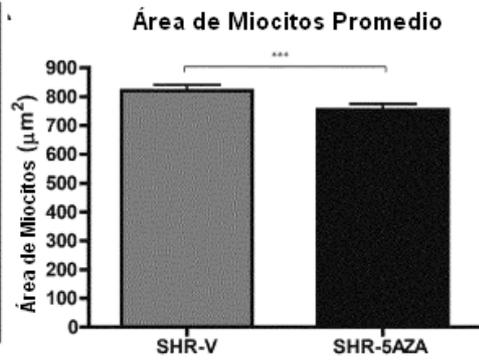


Figura 16

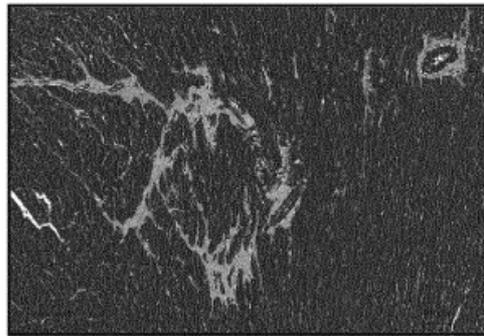


Figura 15

Regulación positiva de MYBP-C por 5aza

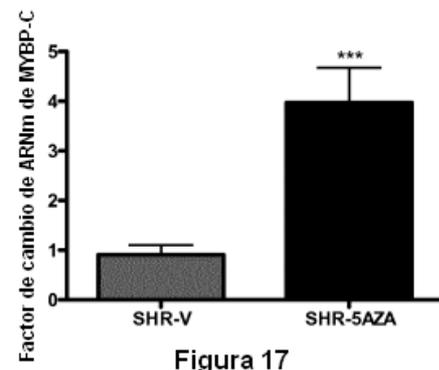


Figura 17

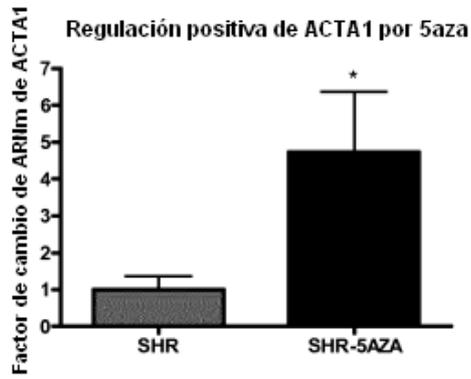


Figura 18

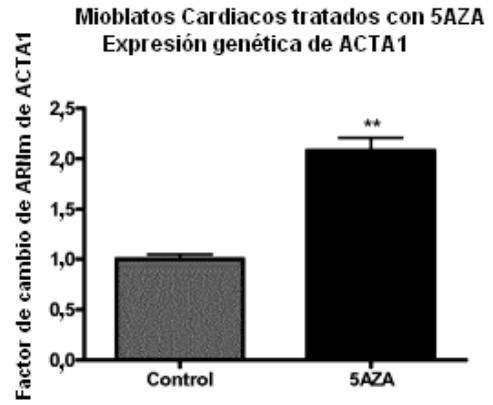


Figura 21



Figura 19

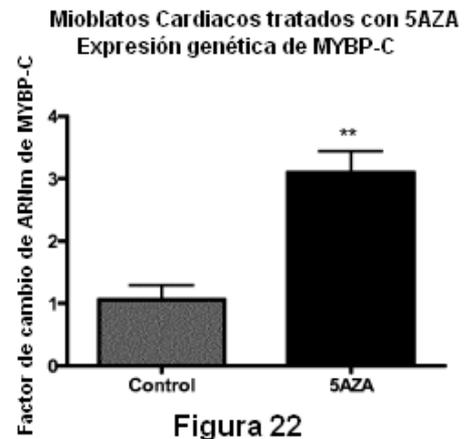


Figura 22

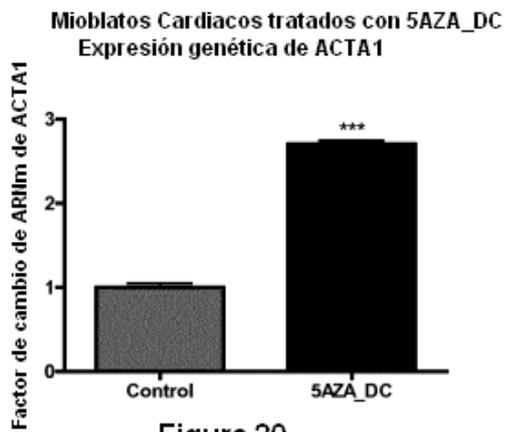


Figura 20

Promotor DNMT1 de Tipo Silvestre

GAGATGCAGTTTCTCTATGTTACCtaggctggtctaaaactcctgggctcaagcgatcctcccaccctggcctcccaa
 agtgcctgggatgacaggcGTGAGCCACGTGGTGCCTaaaaaaggcaacaaaaacccccacacactgggtataga
 agtggcatgggcctctatacactgtgagattctggtactagctacaaattctgtatactcaagatttctagagtaggtgcaattacccc
 gttttacagatgaggacacagaggctgagccgtagtgaccacctaaggctgatagccagcaaatagatggagggtgattggaac
 tgaggacttactcaagggtctcacaacccctgggggcttctcgtctttatcccacacacctgaaagaatgaatgaatgaatgc
 ctoggcaccgtgccacctcccagcaaacctggagctggagcagccactgctccgctggggggggtgtgcccgccttgc
 gcatgctgttccctgggcatggcggctccgttccatcctctgacagggatgcctctcctggttgatcatcccctctccccac
 gccggactgggggtgtagacg cgcctcgcctatgc cccctcccacatcggttccgcgcgaaaagccggggcgctgcgctgcc
 gccgcccgtcTGCTGAAGCCTCCGAGATgccggcgc

Cebador Directo con XhoI	CTCGAGGAGATGCAGTTTCTCTATGTTACC
Cebador Inverso con HindIII	AAGCTTATCTCGGAGGCTTCAGCA

Verde = Cebador Directo sin XhoI
 Cian = Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)
 Rojo Texto = Elemento de respuesta a hipoxia (HRE)
 Amarillo y Negrita = Mutagénesis Dirigida al Sitio/Bases Cambiadas

Figura 23

V\$HIF de Sitio Mutante de DNMT1 (97-113)

GAGATGCAGTTTCTCTATGTTACCtaggctggtctaaaactcctgggctcaagcgatcctcccaccctggcctcccaa
 agtgcctgggatgacaggcGTGAGCCTAGTGGTGCCTaaaaaaggcaacaaaaacccccacacactgggtataga
 agtggcatgggcctctatacactgtgagattctggtactagctacaaattctgtatactcaagatttctagagtaggtgcaattacccc
 gttttacagatgaggacacagaggctgagccgtagtgaccacctaaggctgatagccagcaaatagatggagggtgattggaac
 tgaggacttactcaagggtctcacaacccctgggggcttctcgtctttatcccacacacctgaaagaatgaatgaatgaatgc
 ctoggcaccgtgccacctcccagcaaacctggagctggagcagccactgctccgctggggggggtgtgcccgccttgc
 gcatgctgttccctgggcatggcggctccgttccatcctctgacagggatgcctctcctggttgatcatcccctctccccac
 gccggactgggggtgtagacg cgcctcgcctatgc cccctcccacatcggttccgcgcgaaaagccggggcgctgcgctgcc
 gccgcccgtcTGCTGAAGCCTCCGAGATgccggcgc

Cebadores Mutantes (Diseñados con Cebador X)

Cebador Directo	5' GGATGACAGGCGTGAGCCTAGTGGTGCCTAAAAAAGGC 3'
Cebador Inverso	5' GCCTTTTTTAAGCACCCTAGGCTCACGCCTGTCATCC 3'

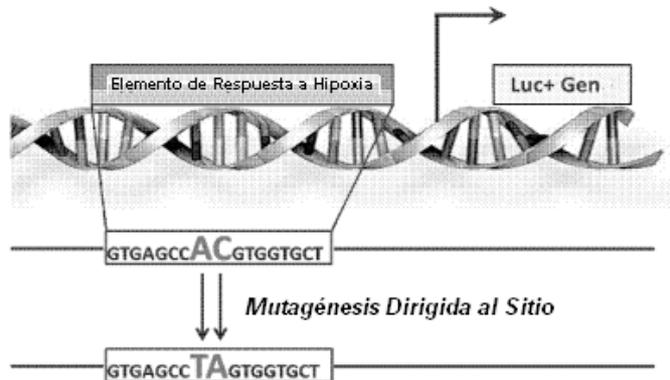


Figura 24

Promotor DNMT3b de Tipo Silvestre

GGGCCGGGGCTACAAGGGGAGT**CGGCACCGCCCCTCCC**Acccactcccgctgccccgtccggccc
 gcgccgcttcctgcagcagctgctcccggctcgcggccGCAG**CCCGGTGGACGC**Tccgagcgcccccgacgga
 cgggaccggctccctggcggT**CGggcgagcgggcggcaacgctgcccggccggcagcgtggggtaagtggccaagTAAA**
 CCTAGCTCGGCGATCGGCGC

Cebador Directo con XhoI	CTCGAGGGGCGGGGCTACAAGGGGAGT
Cebador Inverso con HindIII	AAGCTT CGGCCGATCGCCGAGCTAGGTTTA

Verde = Cebador Directo sin XhoI
 Cian = Cebador Inverso sin HindIII (la secuencia es inversa y complementaria con respecto al cebador)
 Rojo Texto = HRE
 Amarillo y Negrita = Mutagénesis Dirigida al Sitio/Bases Cambiadas

Figura 25

V\$HIF de Sitio Mutante de DNMT3b (108-124)

GGGCCGGGGCTACAAGGGGAGT**CGGCACCGCCCCTCCC**Acccactcccgctgccccgtccggccc
 gcgccgcttcctgcagcagctgctcccggctcgcggccGCAG**ACCGAGTGGACGC**Tccgagcgcccccgacgga
 cgggaccggctccctggcggT**CGggcgagcgggcggcaacgctgcccggccggcagcgtggggtaagtggccaagTAAA**
 CCTAGCTCGGCGATCGGCGC

Cebadores Mutantes (Diseñados con Cebador X)

Cebador Directo	5' GCTCCGCGGCCGAGACCGAGTGGACGCTCCGAGC 3'
Cebador Inverso	5' GCTCGGAGCGTCCACTCGGTCTGCGGCCGCGGAGC 3'

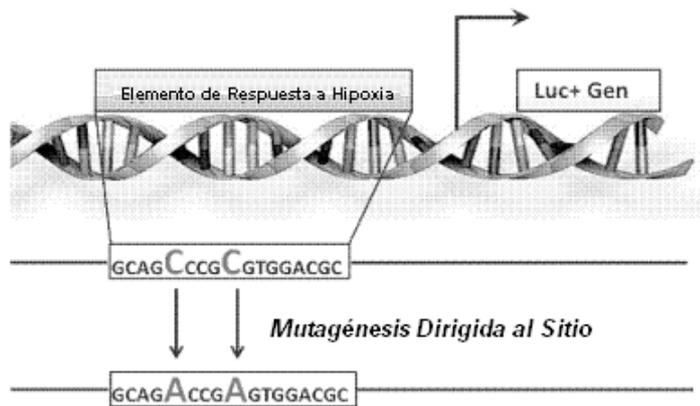


Figura 26