

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 878**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2015 PCT/EP2015/058684**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2015 WO15162161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2015 E 15717502 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3134526**

54 Título: **IncARNs para el tratamiento y el diagnóstico de la hipertrofia cardíaca**

30 Prioridad:

22.04.2014 EP 14165504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2019

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(100.0%)
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**THUM, THOMAS;
REGALLA, KUMARSWAMY y
VIERECK, JANIKA**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 706 878 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

lncARNs para el tratamiento y el diagnóstico de la hipertrofia cardíaca

5 La presente invención se refiere a un compuesto que promueve la expresión y/o la actividad del lncARN de SEQ ID NO: 12 para su uso en el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca patológica, en donde el compuesto es (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico del lncARN de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 69% idéntica a la misma, (b) un vector de expresión que expresa la secuencia de ácido nucleico como se define en (a), preferentemente bajo el control de un promotor específico de corazón o (c) un hospedador que comprende el vector de expresión de (b).
10

El análisis a gran escala de los transcriptomas de mamífero revelaron que la transcripción de los genomas genera una proporción compleja de moléculas de ARN, de las cuales solo una pequeña parte sirve como molde para la síntesis de proteína. Varios estudios han indicado que estos ARN no codificantes (ncARNs) tienen funciones biológicas importantes, al igual que sus homólogos codificantes de proteínas y sugieren que la expresión o la función alterada de los ncARNs provoca enfermedades cardiovasculares, incluyendo hipertrofia y fibrosis cardíaca, trastornos de las arterias coronarias, así como infarto de miocardio.
15

Los ncARNs más reflejados en la investigación cardiovascular son los microARN (miARN, miR). Estos son ARN monocatenarios endógenos formados por aproximadamente 20-22 nucleótidos que se unen a otros transcritos, reduciendo la estabilidad y/o la traducción de sus dianas. Por ejemplo, se ha demostrado que miR-21 y miR-132 inducen fibrosis o hipertrofia cardíaca, respectivamente y que la represión *in vivo* de estos miARN mediante antagomiR específicos (que son oligonucleótidos diseñados químicamente que silencian a los miARN) rescata de la fibrosis o la hipertrofia en un modelo de enfermedad cardíaca de sobrecarga de presión (Thum et al., Nature. 2008 456(7224):980-4.; Ucar y Gupta et al. Nat Commun. 2012 3:1078). En otro estudio, se observó que miR-24 actúa como regulador crítico de la angiogénesis en la enfermedad cardíaca isquémica (Fiedler et al., Circulation. 2011 124(6):720-30).
20
25

Estudios más recientes indican que de manera similar a los miARN, los ncARNs largos (lncARNs) también pueden tener un papel importante en varios procesos biológicos. Los lncARNs son transcritos similares al ARNm que varían de 200 nucleótidos hasta 100 kilobases y se clasifican basándose en su distribución genómica en relación con genes codificantes de proteínas (codificantes para exones y/o intrones, no codificantes, bidireccionales o intergénicos). Varios transcritos de lncARNs están restringidos exclusivamente al núcleo, mientras que también se encuentran otros en el citoplasma. En este interactúan con proteínas, así como con otras moléculas de ARN o ADN, lo que permite a los lncARNs tener influencia en una serie de mecanismos reguladores de genes, incluyendo la modificación de la cromatina, la impronta genómica, la compartimentalización y arquitectura nuclear, así como la regulación transcripcional y postranscripcional (Schonrock et al., Circ Res. 26 de octubre de 2012;111(10):1349-62.; Caley et al. ScientificWorldJournal. 2010 10:90-102). No es sorprendentemente, por lo tanto, que los lncARNs estén implicados en las enfermedades humanas, tales como el cáncer y trastornos metabólicos y neuronales.
30
35

Sin embargo, poco se sabe acerca de su papel en la biología cardiovascular. Estudios recientes indicaron que los dos lncARNs, Braveheart (Bvht) y FOXF1 adyacentes al ARN regulador del desarrollo no codificante (Fendrr) son necesarios para la diferenciación de los cardiomiocitos y el desarrollo del tejido del mesodermo lateral en la pared cardíaca y corporal, respectivamente (Klattenhoff et al., Cell. 2013 152(3):570-83.; Grote et al. Dev Cell. 2013 24(2):206-14). Ambos lncARNs modulan el perfil epigenético de las células mediante una interacción con complejos modificadores de la cromatina. En informes recientes también se ha comenzado a explorar el papel de los lncARNs en enfermedades cardiovasculares. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), han identificado polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en loci que codifican los lncARNs MIAT (transcrito asociado con infarto de miocardio) o ANRIL (ARN no codificante antisentido en el locus INK4) que parecen estar relacionados con el riesgo de infarto de miocardio de enfermedad de las arterias coronarias (Ishii et al. J Hum Genet. 2006 51(12):1087-99.; McPherson et al. Science. 2007 316(5830):1488-91). El lncARN Kcnq1ot1 controla la expresión de su gen antisentido, Kcnq1, que codifica un canal de potasio. Ya que la actividad de los canales de potasio es esencial para un funcionamiento cardíaco normal, una regulación alterada relacionada con lncARN podría ocasionar un funcionamiento cardíaco anómalo (Korostowski et al. PLoS Genet. 2012 8(9):e1002956). Un estudio reciente identificó los lncARNs miR-489 y CHRF (factor relacionado con la hipertrofia cardíaca) y reveló su participación en la regulación de la hipertrofia cardíaca (Wang et al. Circ Res. 25 de abril de 2014;114(9):1377-88). El documento WO 2004/031359 relacionó el lncARN H19 con la regulación de genes que controlan la angiogénesis y mostró que la modulación de la expresión de H19 podría proporcionar medios para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la angiogénesis.
40
45
50
55

Uno de los principales retos en la investigación de las enfermedades cardíacas es identificar estrategias novedosas y eficaces para modular las redes génicas o las vías de señalización intracelular específicas que puedan demostrar ser opciones terapéuticas eficaces en sí o tener el potencial de aumentar la eficacia de las estrategias terapéuticas existentes. Sorprendentemente, se ha descubierto que algunos lncARNs específicos desempeñan un papel en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, proporcionando por tanto nuevas estrategias terapéuticas.
60
65

En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto que

promueve la expresión y/o la actividad de uno o más ARN no codificantes largos (IncARNs) seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13; y/o (ii) un compuesto que inhibe la expresión y/o la actividad de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28.

5 De acuerdo con la presente divulgación, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a una composición para su administración a un paciente, preferentemente un paciente humano. La composición farmacéutica descrita anteriormente comprende los compuestos citados anteriormente. Opcionalmente, esta puede comprender moléculas adicionales capaces de alterar las características de los compuestos de la divulgación, de este modo estabilizando, modulando y/o activando su función. La composición puede encontrarse en forma sólida, líquida o gaseosa y puede encontrarse, entre otras cosas, en forma de polvos, comprimidos, soluciones o aerosoles. La composición farmacéutica descrita anteriormente puede comprender, opcional y adicionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en la técnica ejemplos de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables e incluyen soluciones de suero salino tamponado con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, disolventes orgánicos entre los que se incluyen DMSO, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos o excipientes pueden formularse mediante métodos convencionales de sobra conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La pauta posológica la determinará el médico a cargo del tratamiento y los factores clínicos. Como se sabe en la técnica médica, las dosis para un paciente cualquiera dependen de diversos factores, entre los que se incluyen el tamaño del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular que se vaya a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación concreta se determinará fácilmente mediante experimentación rutinaria y se encuentra dentro de las capacidades y el criterio de un profesional sanitario o médico normalmente versado en la materia. En general, esta pauta en forma de una administración regular de la composición farmacéutica debe encontrarse en el intervalo de unidades de 1 µg a 5 g al día. Sin embargo, una dosis más preferida podría encontrarse en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg, aún más preferentemente de 0,01 mg a 50 mg/kg y lo más preferentemente, de 0,01 mg a 10 mg al día.

Además, en caso de que, por ejemplo, dicho compuesto sea una secuencia de ácido nucleico, tal como un siARN, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de la composición farmacéutica administrada será normalmente menor de aproximadamente 75 mg por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, menos de aproximadamente 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 o 0,0005 mg por kg de peso corporal. Más preferentemente, la cantidad será menor de 2000 nmol de secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente $4,4 \times 10^{16}$ copias) por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075 o 0,00015 nmol de agente de siARN por kg de peso corporal.

La duración del tratamiento necesaria para observar cambios y el intervalo después del tratamiento para que se produzcan las respuestas varían dependiendo del efecto deseado. Pueden determinarse las cantidades concretas mediante pruebas convencionales que son de sobra conocidas por el experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente comprenden preferentemente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de formulación no tóxico, sólido, semisólido o líquido de cualquier tipo (véase también Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª ed. 2010, publicado por The Pharmaceutical Press). La composición farmacéutica puede administrarse, por ejemplo, por vía oral, por vía parenteral, tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, transdérmica, transmucosal, subdural, local o tópica mediante iontoforesis, sublingual, mediante pulverización para inhalación, en aerosol o por vía rectal y similares en formas farmacéuticas unitarias que comprenden opcionalmente vehículos o excipientes convencionales farmacéuticamente aceptables.

El término "ncARN" o la expresión "ARN no codificante", tal como se usa en el presente documento, indica una molécula de ARN funcional que no se traduce en una proteína. La secuencia de ADN a partir de la cual se transcribe un ARN no codificante normalmente se denomina en la técnica gen de ARN. El término "IncARN" o la expresión "ARN no codificante largo" se usa comúnmente en la técnica e indica un ncARN que comprende más de 200 nucleótidos. Las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 comprenden secuencias que varían de 132 a 1598 nucleótidos.

Los compuestos de la presente divulgación pueden formularse en vesículas, tales como liposomas. Los liposomas han gozado de gran interés debido a su especificidad y a la duración de la acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro de fármacos. Se han usado sistemas de suministro liposómico para suministrar de manera eficaz ácidos nucleicos, tales como siARNs en células *in vivo* (Zimmermann et al., (2006) Nature, 441:111-114). Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que se vaya a suministrar. Los liposomas catiónicos tienen la ventaja de que pueden fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse con la misma eficacia con la pared celular, son fagocitados por los macrófagos y otras células *in vivo*. Un compuesto que inhiba la expresión de uno o más de los IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, como se define en el presente documento en el punto (ii) es, de acuerdo con la presente divulgación, un compuesto que reduce o impide la transcripción de uno o más de los genes que codifican los IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1

a 7, 27 y 28. Dichos compuestos incluyen compuestos que interfieren con la maquinaria transcripcional y/o su interacción con el promotor de dichos genes y/o con los elementos de control de la expresión distante respecto del promotor, tales como los potenciadores. El compuesto que inhibe la expresión de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 inhibe específicamente la expresión de dicho lncARN, por ejemplo, interfiriendo de manera específica con la región promotora que controla la expresión del lncARN. Preferentemente, se reduce la transcripción de uno de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 en al menos un 50%, más preferentemente, en al menos un 75%, tal como al menos un 90% o 95%, aún más preferentemente, en al menos un 98% y lo más preferentemente, en aproximadamente un 100%. Un compuesto que inhibe la actividad de uno de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 como se define en el punto (ii) de acuerdo con la presente divulgación hace que dicho lncARN lleve a cabo su función con una eficacia reducida. El compuesto que inhibe la actividad de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 inhibe específicamente la actividad de dicho lncARN. Preferentemente, se reduce la actividad de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 en al menos un 50%, más preferentemente, en al menos un 75%, tal como al menos un 90% o 95%, aún más preferentemente, en al menos un 98% y lo más preferentemente, aproximadamente un 100%. Los medios y métodos para determinar la reducción de la actividad de un ARN se han establecido en la técnica y se describen, por ejemplo, en Esau et al. (2004), JBC, 279:52361-52365 o Gribbins et al. (2009), Nature Cell Biology 11, 1143-1149. Los compuestos como se definen en el presente documento en el punto (ii) pueden ser una molécula antisentido, siARNi, shARN, anticuerpo, ribozima, aptámero o molécula pequeña. Se proporcionarán detalles adicionales de estos y otros compuestos más adelante.

La eficacia de un compuesto inhibidor puede cuantificarse mediante métodos que comparan el nivel de actividad en presencia del inhibidor con aquel en ausencia del inhibidor. Por ejemplo, puede usarse una medida de actividad: el cambio en la cantidad de lncARN formado. Dicho método puede efectuarse en un formato de alto rendimiento a fin de probar la eficacia de varios compuestos inhibidores de manera simultánea. En general, pueden llevarse a cabo ensayos de alto rendimiento, independientemente de que sean bioquímicos, celulares o de otro tipo en los pocillos de placas de microtitulación, en donde cada placa puede contener 96, 384 o 1536 pocillos. La manipulación de las placas, incluyendo la incubación a temperaturas distintas de la temperatura ambiental y la puesta en contacto de los compuestos de ensayo con la mezcla de ensayo, se lleva a cabo preferentemente por medio de uno o más sistemas robóticos controlados por ordenador, incluyendo dispositivos de pipeteado. En caso de que se vayan a estudiar bibliotecas grandes de compuestos de ensayo y/o en caso de que se vaya a efectuar la exploración en un corto espacio de tiempo, pueden añadirse mezclas de, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 compuestos de ensayo a cada pocillo. En caso de que un pocillo muestre la actividad esperada, puede desconvolucionarse dicha mezcla de compuestos de ensayo para identificar uno o más compuestos de ensayo en dicha mezcla que ocasionen dicha actividad.

Un compuesto que promueve la expresión de uno o más de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13, como se define en el presente documento en el punto (i), puede ser cualquier compuesto que potencie o regule positivamente la transcripción de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. Los ejemplos no limitantes de dichos compuestos son factores de transcripción que potencian la transcripción de los genes que codifican los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 o una molécula pequeña que potencie la expresión de uno o más de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. Un factor de transcripción es una proteína que se une a secuencias de ADN específicas, controlando de este modo la transcripción de la información genética del ADN al ARN. Una molécula pequeña es un compuesto de bajo peso molecular que, por definición, no es un polímero. Un compuesto que promueve la Actividad de uno o más de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13, como se define en el presente documento en el punto (i), puede ser cualquier compuesto que haga que dicho lncARN lleve a cabo de manera eficaz su función en una célula. Por lo tanto, en la forma más simple, dicho compuesto puede ser un lncARN producido de manera recombinante o aislado seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 o cualquier precursor o fragmento del mismo. En este contexto, la administración de un lncARN producido de manera recombinante o aislado aumenta la concentración de lncARN en el sujeto que se vaya a tratar. Esta mayor concentración promueve la actividad general del lncARN respectivo en el sujeto. Los fragmentos han de conservar o conservar esencialmente la función del lncARN de longitud completa. Dicho compuesto también puede ser un vector o un hospedador que sea capaz de producir dichos lncARNs. Por lo tanto, los fragmentos han de ser fragmentos funcionales. Asimismo, pueden usarse secuencias ortólogas u homólogas del lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 de diferentes especies, incluyendo precursores o fragmentos funcionales de los mismos. A este respecto, las secuencias homólogas preferidas del lncARN humano de las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 son los respectivos homólogos de ratón de las SEQ ID NO: 25, 21 a 24 y 26, respectivamente. La secuencia homóloga más preferida es la SEQ ID NO: 12. Como alternativa, dicho compuesto puede ser un compuesto que conserva o incluso mejora la actividad de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13, actuando ya sea directa o indirectamente con el lncARN. Por ejemplo, dicho compuesto puede impedir la degradación de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 por medio de RNasas o puede ser un compañero de interacción, tal como otro lncARN, que se une a y promueve la actividad de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. Se proporcionarán detalles adicionales más adelante en el presente documento de los compuestos como se definen en el presente documento en el punto (i).

También puede cuantificarse la eficacia de un compuesto como se define en el presente documento en el punto (i) mediante métodos que comparan el nivel de expresión y/o actividad de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 en presencia de un compuesto que promueva la expresión y/o la actividad del lncARN, tal como un

factor de transcripción, con la misma en ausencia de dicho compuesto. Por ejemplo, puede usarse como medida de actividad el cambio en la cantidad de IncARN formado. El método se lleva a cabo preferentemente en formato de alto rendimiento, como se ha detallado con más detalle anteriormente en el presente documento.

5 La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un compuesto que promueve la expresión y/o la actividad del IncARN de SEQ ID NO: 12 para su uso en el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca patológica, en donde el compuesto es (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico del IncARN de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 69% idéntica a la misma, (b) un vector de expresión que expresa la secuencia de ácido nucleico como se define en (a), preferentemente
10 bajo el control de un promotor específico de corazón o (c) un hospedador que comprende el vector de expresión de (b).

También se describe un compuesto (i) que promueve la expresión y/o la actividad de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13; y/o (ii) que inhibe la expresión y/o la actividad de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, para su uso en el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca.
15

Se han proporcionado detalles adicionales de los compuestos definidos en el presente documento en los puntos (i) y (ii) en relación con la composición farmacéutica descrita en el presente documento. Pueden usarse los mismos compuestos para tratar o prevenir la hipertrofia cardíaca patológica.
20

La hipertrofia cardíaca se define como un aumento del tamaño del corazón, sin aumentar el número de miocitos. Esto ocasiona un engrosamiento las paredes cardíacas. La hipertrofia cardíaca patológica se produce en respuesta a la sobrecarga hemodinámica causada por diferentes formas de estrés, tal como hipertensión, valvulopatía e infarto de miocardio (IM). Un crecimiento hipertrófico del corazón provoca arritmias cardíacas, insuficiencia cardíaca y puede causar muerte súbita (Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65: 45-79). Por lo tanto, de acuerdo con la divulgación, la hipertrofia cardíaca es una hipertrofia cardíaca no saludable (o hipertrofia patológica), tal como hipertrofia cardíaca en respuesta al estrés o una enfermedad, por ejemplo, hipertensión, lesión del músculo cardíaco (infarto de miocardio), insuficiencia cardíaca o neurohormonas. La hipertrofia cardíaca no saludable debe distinguirse de la hipertrofia cardíaca saludable (hipertrofia fisiológica o "corazón de atleta"), que es una respuesta normal del corazón, por ejemplo, en respuesta a un ejercicio saludable o un embarazo. Entre los individuos sanos, los remeros o los ciclistas tienden a tener un corazón de mayor tamaño, con un espesor de la pared ventricular izquierda de 1,3 centímetros, en comparación con los 1,1 centímetros en un adulto medio.
25
30

A fin de identificar IncARNs que desempeñan un papel en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, se usó el modelo de ratón de constricción aórtica transversal (TAC) (véase deAlmeida et al., (2010), *J Vis Exp.* abril de 2010, (38)). El modelo de ratón de TAC se estableció en 1991. Desde entonces, se ha usado exhaustivamente este modelo como una herramienta valiosa para imitar la hipertrofia cardíaca humana para dilucidar procesos de señalización fundamentales implicados en la respuesta hipertrófica cardíaca. Se usó el ARN aislado de ratones TAC para la elaboración de perfiles de IncARNs globales en corazón completo, así como en muestras específicas de cardiomiocitos aplicando las plataformas NCode y Arraystar. Sorprendentemente, se ha descubierto que los IncARNs específicos se encuentran significativamente desregulados en comparación con los ratones de control negativo. Estos IncARNs se seleccionaron de los datos de los perfiles elaborados (véase la tabla 5). Se verificó la presencia de transcritos en el tejido cardíaco de ratón mediante PCR y la desregulación se validó mediante PCR en tiempo real.
35
40
45

Como resulta evidente a partir de los ejemplos más adelante en el presente documento, la presente divulgación descubrió inesperadamente que los homólogos de ratón (es decir, los IncARNs de las SEQ ID NO: 14 a 20) de los IncARNs humanos de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 se encuentran regulados positivamente de manera significativa en el modelo de ratón TAC, en comparación con los ratones de control negativo. A este respecto, cabe destacar que las secuencias humanas, las SEQ ID NO: 1, 27 y 28 son homólogas de la secuencia de ratón de SEQ ID NO: 14. A causa de un evento de duplicación genómica que distingue al ser humano del ratón, existe más de un homólogo de ser humano. Se observó que los tres homólogos de ser humano se expresan en los tejidos cardíacos humanos y más sorprendentemente, se descubrió que están regulados positivamente en los corazones hipertróficos de pacientes con estenosis aórtica (véase la figura 13 B). La regulación positiva de estos IncARNs homólogos de ser humano se asocia evidentemente con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Por consiguiente, los IncARNs de ratón de las SEQ ID NO: 14 a 20, así como los IncARNs homólogos de ser humano de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, son IncARNs prohipertróficos. Puede esperarse que los IncARNs homólogos de ser humano tengan la misma función que los IncARNs de ratón. Se deduce que la inhibición de la expresión y/o actividad de los IncARNs de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 en seres humanos será beneficiosa para el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca.
50
55
60

Como resulta además evidente a partir de los ejemplos más adelante en el presente documento, la presente divulgación revela que los homólogos de ratón (es decir, los IncARNs de las SEQ ID NO: 25, 21 a 24 y 26) de los IncARNs humanos de las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 se encuentran regulados negativamente de manera significativa en el modelo de ratón TAC, en comparación con los ratones de control negativo. La regulación negativa de estos IncARNs de ratón se asocia evidentemente con el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Por consiguiente, los IncARNs de ratón de las SEQ ID NO: 25, 21 a 24 y 26, así como los IncARNs homólogos de ser humano de las SEQ ID NO:
65

12, 8 a 11 y 13 son lncARNs antihipertróficos. Se deduce que la promoción de la expresión y/o actividad de los lncARNs de las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 en seres humanos será beneficiosa para el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca.

5 Se ha demostrado experimentalmente la conclusión de que los lncARNs de ratón de SEQ ID NO: 14 a 20 son lncARNs prohipertróficos, mientras que los lncARN de SEQ ID NO: 25, 21 a 24 y 26 son lncARNs antihipertróficos para el lncARN prohipertrófico Gm11641 (SEQ ID NO: 14; homólogos de humano de SEQ ID NO: 1, 27 y 28), el lncARN antihipertrófico Gm17499 (SEQ ID NO: 21, homólogo de humano de SEQ ID NO: 8) y el lncARN antihipertrófico H19 (SEQ ID NO: 25; homólogo de humano de SEQ ID NO: 12) mediante un modelo *in vitro* independiente. En el presente documento, Gm11641 también se cita como Chast (transcrito asociado con hipertrofia cardíaca). El rasgo característico de los cardiomiocitos hipertrofiados es un aumento en el tamaño celular, en relación con las células no hipertrofiadas. Puede inducirse el crecimiento hipertrofico *in vitro* y el aumento del tamaño celular de las células de músculo cardíaco de ratón HL-1 con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). Por lo tanto, en una primera configuración experimental, se investigó el tamaño celular de células de músculo cardíaco de ratón HL-1 tras su estimulación con PE e ISO en condiciones, en donde (a) se reprime la expresión del lncARN Gm11641 así como (b) en condiciones, en donde se eleva la expresión del lncARN Gm11641 (véase la Fig. 11). En línea con los resultados en el modelo de ratón TAC, se descubrió que la expresión del lncARN Gm11641 provoca un aumento del tamaño celular en comparación con un control negativo, mientras que la represión del lncARN Gm11641 redujo el tamaño de los cardiomiocitos y además, atenuó el aumento de tamaño celular inducido por PE/ISO. Además, la sobreexpresión de Gm11641 aumenta la masa muscular del ventrículo izquierdo e induce el crecimiento de los cardiomiocitos (Fig. 38). Estos resultados demuestran la función prohipertrófica del lncARN Gm11641. Se llevaron a cabo experimentos correspondientes en una segunda y una tercera configuración experimental con los lncARNs Gm17499 y H19, respectivamente. Asimismo, en línea con los resultados en el modelo de ratón TAC, la expresión potenciada del lncARN Gm17499 impide el aumento del tamaño de las células HL-1 causado por estímulos prohipertróficos, mientras que el silenciamiento del lncARN Gm17499 da como resultado un agrandamiento de los cardiomiocitos HL-1, lo que indica una función antihipertrófica de este transcrito (véase la figura 22). Estos resultados demuestran la función antihipertrófica del lncARN Gm17499. Se observaron resultados similares en experimentos con la supresión del lncARN H19 (véanse las Fig. 28 a 30). De manera importante, cuando se examinó la expresión de H19 en tejido cardíaco humano sano e hipertrofico (causado por estenosis aórtica), se observó que H19 está fuertemente regulado negativamente en los corazones hipertrofiados (véase la Fig. 31). Además, los resultados *in vivo* en ratones con silenciamiento génico de H19 indican que H19 tiene un efecto beneficioso en el programa génico hipertrofico y es útil en un tratamiento antihipertrófico (véanse las Fig. 34 y 35).

De acuerdo con una realización preferida del primer aspecto de la invención, la hipertrofia cardíaca es una hipertrofia ventricular.

La mayoría de casos de hipertrofia cardíaca afectan a los ventrículos del corazón. Aunque es más común la hipertrofia ventricular izquierda, también puede producirse hipertrofia cardíaca en el ventrículo derecho o en ambos ventrículos. Los ventrículos son las cámaras dentro del corazón responsables de bombear sangre a los pulmones (ventrículo derecho) o al resto del organismo (ventrículo izquierdo).

El compuesto como se ha definido anteriormente en el presente documento en el punto (ii) puede ser (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos 12 nucleótidos contiguos de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, (b) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos un 69% idéntica a la hebra complementaria de uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, (c) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos de acuerdo con (a) o (b), en donde U se reemplaza por T, (d) un vector de expresión que expresa la secuencia de ácido nucleico como se ha definido en uno cualquiera de (a) a (c), preferentemente bajo el control de un promotor específico de corazón o (e) un hospedador que comprende el vector de expresión de (d).

La expresión "secuencia de ácido nucleico" o "secuencia de nucleótidos", de acuerdo con la presente divulgación, incluye ADN, tal como ADNc o, preferentemente, ADN genómico y ARN. Se entiende que el término "ARN", tal como se usa en el presente documento, comprende todas las formas de ARN, incluyendo, preferentemente, ARNm o miARN. La expresión "secuencia de ácido nucleico" se usa, de acuerdo con la divulgación, como sinónimo del término "polinucleótido".

Las secuencias de ácido nucleico como se han definido en los puntos (a) a (c) pueden comprender o consistir en secuencias que comprenden o que son complementarias a nucleótidos de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Por lo tanto, estas secuencias de ácido nucleico pueden comprender o ser secuencias de ácido nucleico antisentido. La tecnología antisentido para silenciar la expresión de un gen diana está bien establecida y se usa ampliamente en la técnica para tratar diversas enfermedades.

La molécula de acuerdo con el punto (a) puede comprender o consistir en una secuencia que es, por orden de preferencia, complementaria a al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos,

al menos 21 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos o los 23 nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Estos al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos o al menos 21 nucleótidos son preferentemente una parte contigua de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, es decir, los nucleótidos son consecutivos en su SEQ ID NO respectiva.

La molécula de acuerdo con el punto (a) es preferentemente un "siARNi". El término "siARNi" de acuerdo con la presente divulgación se refiere a ARN pequeño de interferencia, también conocido como ARN corto de interferencia o ARN de silenciamiento. Los siARNsi son una clase de moléculas de ARN bicatenario de 18 a 30, preferentemente de 20 a 25, más preferentemente de 21 a 23 o de 21 nucleótidos de longitud que tienen diversos papeles en la biología. De manera más destacable, el siARN está implicado en la vía de interferencia de ARN (iARN), donde el siARN interfiere con la expresión de un gen específico. Además de su papel en la vía de iARN, los siARNs también actúan en las vías relacionadas con la iARN, por ejemplo, como mecanismo antivírico o para dar forma a la estructura de la cromatina de un genoma. Los siARNs tienen una estructura bien definida: una hebra bicatenaria corta de ARN (bcARN), ventajosamente, teniendo al menos una hebra de ARN un saliente. Cada hebra tiene normalmente un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura es el resultado del procesamiento por decir, una enzima que convierte los bcARNs largos o los ARN en horquilla corta en siARNs. Los siARNs también pueden introducirse de manera exógena (artificial) en las células para provocar el silenciamiento génico específico de un gen de interés. Por lo tanto, en principio, puede usarse como diana cualquier gen de secuencia conocida basándose en su complementariedad de secuencia con un siARN diseñado de manera adecuada. La molécula de ARN bicatenaria o un producto del procesamiento metabólico de la misma tiene la capacidad de mediar modificaciones en el ácido nucleico específicas de la diana, en particular, interferencia de ARN y/o metilación del ADN. Asimismo, preferentemente, al menos una hebra de ARN tiene un saliente 5' y/o 3'. Preferentemente, uno o ambos extremos de la doble cadena tienen un saliente 3' de 1-5 nucleótidos, más preferentemente, de 1-3 nucleótidos y lo más preferentemente, de 2 nucleótidos. En general, en el presente documento se prevé cualquier molécula de ARN adecuada para que actúe como siARN. El silenciamiento más eficaz se ha obtenido hasta ahora con dúplex de siARNs formados por hebras codificantes de 21 nt y hebras no codificantes de 21 nt, emparejadas de tal forma que tienen salientes 3' de 2 nt. La secuencia del saliente 3' de 2 nt proporciona una pequeña contribución a la especificidad del reconocimiento de la diana restringida al nucleótido desapareado adyacente al primer par de bases (Elbashir et al., Nature. 24 de mayo de 2001; 411(6836):494-8). Los desoxinucleótidos 2' en los salientes 3' son igual de eficaces que los ribonucleótidos, pero normalmente son más baratos de sintetizar y probablemente, más resistentes a las nucleasas. El siARN de acuerdo con la presente divulgación comprende una hebra antisentido que comprende o consiste en una secuencia que es, por orden de preferencia, complementaria a al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 21 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos o los 23 nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Estos al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos o al menos 21 nucleótidos son preferentemente una parte contigua de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, es decir, los nucleótidos son consecutivos en su SEQ ID NO respectiva.

La molécula de acuerdo con el punto (a) es también preferentemente un "shARN". Un "shARN" de acuerdo con la presente divulgación es un ARN en horquilla corta, que es una secuencia de ARN que forma un giro en horquilla (cerrado) que también puede usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia de ARN. El shARN utiliza preferentemente el promotor U6 para su expresión. La estructura de horquilla del shARN se escinde por la maquinaria celular en siARN, que después se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este complejo se une a y escinde los ARNm que coinciden con el shARN unido a los mismos. El shARN de acuerdo con la divulgación comprende o consiste en una secuencia que es, por orden de preferencia, complementaria a al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 21 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos o los 23 nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Estos al menos 13 nucleótidos, al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 16 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 19 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos o al menos 21 nucleótidos son preferentemente una parte contigua de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, es decir, los nucleótidos son consecutivos en su SEQ ID NO respectiva.

Una molécula de acuerdo con el punto (b) como se ha descrito anteriormente en el presente documento puede ser capaz de interactuar con, más específicamente, de hibridarse con el IncARN diana. La función del IncARN se reduce o bloquea mediante la formación del híbrido. Se han descrito métodos convencionales relativos a dicha tecnología antisentido (véase, por ejemplo, Melani et al., Cancer Res. (1991) 51:2897-2901). La expresión "molécula antisentido" de acuerdo con la presente divulgación se refiere, por tanto, a una molécula de ácido nucleico, preferentemente, una molécula de ARN que tiene una secuencia de bases complementaria a un IncARN dado, es decir, la secuencia "codificante".

Un ejemplo particularmente preferido de la molécula de acuerdo con el punto (a) es un siARN preparado por endorribonucleasa (esiARN). Un esiARN es una mezcla de oligos de siARNi que es el resultado de la escisión de un ARN bicatenario (bcARN) largo de acuerdo con el punto (b) con una endorribonucleasa, tal como RNasa III de *Escherichia coli* o dicer. Los esiARNs son un concepto alternativo al uso de siARNs sintetizados químicamente para

la interferencia de ARN (iARN). Un esiARN es la digestión enzimática *in vitro* de un ARN bicatenario largo. Para la generación de los esiARNs, puede amplificarse mediante la PCR un molde de IncARN y marcarse con dos secuencias promotoras de bacteriófago. Después, se usa ARN polimerasa para generar el ARN bicatenario largo que es complementario al ADNc del gen diana. Este ARN complementario puede digerirse posteriormente con RNasa III de *Escherichia coli* para generar fragmentos cortos solapantes de siARN con una longitud de entre 18-25 pares de bases. Esta mezcla compleja de ARN bicatenarios cortos es similar a la mezcla generada por la escisión de dicer *in vivo* y por lo tanto, se denomina siARN preparado por endorribonucleasas o esiARN corto. Por lo tanto, los esiARNs son una mezcla heterogénea de siARNs que actúan de manera selectiva sobre la misma secuencia de ARNm. Los esiARNs provocan un silenciamiento génico altamente específico y eficaz.

La identidad de secuencia de la molécula de acuerdo con el punto (b) respecto de un IncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 es, por orden de preferencia, de al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, al menos un 99% y un 100%. Se conocen en la técnica medios y métodos para determinar la identidad de secuencia. Preferentemente, se usa el programa BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool, herramienta de búsqueda de alineamiento local básico) para determinar la identidad de secuencia respecto de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Los ejemplos preferidos de secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos un 69% idéntica a la hebra complementaria de uno o más de los IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 son la hebra complementaria de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 14 a 20.

Las moléculas antisentido, los siARNs y los shARNs descritos en el presente documento se sintetizan preferentemente de manera química usando fosforamiditas de ribonucleósidos debidamente protegidas y un sintetizador de ARN convencional. Los proveedores de reactivos para la síntesis de ARN incluyen Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE. UU.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE. UU.), Glen Research (Sterling, VA, EE. UU.), ChemGenes (Ashland, MA, EE. UU.) y Cruachem (Glasgow, R. U.).

La capacidad de las moléculas antisentido, siARNs y shARNs, para silenciar de manera potente pero reversible el IncARN y genes *in vivo* hace que estas moléculas sean particularmente adecuadas para su uso en la composición farmacéutica descrita en el presente documento. Se describen formas para administrar siARN a seres humanos en De Fougerolles et al., *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8:280-285. Dichas formas también son adecuadas para administrar otras moléculas pequeñas de ARN, tales como shARN. Por consiguiente, pueden administrarse dichas composiciones farmacéuticas formuladas directamente en forma de suero salino, mediante estrategias de nanopartículas a base de liposomas o a base de polímeros, en forma de composiciones farmacéuticas conjugadas o complejadas o mediante sistemas de suministro vírico. La administración directa comprende inyección en tejido y administración intranasal e intratraqueal. Las estrategias de nanopartículas a base de liposomas y a base de polímeros comprenden el lípido catiónico Genzyme Lipid (GL) 67, liposomas catiónicos, nanopartículas de quitosano y péptidos catiónicos de penetración en células (CPP). Las composiciones farmacéuticas conjugadas o de complejación comprenden moléculas antisentido complejadas con PEI, siARN, shARN o miARN. Además, los sistemas de suministro vírico comprenden envueltas y virosomas del virus de la gripe.

Las moléculas antisentido, siARNs, y shARNs pueden comprender nucleótidos modificados, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés, Locked Nucleic Acid). El resto de ribosa de un nucleótido de LNA se modifica con un puente adicional que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. El puente "bloquea" la ribosa en la conformación 3'-endo (Norte), que normalmente se encuentra en los dúplex de forma A. Los nucleótidos de LNA pueden mezclarse con restos de ADN o ARN en el oligonucleótido siempre que se desee. Dichos oligómeros se sintetizan químicamente y se encuentran disponibles comercialmente. La conformación de ribosa bloqueada mejora el apilamiento de bases y la organización previa del armazón. Esto aumenta significativamente las propiedades de hibridación (temperatura de fusión) de los oligonucleótidos. Un ejemplo particularmente preferido de siARNes los GapmeR (LNA™ GapmeR (Exigon)). Los GapmeR son potentes oligonucleótidos antisentido usados para una inhibición altamente eficaz de la función de los ARNm y IncARN. Los GapmeR contienen una serie central de monómeros de ADN flanqueada por bloques de LNA. Los GapmeR tienen preferentemente 14-16 nucleótidos de longitud y opcionalmente, están completamente fosforilados. El hueco de ADN activa la degradación mediada por RNasa II de los ARN diana y también es adecuado para actuar de manera selectiva directa sobre transcritos en el núcleo. Los GapmeR se usan en los ejemplos, por ejemplo, para regular negativamente el IncARN Gm11641 (SEQ ID NO: 14) en la línea celular de cardiomiocitos HL-1 (Fig. 9).

Los ejemplos de vectores de expresión adecuados que pueden usarse en relación con el punto (d) como se ha descrito anteriormente se detallarán más adelante en el presente documento.

El compuesto como se ha descrito en el presente documento anteriormente en el punto (ii) puede ser un aptámero, una ribozima, un anticuerpo, un fármaco proteínico o un inhibidor de molécula pequeña.

Este aptámero, ribozima, anticuerpo, fármaco proteínico o inhibidor de molécula pequeña se une de manera específica a uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, inhibiendo de este modo la actividad de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28.

El término "aptámero", como se describe en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN o ADN que se encuentran o bien en la conformación D natural o en la conformación L ("Spiegemelter") que se han seleccionado de grupos aleatorios basándose en su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácidos nucleicos, proteínas, compuestos orgánicos pequeños e incluso organismos completos. Se mantiene una base de datos de aptámeros en <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.

Más específicamente, los aptámeros pueden clasificarse como aptámeros de ADN o ARN o aptámeros peptídicos. Mientras que los primeros constan de hebras (normalmente cortas) de oligonucleótidos, los últimos constan de un dominio peptídico variable corto, unidos en ambos extremos a un armazón proteínico. Los aptámeros de ácido nucleico son especies de ácido nucleico que se han diseñado mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o de manera equivalente, SELEX (por sus siglas en inglés, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento potencial) para que se unan a diversas dianas moleculares, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. La diana molecular prevista en el presente documento es un ácido nucleico, a saber, un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. Por lo tanto, pueden producirse aptámeros contra la molécula diana descrita en el presente documento. Los aptámeros peptídicos son péptidos que se diseñan para interferir con otras interacciones entre proteínas dentro de las células. Consisten en un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un armazón proteínico. Esta doble restricción estructural aumenta significativamente la afinidad de unión del aptámero peptídico hasta niveles comparables con los de un anticuerpo (intervalo nanomolar). La longitud del bucle variable está normalmente formada por 10 a 20 aminoácidos y el armazón puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. En la actualidad, el armazón proteínico más usado es la proteína bacteriana, tiorredoxina A, insertándose el bucle variable dentro del sitio activo reductor, que es un bucle de -Cys-Gly-Pro-Cys en la proteína silvestre, siendo capaces las dos cadenas laterales de cisteína de formar un puente disulfuro. La selección de aptámeros peptídicos puede efectuarse usando diferentes sistemas, pero el más usado en la actualidad es el sistema de dos híbridos de levadura.

Los aptámeros son útiles en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de las biomoléculas normalmente usadas, en particular, los anticuerpos. Además de su reconocimiento discriminado, los aptámeros tienen ventajas frente a los anticuerpos, ya que pueden diseñarse completamente en un tubo de ensayo, se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros no modificados se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo, con una semivida de minutos a horas, principalmente debido a la degradación por nucleasas y a la eliminación del organismo a través de los riñones, un resultado del bajo peso molecular inherente del aptámero. La rápida eliminación de los aptámeros puede ser una ventaja en aplicaciones como la obtención de imágenes diagnósticas *in vivo*. Los científicos cuentan con varias modificaciones, tales como pirimidinas sustituidas con 2'-flúor, enlace de polietilenglicol (PEG), etc. con las que puede aumentarse fácilmente la semivida de los aptámeros a escala de días o incluso semanas.

El término "ribozima" se refiere a moléculas de ARN que actúan como enzimas en ausencia de proteínas. Estas moléculas de ARN actúan de manera catalítica o autocatalítica y son capaces de escindir, por ejemplo, otros ARN en sitios diana específicos, aunque también se ha observado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma. Puede llevarse a cabo la selección de sitios diana adecuados y de las ribozimas correspondientes como se describe, por ejemplo, en Zaher y Urnau (2007), RNA 13 (7): 1017-1026.

Son ejemplos de ARN autoescisores pequeños bien caracterizados las ribozimas hammerhead, hairpin, virus de la hepatitis delta y las seleccionadas *in vitro* dependientes de líder. La organización de estos catalizadores pequeños difiere de la de ribozimas de mayor tamaño, tales como el intrón de grupo I.

El principio de la autoescisión catalítica se ha analizado exhaustivamente en los últimos 10 años. Las ribozimas hammerhead son las mejor caracterizadas entre las moléculas de ARN con actividad de ribozima. Debido a que se ha demostrado que las estructuras hammerhead pueden integrarse en secuencias de ARN heterólogas y que por lo tanto puede transferirse la actividad de ribozima a estas moléculas, parece ser que pueden crearse secuencias catalíticas para prácticamente cualquier secuencia diana, a condición de que la secuencia diana contenga un potencial sitio de escisión coincidente.

El principio básico de la construcción de ribozimas hammerhead es el siguiente: Se selecciona una región del ARN de interés, que contiene el triplete GUC (o CUC). Se toman dos hebras de oligonucleótido, cada una de 6 a 8 nucleótidos y entre ellas se inserta la secuencia catalítica hammerhead. Se han sintetizado moléculas de este tipo para numerosas secuencias diana. Mostraron actividad catalítica *in vitro* y en algunos casos, también *in vivo*. Normalmente, los mejores resultados se obtienen con ribozimas y secuencias diana cortas. Ya que la secuencia diana es una secuencia de ARN corta, a saber, un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28, los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 son secuencias diana genuinas para la generación de ribozimas que sean capaces de escindir un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28.

Asimismo, los aptámeros y ribozimas pueden comprender nucleótidos modificados, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, comprende, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. Además, el término "anticuerpo" también comprende derivados o fragmentos del mismo que conserven la especificidad de unión. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden, entre otras cosas, fragmentos Fab o Fab', fragmentos Fd, F(ab')₂, Fv o scFv, un solo dominio V_H o dominios similares a V, tales como dominios V_HH o V-NAR, así como formatos multiméricos, tales como minibodies, diabodies, tribodies, tetrabodies o multímeros Fab' conjugados químicamente (véase, por ejemplo, Altshuler et al., 2010., Holliger y Hudson, 2005). El término "anticuerpo" también incluye anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos (dominio constante humano, dominio variable no humano), monocatenarios y humanizados (anticuerpo humano, salvo por las CDR no humanas).

En la especialidad se conocen diversas técnicas para la producción de anticuerpos y fragmentos de los mismos y se describen, por ejemplo, en Altshuler et al., 2010. Por lo tanto, pueden obtenerse anticuerpos policlonales de la sangre de un animal después de su inmunización con un antígeno mezclado con aditivos y adyuvantes y los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Se describen ejemplos para dichas técnicas, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) y (1999) e incluyen la técnica de hibridoma, descrita inicialmente por Köhler y Milstein, 1975, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, 1983; Li et al., 2006) y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985). Además, pueden obtenerse anticuerpos recombinantes a partir de anticuerpos monoclonales o pueden prepararse *de novo* usando varios métodos de presentación, tales como presentación en fagos, ribosómica, de ARNm o celular. Un sistema adecuado para la expresión de los anticuerpos recombinantes (humanizados) o fragmentos de los mismos puede seleccionarse entre, por ejemplo, bacterias, levaduras, insectos, líneas celulares de mamíferos o animales o plantas transgénicas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6.080.560; Holliger y Hudson, 2005). Además, pueden adaptarse las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otras, la Patente de los Estados Unidos 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios específicos para la diana descrita en el presente documento. Puede usarse resonancia de plasmón superficial, como se emplea en el sistema BIAcore, para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fagos.

La expresión "fármaco proteínico" indica fármacos de diseño que son derivados de proteínas humanas. Estas proteínas se usan como armazón para crear un fármaco proteínico mediante procedimientos de exploración bien conocidos (véase Tomlinson et al. (2004), NATURE BIOTECHNOLOGY, 22(5): 521-522). Los ejemplos no limitantes de proteínas humanas que sirven como armazón para diseñar fármacos proteínicos son transferrina, lectinas de tipo C, trinectinas, anticuerpos de dominio, dominios kunitz, lipocalinas y el dominio SH3 de Fyn.

Un inhibidor de molécula pequeña es un compuesto orgánico de bajo peso molecular que por definición, no es un polímero. La molécula pequeña como se describe en el presente documento puede ser una molécula que se une con alta afinidad a un lncARN de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y además, inhibe la actividad de un lncARN de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28. El límite superior de peso molecular para una molécula pequeña es preferentemente de 1500 Da, más preferentemente, de 1000 Da y lo más preferentemente, de 800 Da, lo que posibilita que se difunda rápidamente a través de las membranas celulares, por lo que puede alcanzar sitios de acción intracelulares. Se han establecido en la especialidad bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas y técnicas de alto rendimiento para explorar dichas bibliotecas con una molécula diana específica, en el presente caso, un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28.

Puede fusionarse una molécula antisentido, siARN, shARN, anticuerpo, enzima, ribozima, aptámero, fármaco proteínico o inhibidor de molécula pequeña a un lípido, tal como colesterol. Los medios y métodos para introducir modificaciones de lípidos y en particular, una modificación con colesterol en una molécula de ácido nucleico se describen en Krützfeld et al., 2005 (Nature 438, 685-689). Por ejemplo, puede unirse un colesterol a través de un engarce de hidroxiprolinol a una molécula de ácido nucleico. Dichas modificaciones aumentan la eficacia de la captación de una molécula de ácido nucleico y en particular, de ARN pequeños al interior de la célula.

El compuesto descrito anteriormente en el presente documento en el punto (i) puede ser (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 o una secuencia de ácido nucleico que sea al menos un 69% idéntica a las mismas, (b) un vector de expresión que expresa la secuencia de ácido nucleico como se define en (a), preferentemente bajo el control de un promotor específico de corazón o (c) un hospedador que comprende el vector de expresión de (b).

La secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el punto (a) como se ha descrito anteriormente en el presente documento puede ser un lncARN producido de manera recombinante o aislado seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13, cualquier precursor del mismo o cualquier fragmento del mismo, en tanto que se conserve una identidad de secuencia de al menos el 69% a lo largo de la longitud completa de un lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. Asimismo, pueden usarse secuencias ortólogas u homólogas del lncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 de diferentes especies, incluyendo precursores o un fragmento funcional de los mismos. Preferentemente, se usan los homólogos de ratón respectivos de SEQ ID NO: 21 a 26. Los fragmentos han de conservar o conservar esencialmente la función del lncARN de longitud completa. Por lo tanto, los fragmentos han de ser fragmentos funcionales. Son ejemplos particularmente preferidos de secuencias que comprenden una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 69% idéntica a los lncARNs de las SEQ ID NO: 8 a 13 los lncARNs homólogos

de ratón de las SEQ ID NO: 21 a 26, respectivamente. El IncARN homólogo de ratón más preferido es la SEQ ID NO: 25.

La identidad de secuencia de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con el punto (a) respecto de un IncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 es, por orden de preferencia, de al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, al menos un 99% y un 100%. Se conocen en la técnica medios y métodos para determinar la identidad de secuencia. Preferentemente, se usa el programa BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool, herramienta de búsqueda de alineamiento local básico) para determinar la identidad de secuencia respecto de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13.

De acuerdo con los puntos (b) y (c) como se han descrito anteriormente en el presente documento, dicho compuesto también puede ser un vector de expresión o un hospedador que es capaz de producir una secuencia de ácido nucleico como se ha definido anteriormente en el presente documento en el punto (a).

Un vector de expresión puede ser un plásmido que se usa para introducir un transcrito específico en una célula diana. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula, se produce la proteína codificada por el gen mediante los complejos ribosómicos de la maquinaria de transcripción y traducción celular. En general, el plásmido se modifica para que contenga secuencias reguladoras que actúan como regiones potenciadoras y/o promotoras y da lugar a una transcripción eficaz del transcrito. De acuerdo con la presente divulgación, el vector de expresión contiene preferentemente un promotor específico de corazón. Se conocen en la técnica promotores específicos de corazón, por ejemplo, de Boecker et al. (2004), *Mol Imagin.*; 3(2):69-75. Esto garantiza que las secuencias de ácido nucleico se expresen únicamente en el corazón y puede evitar potenciales efectos secundarios no deseados mediante la expresión en otros órganos.

Los ejemplos no limitantes de vectores de expresión incluyen vectores plasmídicos de procariotas, tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCRTLPO (Invitrogen) y vectores compatibles con la expresión en células de mamífero, como pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Los ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pAO815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen). Para la formulación de una composición farmacéutica, se selecciona un vector adecuado de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación. Dichos vectores se conocen en la técnica, por ejemplo, de Ausubel et al, *Hum Gene Ther.* abril de 2011; 22(4):489-97 o Allay et al., *Hum Gene Ther.* mayo de 2011; 22(5): 595-604.

Un vector de expresión en mamíferos típico contiene el elemento promotor, que actúa como intermediario en el inicio de la transcripción del ARNm, la secuencia codificante de proteína y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y poliadenilación del transcrito. Además, también pueden incluirse elementos tales como un origen de replicación, gen de resistencia a fármacos y reguladores (como parte de un promotor inducible). El promotor *lac* es un promotor inducible típico, útil para células procariotas, que puede inducirse usando el análogo de lactosa *isopropiltiol-b-D-galactósido*. ("IPTG"). Para la expresión y secreción recombinantes, puede ligarse el polinucleótido de interés entre, por ejemplo, la secuencia líder de PeiB, que dirige a la proteína recombinante en el periplasma y el gen III en un fagémido, denominado pHEN4 (descrito en Ghahroudi et al., 1997, *FEBS Letters* 414:521-526). Los elementos adicionales pueden incluir potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores para el corte y empalme de ARN. Puede lograrse una transcripción altamente eficiente con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones largas terminales (LTR) de retrovirus, por ejemplo, VRS, HTLVI, HIV1 y el promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Como alternativa, el (poli) péptido recombinante puede expresarse en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma. La transfección junto con un marcador de selección, tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades del (poli) péptido codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy et al. 1991, *Biochem J.* 227:277-279; Bebbington et al. 1992, *Bio/Technology* 10:169-175). Mediante el uso de estos marcadores, las células de mamífero se cultivan en medio de selección y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Como se ha indicado anteriormente, los vectores de expresión incluirán preferentemente al menos un marcador de selección. Dichos marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para el cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclinas, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3. En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, el

virico de SV40 y M 13.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden, por ejemplo, sintetizarse mediante métodos convencionales o aislarse de fuentes naturales. El ligamiento de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción y/o a otras secuencias codificantes de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo usando métodos establecidos. Los expertos en la materia conocen bien los elementos reguladores de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariotas o eucariotas. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, codón de inicio de la traducción, promotores, potenciadores y/o aislantes), sitios de entrada al ribosoma internos (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) y opcionalmente, señales de poliA que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores de la transcripción y de la traducción y/o regiones promotoras asociadas de manera natural y/o heterólogas. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos como se ha definido en el punto (a) descrito anteriormente está unida operativamente a dichas secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariotas o eucariotas.

El hospedador puede ser una célula procariota o eucariota. Un hospedador eucariota adecuado puede ser una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, una célula fúngica o una célula vegetal. Los ejemplos representativos de células bacterianas son células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; de las células fúngicas son las células de levadura; y de células de insecto son células S2 de *Drosophila* Sf9 de *Spodoptera*. Se prefiere que la célula sea una célula de mamífero, tal como una célula humana. Las células hospedadoras de mamífero que pueden usarse incluyen células HeLa, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO). La célula puede formar parte de una línea celular, preferentemente una línea celular humana. Los medios y las condiciones de cultivo adecuadas para las células hospedadoras descritas anteriormente se conocen en la técnica. El hospedador es, preferentemente, una célula hospedadora y más preferentemente, una célula hospedadora aislada. El hospedador también es preferentemente un hospedador no humano.

El compuesto como se ha definido anteriormente en el punto (i) puede ser (a) un factor de transcripción que promueve la expresión de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 y/o (b) una molécula pequeña que potencia la expresión de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13.

La expresión "factor de transcripción", tal como se usa en el presente documento, define una proteína o péptido que se une a secuencias de ADN específicas, controlando de este modo la transcripción de los genes que codifican uno o más de los IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. Puede cuantificarse la eficacia de un factor de transcripción para activar la expresión de un IncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 mediante métodos que comparan el nivel del IncARN en presencia del factor de transcripción con esta en ausencia del factor de transcripción. Por ejemplo, puede usarse como medida de actividad el cambio en la cantidad de IncARN formado. Dicho método puede efectuarse en un formato de alto rendimiento a fin de probar la eficacia de varios compuestos inhibidores de manera simultánea. Los formatos de alto rendimiento se han explicado con detalle anteriormente en el presente documento.

La molécula pequeña que potencia la expresión de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 es un compuesto orgánico de bajo peso molecular que, por definición, no es un polímero. La molécula pequeña, como se describe en el presente documento, puede ser una molécula que se une con alta afinidad a un IncARN de las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 y además, potencia la actividad de un IncARN de las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13. El límite superior de peso molecular para una molécula pequeña es preferentemente de 1500 Da, más preferentemente, de 1000 Da y lo más preferentemente, de 800 Da, lo que posibilita que se difunda rápidamente a través de las membranas celulares, por lo que puede alcanzar sitios de acción intracelulares. Se han establecido en la especialidad bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas y técnicas de alto rendimiento para explorar dichas bibliotecas con una molécula diana específica, en el presente caso, un IncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar la hipertrofia cardíaca patológica en un paciente, que comprende (a) detectar el nivel de expresión de un IncARN de SEQ ID NO: 12 en una muestra obtenida de dicho paciente y (b) comparar dicho nivel de expresión con el nivel de expresión de dicho IncARN en una muestra obtenida de sujetos sanos, en donde una regulación positiva de más de 2 veces el IncARN de SEQ ID NO: 12 indica la presencia de hipertrofia cardíaca patológica en el paciente.

Asimismo, en el presente documento se describe un método para diagnosticar hipertrofia cardíaca en un paciente, que comprende (a) detectar el nivel de expresión de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 en una muestra obtenida de dicho paciente y (b) comparar dicho nivel de expresión de los uno o más IncARNs con el nivel de expresión de estos uno o más IncARNs en una muestra obtenida de sujetos sanos, en donde una regulación negativa de más de 2 veces de uno o más de los IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28; y/o una regulación positiva de más de 2 veces de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 indica la presencia de hipertrofia cardíaca en el paciente.

Estos métodos de diagnóstico también pueden abarcar la detección y comparación del nivel de expresión de uno o

más IncARNs que sean, por orden de preferencia, al menos un 90%, al menos un 92%, al menos un 94%, al menos un 96%, al menos un 98%, al menos un 99% o al menos un 99,5% idénticos a una cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. Se conocen en la técnica medios y métodos para determinar la identidad de secuencia. Preferentemente, se usa el programa BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool, herramienta de búsqueda de alineamiento local básico) para determinar la identidad de secuencia respecto de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y/o 12, 8 a 11 y 13. Además, estos métodos pueden abarcar detectar y comparar el nivel de expresión de uno o más IncARNs que difieren, por orden de preferencia, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido(s) respecto de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y/o 12, 8 a 11 y 13. Las diferencias de nucleótidos pueden ser la adición, eliminación y/o sustitución de nucleótidos. Las secuencias cuya expresión se compara, aun no siendo homólogas, también pueden diferir entre sí, por orden de preferencia, en no más de 10, tal como 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido(s).

El término "muestra" indica una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal. La muestra de fluido corporal se selecciona preferentemente entre sangre, suero, plasma, orina, saliva, fluido amniótico, líquido cefalorraquídeo y linfa. La muestra de tejido es preferentemente una muestra de un órgano, tal como una muestra de corazón, hígado o riñón. En la medida en que el método se aplica a una muestra de tejido corporal, ha de entenderse que el nivel de expresión de un IncARN corresponde a la concentración del IncARN, debido a que los IncARNs no se expresan directamente en el fluido corporal, sino que se secretan por las células, expresando dichas células los IncARNs, en los fluidos corporales.

El "paciente" o "sujeto" citado en el presente documento es un ser humano.

La expresión "detectar el nivel de expresión de un IncARN" significa determinar la cantidad o la producción del IncARN. Los IncARNs se expresan inicialmente dentro de una célula. En el presente documento se ha descubierto que los IncARNs de las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y/o 12, 8 a 11 y 13 pueden detectarse en la muestra de un paciente, en particular, en una muestra de tejido cardíaco. Un IncARN que se "expresa en una muestra" es por tanto un IncARN cuyo nivel de expresión puede detectarse en la muestra mediante medios y métodos que se explican con más detalle más adelante en el presente documento. Un ncARN se encuentra regulado positivamente en una muestra de ensayo en caso de que la cantidad o el rendimiento del ncARN sea significativamente mayor en comparación con la cantidad o el rendimiento del ncARN correspondiente en una muestra de control. Asimismo, un ncARN está regulado negativamente en una muestra de ensayo si la cantidad o el rendimiento del ncARN es significativamente menor en comparación con la cantidad o en rendimiento del ncARN correspondiente en una muestra de control. En este contexto, la expresión "ncARN correspondiente" significa, por ejemplo, que el nivel de expresión del IncARN de SEQ ID NO: 1 en la muestra de ensayo se compara con el nivel de expresión del IncARN de SEQ ID NO: 1 en la muestra de control o de igual modo, que el nivel de expresión del IncARN de SEQ ID NO: 2 en la muestra de ensayo se compara con el nivel de expresión del IncARN de SEQ ID NO: 2 en la muestra de control. Esto se aplica, *mutatis mutandis*, para escenarios donde se determina la expresión de más de un IncARN seleccionado entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. Por ejemplo, en caso de que se determine el nivel de expresión de todos los IncARNs de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 en la muestra de ensayo, se compara con el nivel de expresión de todos los IncARNs de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 en la muestra de control.

Puede cuantificarse el nivel de expresión en las muestras aplicando cualquier medio y método adecuado disponible en la técnica. En general, pueden usarse medios y métodos de cuantificación relativa y absoluta. En la cuantificación absoluta no se necesitan patrones o controles conocidos. El nivel de expresión puede cuantificarse directamente. Como es de sobra conocido en la técnica, la cuantificación absoluta puede basarse en una curva patrón determinada. En la cuantificación relativa, se cuantifica el nivel de expresión en relación con una referencia (tal como niveles de expresión de control conocidos). Asimismo, en ausencia de controles, se puede cuantificar de manera relativa el nivel de expresión cuando se comparan, por ejemplo, las intensidades de fluorescencia.

Los métodos para evaluar la concentración de ARN pueden comprender, por ejemplo, medir la intensidad de fluorescencia de colorantes que se unen a los ácidos nucleicos y que emiten fluorescencia de manera selectiva cuando están unidos. Dichos métodos comprenden una reacción de retrotranscripción y la producción de ADNc, en donde se determina la cantidad de ADNc, determinando por tanto de manera indirecta la cantidad del ARN. El método basado en fluorescencia es particularmente útil para los casos donde la concentración de ARN es demasiado baja como para evaluarla de manera precisa con espectrofotometría y/o en casos donde los contaminantes que absorben a 260 nm hacen que la cuantificación precisa mediante espectrofotometría sea difícil o imposible.

Cuando se compara el nivel de expresión de los uno o más IncARNs entre diferentes muestras, se mejora la fiabilidad de la comparación, preferentemente, incluyendo un control endógeno invariante (expresión de un gen de referencia) para corregir respecto de potenciales variaciones entre muestras. Dicha normalización respecto de un control endógeno invariante se lleva a cabo de manera rutinaria en la técnica. Por ejemplo, están bien establecidos los medios y métodos para la normalización del nivel de expresión, por ejemplo, en la RT-PCR en tiempo real (véase, por ejemplo, Bustin, *Journal of Molecular Endocrinology*, (2002) 29, 23-39) o en el análisis de expresión en micromatriz (véase, por ejemplo, Calza y Balwitan, *Methods Mol Biol.* 2010;673:37-52). Asimismo, hay establecidos métodos para la normalización de los niveles de expresión de secuencias de ARN pequeñas (véase, por ejemplo, Mestdagh et al. (2009) *Genome Biol.*; 10(6):R64). En caso de usar RT-PCR o una micromatriz para determinar los niveles de expresión

de acuerdo con la presente divulgación, los niveles de expresión se normalizan respecto de un ARN añadido (véase, por ejemplo, McCormick et al. (2011), Science, 2:2). Durante la preparación, se mezclan cantidades conocidas de un ARN añadido con la muestra. Más preferentemente, el ARN se añade de manera externa al plasma y/o suero antes de llevar a cabo el proceso de aislamiento del ARN, en cuyo caso, las muestras son de plasma y/o suero. La tecnología de ARN añadido es de sobra conocida y hay disponibles kits comerciales de diversos fabricantes. El ARN añadido es preferentemente un ARN de *C. elegans* añadido.

Como resultará evidente a partir de los ejemplos más adelante en el presente documento, la desregulación de los niveles de uno o más lncARNs de ratón seleccionados entre las SEQ ID NO: 14 a 20 y 15 a 26 indica hipertrofia cardíaca, como se evidencia en el modelo de ratón TAC. Por lo tanto, puede esperarse que la determinación de los niveles de expresión de uno o más de los lncARNs homólogos de humano respectivos seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 tenga un valor pronóstico para diagnosticar la hipertrofia cardíaca en un paciente. Los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 pueden combinarse con marcadores diagnósticos adicionales para la hipertrofia cardíaca a fin de mejorar la fiabilidad del método de diagnóstico. Un alto nivel de expresión de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y un bajo nivel de expresión de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 es indicativo de hipertrofia cardíaca.

En los ejemplos más adelante en el presente documento, se emplearon las secuencias de cebador de las SEQ ID NO: 29 a 62 a fin de detectar el nivel de expresión del lncARN, en donde los números impares son los cebadores directos y los números pares son los cebadores inversos. Los números consecutivos, tales como las SEQ ID NO: 29 y 30, las SEQ ID NO: 31 y 32, las SEQ ID NO: 33 y 34, etc. son un par de cebadores. El par de cebadores de las SEQ ID NO: 29/30 es para la detección del nivel de expresión del lncARN de ratón, H19 (SEQ ID NO: 25) mientras que el par de cebadores de SEQ ID NO: 31/32 es para la detección del nivel de expresión del lncARN de humano, H19 (SEQ ID NO: 12). El par de cebadores de las SEQ ID NO: 39/40 es para la detección del nivel de expresión del lncARN de ratón, Gm11641 (SEQ ID NO: 14), mientras que los niveles de expresión de los tres lncARN homólogos de humano de las SEQ ID NO: 1, 27 y 28 pueden detectarse mediante el par de cebadores de las SEQ ID NO: 33/34, las SEQ ID NO: 35/36 y las SEQ ID NO: 37/38, respectivamente.

Preferentemente, se usan uno o más de estos pares de cebadores en los métodos de diagnóstico de acuerdo con la presente divulgación. De igual modo, se incorpora preferentemente uno o más de estos pares de cebadores en el kit que se describe más adelante en el presente documento.

La regulación negativa mayor de 2 veces es, por orden de preferencia, una regulación negativa mayor de 3 veces, una regulación negativa mayor de 4 veces, una regulación negativa mayor de 5 veces, una regulación negativa mayor de 6 veces, una regulación negativa mayor de 7 veces y una regulación negativa mayor de 8 veces. Asimismo, la regulación positiva mayor de 2 veces es, por orden de preferencia, una regulación positiva mayor de 3 veces, una regulación positiva mayor de 4 veces, una regulación positiva mayor de 5 veces, una regulación positiva mayor de 6 veces, una regulación positiva mayor de 7 veces y una regulación positiva mayor de 8 veces. Los umbrales mayores para la regulación positiva y negativa pueden aumentar la fiabilidad de los métodos descritos anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la muestra es una muestra de sangre o una muestra procedente de la sangre.

La muestra procedente de la sangre es preferentemente plasma o suero.

De acuerdo con otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, la muestra es una muestra de tejido cardíaco.

La muestra de tejido cardíaco comprende preferentemente células musculares de la pared cardíaca y lo más preferentemente, células musculares de la pared ventricular.

De acuerdo con una realización preferida adicional del segundo aspecto de la invención, la detección del nivel de expresión del lncARN comprende (a) PCR cuantitativa, preferentemente, PCR cuantitativa en tiempo real o (b) un método de amplificación de molde/ARN, seguido de la determinación del nivel de expresión del lncARN usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia.

En la PCR cuantitativa (qPCR), se ligar la cantidad de producto amplificado a la intensidad de fluorescencia usando una molécula indicadora fluorescente. El momento en el que se mide la señal de fluorescencia a fin de calcular la cantidad de molde inicial puede ser al final de la reacción (PCR semicuantitativa de punto final) o mientras está progresando la amplificación (qPCR en tiempo real).

En la PCR semicuantitativa de punto final, se recogen los datos de fluorescencia tras haberse completado la reacción de amplificación, normalmente tras 30-40 ciclos y esta fluorescencia final se usa para volver a calcular la cantidad de molde presente antes de la PCR.

El método de qPCR en tiempo real, más sensible y reproducible, mide la fluorescencia en cada ciclo, a medida que avanza la amplificación. Esto permite que la cuantificación del molde esté basada en la señal de fluorescencia durante la fase exponencial de la amplificación, antes de que hayan comenzado a tener efecto los reactivos limitantes, la acumulación de inhibidores o la inactivación de la polimerasa sobre la eficacia de la amplificación. Las lecturas de fluorescencia en estos ciclos más tempranos de la reacción medirán la cantidad de molde amplificado, donde la reacción es mucho más reproducible de una muestra a otra que en el punto final.

Un ejemplo no limitante de un método de amplificación de molde/ARN seguido de la determinación del nivel de expresión de los uno o más lncARNs usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia es un método que combina la amplificación mediada por transcripción (TMA) y un ensayo de protección de la hibridación (HPA). Con más detalle, dicho método puede comprender hibridar uno o más oligonucleótidos ("oligonucleótidos de captura") que son complementarios a cualquiera de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. En caso de usar como diana dos o más de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28, se usan oligonucleótidos de captura separados para cada secuencia seleccionada entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. Después, se capturan las secuencias diana hibridadas sobre micropartículas magnéticas que se separan de la muestra en un campo magnético. Pueden utilizarse etapas de lavado para retirar componentes extraños. La amplificación de la diana normalmente se produce mediante TMA, que es un método de amplificación de ácidos nucleicos basado en transcripción que utiliza dos enzimas, la retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y la ARN polimerasa T7. Se usa un conjunto de cebadores únicos para cada secuencia diana seleccionada entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. La retrotranscriptasa se usa para generar una copia de ADN (que contiene una secuencia promotora para una ARN polimerasa T7) de la secuencia diana. La ARN polimerasa T7 produce múltiples copias de amplicón de ARN a partir de la copia de ADN. La detección del nivel de expresión del lncARN se logra mediante HPA usando sondas de ácido nucleico monocatenarias marcadas de manera quimioluminiscente que son complementarias a los uno o más amplicones. Preferentemente, se usan sondas marcadas de manera distinguible para cada amplicón diana. Las sondas de ácido nucleico marcadas hibridan de manera específica con el amplicón. Posteriormente, un "reactivo de detección" diferencia entre las sondas hibridadas y no hibridadas mediante la inactivación del marcador en las sondas no hibridadas. Durante la etapa de detección, se mide la señal quimioluminiscente producida por la sonda hibridada en un luminómetro y se comunica en forma de "Unidades de Luz Relativas" (URL), cuantificando de este modo el nivel de expresión del lncARN.

De acuerdo con una realización aún más preferida del segundo aspecto de la invención, el método comprende, antes de la detección del nivel de expresión del ARN no codificante largo, una etapa de preamplificación del ARN en la muestra del paciente y/o la muestra de control del paciente.

Es particularmente ventajoso llevar a cabo una etapa de preamplificación en caso de disponer de tan solo una pequeña cantidad de muestra (de ensayo y/o control). La etapa de preamplificación permite aumentar la cantidad de ARN en la muestra antes de proceder al análisis del nivel de expresión. Los medios y métodos para la preamplificación del ARN se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Vermeulen et al (2009) BMC Res Notes., 2:235). En caso de que se preamplifique el ARN tanto en la muestra de ensayo como en la de control, se usa preferentemente el mismo método de preamplificación, de tal modo que se mantenga la cantidad relativa de ARN de la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control. En caso de que solo se preamplifique el ARN de la muestra de ensayo o de control o si se preamplifican las dos muestras de ARN mediante métodos diferentes, puede ser necesario normalizar los datos de expresión para la etapa de preamplificación; véase, por ejemplo, Mestdagh et al. (2009), Genome Biology 2009, 10:R64.

Asimismo, en el presente documento se describe un kit para diagnosticar hipertrofia cardíaca en un paciente, comprendiendo dicho kit medios para la detección del nivel de expresión de uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 e instrucciones de uso del kit.

Las instrucciones de uso del kit informan preferentemente, entre otras cosas, de que un alto nivel de expresión de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 1 a 7, 27 y 28 y un bajo nivel de expresión de los lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 8 a 11 y 13 indica hipertrofia cardíaca.

Los medios para la detección del nivel de expresión de uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 son preferentemente los medios necesarios para (i) una PCR cuantitativa, preferentemente, PCR cuantitativa en tiempo real o (ii) un método de amplificación de molde/ARN, seguido de la determinación del nivel de expresión los lncARNs usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia. Estos medios se han explicado con detalle adicional anteriormente en relación con los métodos de diagnóstico descritos anteriormente y pueden estar comprendidos en el kit. Por lo tanto, los medios comprenden preferentemente oligonucleótidos, tales como sondas de hibridación o cebadores fluorescentes, que hibridan de manera específica con uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28. Los ingredientes adicionales de los kits pueden ser tintes fluorescentes o luminiscentes, acoplados preferentemente a dichos oligonucleótidos. Asimismo, los ingredientes adicionales de los kits pueden ser enzimas, tales como una retrotranscriptasa y/o una polimerasa.

De acuerdo con el kit descrito anteriormente, los medios para la detección del nivel de expresión de uno o más lncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 comprenden preferentemente medios para la detección

del IncARN de SEQ ID NO: 12.

Los diversos componentes del kit pueden empaquetarse en uno o más recipientes, tales como uno o más viales. Los viales pueden comprender, además de los componentes, conservantes o tampones de almacenamiento.

5 Los medios pueden ser pares de cebadores usados para la detección específica del nivel de expresión de uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28.

10 Los uno o más IncARNs seleccionados entre las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 pueden ser al menos 3 IncARN y preferentemente, al menos 5 IncARN.

15 El empleo de al menos 3 IncARNs, preferentemente, al menos 5 IncARNs, más preferentemente, al menos 10 IncARN, aún más preferentemente, al menos 20 IncARNs y lo más preferentemente todos los IncARN de las SEQ ID NO: 12, 1 a 11, 13, 27 y 28 aumentará además la eficacia de las composiciones farmacéuticas, los usos médicos, los métodos y los kits descritos en el presente documento. El empleo de estos números de IncARN puede equilibrar las potenciales diferencias asociadas con los compuestos particulares, las sondas o los métodos usados en conexión con los métodos y kits descritos en el presente documento. En las composiciones farmacéuticas y los usos médicos de la divulgación, estos números de IncARNs pueden aumentar el efecto beneficioso para el sujeto que se esté tratando.

20 De acuerdo con la presente invención, el IncARN es o comprende el IncARN de SEQ ID NO: 12.

25 La SEQ ID NO: 12 es el IncARN de humano H19. El IncARN homólogo de ratón de H19 está representado por la SEQ ID NO: 25. La naturaleza antihipertrófica del IncARN H19 se demuestra en el ejemplo 3 más adelante en el presente documento. El gen del IncARN H19 se encuentra en seres humanos y otros mamíferos. La regulación del gen *H19* está bien descrita como un paradigma de la impronta genómica y además, se ha relacionado con trastornos genéticos y cáncer en seres humanos. Tras el nacimiento, H19 se expresa predominantemente en tejido muscular, donde promueve la diferenciación y la regeneración. La función biológica del IncARN en el corazón aún no se ha dilucidado. Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, en la técnica anterior se desconocía el papel o la función de H19 en la hipertrofia cardíaca y se ha descubierto sorprendentemente con la presente invención. H19 está conservado evolutivamente entre diversas especies de mamífero, incluyendo ratones y seres humanos (véanse las Fig. 32 y 33).

30 Los uno o más IncARNs pueden ser o comprender el IncARN de las SEQ ID NO: 1, 27 o 28, prefiriéndose especialmente la SEQ ID NO: 1.

35 Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, las SEQ ID NO: 1, 27 y 28 son los IncARNs homólogos de humano del IncARN Gm11641 de ratón (SEQ ID NO: 14), observándose que un evento de duplicación distingue al ser humano del ratón y da lugar a más de un IncARN homólogo de humano del IncARN de ratón respectivo (véanse las figuras 13A y B). La naturaleza prohipertrófica del IncARN Gm11641 se demuestra en los ejemplos más adelante del presente documento mediante dos sistemas de ensayo de hipertrofia cardíaca independientes, que son el modelo de ratón TAC y las células de músculo cardíaco de ratón HL-1 tratadas con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO).

40 Los uno o más IncARNs pueden ser o comprender el IncARN de la SEQ ID NO: 8.

45 Como se ha tratado anteriormente en el presente documento, la SEQ ID NO: 8 es el IncARN homólogo de humano del IncARN Gm17499 de ratón (SEQ ID NO: 21). La naturaleza antihipertrófica del IncARN Gm17499 se demuestra en los ejemplos más adelante en el presente documento mediante sistemas de ensayo independientes.

Las figuras muestran:

50 Figura 1: Verificación de la expresión del IncARN Gm11641 en muestras de corazón. Se trató el ARN de corazón de ratón con DNAsa I antes de la retrotranscripción. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con OligodT(20) o conjuntos de cebadores aleatorios.

55 Figura 2: (A) Validación del IncARN candidato, Gm11641 (con el sobrenombre de *Chast*) en muestras de corazón completo de ratones de control quirúrgico y TAC 6 semanas después de la cirugía mediante RT-PCR. FC - cambio múltiplo. * $p < 0,05$. $n = 5$. (B) Validación del transcrito de Gm11641 (con el sobrenombre de *Chast*) mediante amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE). Esta gráfica muestra los resultados de RACE 3' y 5' en ARN de corazones de ratón que incluyen los conjuntos de cebadores usados para cada estrategia.

60 Figura 3: Expresión en órganos del IncARN candidato, Gm11641. FC - cambio múltiplo.

Figura 4: Expresión de los IncARNs candidatos en cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células endoteliales procedentes de corazones de ratón. FC - cambio múltiplo.

65 Figura 5: Expresión del IncARN Gm11641 en cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos o células endoteliales 6 semanas después de la operación de TAC. FC - cambio múltiplo. * $p < 0,05$.

Figura 6: Localización subcelular de los IncARNs candidatos. Se analizaron β -Actina (ActB), GAPDH, Xist y Neat1 como controles.

Figura 7: Representación del plásmido de sobreexpresión lentivírico, denominado pLV+, que porta la secuencia de transcrito completa de un IncARN (por ejemplo, en este caso, el IncARN Gm17499).

Figura 8: Sobreexpresión mediada por lentivirus del IncARN Gm11641. FC - cambio múltiplo. *** $p < 0,001$.

Figura 9: Represión del IncARN Gm11641 en células HL-1. Los niveles de expresión se han evaluado tras un tiempo de incubación de 48 h. FC - cambio múltiplo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. = no significativo.

Figura 10: Expresión del IncARN Gm11641 en células HL-1 tras la estimulación hipertrófica con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). Los niveles de expresión se han evaluado tras 48 h de estimulación. ** $p < 0,01$.

Figura 11: Sobreexpresión mediada por lentivirus y silenciamiento basado en GapmeR del IncARN Gm11641 en células HL-1 estimuladas con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Figura 12: Expresión del péptido natriurético arterial (ANP) en condiciones hipertróficas y desregulación del IncARN Gm11641. * $p < 0,05$, n.s. = no significativo

Figura 13: (A) Representación de homólogos potenciales del IncARN Gm11641 (ENSMUST00000130556) en diferentes especies, aplicando el navegador de genoma del UCSC. (B) Homólogo del IncARN Gm11641 en seres humanos. Alineamiento detallado de la secuencia y estructura de Gm11641 murino y sus homólogos de rata y seres humanos (parte superior). Validación del transcrito humano mediante PCR específica de gen (parte inferior izquierda; n=al menos 3 experimentos independientes). Expresión del homólogo Gm11641 de ser humano de SEQ ID NO: 1 en tejidos de corazón de donante sano (n=23) o en pacientes con estenosis aórtica (n=21). * $p < 0,05$. FC = cambio múltiplo.

Figura 14: Validación de IncARNs candidatos en muestras de corazón completo de corazones TAC en comparación con el tejido de animales de control quirúrgico. (FC - cambio múltiplo). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, n.s. = no significativo.

Figura 15: (A) Validación de IncARNs candidatos procedentes de la micromatriz de IncARN Arraystar Mouse V2.0 que compara muestras de cardiomiocitos (CMC) de corazones sanos de 12 semanas o de control quirúrgico de 13 semanas frente a de ratones TAC de 13 semanas. El candidato AJ409495 tiene potencial de codificación de proteínas y no se tomará en consideración en la siguiente representación de los resultados. FC - cambio múltiplo. CMC - cardiomiocitos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, n.s. = no significativo. (B) Validación por micromatriz de la represión de H19 causada por la hipertrofia cardíaca en muestras de corazón completo en varios puntos de tiempo tras la TAC (n=4-8). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. FC = cambio múltiplo. (C) Niveles de expresión de H19 en corazones de ratón 2 semanas después de la infusión continua de angiotensina II (ATII). (n=4-5). * $p < 0,05$. FC = cambio múltiplo.

Figura 16: Expresión en órganos de IncARNs candidatos. FC - cambio múltiplo.

Figura 17: Expresión de los IncARNs candidatos en cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células endoteliales procedentes de corazones de ratón. FC - cambio múltiplo.

Figura 18: Localización subcelular de los IncARNs candidatos. Se analizaron β -Actina, GAPDH, Xist y Neat1 como controles.

Figura 19: Representación del plásmido de sobreexpresión lentivírico, denominado pLV+Gm17499, que porta la secuencia de transcrito completo del IncARN Gm17499.

Figura 20: Sobreexpresión mediada por lentivirus del IncARN Gm17499. FC - cambio múltiplo. ** $p < 0,01$.

Figura 21: Prueba de diferentes químicas antisentido para suprimir al IncARN candidato, Gm17499. Los niveles de expresión se han evaluado tras un tiempo de incubación de 48 h. FC - cambio múltiplo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. = no significativo.

Figura 22: Silenciamiento basado en siARN y sobreexpresión mediada por lentivirus del IncARN Gm17499 en células HL-1 estimuladas con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, n.s. = no significativo. u.a. = unidad arbitraria. La barra de escala en la imagen representa 50 μ M.

Figura 23: Expresión de genes asociados con la hipertrofia en condiciones hipertróficas y desregulación del IncARN Gm17499. La primera fila representa la expresión de ANP, la segunda la de BNP y la última final muestra los niveles de Mcip1.4. * $p < 0,05$, n.s. = no significativo.

Figura 24: Validación de la expresión del IncARN candidato, H19, 4 y 6 semanas después de la operación de TAC. ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. n = 5-7

Figura 25: Expresión del lncARN H19 en cardiomiocitos primarios de rata neonata (NRCM) tras 72 h de tratamiento prohipertrófico con fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII). n.s. - no significativo. * $p < 0,05$.

Figura 26: (A) Represión de los lncARN de H19 en las líneas celulares de cardiomiocitos HL-1 (ratón) y H9C2 (rata) aplicando esiARN (48 h después del tratamiento). RLUC - esiARN contra luciferasa de renilla (control negativo), H19 - esiARN contra H19. * $p < 0,05$. (B) Represión de H19 en cardiomiocitos HL-1 mediante esiARN en comparación con un control no dirigido (luciferasa de renilla, RLUC). (C) Sobreexpresión de H19 aplicando transducción lentivírica (pLV). $n =$ al menos 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. FC = cambio múltiplo.

Figura 27: (A) Tamaño celular de la línea celular de cardiomiocitos murinos HL-1 reprimiendo H19 (mediante esiARN) tratadas con los estímulos hipertróficos fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII) durante 48 h. RLUC - esiARN contra luciferasa de renilla (control negativo), H19 - esiARN contra H19. * $p < 0,05$. n.s. - no significativo. (B) Respuesta de cardiomiocitos HL-1 tras la sobreexpresión lentivírica (pLV+) de H19. Se han determinado los niveles de expresión de péptido natriurético auricular y cerebral (ANP, BNP), así como de la cadena pesada de β -miosina (β -MHC). $n =$ al menos 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. FC = cambio múltiplo.

Figura 28: Tamaño celular de la línea celular de cardiomiocitos de rata H9C2 reprimiendo H19 (mediante esiARN) tratadas con los estímulos hipertróficos fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII) durante 48 h. RLUC - esiARN contra luciferasa de renilla (control negativo), H19 - esiARN contra H19. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. n.s. - no significativo.

Figura 29: Tamaño celular de cardiomiocitos primarios de rata neonata (NRCM) reprimiendo H19 (mediante esiARN) tratadas con los estímulos hipertróficos fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII) durante 48 h. RLUC -esiARN contra luciferasa de renilla (control negativo), H19 -esiARN contra H19. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. n.s. - no significativo.

Figura 30: Tamaño celular de cardiomiocitos primarios de rata neonata (NRCM) reprimiendo H19 (mediante esiARN) tratadas con los estímulos hipertróficos fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII) durante 72 h. RLUC - esiARN contra luciferasa de renilla (control negativo), H19 - esiARN contra H19. *** $p < 0,001$. n.s. - no significativo.

Figura 31: Análisis de la expresión de H19 en tejidos cardíacos humanos sanos ($n=22$) e hipertróficos (estenosis aórtica; $n=23$) mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). AS: estenosis aórtica. ** $p < 0,01$

Figura 32: Representación de la conservación de la secuencia de H19 en diferentes especies aplicando el navegador de genoma del UCSC.

Figura 33: Comparación de secuencia de las secuencias de H19 mediante análisis Dotplot. Puede observarse una fuerte conservación entre ratón y rata, así como entre ratones y seres humanos. También existe un homólogo de cerdo.

Figura 34: Operación de TAC en ratones con supresión génica de H19 y sus compañeros de camada de ts. Tras 6 semanas, se observó una inducción de la relación de peso cardíaco a peso corporal. $n=2-8$. HW = peso cardíaco, BW = peso corporal, ts = tipo silvestre.

Figura 35: La sobreexpresión mediante AAV9-H19 *in vivo* durante 6 semanas provoca una reversión del programa génico hipertrófico ($2+E12$ copias por animal). $n=3$. * $p < 0,05$. FC = cambio múltiplo.

Figura 36: Reguladores transcripcionales potenciales de la expresión de Gm11641. Predicción bioinformática de los sitios de unión de factores de transcripción en el promotor de Gm11641. Esto también incluye el factor de transcripción prohipertrófico NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados). En ratones transgénicos para calcineurina (CnA TG), que tienen activada de manera constitutiva la vía de NFAT ($n=4$), se induce la expresión de Gm11641, mientras que el inhibidor de NFAT, 11R-VIVIT, reprime la expresión de Gm11641 en cardiomiocitos HL-1 ($n =$ al menos 3 experimentos independientes). * $p < 0,05$; FC = cambio múltiplo, Gm11641 se cita en la figura 36 como "Chast" (transcrito asociado con hipertrofia cardíaca)

Figura 37: Sobreexpresión específica cardíaca de Gm11641 en ratones aplicando AAV9 (6 semanas después de la inyección). Representación de la construcción de AAV9 (a la izquierda) y la eficacia de la sobreexpresión en corazones de ratón, en comparación con el vector de control (a la derecha). $n=3$. * $p < 0,05$; FC = cambio múltiplo, Gm11641 se cita en la figura 36 como "Chast".

Figura 38: La sobreexpresión mediante AAV9-Gm11641 *in vivo* durante 6 semanas provoca hipertrofia cardíaca ($0,5+E12$ copias por animal). Esto provocó una inducción de la relación de peso corporal cardíaco a corporal y la masa ventricular izquierda, así como un agrandamiento del diámetro de los cardiomiocitos. $n=3$. * $p < 0,05$. masa VI = masa del ventrículo izquierdo, DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol (tinción de ADN); WGA = aglutinina de germen

de trigo (tinción de membrana), u.a. = unidad arbitraria, Gm11641 se cita en la figura 36 como "Chast".

Figura 39: La operación de TAC y la sobreexpresión de Gm1164 mediante AAV9 (0,5+E12 copias por animal) durante 6 semanas provocó una inducción de la relación de peso cardíaco a corporal. n=5-8.

5 Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1- El IncARN prohipertrófico Gm11641

10 1.1 Elaboración de perfiles y validación de los IncARN

Para identificar IncARNs candidatos desregulados en muestras de corazón completo 6 semana después de TAC (constricción aórtica transversal), se elaboró un perfil de IncARN general mediante Arraystar (micromatriz de IncARN *Arraystar Mouse V2.0*). A partir de esta plataforma, el IncARN Gm11641 (ENSMUST00000130556) se identificó como un candidato (Tab. 1).

Tab. 1: IncARN Gm11641 procedente de la micromatriz de ARN no codificante de ratón Ncode™ comparando muestras de corazón completo de ratones de control quirúrgico de 6 semanas y TAC de 6 semanas.

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	FC	Regulación
Gm11641	ENSMUST00000130556	Ensembl	923 pb	antisentido	3,85	positiva

20 Se verificó la expresión de este IncARN en el corazón mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ADNc procedente de ARN de corazón que se trató con DNasa I antes de la retrotranscripción con OligodT(20) o conjuntos de cebadores aleatorios (Fig. 1). Para la validación adicional del transcrito, se cortó y secuenció la banda de la PCR resultante.

25 La regulación positiva de IncARN candidato, Gm11641 tras la cirugía de TAC se validó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) (Fig. 2 A). Para la validación adicional del transcrito, se cortó y secuenció la banda de la PCR resultante. En una segunda etapa, se analizó la secuencia del transcrito mediante la amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) con ARN de corazones de ratón como material de partida. Esto condujo a la validación de ambos exones (Fig. 2 B).

30 Gm11641 estaba sobreexpresado en células HL-1 y los péptidos pequeños se evaluaron mediante espectrometría de masas. No se observaron péptidos que solapasen con fases abiertas de lectura potenciales, lo que demuestra que Gm11641 es un ARN no codificante.

35 1.2 Expresión en órganos del IncARN candidato, Gm11641

Para determinar la abundancia y la expresión específica en tejidos del IncARN Gm11641 en diferentes órganos (Fig. 3), se midió su expresión en 14 muestras de tejido diferentes, incluyendo de corazón, aorta, plasma, médula ósea, músculo esquelético, pulmón, hígado, bazo, riñón, cerebro, ganglio linfático, timo, vesícula biliar y piel.

40 El IncARN Gm11641 se expresa en prácticamente todos los órganos evaluados. Esto incluye el corazón y en plasma, lo que sugiere que este transcrito es una diana terapéutica potencial y un biomarcador de diagnóstico.

1.3 Expresión del IncARN candidato, Gm11641, en fracciones celulares del corazón

45 Se examinó el perfil de expresión del IncARN Gm11641 en los tres tipos de células principales del corazón: cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células endoteliales (Fig. 4). Por lo tanto, se aislaron células de corazón adulto de ratón de varios corazones individuales aplicando protocolos de reperfusión retrógrada y de disociación enzimática y se determinaron los niveles de IncARNs candidatos en cada fracción.

50 El IncARN Gm11641 se expresa en todos los tipos celulares cardíacos.

1.4 IncARN Gm11641 en fracciones celulares de corazón después de TAC

55 Debido a que el IncARN Gm11641 se expresa en todas las células cardíacas, se intentó identificar el tipo celular específico que contribuye a la regulación positiva inducida por la hipertrofia del IncARN Gm11641 observada en las muestras de corazón completo (Fig. 2). Los experimentos de fraccionamiento celular usando corazones después de una cirugía simulada y de TAC (6 semanas después de la operación) mostraron que esta regulación positiva del IncARN Gm11641 se observa específicamente en los cardiomiocitos, pero no en los fibroblastos cardíacos o las células endoteliales (Fig. 5), lo que indica un papel potencial del IncARN Gm11641 en la hipertrofia de los cardiomiocitos.

60

1.5 Localización subcelular del IncARN candidato, Gm11641

La función biológica de los IncARN está fuertemente determinada por su localización subcelular. Por lo tanto, se llevó a cabo una separación bioquímica del ARN total procedente de células HL-1 (una línea celular de cardiomiocitos) en la fracción citoplasmática, soluble nuclear y asociada a cromatina (de acuerdo con: Cabianca et al Cell. 11; 149(4):819-31.). Se midió la abundancia relativa del IncARN Gm11641 en las diferentes fracciones mediante RT-PCR. Se usaron los genes constitutivos conocidos de GAPDH y β -actina así como los IncARN Xist y Neat1 como controles para la localización citoplasmática o para el enriquecimiento unido a cromatina, respectivamente (Fig. 6).

Como se esperaba, los ARNm constitutivos *Gapdh* y β -actina (*ActB*) se encontraron predominantemente en el citosol, mientras que los moduladores epigenéticos conocidos, tales como los IncARN *Xist* y *Neat1* se encontraban predominantemente asociados con la cromatina. En comparación con los transcritos citoplasmáticos o asociados con la cromatina, el IncARN Gm11641 parece estar presente en todas las fracciones subcelulares (citosol, nuclear soluble y asociada a cromatina), lo que sugiere un papel potencial en todos los compartimentos celulares. Esto indica además que el IncARN Gm11641 puede modular los procesos tanto transcripcionales como postrcripcionales.

1.6 Sobreexpresión del IncARN candidato, Gm11641

A fin de sobreexpresar de manera estable el IncARN Gm11641, se clonó el transcrito de longitud completa procedente de la base de datos correspondiente (véase la tabla 1) en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de sobreexpresión lentivírico (amablemente proporcionado por A. Schambach, Institute of Experimental Hematology, MHH). Este plásmido porta un promotor bidireccional que permite la producción del transcrito de IncARN a partir del mismo elemento regulador génico, pero desacoplado físicamente del gen indicador de GFP (proteína verde fluorescente) y un casete de selección. La construcción se introdujo mediante transducción lentivírica en cardiomiocitos HL-1 (véase la Fig. 7).

La transducción mediada por lentivirus de células HL-1 mostró una sobreexpresión estable del IncARN Gm11641 en comparación con células que portaban el vector vacío (pLV+vacío) o que carecían de la construcción (no transducidas) (Fig. 8).

1.7 Represión de los IncARN

Para regular negativamente el IncARN Gm11641 se aplicaron oligonucleótidos antisentido GapmeR. Los LNA™ GapmeR (Exigon) contienen una serie central de monómeros de ADN flanqueados por bloques de nucleótidos modificados (LNA, ácidos nucleicos bloqueados). El hueco de ADN activa la degradación mediada por RNasa II de los ARN diana y también es adecuado para actuar de manera selectiva directa sobre transcritos en el núcleo. Con esta tecnología, se reguló negativamente con éxito el IncARN Gm11641 en la línea celular de cardiomiocitos HL-1 (Fig. 9).

1.8 Caracterización funcional del IncARN candidato, Gm11641

1.8.1 Efecto *in vitro* de los cardiomiocitos hipertrofiados en los niveles de Gm11641

La hipertrofia de los cardiomiocitos es una respuesta adaptativa a nivel celular frente al estrés por presión o volumen en el corazón. El crecimiento hipertrófico *in vitro* puede inducirse mediante estímulos que incluyen fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). Por lo tanto, se estimuló a células HL-1 con ambos compuestos y se investigó su influencia en la expresión de Gm11641 (Fig. 10).

1.8.2 Influencia de la desregulación de Gm11641 en el tamaño de los cardiomiocitos

El rasgo característico de los cardiomiocitos hipertrofiados es un aumento en el tamaño celular, en relación con las células no hipertróficas. Por lo tanto, se investigó el tamaño celular de las células HL-1 tras la estimulación con PE e ISO, así como la expresión reprimida y elevada del IncARN Gm11641 aplicando las herramientas de desregulación descritas anteriormente. Los resultados se muestran de manera ilustrativa en la Fig. 11.

En condiciones basales, la sobreexpresión del IncARN Gm11641 ocasiona un aumento del tamaño celular, medido mediante el área superficial celular, lo que demuestra que este transcrito es suficiente para inducir hipertrofia en los cardiomiocitos. De manera acorde, la represión basada en GapmeR del IncARN Gm11641 redujo el tamaño de los cardiomiocitos y además, atenuó el aumento de tamaño celular inducido por PE/ISO. Estos resultados demuestran una función prohipertrófica del IncARN Gm11641.

1.8.3 Influencia en genes asociados con la hipertrofia

El crecimiento de cardiomiocitos inducido por hipertrofia va acompañado de la reinducción del "programa génico fetal", debido a que los patrones de expresión génica imitan a los observados durante el desarrollo embrionario. Aplicando las mismas condiciones (estímulos y desregulación) relativas al IncARN candidato, Gm11641, se midieron los niveles de expresión de los genes asociados con la hipertrofia que incluyen ANP, BNP (péptido natriurético arterial y cerebral),

Mcip1.4 (proteína moduladora que interactúa con calcineurina 1, exón 4 isoforma), α - y β -MHC (cadena pesada de miosina). La Fig. 12 representa el resultado para ANP, mientras que no se muestran las medidas de los otros genes.

De manera comparable con la medición del tamaño celular, la sobreexpresión del lncARN Gm11641 provoca una inducción de la expresión del indicador de hipertrofia, ANP, mientras que el silenciamiento génico aumentó la elevación de ANP inducida por PE/ISO, lo que respalda que el lncARN Gm11641 actúa como transcrito prohipertrófico.

1.8.4. Datos de expresión de micromatrices

A fin de identificar genes cardíacos relevantes que se modulan mediante Gm11641, se llevó a cabo un análisis de expresión de ARNm global en micromatriz tras la sobreexpresión lentivírica o la supresión mediada por GapmeR de Gm11641 (con el sobrenombre de *Chast*) en la línea celular de cardiomiocitos murinos HL-1. Los resultados indicaron que la regulación positiva o la supresión de Gm11641 tienen un fuerte efecto en el transcriptoma de los cardiomiocitos HL-1. Un número de genes con relevancia cardíaca, tales como *Axl*, *Pak3*, *Myo18B*, *Egr1*, *Ogn* y *Nos1ap* (Tab. 2) están regulados de manera recíproca tras la sobreexpresión y la supresión de Gm11641. Estos resultados indican que la desregulación de la expresión de Gm11641 afecta al perfil de expresión transcripcional de ARNm y activa las vías prohipertróficas en los cardiomiocitos.

Tab. 2: Resultados de la micromatriz de ARNm regulados de manera recíproca tras el silenciamiento (GapmeR) y la sobreexpresión (pLV+) de Gm11641. FC = cambio múltiplo.

	GapmeR (FC)	pLV+ (FC)
Axl	-1.499	1.510
Pak3	-1.423	1.345
Egr1	-1.798	1.366
Ogn	-1.192	1.207
Myo18b	1.405	-1.477
Nos1ap	1.487	-2.067

1.9 Conservación

Para identificar el homólogo del lncARN Gm11641 en especies adicionales, incluyendo seres humanos, se aplicó BLAST, que es un algoritmo para la comparación de secuencias de ADN primarias con una biblioteca de una base de datos de secuencias. Los resultados de este alineamiento arrojan los siguientes resultados (Tab. 2):

Tab. 3: Comparación de secuencia basada en BLAST del transcrito Gm11641 con diferentes especies.

	<i>Ratus norvegicus</i>		<i>Homo sapiens</i>		<i>Sus scrofa</i>		<i>Danio reiro</i>	
	cobertura	identidad	cobertura	identidad	cobertura	identidad	cobertura	identidad
Gm11641	99%	94%	34%	81%	39%	81%	-	-

Se usó el navegador de genoma del UCSC para representar un alineamiento entre las distintas especies (Fig. 13A). El alineamiento identificó el homólogo de humano del lncARN Gm11641 de ratón.

Un alineamiento de secuencia y estructura más detallado de Gm11641 reveló que existen homólogo de Gm11641 en ratas, cerdos y seres humanos ubicados en un intrón de un gen codificante de proteína *Plekhhm* en orientación antisentido (Figura 13B). El homólogo de humano se anota como:

gi|528476558|ref|NC_018928.2|:62843244-62843536 Homo sapiens cromosoma 17, ensamblaje alternativo CHM1_1.1., o
gi|568815581:64783259-64783551 Homo sapiens cromosoma 17, GRCh38.p2 ensamblaje primario

Se verificó la presencia de un homólogo de Gm11641 en tejidos cardíacos humanos mediante PCR específica de gen (Fig. 13 B). Se preparó ADN complementario (ADNc) a partir de ARN aislado de tejidos cardíacos humanos totales. La reacción de preparación del ADNc sin retrotranscripción sirvió como control interno para descartar cualquier posible amplificación o ADN contaminante.

A continuación, se examinó la expresión de este homólogo de humano en 23 corazones de control y 21 corazones hipertróficos de pacientes con estenosis aórtica. En línea con los resultados obtenidos en los corazones de ratón hipertróficos, el homólogo de Gm11641 humano también está regulado positivamente en el tejido cardíaco hipertrófico humano (Figura 13B), lo que evidencia que los hallazgos de este estudio tienen un potencial traduccional.

1.10 Regulación de la expresión de Gm11641

En los cardiomiocitos, la respuesta hipertrófica está orquestada por factores de crecimiento y citocinas que tienen influencia sobre varias cascadas de señalización, especialmente la señalización dependiente de calcio. El factor de transcripción NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados) es un regulador central en esta vía, que ocasiona, en última instancia, la activación del programa prohipertrófico.

Por lo tanto, se determinó si este regulador central tiene un impacto en la expresión de Gm11641. Las herramientas bioinformáticas predicen sitios de unión para varios factores de transcripción relacionados con la hipertrofia en el promotor de Gm11641. Estos incluyen también sitios de unión de NFAT (Fig. 36).

Para estudiar con más detalle la influencia de NFAT, se evaluó la expresión de Gm11641 en corazones de ratón transgénicos para calcineurina y se observó una inducción de la expresión de Gm11641 tras una señalización de NFAT activada de manera constitutiva. *In vitro*, la inhibición de NFAT mediante 11R-VIVIT ocasionó niveles reducidos de Gm11641 en cardiomiocitos HL-1. Estos datos indican que la expresión de Gm11641 depende de la vía prohipertrófica de NFAT.

1.11 Estudios *in vivo* de Gm11641

La hipertrofia patológica es una respuesta al estrés o a enfermedades, tales como la hipertensión, lesiones del músculo cardíaco, estenosis de las válvulas coronarias o a neurohormonas. Esto provoca un aumento de la masa muscular del corazón y en última instancia, a un engrosamiento de las paredes ventriculares, especialmente del ventrículo izquierdo. Aunque aumenta la masa muscular, no aumenta la capacidad de bombeo del corazón. Por el contrario, se altera el rendimiento del corazón y puede ocasionar en última instancia una insuficiencia completa.

Para analizar el papel de Gm11641 *in vivo*, se sobreexpresó este transcrito aplicando vectores adenovirales (AAV). Los AAV son virus pequeños que carecen de envuelta y portan n ADN monocatenario. Para transferir el material genético, los AAV dependen de un virus auxiliar. Sin embargo, la transducción de vectores AAV no da como resultado la expresión de genes víricos adicionales, lo que contribuye a su baja inmunogenicidad. Entre todos los serotipos, AAV9 parece ser el más cardioprotéico. Por lo tanto, se aplicó un AAV9 bajo el control del promotor de troponina T específica cardíaca para lograr una inducción de Gm11641 dirigida a los cardiomiocitos (Fig. 37).

Aplicando la construcción AAV9-Gm11641, se logró una inducción de 20 veces de Gm11641 en las muestras de corazón completo. A nivel funcional, se observó una inducción de la relación de peso cardíaco al corporal (Fig. 38, parte superior izquierda), lo que indica que la sobreexpresión de Gm11641 aumenta la masa muscular del ventrículo izquierdo (Fig. 38, parte superior derecha). Se analizó adicionalmente el tamaño de los cardiomiocitos y se observó que Gm11641 induce el crecimiento de los cardiomiocitos (Fig. 38, parte inferior).

Además, se aplicó sobrecarga de presión ventricular mediante la operación de TAC y se sobreexpresó Gm11641 mediante AAV9 durante 6 semanas. Como cabía esperar, la constricción aórtica provocó un aumento en la relación de peso cardíaco a corporal, al igual que con la inyección simple de AAV9-Gm11641. Curiosamente, la operación de TAC y la administración de AAV9-Gm11641 exacerbó la inducción de la masa cardíaca (Fig. 39).

1.12 Conclusión

En conclusión, basándose en los hallazgos en los modelos de hipertrofia cardíaca evaluados sobre el lncARN Gm11641, este lncARN tiene un valor diagnóstico y terapéutico para la hipertrofia cardíaca.

Ejemplo 2- Identificación de lncARN prohipertróficos y antihipertróficos

2.1 Elaboración de perfiles y validación de los lncARN

Para elaborar un perfil de lncARN general, se llevó a cabo un análisis por micromatriz aplicando las plataformas proporcionadas por Agilent/Life Technologies (NCode™ Mouse Non-coding RNA Microarrays) y Arraystar (Arraystar Mouse lncRNA microarray V2.0). Se verificó mediante la PCR que los transcritos candidatos se expresaban en tejido cardíaco (en muestras de ADNc procedentes de ARN tratado con DNasa I o no antes de la retrotranscripción) y la desregulación se validó mediante PCR en tiempo real.

Las tablas 3 y 4 y las figuras 14 y 15 a continuación son un resumen de los lncARNs candidatos que se han validado mediante diferentes micromatrices:

Tab. 4: Candidatos de **IncARN** procedentes de la micromatriz de **IncARN** *Arraystar Mouse V2.0* analizando muestras de corazón completo de ratones de control quirúrgico y TAC de 6 semanas.

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	gen relacionado	FC	Regulación
Gm16192	ENSMUST00000148357	Ensembl	937 pb	antisentido	Mtus1	4,20	Positiva
Gm11641	ENSMUST00000130556	Ensembl	923 pb	antisentido	Arhgap27	3,85	Positiva
Gm8459	ENSMUST00000162504	Ensembl	760 pb	intergénica	--	- 10,09	Negativa
AK083183	AK083183.1	Fantom3	2759 pb	intergénica	--	-8,86	Negativa
Gm13316	ENSMUST00000140537	Ensembl	691 pb	antisentido	Cacnb2	-2,83	Negativa
H19 (NR_001592.1)	ENSMUST00000136359	Ensembl	2286 pb	intergénica	--	-2,01	Negativa
	ENSMUST00000152754	Ensembl	1853 pb	intergénica	--	-2,06	Negativa
	ENSMUST00000140716	Ensembl	817 pb	Intergénica	--	-5,30	Negativa

Tab. 5: Candidatos de lncARNs procedentes de la micromatriz de lncARN *Arraystar Mouse* V2.0 analizando una fracción específica de cardiomiocitos de corazones de ratón sanos de 12 semanas frente a TAC de 13 semanas.

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	gen relacionado	FC	Regulación
AK013700	AK013700.1	predicha	725 pb	intergénica	--	10,9 3	Positiva
Gm15892-002	ENSMUST000001 52627	Ensem bl	439 pb	intergénica	--	9,54	Positiva
BC023483	uc007dvi.1	UCSC	1726 pb	intergénica	--	6,52	Positiva
Gm12224-001	ENSMUST000001 24047	Ensem bl	567 pb	antisentido	Acsi6	6,20	Positiva
AJ409495	AJ409495.1	NRED	292 pb	intergénica	--	5,80	Positiva
Gm16192	ENSMUST000001 48357	Ensem bl	937bp	antisentido	Mtus1	5,50	Positiva
Gm8822-202	ENSMUST000001 68371	Ensem bl	339 pb	intergénica	--	- 10,12	Negativa
H19 (NR_0015 92.1)	ENSMUST000001 40716	Ensem bl	817 pb	intergénica	--	- 4,73	Negativa
	ENSMUST000001 36359	Ensem bl	2286 pb	intergénica	--	- 2,48	Negativa

2.2 Expresión en órganos de lncARNs candidatos

5 A fin de determinar la especificidad de la expresión de lncARNs en diferentes órganos (Fig. 16), se midió la expresión de transcritos candidatos en 14 muestras de tejidos diferentes, incluyendo de corazón, aorta, plasma, médula ósea, músculo esquelético, pulmón, hígado, bazo, riñón, cerebro, ganglio linfático, timo, vesícula biliar y piel. La mayor parte de los lncARNs son abundantes en varios órganos. Los transcritos Gm8459, H19 y Gm12224-1 parecen estar enriquecidos más específicamente en tejido muscular, incluyendo el corazón.

2.3 Expresión de lncARNs candidatos en fracciones celulares del corazón

15 Se examinó el perfil de expresión de lncARNs candidatos en los tres tipos de células principales del corazón: cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células endoteliales (Fig. 17). Por lo tanto, se aislaron células de corazón adulto de ratón de varios corazones individuales aplicando protocolos de reperfusión retrógrada y de disociación enzimática y se determinaron los niveles de lncARNs candidatos en cada fracción.

2.4 Localización subcelular de los lncARNs candidatos

20 Para dilucidar más aún el mecanismo de acción de los lncARNs candidatos, se analizó la localización subcelular mediante separación bioquímica del ARN total procedente de células HL-1 (una línea celular de cardiomiocitos) en la fracción citoplasmática, nuclear soluble y asociada a cromatina (de acuerdo con: Cabianca et al Cell. 11;149(4):819-31). Se midió la abundancia relativa de los transcritos en las diferentes fracciones mediante RT-PCR. Se usaron los genes conocidos de GAPDH y β -actina así como los Xist y Neat1 como controles para la localización citoplasmática o para el enriquecimiento unido a cromatina, respectivamente (Fig. 18).

30 Se observó que más de la mitad de los lncARNs candidatos estaban asociados a la cromatina, mientras que los lncARNs nucleares solubles no se encuentran entre los candidatos. Solo se enriqueció un transcrito en el citoplasma (Gm8459).

2.5 Sobreexpresión de lncARNs candidatos

35 Para sobreexpresar de manera estable lncARNs candidatos, se clonó el transcrito de longitud completa procedente de la base de datos correspondiente en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de sobreexpresión lentivírico (amablemente proporcionado por A. Schambach, Institute of Experimental Hematology, MHH). Este plásmido porta un promotor bidireccional que permite la producción de los transcritos de lncARN a partir del mismo elemento regulador génico, pero desacoplado físicamente del gen indicador de GFP (proteína verde fluorescente). La construcción se introdujo mediante transducción lentivírica en células HL-1 (véase la Fig. 19). Los siguientes resultados se proporcionan de manera ilustrativa para el lncARN candidato, Gm17499.

40 La transducción mediada por lentivirus de células HL-1 mostró una sobreexpresión estable del lncARN Gm17499 en

comparación con células que portaban el vector vacío (pLV+vacío) o que carecían de la construcción (no transducidas) (Fig. 20).

2.6 Represión de los lncARNs

5 Para regular negativamente los transcritos de lncARN, se aplicaron tres químicas antisentido diferentes: siARN, esiARN y GapmeR. Los siARNs (ARN pequeño de interferencia) son, de un modo similar a los microARN, moléculas cortas (20-25 nucleótidos) que están implicados en la vía de interferencia de ARN. Se unen a secuencias de nucleótidos complementarias e inducen su degradación por una maquinaria citoplasmática localizada. Los esiARNs (Eupheria Biotech/Sigma-Aldrich) son siARNs preparados con endorribonucleasas que son el resultado de la escisión de ARN bicatenarios largos. Estas especies antisentido actúan de manera selectiva no solo sobre una secuencia específica, como es el caso de los siARNs, sino varias secuencias sobre la diana. Los LNA™ GapmeR (Exigon) contienen una serie central de monómeros de ADN flanqueados por bloques de nucleótidos modificados (LNA, ácidos nucleicos bloqueados). El hueco de ADN activa la degradación del ARN diana y es adecuado para actuar de manera selectiva directa sobre transcritos en el núcleo.

De manera ejemplar, se muestran los resultados para Gm17499 aplicado las tres químicas (Fig. 21), así como para H19. H19 se reguló negativamente con éxito con esiARN y Malat1 y se reprimió aplicando GapmeR (este lncARN sirvió como control positivo para la tecnología GapmeR).

2.7 Caracterización funcional de los lncARNs candidatos

2.7.1 Influencia en el tamaño de los cardiomiocitos

25 La hipertrofia de los cardiomiocitos es una respuesta adaptativa a nivel celular frente al estrés por presión o volumen en el corazón. El crecimiento hipertrófico *in vitro* puede inducirse mediante estímulos que incluyen fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO). Por lo tanto, se estimuló a células HL-1 con ambos compuestos y se investigó el tamaño celular de los cardiomiocitos con niveles alterados de lncARN. Los resultados se proporcionan de manera ejemplar para el lncARN Gm17499 (Fig. 22).

30 La expresión potenciada del lncARN Gm17499 previene el aumento de tamaño celular causado por estímulos prohipertróficos, mientras que su silenciamiento dio como resultado un agrandamiento de los cardiomiocitos, lo que indica una función antihipertrófica de este transcrito.

2.7.2 Influencia en genes asociados con la hipertrofia

35 El crecimiento de cardiomiocitos inducido por hipertrofia va acompañado de una reinducción del "programa génico fetal", debido a que los patrones de expresión génica imitan a los observados durante el desarrollo embrionario. Aplicando las mismas condiciones (estímulos y desregulación) relativas al lncARN candidato, Gm17499, se midieron los niveles de expresión de los genes asociados con la hipertrofia que incluyen ANP, BNP (péptido natriurético arterial y cerebral), y Mcip1.4 (proteína moduladora que interactúa con calcineurina 1, exón 4 isoforma) (Fig. 23).

2.8. Conclusión

45 En conclusión, basándose en los hallazgos experimentales anteriores, los lncARNs desregulados en el modelo de hipertrofia evaluado (sobrecarga de presión ventricular izquierda) tienen un interés diagnóstico y terapéutico para la hipertrofia cardíaca. En particular, los lncARNs siguientes tienen una gran importancia:

Tab. 6: Resumen de los lncARNs candidatos investigados.

50

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	gen relacionado
Gm17499	ENSMUST00000171177	Ensembl	692 pb	Antisentido	Tmpo
Gm16192	ENSMUST00000148357	Ensembl	937 pb	antisentido	Mtus1
Gm11641	ENSMUST00000130556	Ensembl	923 pb	Antisentido	--
Gm8459	ENSMUST00000162504	Ensembl	760 pb	intergénica	--
AK083183	AK083183.1	Fantom3	2759 pb	intergénica	--
Gm13316	ENSMUST00000140537	Ensembl	691 pb	antisentido	Cacnb2
H19 (NR_001592.1)	ENSMUST00000136359	Ensembl	2286 pb	intergénica	--
	ENSMUST00000152754	Ensembl	1853 pb	intergénica	--

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	gen relacionado
	ENSMUST00000140716	Ensembl	817 pb	Intergénica	--
AK013700	AK013700.1	predicha	725 pb	intergénica	--
Gm15892-002	ENSMUST00000152627	Ensembl	439 pb	intergénica	--
BC023483	uc007dvi.1	UCSC	1726 pb	intergénica	--
Gm12224-001	ENSMUST00000124047	Ensembl	567 pb	antisentido	Acsl6
AJ409495	AJ409495.1	NRED	292 pb	intergénica	--
Gm8822-202	ENSMUST00000168371	Ensembl	339 pb	intergénica	--

Tabla 7: Homólogos de humano de los IncARNs candidatos investigados

IncARN de ratón	Identificador	homólogo de humano	Identidad con la secuencia de ratón
Gm17499	ENSMUST00000171177	>gi 568815586 ref NC_000012.12 : 98547558-98547816 timopoyetina de Homo sapiens (TMPO), cromosoma 12, GRCh38 ensamblaje primario	88,42%
Gm16192	ENSMUST00000148357	>gi 17224595 gb AF293357.1 :128-394 Homo sapiens AT2 ARNm de la proteína que interactúa con receptor 1, cds completo	78,47%
Gm11641		>gi 568815581:64783259-64783551 Homo sapiens cromosoma 17, GRCh38.p2 ensamblaje primario	69%
Gm8459	ENSMUST00000162504	>gi 307219258 ref NG_001223.5 :1:1 49-953 Homo sapiens pseudogén 2 de canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1P2) en el cromosoma X	80,52%
AK08318 3	AK083183.1	>gi 568815595 ref NC_000003.12 : 142958129-142958893 Homo sapiens cromosoma 3, GRCh38 ensamblaje primario	69,10%
Gm13316	ENSMUST00000140537	>gi 69122714 ref NM_014409.3 :1 241-1929 Homo sapiens ARN polimerasa II similar a TAF5, factor asociado a p300/factor asociado a CBP (PCAF), 65kDa (TAF5L), variante de transcrito 1, ARNm	87,37%
H19	NR_001592.1	* >gi 57862814 ref NR_002196.1 :70 8-2305 Homo sapiens H19, transcrito expresado por impronta materna (no codificante de proteína) (H19), ARN no codificante largo	71,25%
AK01370 0	AK013700.1	>gi 13899395 gb AC008383.8 AC0 08383: 167188-167922 Homo sapiens cromosoma 5 clon CTC-222O22, secuencia completa	71,98%
Gm15892-002	ENSMUST00000152627	>gi 21754306 dbj AK095112.1 :368 1-4000 Homo sapiens ADNc FLJ37793 fis, clon BRHIP3000473	80,00%
BC02348 3	uc007dvi.1	>gi 568815597 ref NC_000001.11 : 245708650-245709375 Homo sapiens cromosoma 1, GRCh38 ensamblaje primario	74,27%
Gm12224-001	ENSMUST00000124047	>gi 568815593 ref NC_000005.10 :131971540-131971671 Homo sapiens cromosoma 5, GRCh38 ensamblaje primario	88,64%
AJ409495	AJ409495.1	>gi 568815593 ref NC_000005.10 : 123761272-123761427 Homo sapiens cromosoma 5, GRCh38 ensamblaje primario	89,17%

IncARN de ratón	Identificador	homólogo de humano	Identidad con la secuencia de ratón
Gm8822-202	ENSMUST00000168371	>gi 27882035 gb BC044590.1 :321-659 Homo sapiens ARP3 homólogo de proteína relacionada con actina 3 (levadura), ARNm (con de ADNc MGC:57216 IMAGE:5261640), cds completo	94,10%

Ejemplo 3 - Caracterización adicional del IncARN antihipertrófico, H19

3.1. Expresión diferencial en cirugía simulada/TAC de 4 y 6 semanas

5 Para identificar IncARNs candidatos desregulados en muestras de corazón completo 6 semana después de TAC (constricción aórtica transversal) o en cardiomiocitos de corazones de ratón 13 semanas después de TAC, se elaboró un perfil de IncARN general mediante Arraystar (micromatriz de IncARN Arraystar Mouse V2.0). Mediante esta plataforma, se identificó el IncARN H19 (NR_001592.1) como uno de los candidatos potenciales, además de Gm17499
10 y Gm11641 (Tab. 8 y 9).

Tab. 8: IncARN H19 procedente de la micromatriz de IncARN *Arraystar Mouse* V2.0 analizando muestras de corazón completo de ratones de control quirúrgico y TAC de 6 semanas.

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	FC	Regulación
H19 (NR_001592.1)	ENSMUST00000136359	Ensembl	2286 pb	intergénica	-2,01	Negativa
	ENSMUST00000152754	Ensembl	1853 pb	intergénica	-2,06	Negativa
	ENSMUST00000140716	Ensembl	817 pb	Intergénica	-5,30	Negativa

15 **Tab. 9:** IncARN H19 procedente de la micromatriz de IncARN *Arraystar Mouse* V2.0 analizando una fracción específica de cardiomiocitos de corazones de ratón sanos de 12 semanas frente a TAC de 13 semanas.

Nombre	Identificador	Origen	Tamaño	Relación	FC	Regulación
H19 (NR_001592.1)	ENSMUST00000140716	Ensembl	817 pb	intergénica	-4,73	Negativa
	ENSMUST00000136359	Ensembl	2286 pb	intergénica	-2,48	Negativa

La regulación negativa del IncARN candidato H19 cuatro y seis semanas después de la cirugía TAC se validó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) (Fig. 24A y B); la validación de la z específica de cardiomiocitos se ha mostrado
20 anteriormente (Tabla 8 y Fig. 15A y B). Se verificó esta represión de H19 en muestras de corazón completo de 6 semanas después de la operación de TAC. Además, esta represión se observó en etapas más tempranas y posteriores de hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Fig. 15 B). La validación de la matriz específica de CMC reveló, que esta represión puede observarse en cardiomiocitos (Fig. 15 A), lo que sugiere que H19 podría estar implicado en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y la modulación de los niveles de H19 tiene valor terapéutico.

25 Un segundo modelo de hipertrofia cardíaca es la infusión continua de angiotensina II (ATII). Este compuesto es un producto clave del sistema de renina-angiotensina y provoca un aumento en la presión sanguínea por medio de su efecto vasoconstrictor. Los estudios clínicos del efecto de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) revelaron que ATII también tiene un papel central en fisiopatología de la hipertrofia cardíaca, el remodelado y
30 la insuficiencia cardíaca. Para inducir hipertrofia cardíaca, se implantan minibombas osmóticas (bombas Alzet) por vía subcutáneas en ratones durante 2 semanas. En este modelo, se observó la misma reducción de los niveles de H19 que para el modelo de TAC, lo que destaca la relevancia de este IncARN en la hipertrofia cardíaca (Fig. 15 C).

3.2 Expresión en órganos del IncARN candidato, H19

35 Para determinar la abundancia y la expresión específica en tejidos del IncARN H19 en diferentes órganos (Fig. 16), se midió su expresión en 14 muestras de tejido diferentes, incluyendo de corazón, aorta, plasma, médula ósea, músculo esquelético, pulmón, hígado, bazo, riñón, cerebro, ganglio linfático, timo, vesícula biliar y piel. H19 muestra un fuerte enriquecimiento en tejido muscular, incluyendo el corazón, músculo esquelético y la vesícula biliar.

40

3.3 Expresión del lncARN candidato, H19, en fracciones celulares del corazón

Se examinó el perfil de expresión del lncARN H19 en los tres tipos de células principales del corazón: cardiomiocitos, fibroblastos cardíacos y células endoteliales. Por lo tanto, se aislaron células de corazón adulto de ratón de varios corazones individuales aplicando protocolos de reperfusión retrógrada y de disociación enzimática y se determinaron los niveles de lncARNs candidatos en cada fracción. Se observó que H19 estaba expresado en todos los tipos celulares cardíacos (Fig. 17).

3.4 Localización subcelular del lncARN candidato, H19

La función biológica de los lncARN está fuertemente determinada por su localización subcelular. Por lo tanto, se llevó a cabo una separación bioquímica del ARN total procedente de células HL-1 (una línea celular de cardiomiocitos de ratón) en la fracción citoplasmática, soluble nuclear y asociada a cromatina (de acuerdo con: Cabianca et al Cell. 11;149(4):819-31). Se midió la abundancia relativa del lncARN H19 en las diferentes fracciones mediante RT-PCR cuantitativa. Se usaron los genes constitutivos conocidos de GAPDH y β -actina así como los lncARN Xist y Neat1 como controles para la localización citoplasmática o para el enriquecimiento unido a cromatina, respectivamente. H19 se encuentra en todas las fracciones subcelulares, los compartimentos citosólico, nuclear soluble y asociado a la cromatina de los cardiomiocitos (Fig. 18). Esto indica que H19 tiene la posibilidad de modular los procesos tanto transcripcionales como postranscripcionales.

3.5 Represión del lncARN candidato, H19

Para regular negativamente el lncARN H19, se aplicó una química antisentido denominada esiARN. Los esiARNs (Eupheria Biotech/Sigma-Aldrich) son siARNs preparados con endorribonucleasas que son el resultado de la escisión de ARN bicatenarios largos. Estas especies antisentido actúan de manera selectiva no solo sobre una secuencia específica, como es el caso de los siARNs, sino varias secuencias sobre la diana.

En comparación con un control de transfección (RLUC, luciferasa de renilla), el lncARN H19 estaba regulado negativamente de manera significativa en dos líneas celulares de cardiomiocitos procedentes de ratón (HL-1) y de rata (H9C2) (Fig. 26A y B).

Para sobreexpresar de manera estable este transcrito, se clonó el transcrito de longitud completa en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de sobreexpresión lentivírico. Este plásmido porta un promotor bidireccional que permite la producción del transcrito de lncARN a partir del mismo elemento regulador génico, pero desacoplado físicamente del gen indicador de GFP (proteína verde fluorescente) y un casete de selección. La construcción se introdujo mediante transducción lentivírica en cardiomiocitos HL-1. La transducción mediada por lentivirus de células HL-1 mostró una sobreexpresión estable de H19 en comparación con células que portaban el vector de control (pLV+vacío) (Fig. 26 C).

3.6 Caracterización funcional del lncARN, H19

3.6.1 Efecto *in vitro* de los cardiomiocitos hipertrofiados en los niveles de H19

La hipertrofia de los cardiomiocitos es una respuesta adaptativa a nivel celular frente al estrés por presión o volumen en el corazón. El crecimiento hipertrófico *in vitro* puede inducirse mediante estímulos que incluyen fenilefrina (PE) e isoproterenol (ISO) o angiotensina II (ATII). Por lo tanto, se estimuló a células HL-1 con estos compuestos y se investigó su influencia en la expresión de H19 (Fig. 25).

3.6.2 Influencia de la represión de H19 en el tamaño de los cardiomiocitos

El rasgo característico de los cardiomiocitos hipertrofiados es un aumento en el tamaño celular, en relación con las células no hipertróficas. Por lo tanto, se investigó el tamaño celular de los cardiomiocitos tras la estimulación con PE e ISO o ATII mientras se reprimía H19 con esiARN. El silenciamiento génico de H19 dio como resultado un aumento significativo en el tamaño de los cardiomiocitos en la línea celular H9C2 de rata tras 48 h, así como en cardiomiocitos de rata neonata (NRCM) tras 72 h (Fig. 28 a 30). Este efecto se observó tras el tratamiento con PE e ISO en ambas líneas celulares de cardiomiocitos de rata, así como en NRCM tras el tratamiento con ATII. En la línea celular HL-1 se observó una tendencia comparable (Fig. 27A).

Además, H19 se sobreexpresó en células HL-1. La sobreexpresión de H19 en cardiomiocitos HL-1 provocó una reducción de los marcadores de estrés cardíaco, péptido natriurético auricular y cerebral (ANP, BNP) y niveles reducidos de la cadena pesada de β -miosina, β -MHC), otro importante marcador de hipertrofia cardíaca (Fig. 27 A), demostrando además que la inducción de H19 tiene un efecto cardioprotector.

3.7 Análisis de la expresión de H19 en tejidos cardíacos humanos sanos y enfermos

La estenosis aórtica se refiere a la calcificación de la válvula aórtica, lo que reduce el flujo sanguíneo.

Consecuentemente, el corazón necesita bombear sangre a una presión mayor, provocando en última instancia un crecimiento hipertrófico del músculo cardíaco. Se midió la expresión de H19 en 22 tejidos cardíacos sanos y 23 tejidos cardíacos hipertróficos (estenosis aórtica) y se observó que la expresión de H19 está fuertemente reducida en los corazones hipertróficos (Fig. 31). Estos datos de sujetos humanos corroboran los hallazgos descritos en el presente documento en modelos de ratón y de rata *in vitro* y evidencia además que H19 es una auténtica diana terapéutica para prevenir la hipertrofia cardíaca.

3.8. Conservación evolutiva de H19

Varios estudios han demostrado que la secuencia de H19, así como el mecanismo de impronta de H19, se encuentran altamente conservados entre humanos y roedores. Esto también puede representarse usando el navegador de genoma del UCSC (Fig. 32). Un alineamiento más detallado de diversas secuencias de H19 mediante análisis Dotplot remarca estos hallazgos (Fig. 33) y demuestra una fuerte relación de secuencia entre la secuencia murina y de rata, así como entre la secuencia murina y de humano. Una comparación adicional reveló que H19 humano muestra un homólogo en cerdos, lo que posibilita llevar a cabo estrategias de terapia relacionadas con H19 en modelos de animales grandes.

3.9 Estudios *in vivo* de H19

Para estudiar los efectos de H19 en el remodelado cardíaco *in vivo*, se investigó un ratón con supresión génica de H19. La eliminación de H19 se logró mediante el casete de resistencia a la neomicina que reemplazó al promotor y la unidad de transcripción de 3 kb de H19 (descripción de la estirpe: H19^{tm1Lda} en un fondo de 129S2/SvPas).

Los animales con supresión génica de H19 y sus compañeros de camada de tipo silvestre (ts) se sometieron a constricción aórtica transversa (Fig. 34). Como cabía esperar, tras 6 semanas después de la cirugía, el ts mostró inducción en la relación de peso cardíaco a corporal. Este aumento de masa cardíaca también se observó para los ratones de control quirúrgico, en comparación con los animales ts y con supresión génica de H19, mientras que los ratones sometidos a la cirugía TAC que carecían del gen H19 mostraron un fenotipo exacerbado.

A fin de obtener un análisis más detallado del papel de la H19 en la hipertrofia cardíaca y para desarrollar una potencial estrategia terapéutica, se sobreexpresó este transcrito aplicando vectores adenovíricos (AAV). Se aplicó un AAV9 bajo el control del promotor de troponina T específica cardíaca para lograr una inducción de H19 dirigida a los cardiomiocitos (Fig. 35).

Aplicando la construcción AAV9-H19, se logró una inducción de 150 veces de H19 en las muestras de corazón completo. Se analizaron los cambios a nivel transcripcional de marcadores específicos de hipertrofia cardíaca. Entre estos se encuentran los transcritos α -MHC, que se regula negativamente en la hipertrofia cardíaca y β -MHC, que está regulado positivamente. Mediante la sobreexpresión *in vivo* de H19, se observó una reversión del cambio de α -MHC a β -MHC (Fig. 35), lo que indica que la administración mediante adenovirus de H19 tiene un efecto beneficioso en el programa génico hipertrófico y sirve como estrategia terapéutica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medizinische Hochschule Hannover

<120> IncARN para el tratamiento y el diagnóstico de la hipertrofia cardíaca

<130> X1554 PCT

<150> EP 14 16 5504.3

<151> 22-04-2014

<160> 62

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 293

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> cromosoma 17, GRCh38.p2 ensamblaje primario

<400> 1

ES 2 706 878 T3

aaggggaaac aagtgcctc agaggcgctt ggctgaggat ggagaggggc tgagcccact 60
 ggcagggcag aaccaggtca tgtgccatgg ccctccactg ggccctccctc ccccagtttc 120
 tcttctcttc tctggcccta ccatctattg tccttggggg aagctgtggc acctagatgg 180
 gcagaggggtg ccaacttgta atctgaaagg ggccttcaag gacaggaaat cgcagatctg 240
 aatgttgtct gtttccatcc cattttaccg caatctgatt tccctgagaa tta 293

5 <210> 2
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> ARNm de proteína 1 que interactúa con el receptor de AT2, cds completo

<400> 2
 tctgtggtgg aatgacattt gctgtgtagg catctttcct ctgactgtat ttcttggcct 60
 tgaagagtac tgagtttaaa aagacagtat gtgacagtcc atggaaattg cctcttctgt 120
 gaaatctcgc cacctgctcc gaagacatgt tgttgtctcc caaattctcc ttatccacca 180
 ttcacatagc actgacggcc aaaggattgc ttcgaaacct tcgacttcct tcagggttta 240
 ggagaagcac tgttgttttc cacacag 267

15 <210> 3
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> cromosoma 5 clon CTC-222022, secuencia completa

<400> 3

ES 2 706 878 T3

agtcatttcc ctggatggtt tcttgctgc actgctgaaa caacagcatc cgaactgcac 60
 tgggaactgt ggaaccaccc agctccgccg ccagagaagc cggagccccg ggccccccgc 120
 cggcatctct gcgctgcggt ggcctctggc tcgcaccggc tcccacctgg ctgggaacat 180
 gggagtccgt ttgcccttgc cggcaggtgg ggtggctacc tgggacccta gcagggcaca 240
 tctctccatc tttctgcttc tgggctttct gaaaagcttc taagtccctgg tacctcttgc 300
 aactctcttc taaggatcct ttccaaagat ttctttttcc atttttcttt tcccctgggg 360
 aagctttggt tgaatatttt ctctgcttta cttcttcaac ccaacctcct ctcatcaggg 420
 cttaaactttt tttgcgactt gttttaactt aagatacggg atgaacacat atgtacctac 480
 atacatacat aaatacaaat aggcatttat ataaatgcat atatataata gttatthttcc 540
 aagagcacac ctctctggca cttttcattg atacctcggg cgtttacctg tttgggattt 600
 gacaagatcc agactcagtt tggctgtgga ttttgattgc tttacaaatg gttattatta 660
 tttttttcac aagaactggg tctccagcac tcactaaggt aagctctaag acttattgct 720
 tttcctgtcc agctg 735

5 <210> 4
 <211> 320
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> ADNc FLJ37793 fis, clon BRHIP3000473
 <400> 4

aggctgaccg gttccctgat gtgttacctg cttctgctac tgatccaaac tgcagaactt 60
 ctcatcctc cccaaggcct ccaggcagta tccaatgggg aatcagctct aaaaggaacc 120
 agaccaacgt tttccagccc cttcattctg cttccctctg tgtgaggaaa ggatagaaat 180
 gttcaggaca tcatcatata ggctcctcat ctacaaagtt ccagtagcag tgacgcctac 240
 acggaagact tggaaactgca aacaggctgg ggtcacctca gtgacatctg acgctgtcca 300
 accagaagtt cgatttttgt 320

15 <210> 5
 <211> 726
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> cromosoma 1, GRCh38 ensamblaje primario
 <400> 5

ES 2 706 878 T3

	taggacagaa aacctgagtt ctaattccag ctttgccagt cgtcccgtcc gtgatatatt	60
	acctaactcc tccagaactc agttttctaa cctataaaat gaagacattg tgctagatga	120
	tctttgtggg tccttcaagc tctggatctc taattccatg attagtaatg tatgtatgtg	180
	tatataaata tgcttatctg tagaaatggg cccatttgaa aagtggagac aaggctctgcc	240
	cagggtgcatt tattgtgcca gaaacagtga attcctaaat aagttcataa aatcttgttt	300
	tacaattcaa tggtagtgct taatgttact gtctgaaatc cactgtttaa ccagatggaa	360
	gactggggcc attcaaaaca ttattagttc acaagtgttt gctgttaaaa tgcttcaata	420
	aaactcattt gttaaagtca gaaattcaac tcttctgtac ttgggcaggt cccagcagcc	480
	ccttggcagg ctagttttgt gcatgggcct ttgcaagcta tataaacggt aggtgttggc	540
	ttgattatga taaatatgag caggctccct ggagaacagt ccagaaaaaa agagttatag	600
	ttctcacaaa ctggtgacat gaatccatta agctgtgtgg cattttccag tgtaaagaca	660
	ttgtttgctg gctacgatct ctgacttttt gtggcatatg aggtgtaaaa tgttgtcaaa	720
	aaagaa	726
5	<210> 6 <211> 132 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <223> cromosoma 5, GRCh38 ensamblaje primario <400> 6	
	atgacaatac ctggcacctc agagctgccc ggagaaatcc cagaactgtt ggtgatgctg	60
	gggctgctcc agtaacaatc atccgcacac acccaccaag actggcctgt gggaagaaag	120
	aagagctgcc aa	132
15	<210> 7 <211> 156 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<220> <223> cromosoma 5, GRCh38 ensamblaje primario <400> 7	
	acacaatagc taagacccaa actgggatta gatacccac tatgcttagc cctaaactcc	60
	aatagttaaa tcaacaaaac tattcaccag aacctacaa gcaatagctt aaaactcaaa	120
25	ggacttggcg gtgctttata tcctctaga ggagcc	156
30	<210> 8 <211> 259 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 706 878 T3

<220>
 <223> Timopoyetina (TMPO), cromosoma 12, GRCh38 ensamblaje primario

<400> 8

5 tttcaactccc aacagtgcta gttgccgcag accaatcaaa ggggctgcag gccggccatt 60
 agaactcagt gatttcagga tggaggagtc tttttcatct aaatatgttc ctaagtatgt 120
 tcccttggca gatgtcaagt cagaaaagac aaaaaaggga cgctccattc ccgatggat 180
 aaaaattttg ctgtttggtg ttgtggcagt ttttttgttt ttggtctatc aagctatgga 240
 aaccaaccaa gtaaatccc 259

<210> 9
 <211> 805
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <223> Pseudogén 2 del canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1P2)

15

<400> 9

 cagggatgtc ttcaccaagg actatggatt tggcttaata aagcttgatt tgaaaacaaa 60
 atctgagaat ggattggaat ttacaagctc aggctcagcc aacactgaga ccaccaaagt 120
 gacaggcagt ctggaaacca agtacagatg gactgagtat ggcctgacgt ttacggagaa 180
 atggaacacc gacaatacac taggcaccga gattacagtg gaagatcagc ttgcatgtgg 240
 actgaagctg accttcgatt catccttctc acctaact gggggggaaa aatgctaaaa 300
 tcaagacagg gtacaagcag gagcacatta acttgactg cgacatagat tttgacattg 360
 ctgggccttc catccggggt gctctggtgc tgggttaciaa gggctggctg gccggctacc 420
 agatgaatth tgagactgca aagtccagag tgaccagag caactttgca gttggctacg 480
 agactgatga attctggctt cacactaatg tgaatgacgg gacagagttt ggcagcctca 540
 tttaccagaa agtgaacaag aagttggaga ccgctgtcaa tcttgctgg acagcaggaa 600
 acagtaacac gcgctttgga atagcagcca agtatcagat tgaccctgac gcctgcttct 660
 cagctaaagt gaacaactcc agcctgatag gtttaggata cactcagact ctaaagccag 720
 gtatcaaact gacactgtca gctcttctgg atgggaagaa cgtcaatgct ggtggccaca 780
 agcttggtct aggactggaa tttca 805

20 <210> 10
 <211> 765
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> cromosoma 3, GRCh38 ensamblaje primario

<400> 10

ES 2 706 878 T3

ctgacagagt gaagtcagca gtggtaaact tcaacagttg aagaacaaga tggtacaac 60
cattttaagt ggctgataac attttgtttg agatattttg atctaatttc aaagacagcc 120
ctatctcact ttgctcaatt ttaaagttag tcaattaagg gactgtatct atatctcttt 180
ttccaattag tgtctgtgtg cttggccagg catcatagcc atgcaaacta gtaaacacag 240
ttgagcagac aatggctctcc gcattctaata gccagtttga aaacttaatc ctgtcacctt 300
ggaccaacta taaagctttg aaatggagat aactcccacc atacctgtct cctattatag 360
ctttgtgcag attaactaat taaagttatg aagagattta aagataaaaa ttctctgttta 420
ttattgctgt tagtcctcag agttggcacc aaatcaggaa aaaatgatataaatcacctc 480
tgtcccaaaa ttttgcatc ttagaaatga ttctatgaa gtatcactat aaattaggct 540
aaattgtttt ttgactgcaa gcacttaaa gctggattta tgaatggaaa catatgaagg 600
ccactctgtc cagctctgta gcccatact ttctccctgg gctatttata gaaagtgtat 660
ggctagtgga aaagttcaca tttattttta caagccagtc atgacatgac cgaggaactc 720
atctcctctc tctgggaagg tcacctctt cacctgagct gcaag 765

<210> 11
<211> 689
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> ARN polimerasa II similar a TAF5

<400> 11

tcttgttctg aagacatgtc catcagatac tgggatctgg ggagtttcac caaactgtg 60
ttgtaccaag gacatgccta tcctgtgtgg gatctggaca tcagtcata tagcctgtac 120
ttcgccagcg ggtcccacga ccgcaccgcc aggctgtggt catttgatcg gacgtacccg 180
ctgaggatat atgcaggaca cctggcagat gtggactgtg tcaaattcca ccctaattca 240
aactacttgg ccacgggctc aaccgacaag accgtccggc tgtggagcgc tcagcagggg 300
aactcgggtga ggcttttcac aggccaccgt ggccccgtgc tttctctcgc cttttctccc 360
aacggtaagt acttggcgtc tgctggcgag gaccagcggg tgaagctgtg ggacttggcc 420
tctgggaccc tttataaaga gttgagaggc cacacagaca atatcaccag cctcaccttc 480
agtccagaca gcggcttgat tgcctctgcc tccatggaca actcgggtgcg cgtctgggac 540
atcaggaaca cttactgcag tgcacctgcc gacggctcct ccagcgagct cgtgggcgtg 600
tacaccgggc agatgagcaa cgtcctgagc gtgcagttca tggcctgtaa cttcttctg 660
gtgactggaa ttacacaaga aaatcagga 689

<210> 12
<211> 1598

ES 2 706 878 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> H19

<400> 12

```

aggcctgggt cagacagga catggcaggg gacacaggac agaggggtcc ccagctgcca      60
cctcaccac cgcaattcat ttagtagcag gcacagggc agctccggca cggctttctc      120
aggcctatgc cggagcctcg agggctggag agcgggaaga caggcagtgc tcggggagtt      180
gcagcaggac gtcaccagga gggcgaagcg gccacgggag gggggccccg ggacattgcg      240
cagcaaggag gctgcagggg ctcggcctgc gggcgccggg cccacgaggc actgcggccc      300
agggctctggt gcggagaggg cccacagtgg acttggtgac gctgtatgcc ctaccgctc      360
agcccctggg gctggcttgg cagacagtac agcatccagg ggagtcaagg gcatggggcg      420
agaccagact aggcgagcg ggcggggcgg agtgaatgag ctctcaggag ggaggatggt      480
gcaggcaggg gtgaggagcg cagcgggcgg cgagcgggag gactggcct ccagagcccg      540
tggccaaggc ggcctcgcg ggcggcgacg gagccgggat cgggtgcctca gcgttcgggc      600
tggagacgag gccaggtctc cagctggggg ggacgtgcc accagctgcc gaaggccaag      660
acgccaggtc cgttgacgt gacaagcagg acatgacatg gtccggtgtg acggcgagga      720
cagaggaggc gcgtccggcc ttctgaaca ccttaggctg gtggggctgc ggcaagaagc      780
gggtctgttt ctttacttcc tccacggagt cggcacacta tggctgccct ctgggctccc      840
agaaccaca acatgaaaga aatggtgcta cccagctcaa gcctgggctt ttgaatccgg      900
acacaaaacc ctctagcttg gaaatgaata tgctgcactt tacaaccact gcactacctg      960
actcaggaat cggctctgga aggtgaagct agaggaacca gacctcatca gcccaacatc     1020
aaagacacca tcggaacagc agcggccgca gcaccaccc cgcaccggcg actccatctt     1080
catggccacc ccctgcggcg gacggttgac caccagccac cacatcatcc cagagctgag     1140
ctcctccagc gggatgacgc cgtcccacc acctccctct tcttcttttt catccttctg     1200
tctctttggt tctgagcttt cctgtcttct ctttttctg agagattcaa agcctccacg     1260
actctgtttc ccccgccct tctgaattta attgcaacta agtcatttgc actggttgga     1320
gttgtggaga cggccttgag tctcagtac agtgtgcgtg agtgtgagcc accttgcaa     1380
gtgcctgtgc agggcccggc cgccctccat ctgggcccggg tgactgggag cgggctgtgt     1440
gcccgaggcc tcaccctgcc ctgcctagt ctggaagctc cgaccgacat cacggagcag     1500
ccttcaagca ttccattacg ccccatctcg ctctgtgcc ctccccacca gggcttcagc     1560
aggagccctg gactcatcat caataaacac tgttacag                               1598

```

10

ES 2 706 878 T3

<210> 13
 <211> 339
 <212> **ADN**
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Homólogo de proteína 3 relacionada con actina ARP3 (levadura), ARNm

10

<400> 13

atggcgggac	ggctgccggc	ctgtgtggtg	gactgtggca	cggggatac	aaaactagga	60
tatgctggaa	atacagaacc	acagtttatc	atcccttcct	gtattgctat	taaggagtca	120
gcaaaagtgg	gtgatcaagc	tcaaaggagg	gtgatgaaag	gtgttgatga	cctagacttc	180
ttcattggtg	atgaagcaat	agaaaaacct	acatatgcaa	caaagtggcc	aatccgcat	240
ggtatagttg	aagattggga	cttaatggaa	aggtttatgg	agcaagtgat	ctttaaatat	300
ttaagggcag	aacctgaaga	ccattatfff	cttttgact			339

<210> 14
 <211> 923
 <212> **ADN**
 <213> *Mus musculus*

15

<220>
 <223> Gm11641

20

<400> 14

ctcagcgcca	tcctcccaa	cgccattccc	ccctcagtcc	agcccggccc	gggcacctta	60
gaactttcgc	ccgctggcct	agcttcact	tgtcccggca	gacgcgcgtg	gggtccgcgt	120
ccggagctgc	ctgctccaca	gccctgctcc	ggcgatgccc	tgtttcctgt	tcaacaatat	180
aaccggcgga	gagcgctcgg	cagaacttcc	tcccaagccg	ggactgggct	gtgcttgcaa	240
gagacaatcc	ccggtgtcct	ggcttcctgt	cccctctggg	ccgggccagc	gctctaggag	300
cagagacgcc	accctcccc	ctcttcccc	ggatcctggg	ccacacctga	ctgtctccgg	360
ggaggaggcg	gtggcagggc	ctggatggag	atctgcgggg	gaggcagttt	ctctcagctt	420
ctgaccagat	tagactccca	ctgaccctca	tccttgtcgg	aggaagtac	cggccactct	480
gcaggcggcc	gaagtgcagt	tgcgggatcc	tcccattttg	gaaactacct	gcctcttggg	540
aaagcagcct	tagcactctg	aggtgtgcct	gtgaacactt	ctgacaaagg	aggcactttc	600
tggggatgag	aactccagtt	tgccatccc	cctctagaca	ggggaaaggg	gaaactgccc	660
tcagaggcac	tgtgctgaag	gtggaaagac	aaccaaagac	agcagcagca	gcagcgcaag	720
tgccaggcgc	ctccccggg	cctgccacc	ccaacctcca	aatccagttc	ctctcccttt	780
gctctgagcc	ctgagaacct	gcctcaaaga	tggccaagga	gcaccaccc	actggctgag	840
ggcgctcaag	gccaggaaac	gaagccctgg	atgttgtctt	tttctgtccc	atftttctgc	900
aacctggttt	ccctaggaat	taa				923

ES 2 706 878 T3

<210> 15
 <211> 937
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <223> Gm16192

10

<400> 15

```

cagataccaa cctcccaagt cagtgtgagg ctatcaaaga cttccgtagg tttgcgtctg      60
gctaacctac catcggaaag atttgggtggc agaggagagc gccagaaagt tccaaggcaa      120
ccatcctgca tcggtaaaca cagacaagcc tacagctgcc ggcacacaac taaagtaccc      180
tcctgcccaa cacaggagat taccgctcct tgtaaccagt caagcctctc cttaaagagg      240
gctttagtgc ccaattatgt ctccatagaa acctgagaag catgagcaag ttcacagca      300
tatctccgac ctcccctccc cgcgcgcggt gctgagcaga cctgtgcagg accaacctgt      360
gtggaaaatg acagtgtttt tcctgagccc cgaaggaagc cggaggtttc gaagcagtcc      420
tttggcgggt aggcggacgt ggatggtgga taaggagaat ttgggagaca acagcatgtc      480
ttcgaagcca gtgggagAAC ttcgcagggg aagcagcttt tccagggacc atcacatact      540
gtgtctcttg gcaactcggg gttcttcag gccaaagat acagccagag aaaaacaagc      600
ttacatgcta atgccaggcc acccagattg ggggggtgctg gggggggggg gtagctagag      660
ttagctatcc cagagctcca ggcttccggt tgctcttcca gatgttgcta acaaacaatg      720
cccttcgtct gagcaagatc tgtgaggagc agctcaggaa gcaagcagcc tgaattacat      780
cacactgtgc atgccgcggg ttgttgtggt tcccgactgg gatggaaagg ggaggagaaa      840
gtgggtggtc tcgggagctt tatgtaacag ccaatgatgt cgcaggtcct gtcactatTT      900
ggaacggggc gaaatgaaat aaaccacctc acatgcc                                937
    
```

15

<210> 16
 <211> 725
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20

<220>
 <223> AK013700

<400> 16

ES 2 706 878 T3

gagtcatttc cctggatggg ttcttgctg cactgctcac acaacagcat ccgaactgct 60
 cctggcaccg tgggacctct cagcttcgga gcccaagccc cgcaggcatc tctcgcttc 120
 ccggctgctt ttccttccca cctggcgggg acatgggcgt ccctttgcc ttgcctgcag 180
 gtgggggtggc tgctgcaacc ctggggggcg catctatctg tcgccctgcc tctgggctct 240
 ctgaatgcct ctaagtccag gtacctcttg caactcttcc aggtgcaaag gatttatctg 300
 ttctataagg tttggatttc gtttttctt tttttcctac ggaagctttg gttgaatata 360
 tatatttttt tcctctgctc cacttcttgc actcagcatc ctctcggttc aacttttttc 420
 ccccccgatt cgtttttagct agagattaga tgtgaatgca tacaccatt catacacaca 480

 tagaaacgta cacctactag agcttaagtg tggaatcatt gttttccgag agcaccaatc 540
 tcttgacact tttcatcgat acctctgtcc tttacctgtt tgggatttga caagacgtcc 600
 aggctcagtg tgtggctgtg gtttctgatt gctctggaaa aggttatttc ttcgcaagaa 660
 ctgagctctc agcactcact cgctaaggta agcgcagaga ctactgctt tctctgtcct 720
 gctgc 725

5 <210> 17
 <211> 439
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <223> Gm15892
 <400> 17

agaccttgaa gggaatcttc taaggcaggg aagaagcaga gacttgtatc cactgaacca 60
 aaatacaagc acatactatg tccaaggctg accagttctc tgggtggtcc tgctactgat 120
 ccatccaaac tgctggactt gtccttcata cccaaggtct tcaggcagta tctaatggga 180
 agtcaactct aaaaggaacc agactgtcat ttctggccc ctttattctg tagctacctc 240
 tatgtgagga aaggatagaa aacattcaag acatcatatg ggcttacgat ctacagattc 300
 caaccagtag cagtggctga ctctacaca gacgactggg aactgcaaac aggctgggggt 360
 cacctcagtg acatctgacg ctgtccaacc agaagtctga cttgtgtgtg cgtgtgctgc 420
 aggaattgaa aaatgtact 439

15 <210> 18
 <211> 1726
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <220>
 <223> BC023483
 <400> 18

ES 2 706 878 T3

atttaggttc ctatgcctta cttgaattct gtccttcccc ccataactgc agctgttgat 60
 agattttaca atcctaataa atctgtatgt ttttcttact ccagcgatgt ctattagcag 120
 agacatgggc caggaagg tgatggatac agccaggggt gggatatcag cctcaaagtg 180
 cagagctttg ctctgaatct cagcaggcag ccaaagggac tgagacaaag ctcttccttt 240
 caagttggca tggcaatcaa cttggaaatc aggttccccg ggcctttgcc ttctaacia 300
 aggatccagc ctctccaac tgggtctcca ctcagcccct gtagaaaagt gctgacagta 360
 ttaagttcta ctcttccta agaccccagg aggtcctcac cgtgcataga tgtgccatct 420
 gttcttgaga aaccaaagca ctttagtgag tcttacaacc cataatactt acagtatttg 480
 ccctctgaaa ggtggaagg gcttgggcta ggtctcattt gagaggcaac tagagctagg 540
 aggaaaagcc tggagctaga cagcagggag ctaagccaca tctgcaccac cacaagctat 600
 gaacctcggg taggttgctg aattttgctg ccccccccc cctagacagt tgtggggagg 660
 tcctaacagc taccctcctg ggatggcaga aaaggaagg aataatataa ctggtgggac 720
 acgctttgaa gaaatcagaa gctctctcca gaggggagg aggatcatgt atagatgaag 780
 aagttgacat ccgtactcac tgcctggcca gggtcacagt ctcacagcag aactgggaca 840
 tgagccccgc cacctggagt gtccctgata gagcacctt caccagagt gtgtacatga 900
 acacaggctg cttctctgtg ccagtgtgtg cacatatgtg ggtgtgtctg tatgggggg 960
 gtgtgcagca cagatgaacg taggacagaa actccgagtc ctaattcctt tctaacagtc 1020
 gacctgtctg tggcctggga cacacaacca actcttctgg acctcagatt ttctaagtca 1080
 taaaacaagg acattgtggc atgggatctt tgtggttctt ccaactttgg tgacgagagc 1140
 ccctaacggg tgatgtatgt atgtatata cgatagctt atctgtagaa acgggcccac 1200
 tgggaaattg gagacgaggc ctgcccagat gattgactt gtaacagaat cggcaacttc 1260
 acaagtccgt aagccttcat tttaaaagtc gatgggatgg tgtcatttac tgtcattggt 1320
 tcaaattcac tgttgaactg ggtagaggat tgggtctgtt ttaaaaacta agttcttagc 1380
 tcacaagtgt ttgctgttac tttcaaac acgagtcatt tgttcaaaag tcaaactttt 1440
 aactctgcct tgggcaggtc cccaacagcc tgttttgag gctgggtttt gtgtatgggc 1500
 ttttacataa ctatataaaa gttagctgtt ggcttgatca tggtaaataat gaacagattg 1560
 cctggagaac agtccagaaa agaattgaat tctatagttc tcatcaactg gtgacatgaa 1620
 accattaagc tgtgtgcaat tccctgggtg gaagatattg ttcactggct acagtctctg 1680
 actttgtggc atatgaggta taaaatggtg taaaaaaaa aaaaaa 1726

5 <210> 19
 <211> 567
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 706 878 T3

<220>
<223> Gm12224

<400> 19

5
 gggctttggt tctttctcct ttgcagaaag gccactgggc tgatagtgtc ctcttagcaa 60
 gtaagcttgc ctgcagctgc taagacagca gtgcccataa aagtaaaaat aagcatcacc 120
 atgtcatcca gaatggcttt cttcaattcc tgaattgaac catgtccagt agttgagttc 180
 ctctgcatcg accagcttga tgtggttgca gggcagaggt gccctacat gccctaggac 240
 accagaacaa gagtgaaagg cttgggcctc tggcatcttc ctctgtaccc ggctgcccag 300
 cacacgtccc accacccccca aggaaggccc gggatgatga tacctggcac cccagagctg 360
 ctcgtaggaa tcccagaacc gttggtgacg cgggggctgc tccagtgaca atcatcctca 420
 catgccacc aagactggcc tgtgggaaga aagaagctgc caatgatggt gacacacgag 480
 atggtcttca tttatggtct gctttcaaca gctggaccct gggtgctaga agagagccac 540
 gtgctgagga agtcgcttct cttttgt 567

<210> 20
<211> 292
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10

<220>
<223> AJ409495

15

<400> 20

ggctcctcta gatggatata aagtaccgcc aagtcctttg agttttaagc tatggctagt 60
 agttctctgg caaatagttt tgttaaattt aattatthag gtttatggct aagcatagtg 120
 gggtatctaa tcccagtttg ggtcttagct gtcgtgtatt ataaatgact agaattactt 180
 tcgttattga gtttaggtcc taacaatgaa ttttcacata taagttggat ttttaattcta 240
 tttatttatt tatagttgac acgttttacg ccgaagataa ttagtttggg tt 292

20

<210> 21
<211> 692
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25

<220>
<223> Gm17499

<400> 21

ES 2 706 878 T3

gggatttcct tggttggtt ccatagcttg atagaccaa acaaaaaaca cggccacaag 60
 ggcaaacagc aacattttta tccacatggg aacggagcgt ctcttctttg tcttttctga 120
 cttgacatct gccaaaggag catacttcgg gacgtactta gatgagaacg actcttccat 180
 cctgaagtca ctgagctcga gcggccggcc tgcagcacct ttgattggtc tgcggcagct 240
 agcactgttc aaagtgaaac agaattccag atgattcaag tcaacaacca aaccttagtg 300
 tgatttctaa gcacactgca aaatgcagca gcagaaaatc gtcagataaa agcaggggat 360
 tgacgtatca catgcttttc tttgtttggt ttgttttttg agacaggggt tctgtgtacc 420
 cttggctgtc ctggaactca ctctgtagac cagggctggt atagagcaac catgtttcga 480
 atactccaaa aagttagctg tatcatatta taaaatagta tttaggataa atactctcta 540
 agcctgtctt ggaggctgag tagtgtactg tgtgcctgta atcgcagcac ttgggaagtg 600
 tgtcatgagt ctaacatctg ccttgcatat agggtaaate caagatcagc ctggtgactt 660
 gagaacttgt ctcaaaaaag aaaataaaac tt 692

<210> 22
 <211> 760
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> Gm8459

<400> 22

atccatcagg gatgtcttca ccaagggcta ccgctttggc ttaataaaac ttgatttgaa 60
 aacgaagtcc aagaatagat tggaatttac cagctcaggc tctgccaaca cggagaccac 120
 cagagtgaac ggcagtctgg aaaccaagga cagatggact gagtatgggc aacattttac 180
 ggagaagtgg aacacagaca gcaccctggg cactgagatc accgtgggag accagcttgc 240
 ttgtggactg aagctgacct tcgattcatc tttttcacc aaacttggg ggaaaatgct 300
 aaaaatcatg acaggttaca agagggagca catcaacttg ggctgtggcg tggactttga 360
 catcgtggg ccctcaatcc ggtgcttggc tatgaggggt ggctagctgg ctaccagatg 420
 aattttgaga cctcgaagtc ctgagtgacc cagagcaaga cagcttcata cgacgggaca 480
 gagtttggtg gttccattta ccagaaggcg aacaagaagt tggagactgc tgtcaatctc 540
 gcctggactg cagaaaacag taacactcgc tttggaatag cagccaaatt tcagttccac 600
 cctgatgcct gcttttctgg caaagtgaac aactccagcc tgattggctt agggtagact 660
 cagatcctaa aaccaggtat caaactgaca ttgtcagccc tactggacgc aagaacatca 720
 atgctggcag acacaagctt ggcttaggac tagaatttca 760

5

10

15

ES 2 706 878 T3

<210> 23
 <211> 2759
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <223> AK083183

10

<400> 23

```

ggagaccctt tctcctttct cagcttgcca ctcaggtgaa gaagatgacc ttcccagaga      60
gaggaagtac agactccttc atgtcatgac tggcttgtaa aaataaacat gatctttttc      120
cactggccat acacgttcca taaatagccc agggagaaag tacggggcta cataactgtc      180
cagagtggcc ttagactgct tccattcata aaccctactg taagtgtca cagtcagaaa      240
accacgtagc ctaatctgat gggcaacttt atatatgggg gaactattgc taagaatatac      300
aaactggtaa gtttttctga ttgagtgatg ggtctgaggg gctgacagca acaagccagg      360
ggttttaacc ttccactccc ccagctagta tatctgctca aagctatagt cgacaggtat      420
ggttgaagtt gctttttaag ggttttatca ttggctgaag gtgacagaat tcagtcttca      480
aactgatagt gaaagcaggg acagctgtgt gctcagctgt gtctattact ctgcaggact      540
    
```

ES 2 706 878 T3

atgttgcattg gtcaagtata cagatgctga ttggatata tgtgtgtaat catggataag 600
atataccttta attgaataca tctattcagt tttaaaatag atcaaaataa gagacgggaa 660
cctttaaaat tagattatag gatcttaaaa tgtcaccagc caccgagatg atttctgtca 720
ccttgttctt tatccattaa gtttgccatt gctgattgac tccgttaggc tcctttggct 780
gatgcctacc tagtcttcaa tgtgatcttc ctagtgttta ctgaacattt actctacgta 840
aggcactaag caacgatcca tgtatccatc cacgtaattg ccttttggtc ttacagcaga 900
gcagagtaga agtttgagtt ttttctcctg ttggtataag atcagtctcg cacagtaata 960
gaccacagc gttttacttt tctccttagc ttaaagcttt ttttaaaatt taatttacia 1020
ttcaggtata agaagagtgt gtctatgaac agagttaaat gttttatcat catggtaatg 1080
acagtagtaa cgatgaactg ctggaagggt atggcgtcca catcatttcg aagagtgggt 1140
tgctcagagt gcctacaaca gacagtgtag tgaagtcaaa gcaagattcc actcaggcag 1200
gtgtttggag agtttagctt atgcttaact ctccaaaaat cttctggcct ttgcctgccc 1260
tcttcttaga tccttccatt ataacgagag agagagagaa ttggattcag acagccaacg 1320
tggaacagct gctcaactcc ggacagtgtt acctgatttt aagttctgtc cctagaaaag 1380
ctttcggact ctgaggggtg ccgtgctcaa acaggtggca agggattcta tttggcatcc 1440
taacaccacc ctgcagcttt tgacggcagc tctgctgtcc gtgggatatt ttgagtagta 1500
catttatcct gtggcttaat ttgtttccat aaaattaggg cataggtcaa aaaggcatta 1560
gaggctaatt gtgaaggaca ttttaagtca ttttcttaaa ggattgtcag catttgttga 1620
catgtactgc cagacaaaag caaaggagcc tagaccctcg ggaaaggaag cccagatgg 1680
ctgaaaccgg cattgtagcc attcctttag gaggggccac aggccttcct actgaagtgt 1740
tgaggtcttt gatattgtca ataatttttt tcttaattac aaaatgacta tcagtactta 1800
gtaatcaaaa aaacctaaca taaattcctg ttacttctca gagaacaaat gtattgcatt 1860
tctagtttgt ggatttctca cgaatttgta gggttttttt ttttcttttc tttccttttc 1920
tctttctttc ctttctttt cttttctttt actttatttt attttttgtg gtagcttctt 1980
acacagtctg tgagcaagct tcagaactgg ctagttaagt tataggtggg gacccaagt 2040
gctcacttag ctagtcatag tggcaggggt ggacacacac ctgtatgcaa caaccgcag 2100
ttactatttg gtgcaggagg agagcagccc cttctttaag cttttagaag tacctgtccc 2160
ccaccctgtg ttaagcttcg gaatgtaaca gagacgcttt aatgcttttt gttccaaaca 2220
tgacatttcc caaggaata tcttgagtgt acaattccat tctcgaatgt ggaaaagtgg 2280
caggccacct tccccacgcc ttacagttcc accccaaata tgcagtaagc acgcgcagtg 2340
aaggccgggt cgggaggagc cttcggatgg ttatttagcc gtgcagtaaa gaccctgctt 2400
ctcctggctc accaccactc cgaggtgggc aggacaccac ggcagtgaac cctgcttctg 2460

ES 2 706 878 T3

	ggtgaagtac agggacacac ttcgcttctt tcacttcttc ttttggttcc atctctattt	2520
	aaaaagtata gtcttttttt ttttaacttg ctggatgtgg aaaaaaatgc atggtaaaaa	2580
	aaaaatttaa agacatattt taattttata tttcaaaggt ttgtaatagc agtttgtttg	2640
	ttaaaaacag gccttagcac atggatgaga accagggctt tttcaaaagc ctcatctttg	2700
	agctcttacc caaatgataa agacctcttg gatctttcaa actgtaaata ttgtgtagt	2759
5	<210> 24 <211> 691 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
10	<220> <223> Gm13316 <400> 24	
	aatcatgttc tgaagatatg tccatcagat actgggacct ggggagcttc accaacactg	60
	tgctgtatca gggacatgcc taccctgtgt gggacgtgga catcagcccc ttcagcctgt	120
	actttgccag tggatcccat gaccgtaccg ccaggctgtg gtcttttgat cggacgtacc	180
	cgctgaggat atatgcagga cacctggcag atgtggactg tgtcaaattc caccccaact	240
	caaactactt agctacaggg tccactgaca aaactgttcg gctatggagt gccacgacag	300
	ggaactcggg gcggtctctc acaggtcacc gaggccccgt gctctccctc tccttttctc	360
	ccaatggtaa gtacttgga tctgctgggtg aggaccagcg gttaaagttg tgggacttgg	420
	cctctgggac actttttaaa gaactgagag gccacacgga cagcatcacc agtctggcct	480
	ttagcccgga cagcggctctg attgcttctg cctccatgga caactccgtg cgtgtctggg	540
	acatcagaag catgtgctgc aacacacctg ctgacggctc ttcaggtgag cttgtgggag	600
	tgtacactgg gcagatgagc aacgtcctga gtgtacagtt catggcttgc aaccttctcc	660
	tggtgactgg aatcacacaa gagaatcaag a	691
15	<210> 25 <211> 2615 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
20	<220> <223> H19 <400> 25	
	accgggtgtg ggaggggggt ggggggtggg ggtgggggggt atcggggaaa ctggggaaga	60
	tgggagagct ggaggagagt cgtgggggtcc gaggagcacc tcggcatctg gagtctggca	120
	ggaatgttga aggactgagg ggctagctca ggacagcaa aggcatcgca aaggctggaa	180
25	aacatcggag tgaagctgaa gggcctgagc tagggttgga gaggaatggg gagccagaca	240

ES 2 706 878 T3

ttcacccccg ttacttttgg ttacaggacg tggcggctgg tcggataaag gggagctgct 300
 gggaaggggt cgaccccaga cctgggcagt gaaggtatag ctggcagcag tgggcaggtg 360
 aggaccgccc tctgctgggc aggtgagtct ccttcttctc tcttggcctc gctccactga 420
 ccttctaaac gaaggtttag agagggggcc tggtgagaag aagcggctgg cctcgagca 480
 gaatggcaca tagaaaggca ggatagttag caaaggagac atcgtctcgg ggggagccga 540
 gacagaagga ggctggggga ccattggcga cccaggtgg aaagagctct tagagagaag 600
 aaagaagagg tgcagggttgc ccagtaaaga ctgaggccgc tgcctccagg gaggtgatag 660
 gagtccttgg agacagtggc agagaccatg ggatccagca agaacagaag cattctaggc 720
 tgggggtcaa cagggcaaga tggggtcaca agacacagat ggggtccccag ccgccacaac 780
 atcccaccca ccgtaattca cttagaagaa ggttcaagag tggctctggc aaagtcccaa 840
 gtttgccaga gcctcaataa ctggagaatg gaaaagaag gcagtgcagg gtgtcaccag 900
 aaggggagtg ggggctgcag gtatcggact ccagagggat tttacagcaa ggaggctgca 960
 gtgggtccag cctgcagaca caccattccc atgaggcact gcggcccagg gactggtgcg 1020
 gaaagggccc acagtggact tggtagactg tatgccctaa ccgctcagtc cctgggtctg 1080
 gcatgacaga cagaacattt ccaggggagt caagggcaca ggatgaagcc agacgaggcg 1140
 aggcaggcgg ggcagaatga atgagtttct agggaggag gttgggtgca ggtagagcga 1200
 gtagctgggg tggtagacca gggaggcact ggctccaga gtccgtggcc aaggagggcc 1260
 ttgccccg cgacggagca gtgatcgggtg tctcgaagag ctcggactgg agactagggt 1320
 aagtgtctgt cccgctcgtg gtcaccagc ctctcccac gcaagttcaa ttaactcatg 1380
 tcttcatttc tccctatagc caggctctca gcagaggtgg atgtgcctgc cagtactga 1440
 aggcgaggat gacaggtgtg gtcaatgtga cagaaagaca tgacatggtc cgggtgtgatg 1500
 gagaggacag aagggcagtc atccagcctt cttggtgagc atactccctg ccacagggct 1560
 agtccgctca accaccta atgtccacca ctactcagg attctgtcct ttgcagaaca 1620
 ccatgggctg gcgccttgtc gtagaagccg tctgttcttt cacttttccc aaagagctaa 1680
 cacttctctg ctgctctctg gatcctcctc cccctacctt gaacctcaa gatgaaaggt 1740
 gagttctctt ctgccccatg tgggtgggag aggggtggat gccaaaggaca ggggtctcat 1800
 tctctcccac ccatagaaat ggtgctacct agctcatgtc tgggcctttg aatccgggga 1860
 cttctttaag tccgtctcgt tctgaatcaa gaagatgctg caatcagaac cactacacta 1920
 cctgcctcag gaatctgctc caaggtgagc tggggcacc ctttgaagct tgccaagccc 1980
 actccccacc ccacccccg cccacctca tttgtcttta ttctctttgc aggtgaagct 2040
 gaaagaacag atggtgtcaa cttttgaaa gagcagactc atagcaccoca cccaccctg 2100
 agaatccatc ttcattggcca actctgcctg acccgggaga ccaccacca catcatcctg 2160

ES 2 706 878 T3

	gagccaagcc tctaccccgg gatgacttca tcactctccct cctgtctttt tcttcttct	2220
	cctttcctgt aattctgttt ctttcctttt gttccttctct tgcttgagag actcaaagca	2280
	cccgtgactc tgtttcccca tttaccccct tttgaatttg cactaagtcg attgcactgg	2340
	tttggagtcc cggagatagc tttgagtctc tccgatgaa tgtatacagc gagtgtgtaa	2400
	acctctttgg caatgctgcc ccagtaccca cctgtcgtcc atctccgtct gagggcaact	2460
	gggtgtggcc gtgtgcttga ggcctcgcct tcccctcgcc tagtctggaa gcagttccat	2520
	cataaagtgt tcaacatgcc ctacttcac ctttgcccct cctcaccagg gcctcaccag	2580
	aggctcctggg tccatcaata aatacagtta cagtc	2615
	<210> 26	
	<211> 339	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<220>	
	<223> Gm8822	
10	<400> 26	
	atggcgggac ggctgccggc ctgtgtggtg gactgtggca cgggatatac aaaactagga	60
	tatgctggaa atacagagcc acagtttacc atcccatcat gtattgcat taaagagtct	120
	gcaaaaagtgg gtgaccaagc ccagaggagg gtgatgaaag gcgtggatga cctagacttc	180
	ttcattggtg atgaaacaat agaaaagccc acatatgcaa caaagtggcc aattcgccat	240
	ggatagttg aagactggga cttaatggaa aggtttatgg agcaagtgat ttttaaata	300
	ttaagggcag aacctgaaga tcattacttt cttttgact	339
	<210> 27	
	<211> 366	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220>	
	<223> cromosoma 17, GRCh38.p2 ensamblaje primario	
	<400> 27	
	cctgcccggg cacctcgggg cgtccgctcg ccggcctcgt ctccacttgt cccggcaggc	60
	gcgcgtgggc tcggcgtccc gcgctccctc ctcgaccgcg cggctccggc gctgccaggt	120
	ttcctgtata gcaactataac cagtgaggca ccggcggaga gcgcccggca gaacttctc	180
	ccggactggg gctgggctgc ggttgcgaga gacaatcccc ggcgtcctgg cttcctgtcg	240
	cctctggggc aggcccgcgc ctgaagagga aagatgccac cccctcccct gcatttcccg	300
	ggatcctggg ccaactcccgg gatcctggct gtctccaggg aggaagaggc cgcggggctg	360
25	agatgg	366

ES 2 706 878 T3

<210> 28
 <211> 358
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <223> cromosoma 17, GRCh38.p2 ensamblaje primario
 <400> 28
 10
 cctgcccggg cacctcgggg cgtccgctcg ccggcttcgc ctccacttgc cccggcaggg 60
 gcgcgtgggc tcggcgtccc gcgctccctc ctcgactgtg cggctcccgc gctgcccgggt 120
 ttctgtttca acaatataac cagggaggca ccggcggaga gcgccgggca gaacttcctc 180
 ccggactggg gctgggctgc ggttgcgaga gacaatcccc ggtgtcctgg ctctctgtcc 240
 cctctggggc gggccagcgc ctgaggagcg aagacgccac cccctcccct gcctttcccg 300
 ggatcctggg ccgcacctgg ctgtctccag ggagaaagag gctgcggggc tgagatgg 358
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador directo de H19 de humano
 20
 <400> 29
 agacagtaca gcatccaggg 20
 <210> 30
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador inverso de H19 de humano
 30
 <400> 30
 gagacctggc ctcgtctc 18
 35
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador directo de H19 de ratón
 <400> 31
 gaacatttc aggggagtca 20
 45
 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador inverso de H19 de ratón
 <400> 32
 55 acacttacc tagtctccag tcc 23

ES 2 706 878 T3

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Cebador directo de CHAST (L302) de humano
<400> 33
gcagagggtg ccaactgta 20
10
<210> 34
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> Cebador inverso de CHAST (L302) de humano
20
<400> 34
tctcaggaa atcagattgc gg 22
<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Cebador directo de CHAST (L300) de humano
30
<400> 35
cggttgcgag agacaatccc 20
<210> 36
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> Cebador inverso de CHAST (L300) de humano
40
<400> 36
aggatcccgg gaaatgcag 19
45
<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Cebador directo de CHAST (L299) de humano
<400> 37
ggttgcgaga gacaatcccc 20
55
<210> 38
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60
<220>
<223> Cebador inverso de CHAST (L299) de humano
<400> 38
gcagcctctt tctccctgg 19
65

ES 2 706 878 T3

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Cebador directo de Gm11641 de ratón
<400> 39
10 ccactgaccc tcacctgt 20
<210> 40
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de Gm11641 de ratón
20 <400> 40
cccagaaagt gcctccttg t 21
<210> 41
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de Gm17499 de ratón
30 <400> 41
actctgtaga ccagggctgt ta 22
<210> 42
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Cebador inverso de Gm17499 de ratón
<400> 42
caccaggctg atcttgatt 20
45 <210> 43
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> Cebador directo de Gm16192 de ratón
<400> 43
55 ccatcgaaa gattggtg 19
<210> 44
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de Gm16192 de ratón
<400> 44
65 ggaggtcgga gatagctga 20

ES 2 706 878 T3

5
<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de Gm8459 de ratón

10 <400> 45
cctcgaagtc ctgagtgacc 20

<210> 46
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Gm8459 de ratón

20 <400> 46
ccaatcaggc tggagttgtt 20

<210> 47
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de AK083183 de ratón

30 <400> 47
ccagagtggc ctagactgc 20

<210> 48
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Cebador inverso de AK083183 de ratón

<400> 48
ttaaaccacc tggctgttg 20

45 <210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador directo de Gm13316 de ratón

<400> 49
55 gtgcaaat ccacccaac 20

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso de Gm13316 de ratón

<400> 50
65 ggccaagtcc cacaactta 20

ES 2 706 878 T3

5
<210> 51
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de AK013700 de ratón
<400> 51
tccgagagca ccaatctctt 20

10
<210> 52
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de AK013700 de ratón
<400> 52
tagcgagtga gtgctggaga 20

15
<210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de Gm15892-002 de ratón
<400> 53
tccaaggctg accagtctc 20

20
<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de Gm15892-002 de ratón
<400> 54
actgcctgaa gaccttgggt 20

25
<210> 55
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de BC023483 de ratón
<400> 55
cagttgtggg gagtcctaa 20

30
<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 56
tgtcccagtt ctgctgtgag 20

35
<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 57
gtgctgctga gctgctgctg 20

40
<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 58
gtgctgctga gctgctgctg 20

45
<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 59
gtgctgctga gctgctgctg 20

50
<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 60
gtgctgctga gctgctgctg 20

55
<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 61
gtgctgctga gctgctgctg 20

60
<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 62
gtgctgctga gctgctgctg 20

65
<210> 63
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de BC023483 de ratón
<400> 63
gtgctgctga gctgctgctg 20

ES 2 706 878 T3

5
<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de Gm12224-001 de ratón
<400> 57
aagcatcacc atgcatcca 20

10
<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de Gm12224-001 de ratón
<400> 58
agccgggtac agaggaagat 20

15
<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de AJ409495 de ratón
<400> 59
tgggtctta gctgtcgtgt 20

20
<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de AJ409495 de ratón
<400> 60
tcggcgtaaa acgtgtcaac 20

25
<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador directo de Gm8822-202 de ratón
<400> 61
gcaaaaagtg gtagcaagc 20

30
<210> 62
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de Gm8822-202 de ratón
<400> 62
tgttgcata gtaggctttt ct 22

35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que promueve la expresión y/o la actividad del lncARN de SEQ ID NO: 12 para uso en el tratamiento o la prevención de la hipertrofia cardíaca patológica, en donde el compuesto es
- 5 (a) una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico del lncARN de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 69% idéntica a la misma,
- (b) un vector de expresión que expresa la secuencia de ácido nucleico como se define en (a), preferentemente bajo el control de un promotor específico de corazón o
- 10 (c) un hospedador que comprende el vector de expresión de (b).
2. El compuesto para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hipertrofia cardíaca patológica es una hipertrofia patológica ventricular.
- 15 3. Un método para diagnosticar la hipertrofia cardíaca patológica en un paciente, que comprende
- (a) detectar el nivel de expresión del lncARN de SEQ ID NO: 12 en una muestra obtenida de dicho paciente y
- (b) comparar dicho nivel de expresión con el nivel de expresión de dicho lncARN en una muestra obtenida de sujetos sanos, en donde una regulación positiva de más de 2 veces del lncARN de SEQ ID NO: 12 indica la
- 20 presencia de hipertrofia cardíaca patológica en el paciente.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha muestra es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha muestra es una muestra de tejido cardíaco.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la detección del nivel de expresión del lncARN comprende
- 30 (a) PCR cuantitativa, preferentemente PCR cuantitativa en tiempo real o
- (b) un método de amplificación de molde/ARN, seguido de la determinación del nivel de expresión del lncARN usando un método de cuantificación basado en fluorescencia o luminiscencia.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el método comprende, antes de la detección del nivel de expresión del ARN no codificante largo, una etapa de preamplificación del ARN en la muestra del paciente y/o la muestra de control del paciente.

Figura 1

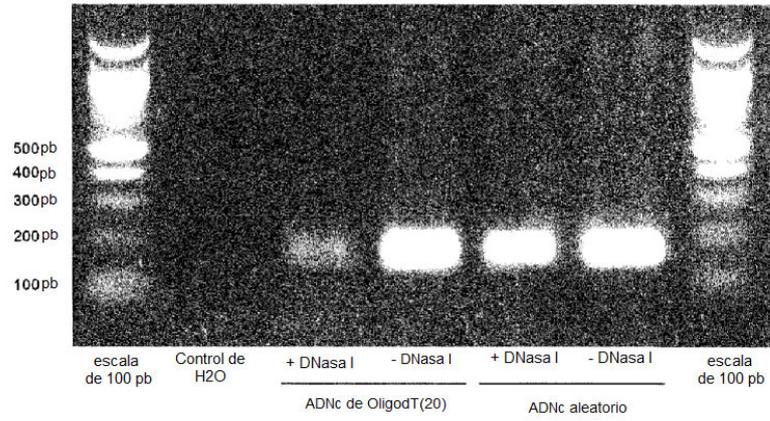
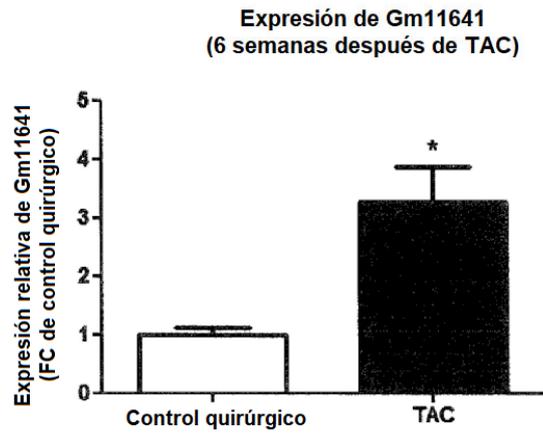


Figura 2

A



B

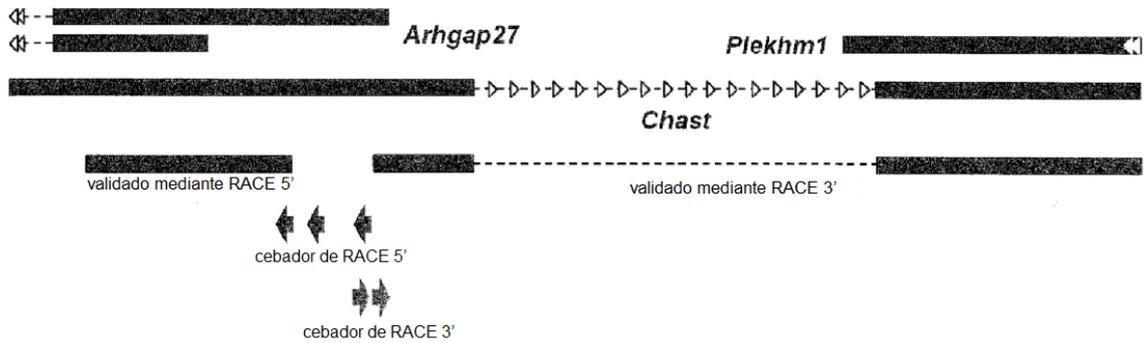


Figura 3

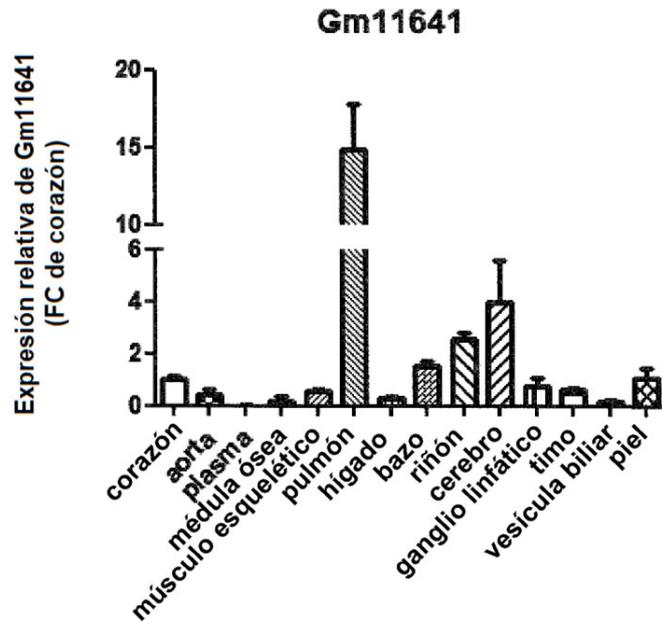


Figura 4

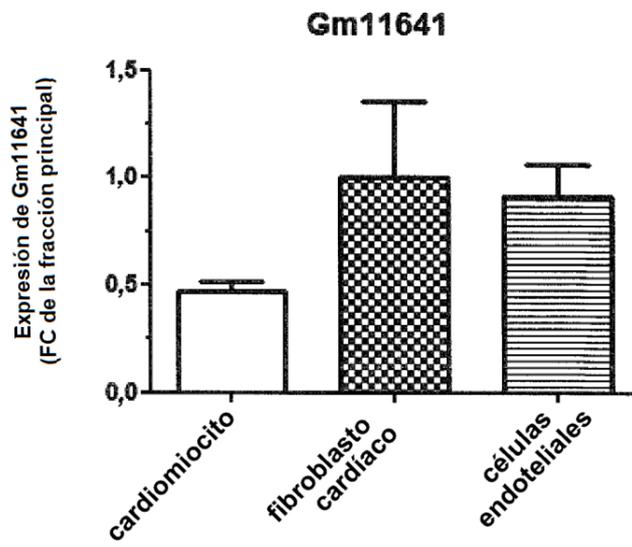


Figura 5

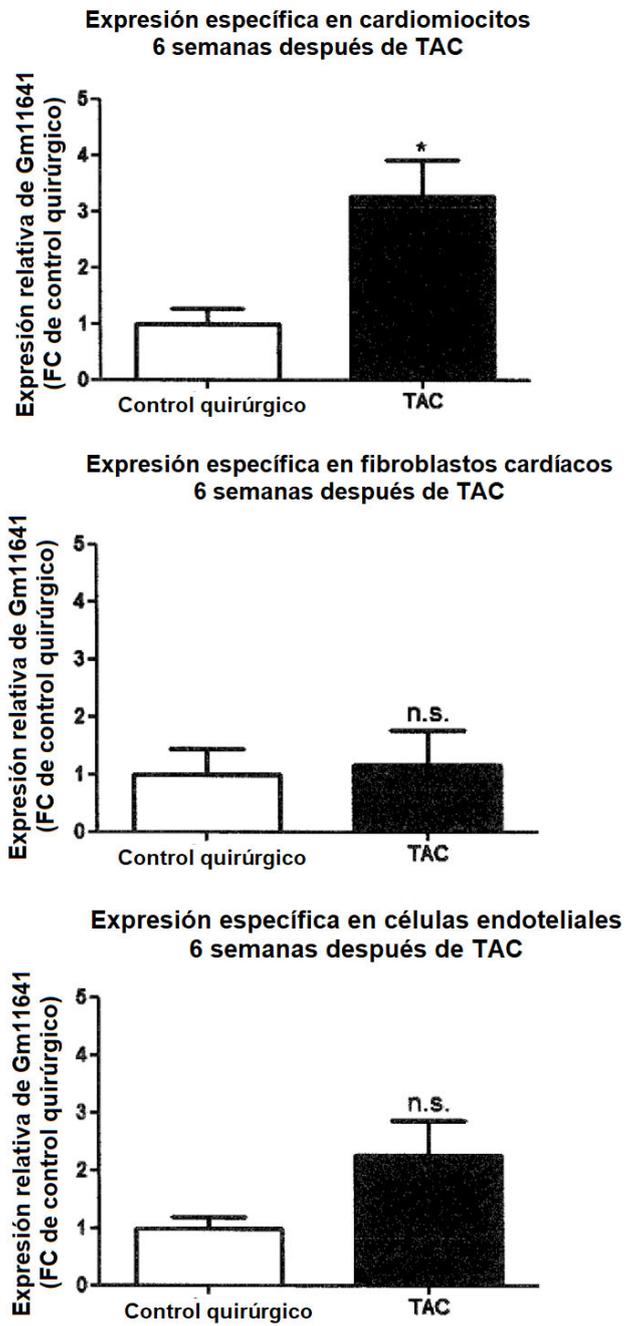


Figura 6

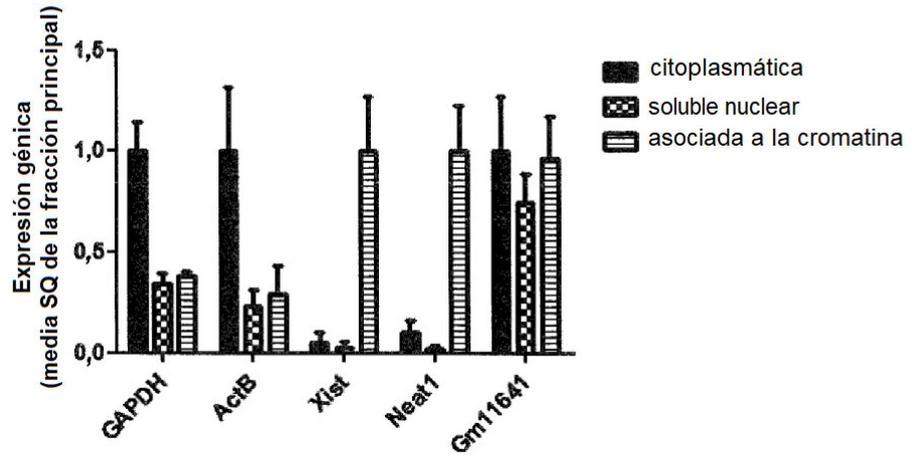


Figura 7

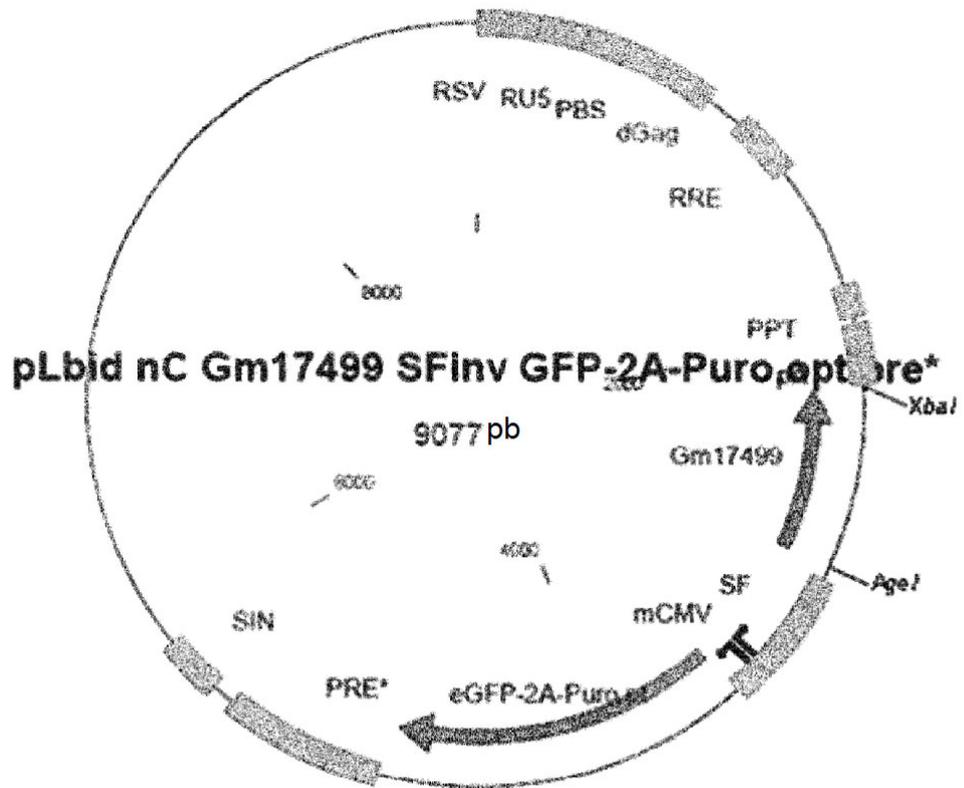


Figura 8

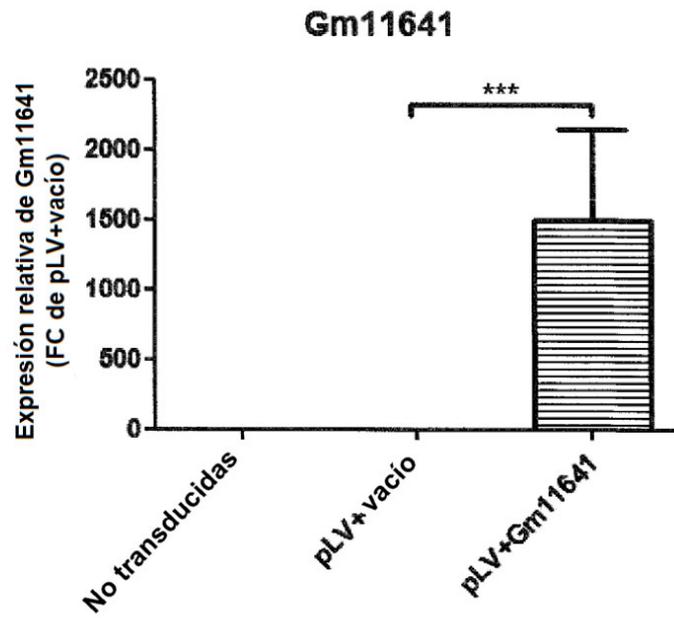


Figura 9

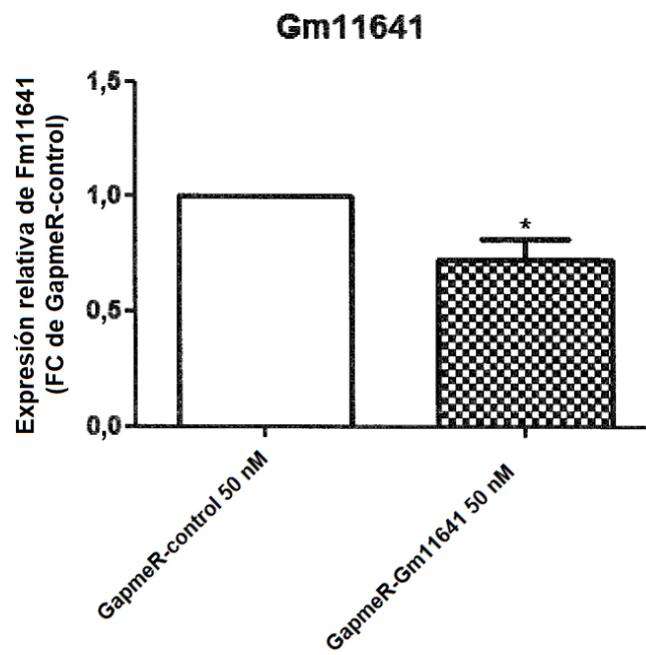


Figura 10

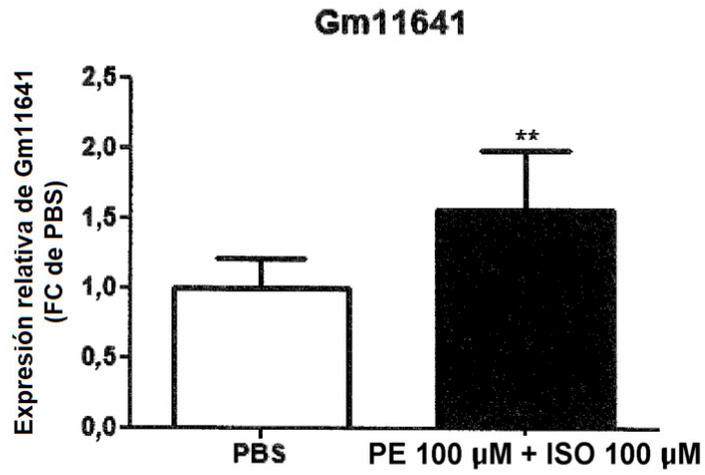


Figura 11

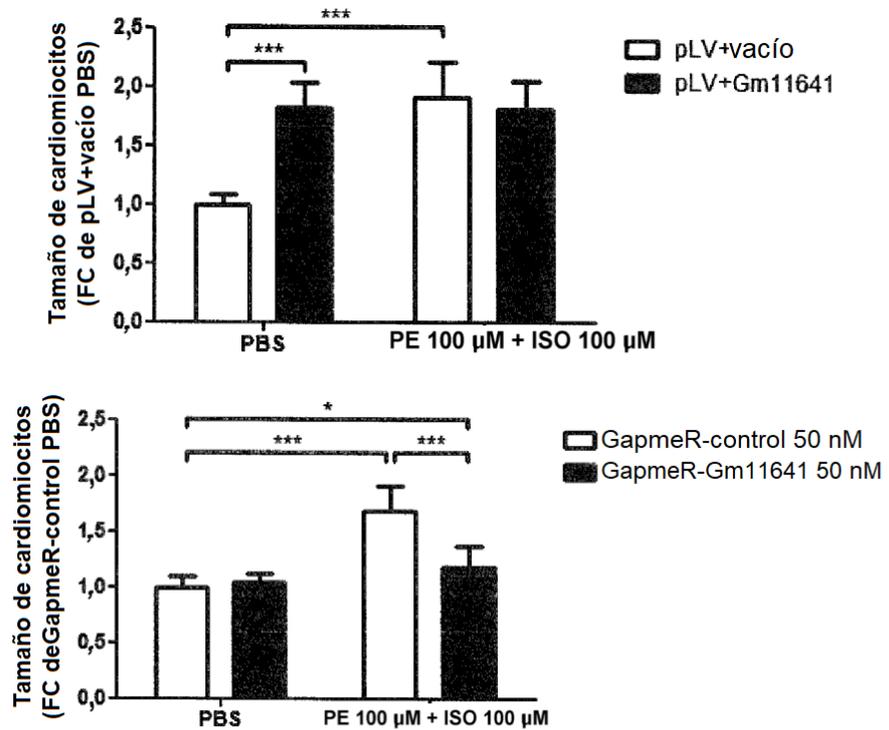


Figura 12

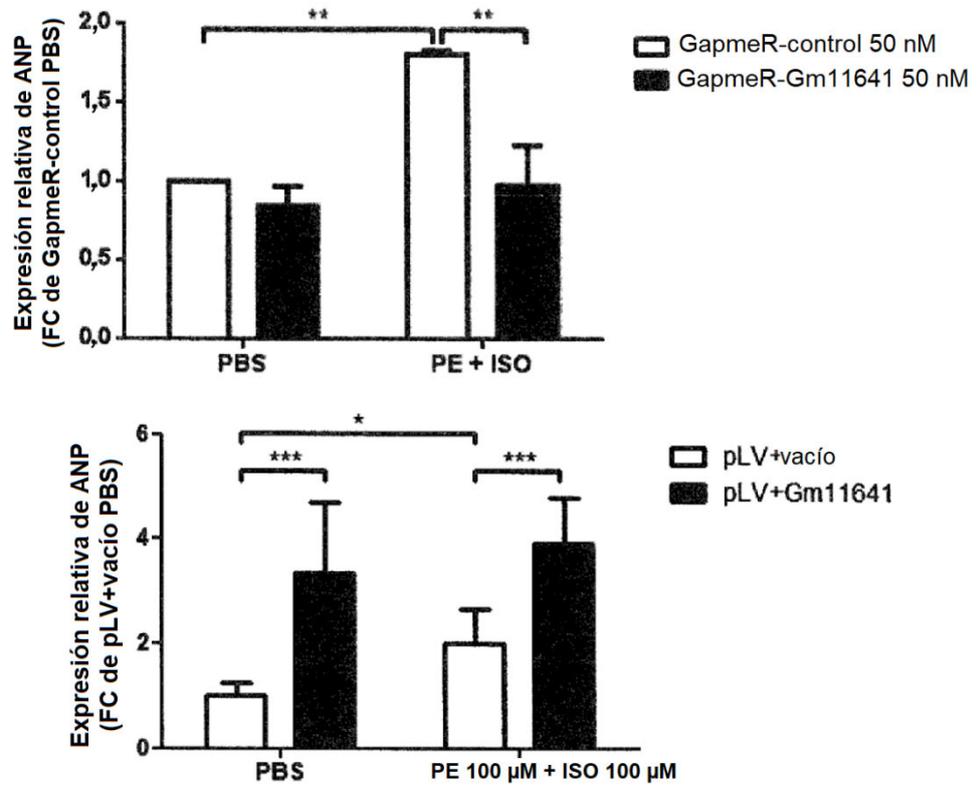


Figura 13 A

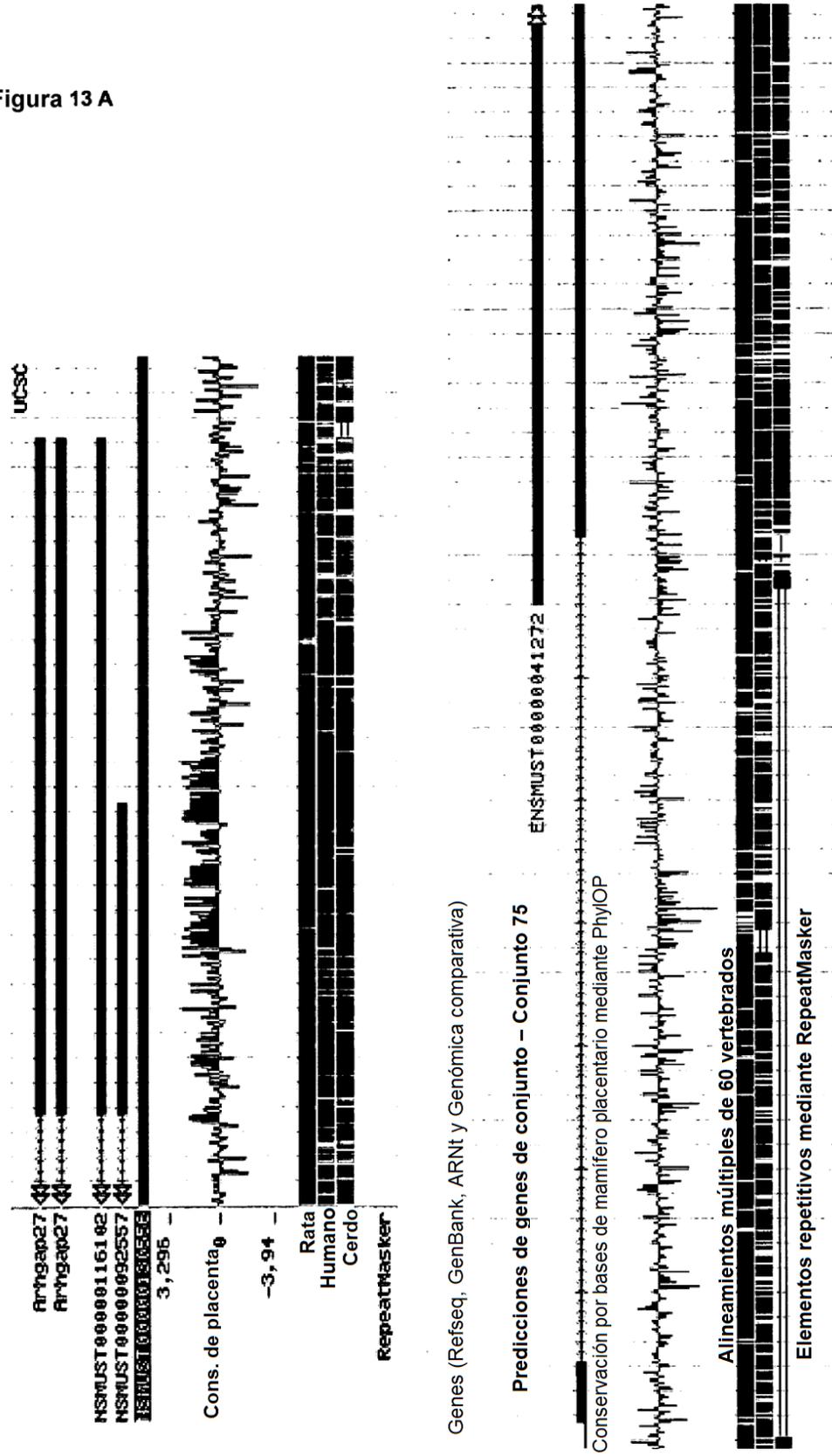


Figura 13 continuación

B

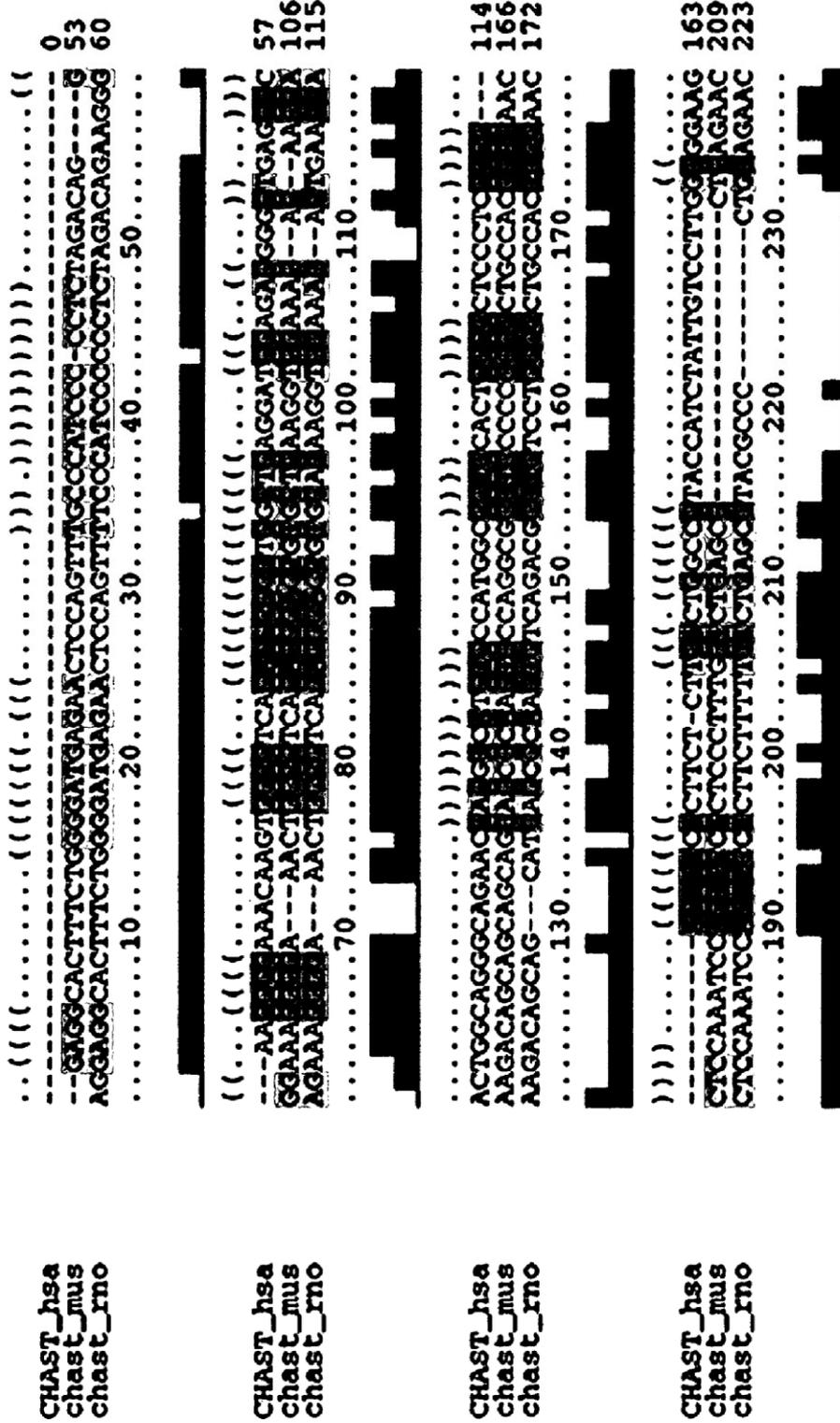


Figura 13 continuación

B

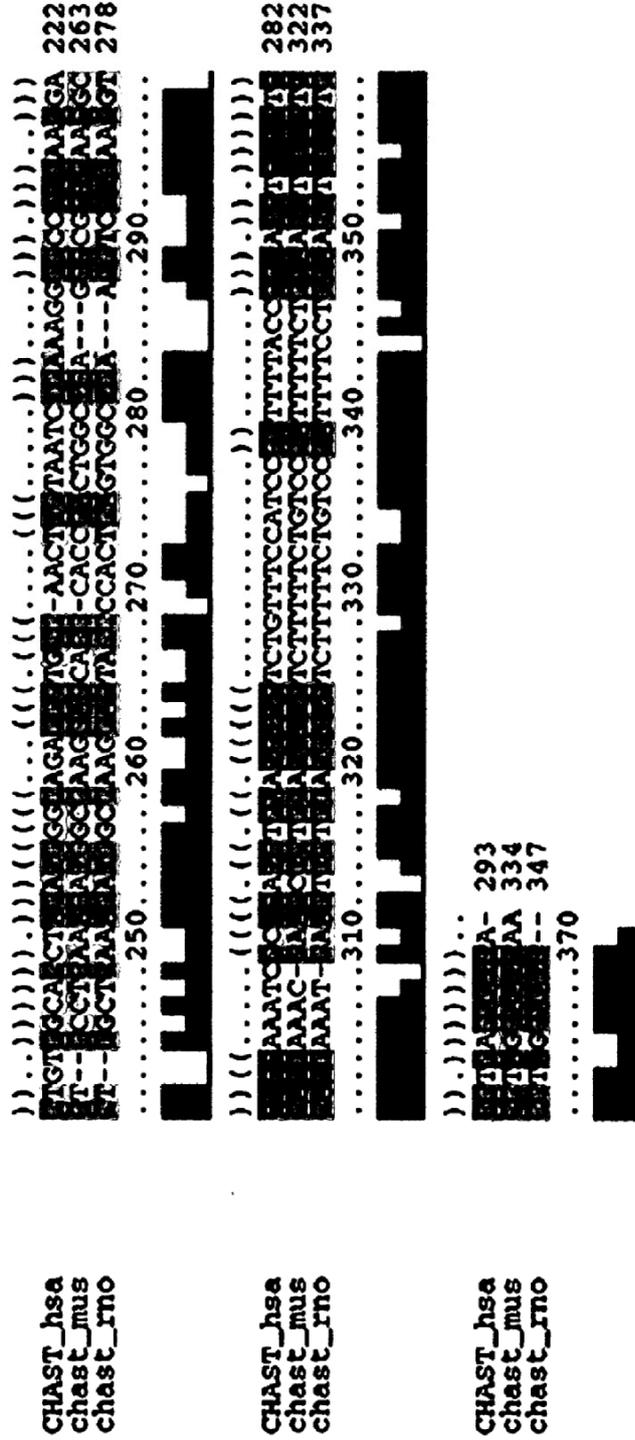


Figura 13 continuación

B

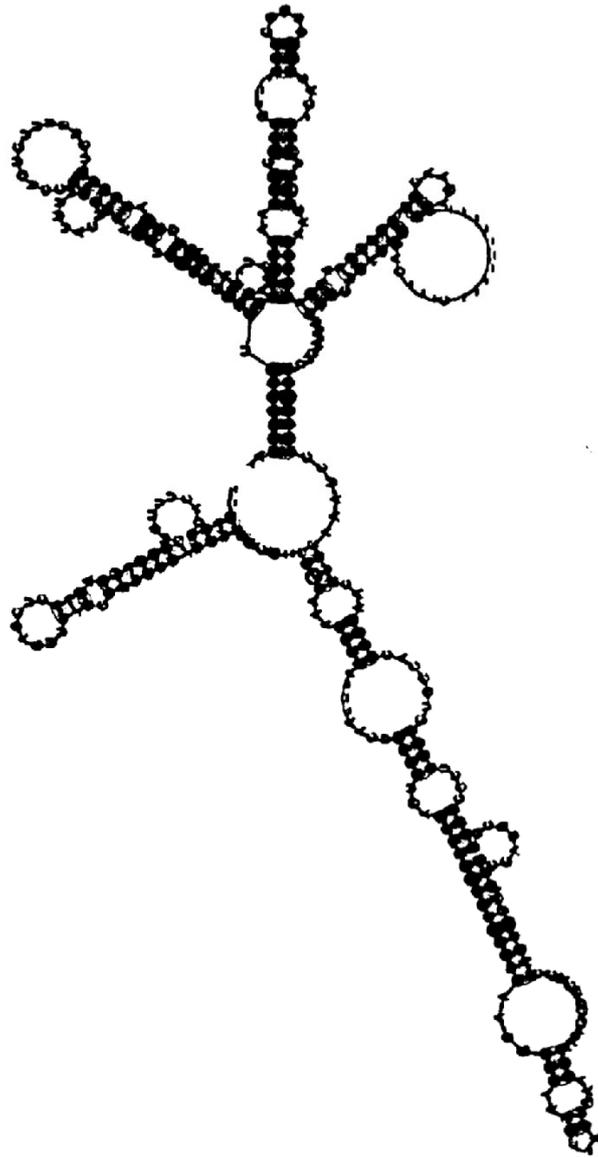


Figura 13 continuación

B

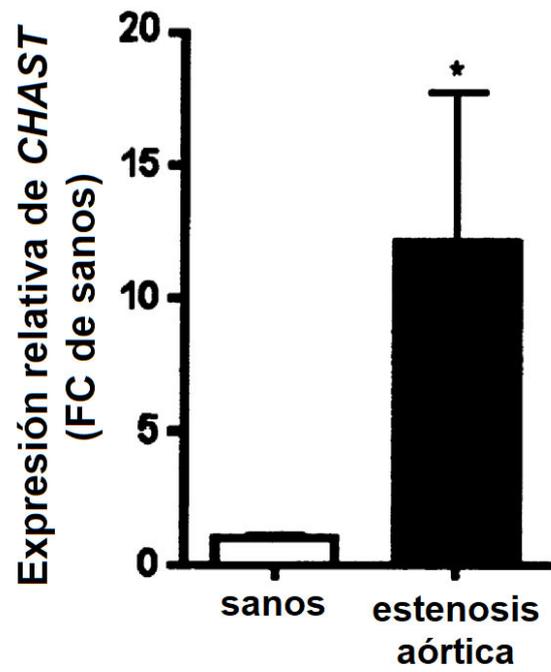
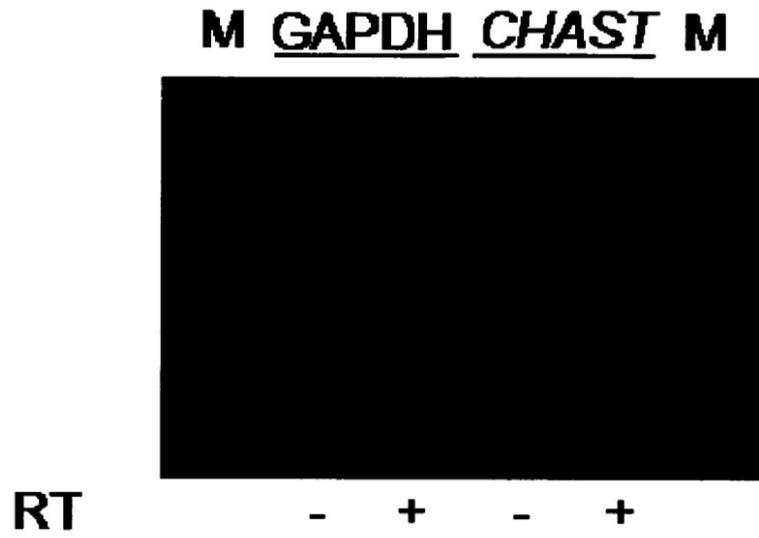


Figura 14

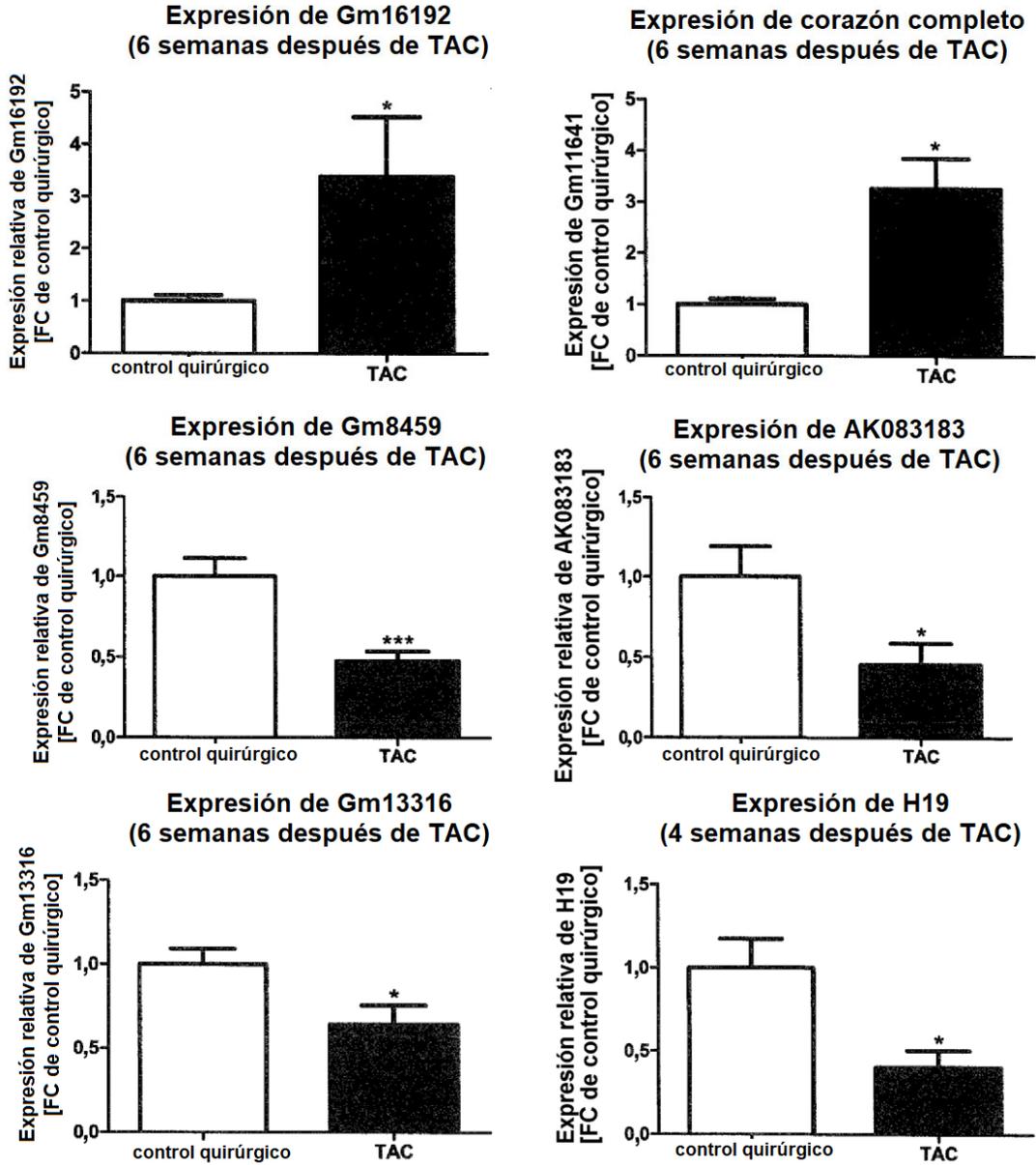


Figura 15

A

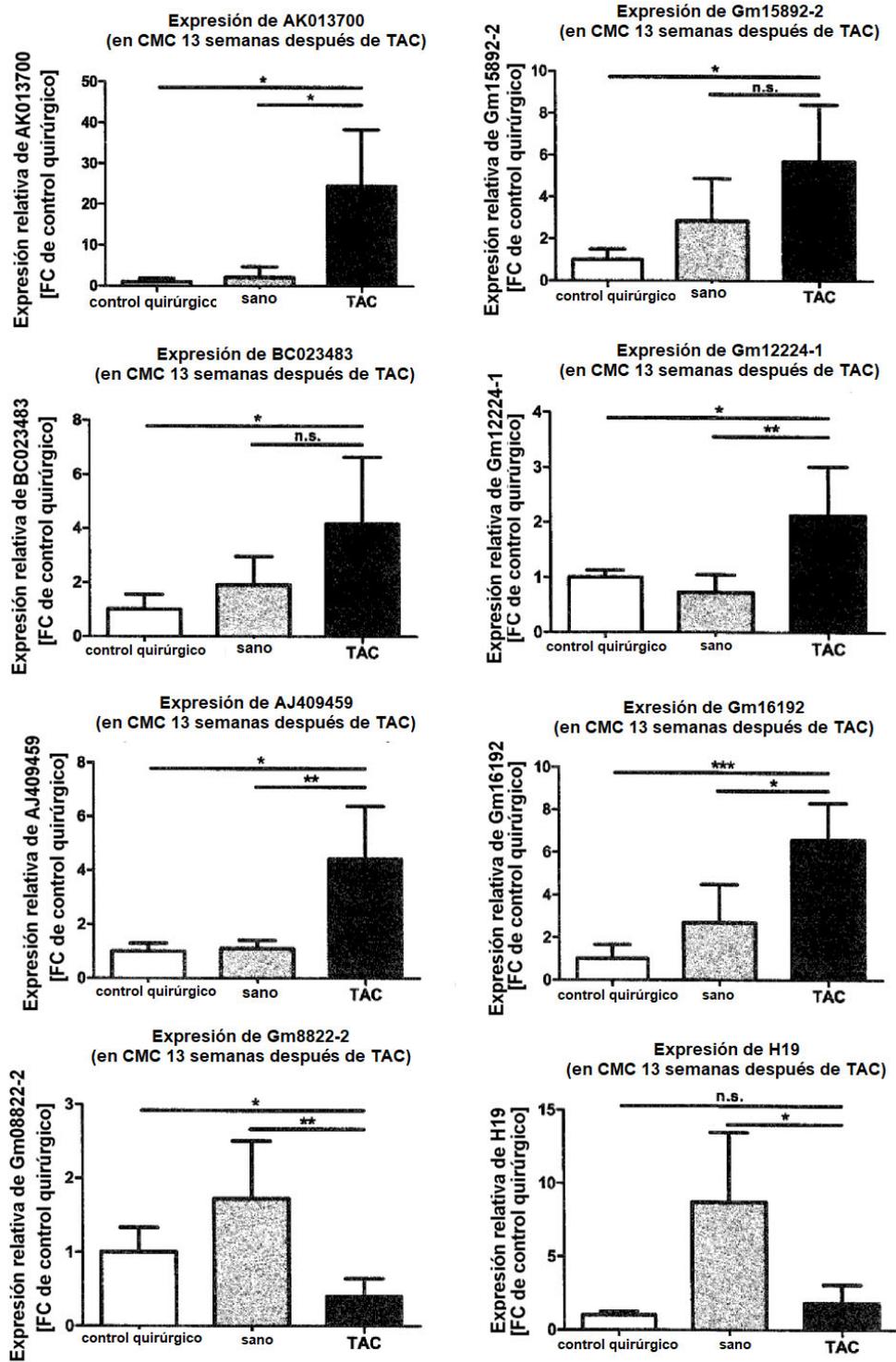
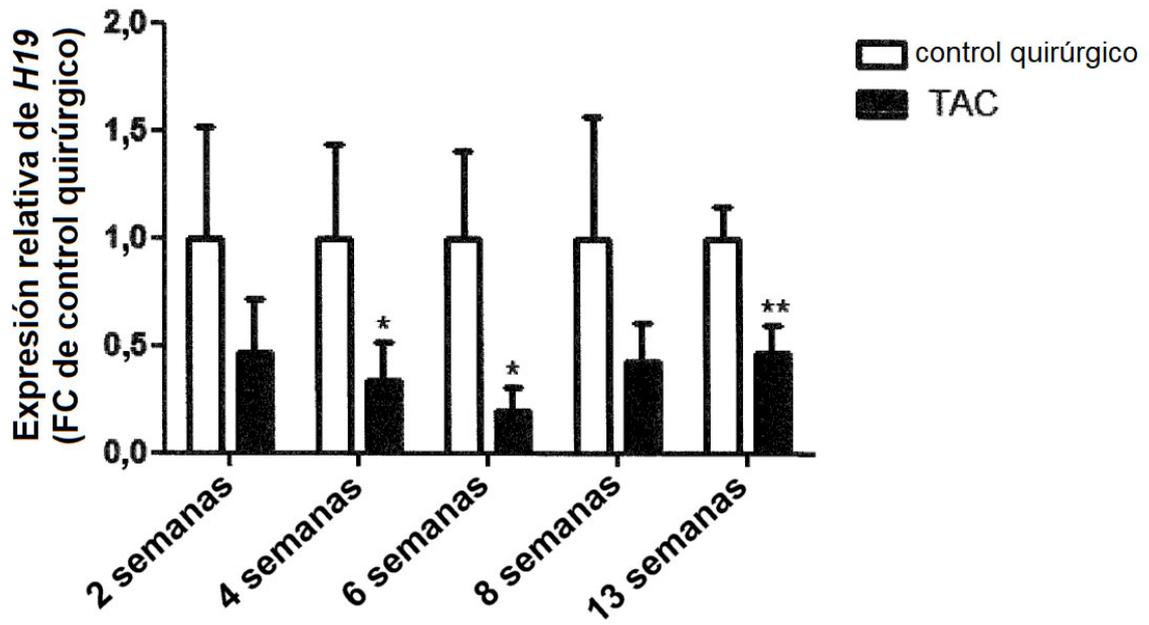


Figura 15 continuación

B



C

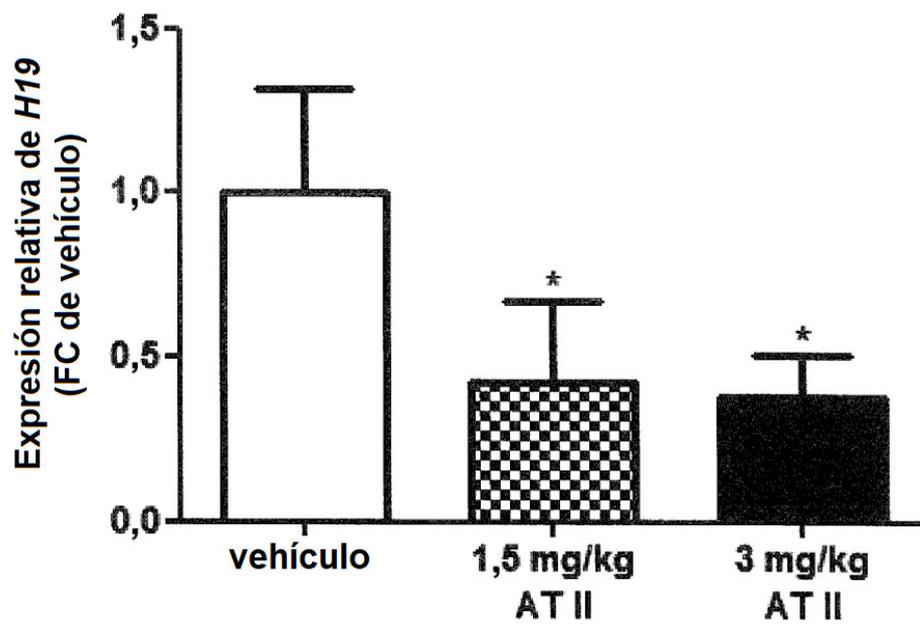


Figura 16

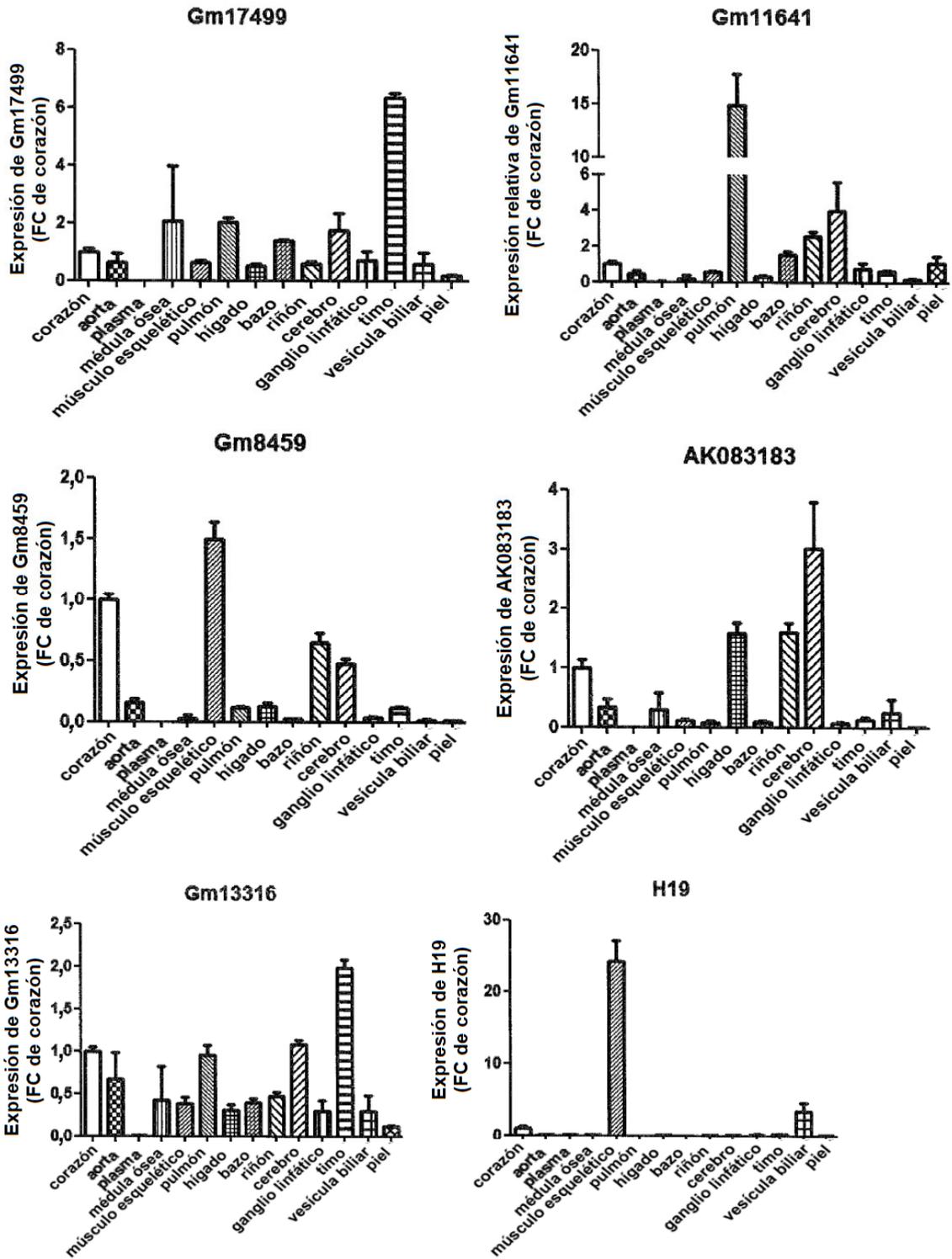


Figura 16 continuación

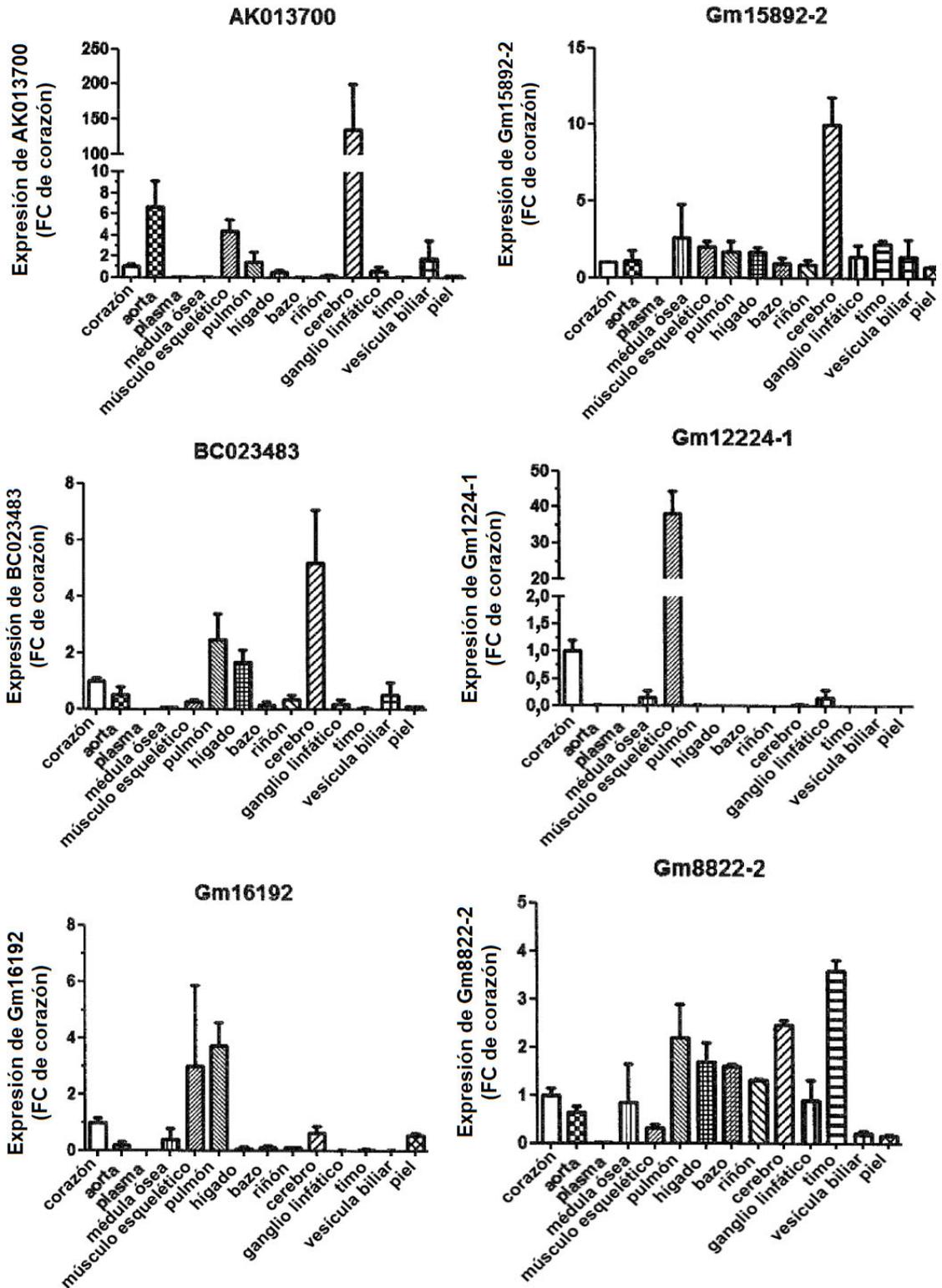


Figura 17

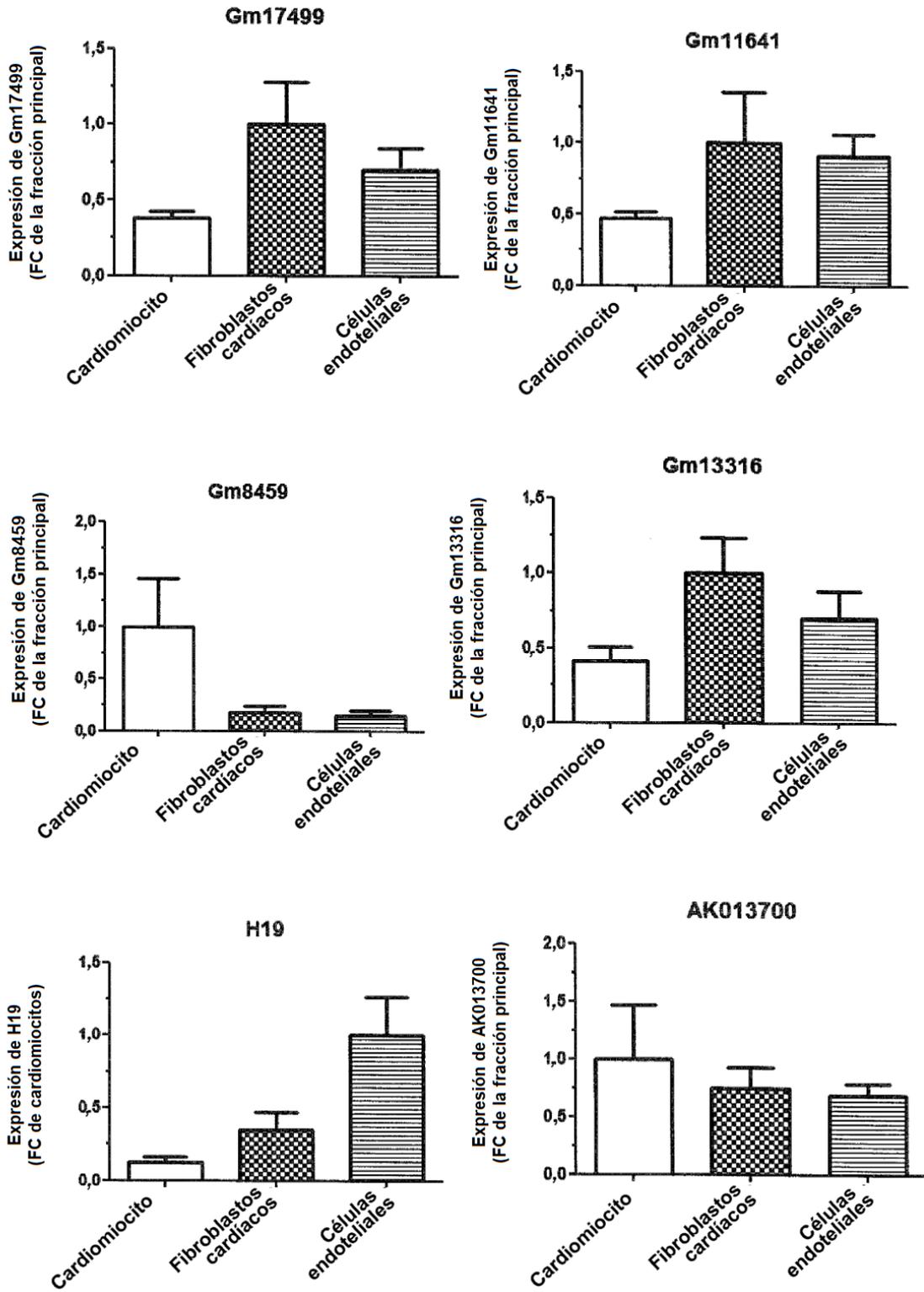


Figura 17 continuación

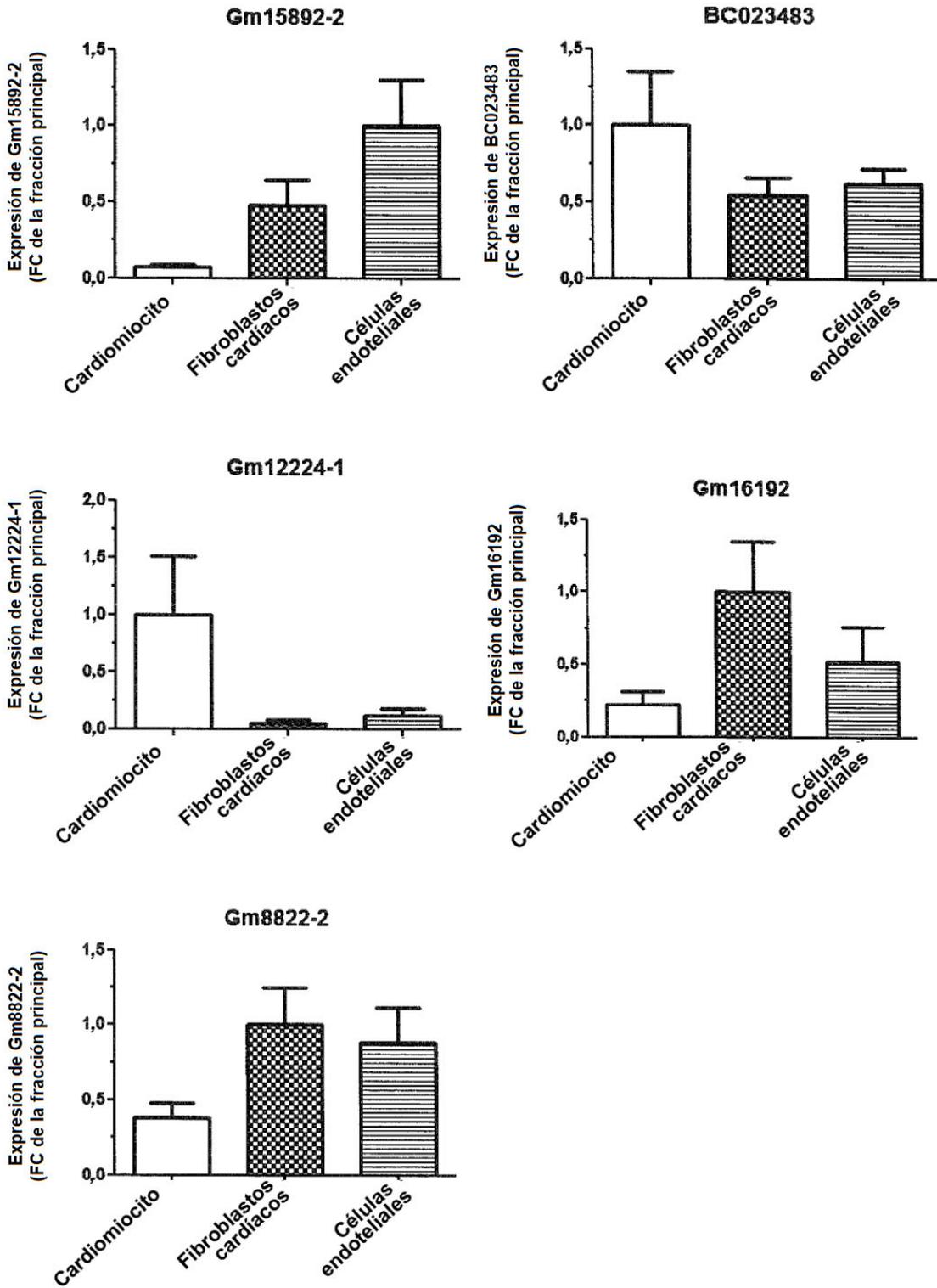


Figura 18

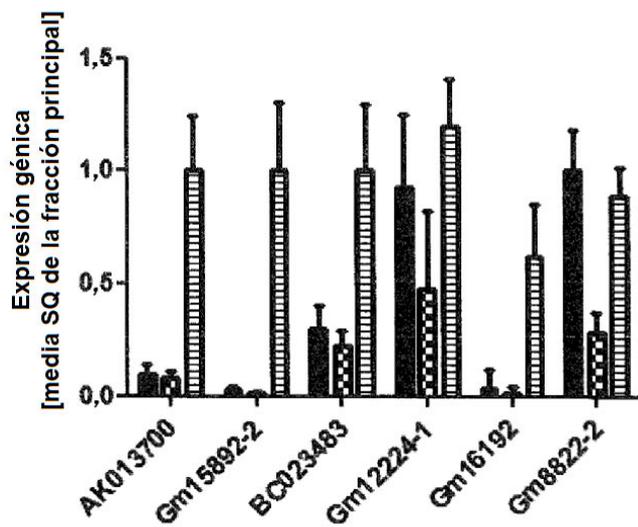
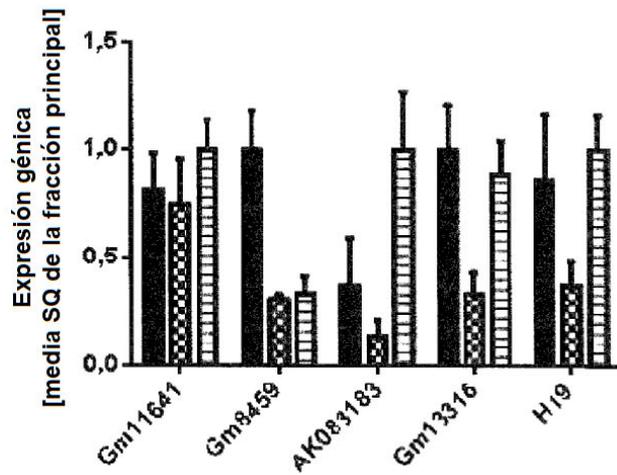
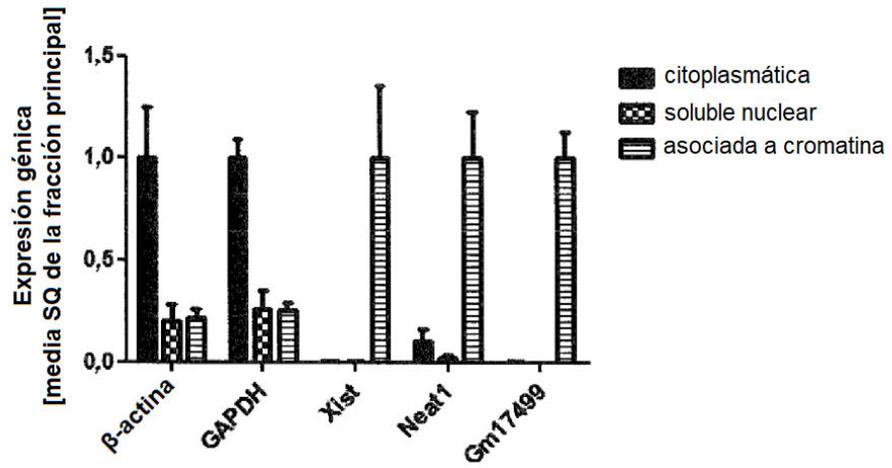


Figura 19

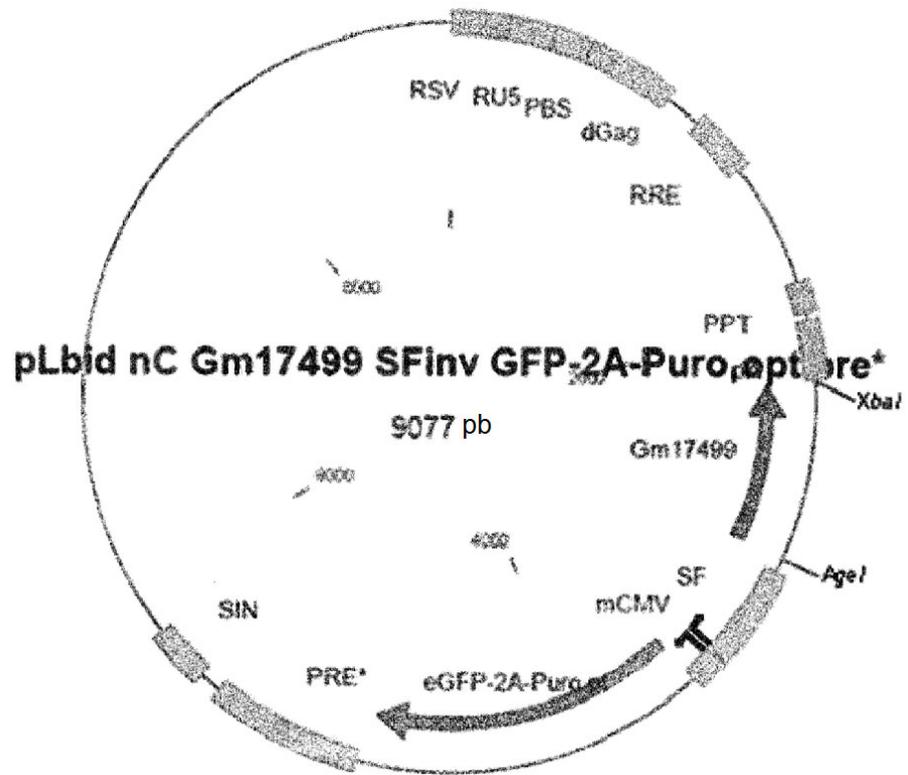


Figura 20

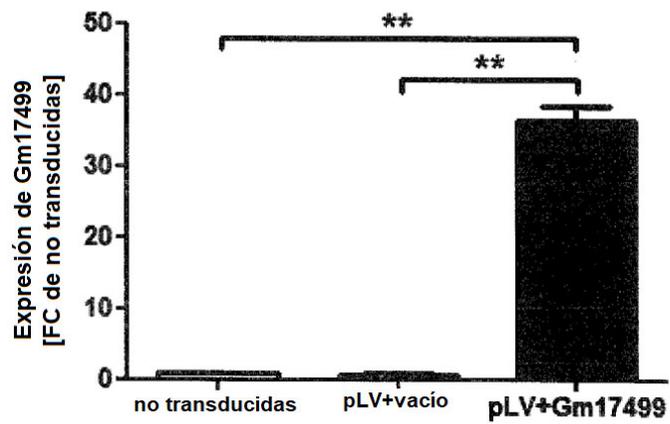


Figura 21

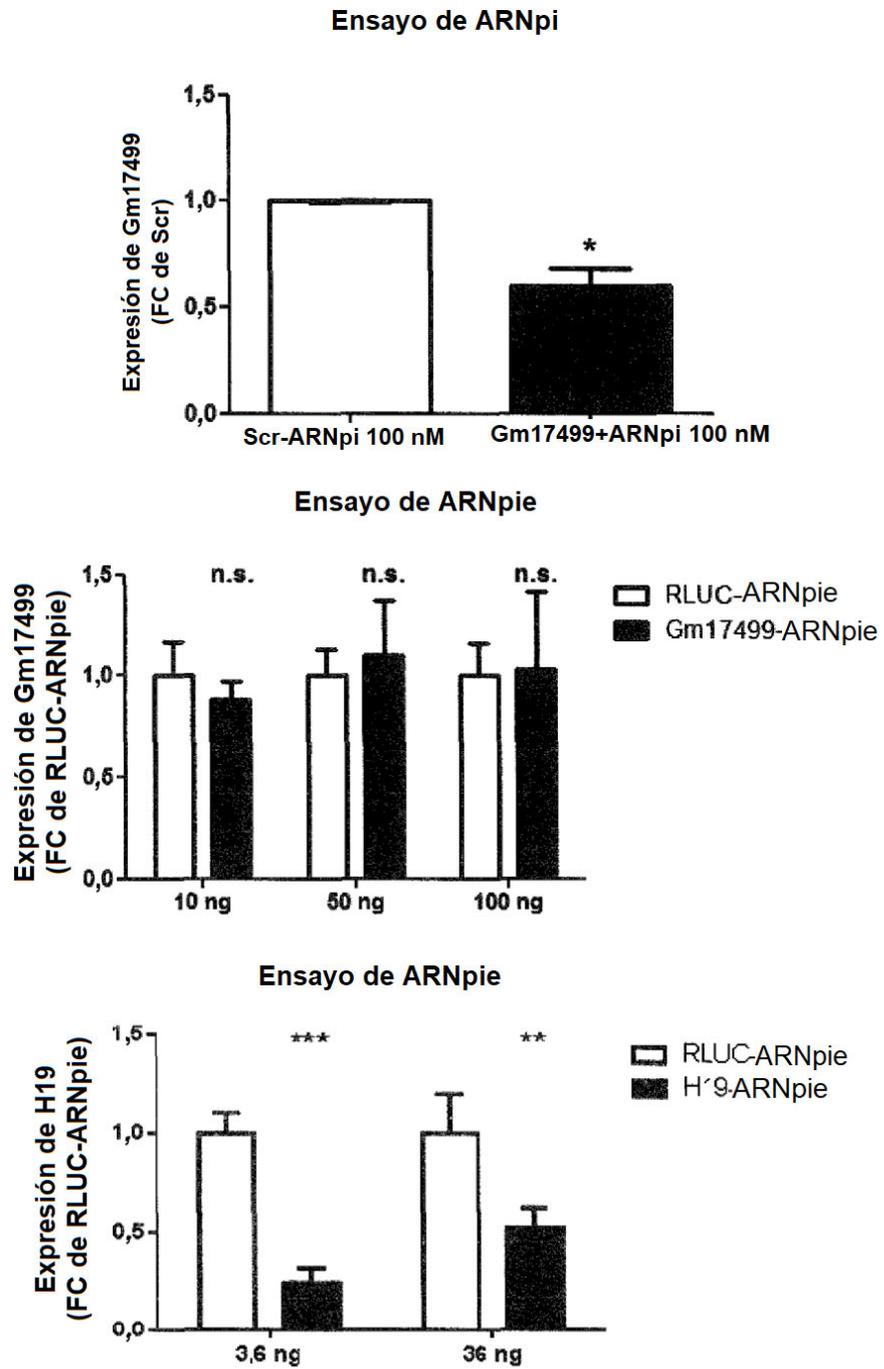


Figura 21 continuación

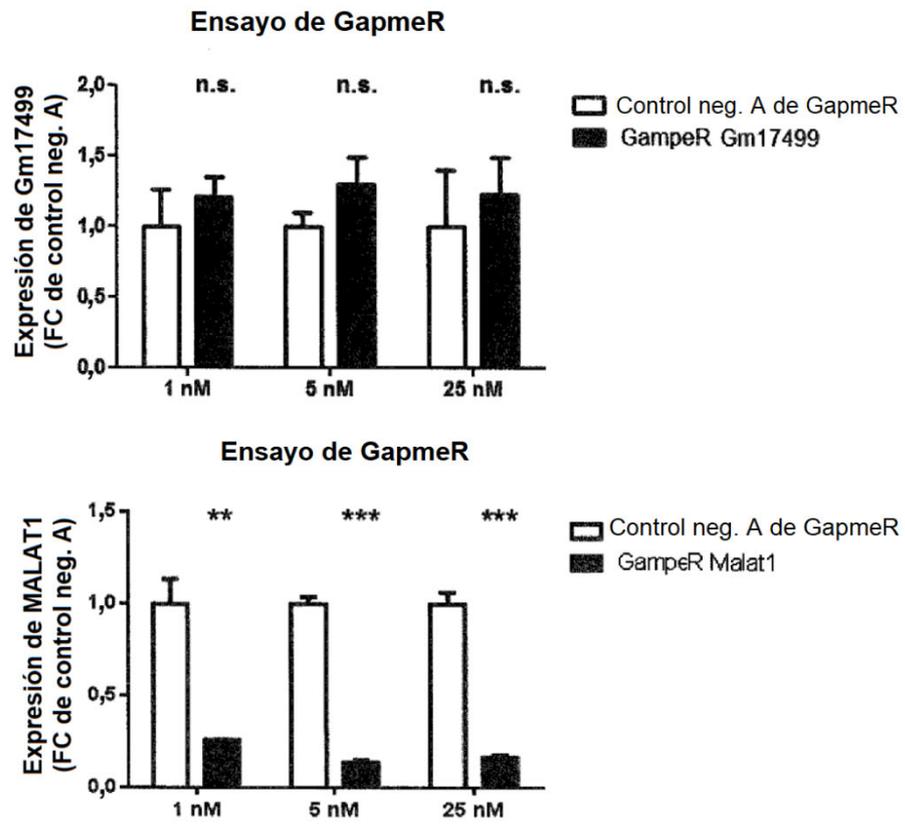


Figura 22

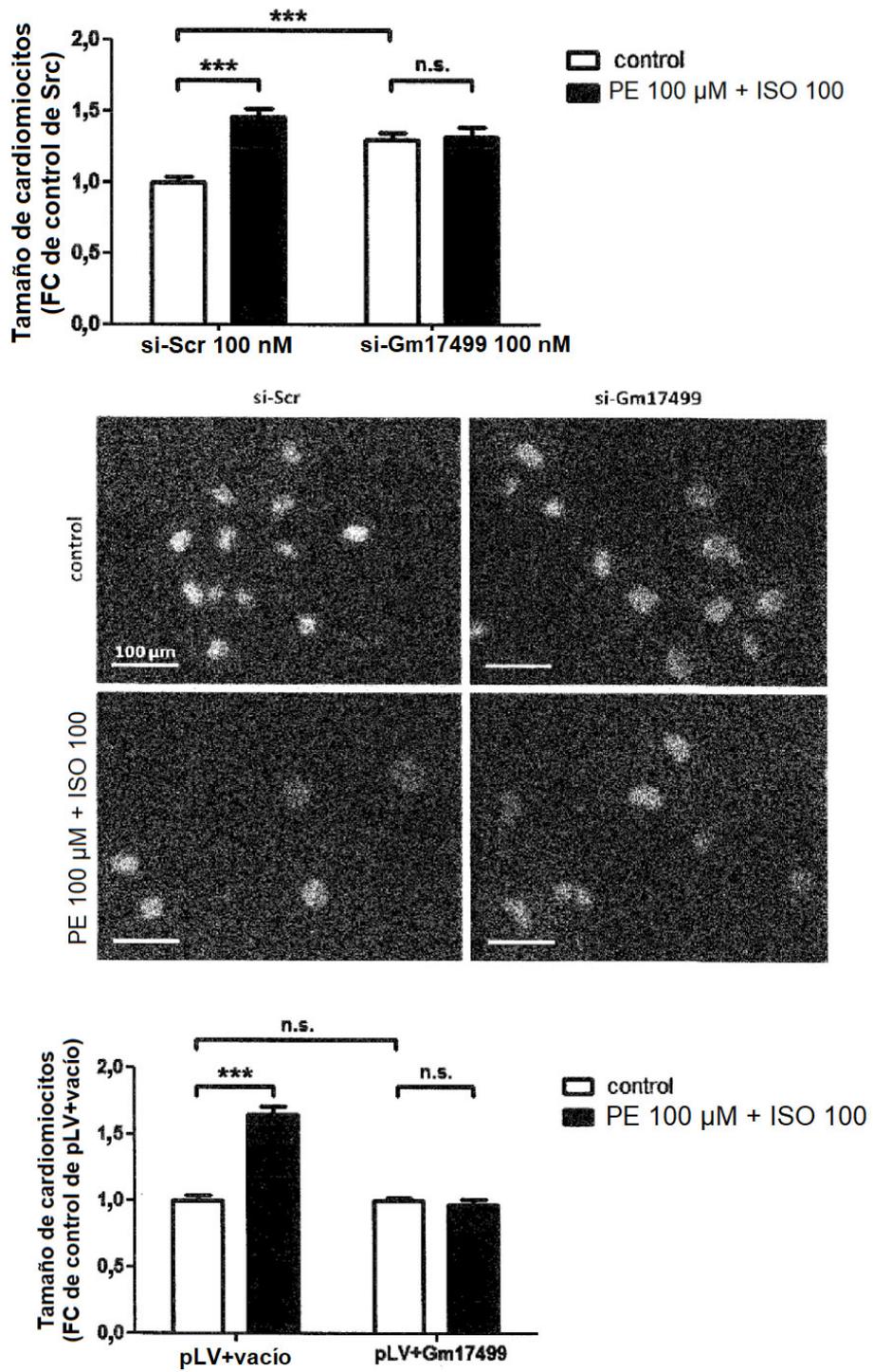


Figura 22 continuación

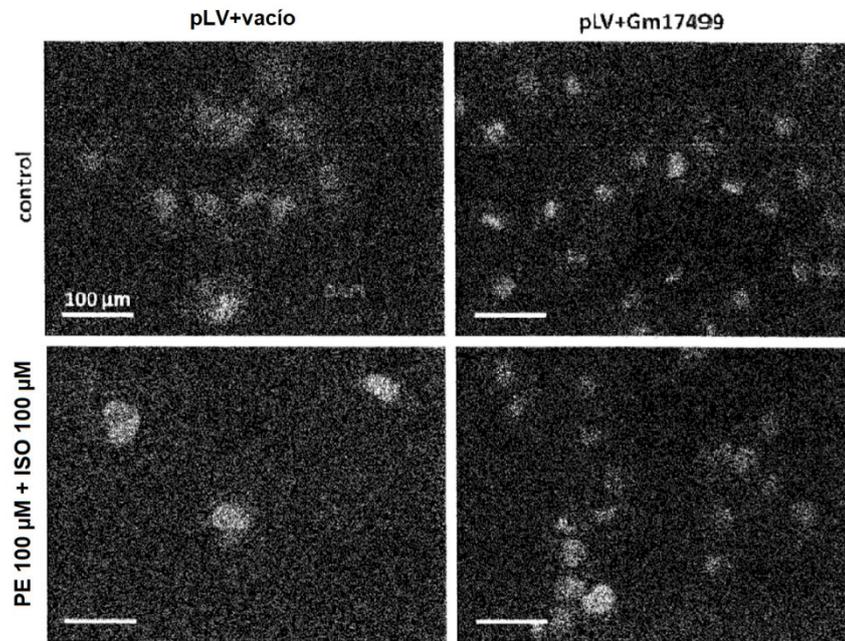


Figura 23

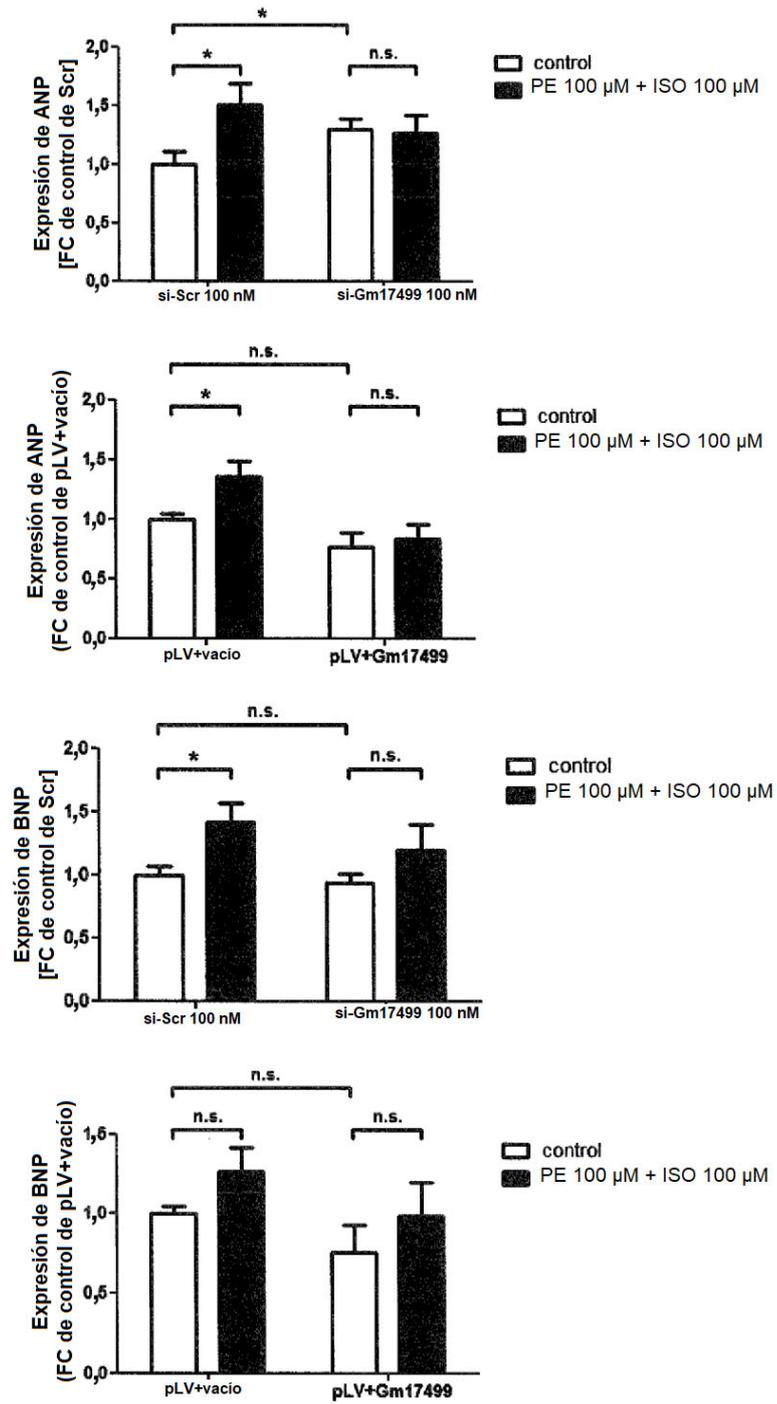


Figura 23 continuación

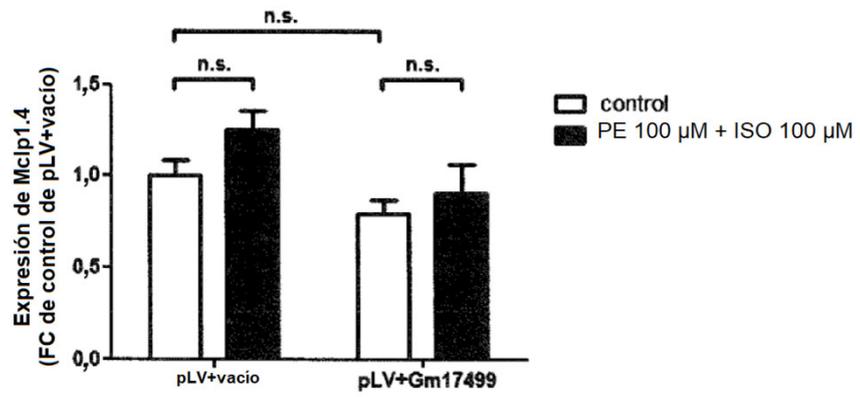
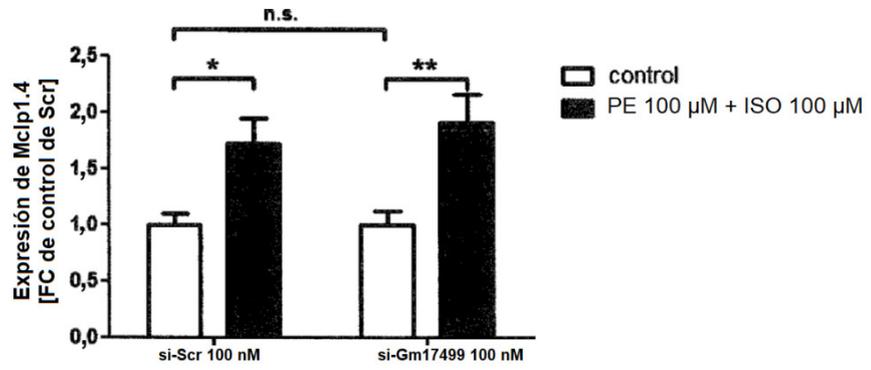
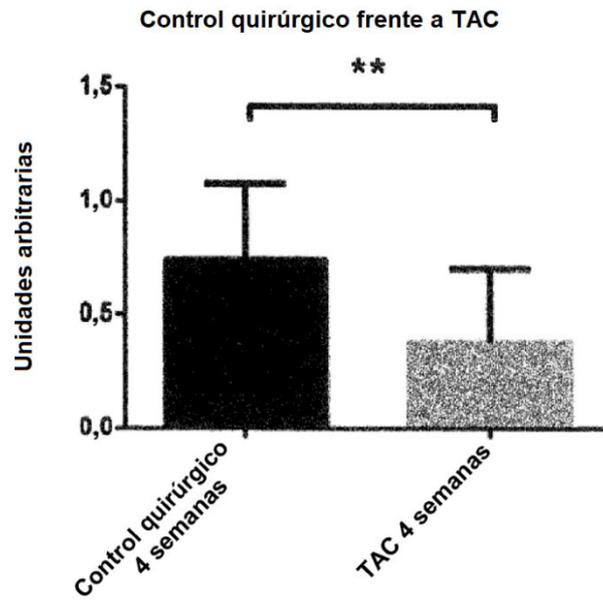


Figura 24

A



B

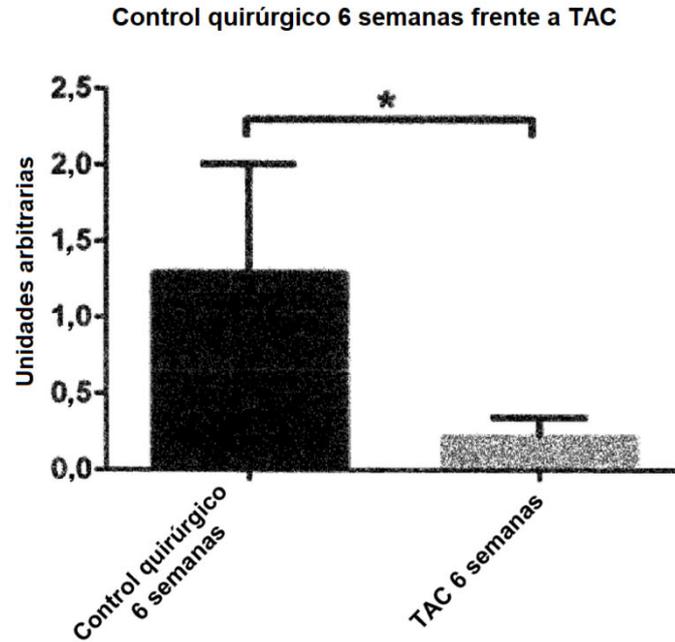


Figura 25

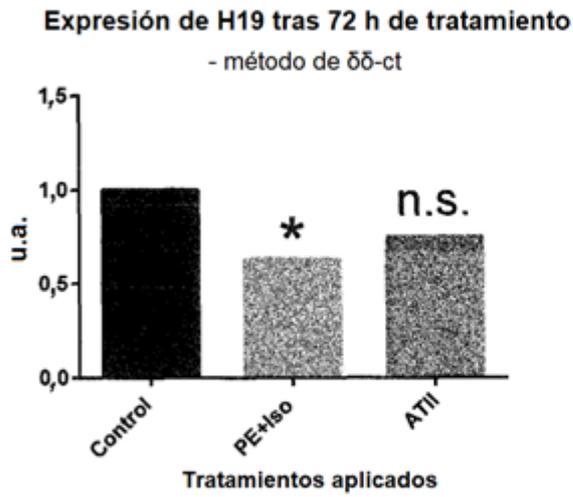


Figura 26

A

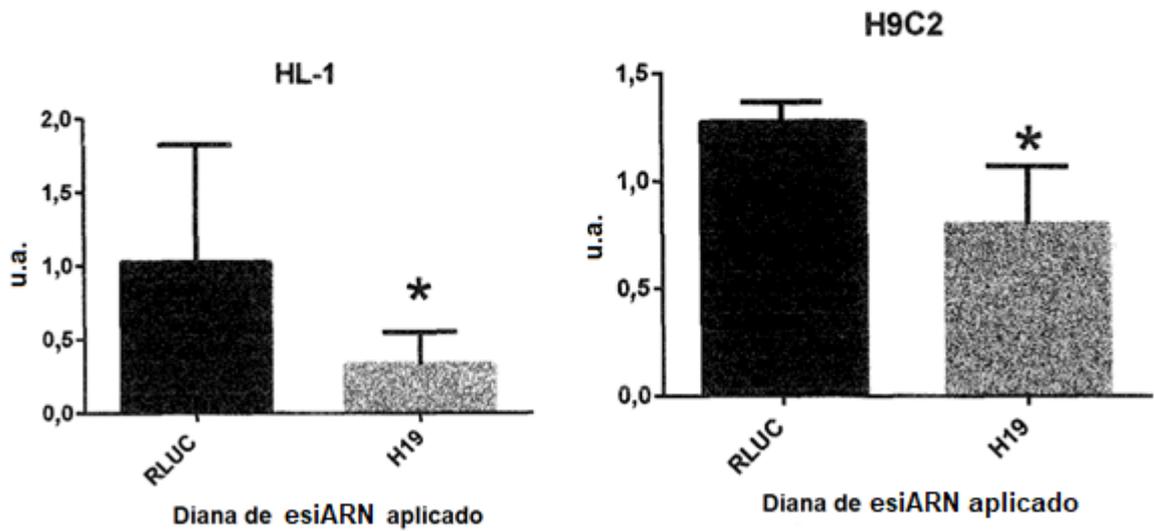
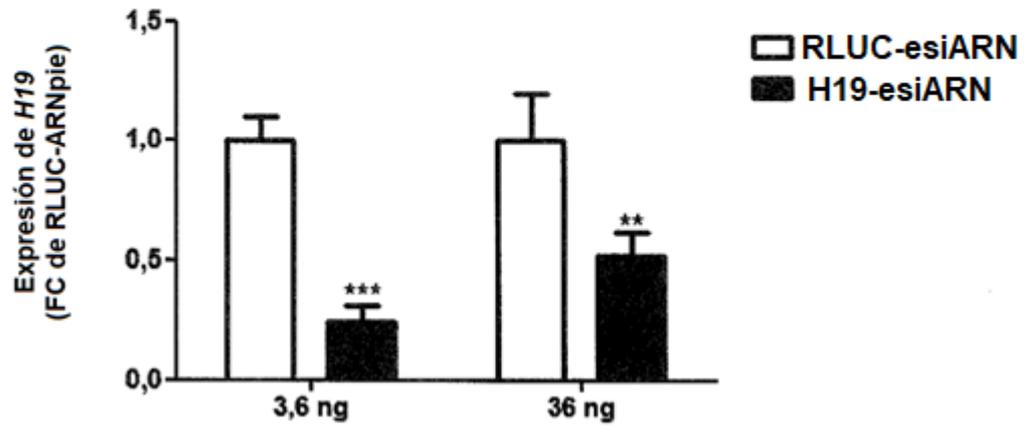


Figura 26 continuación

B



C

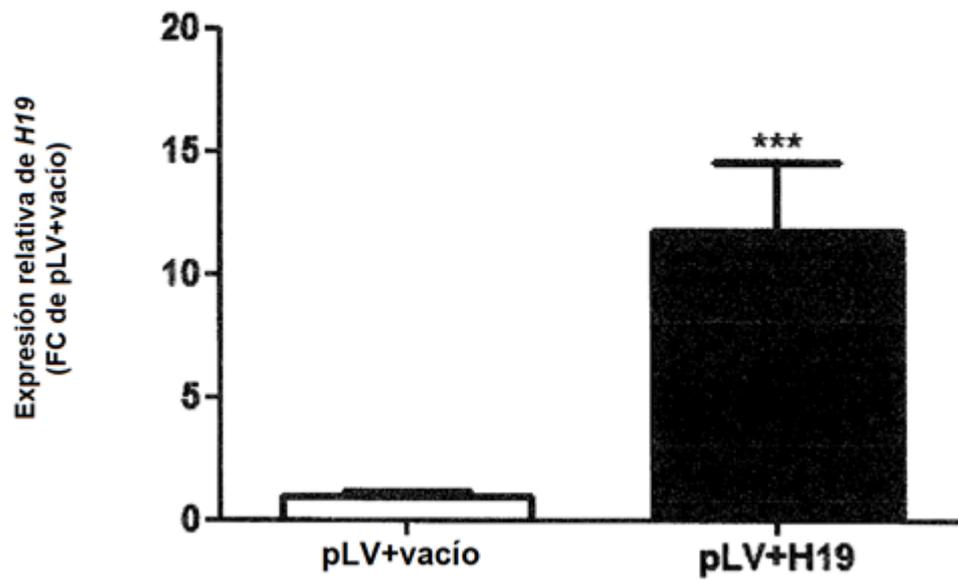


Figura 27

A

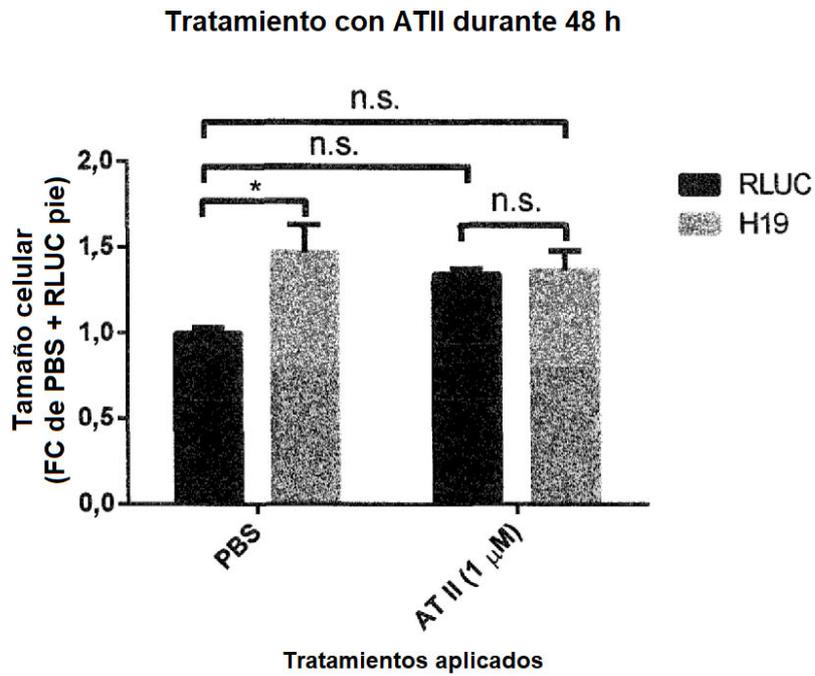
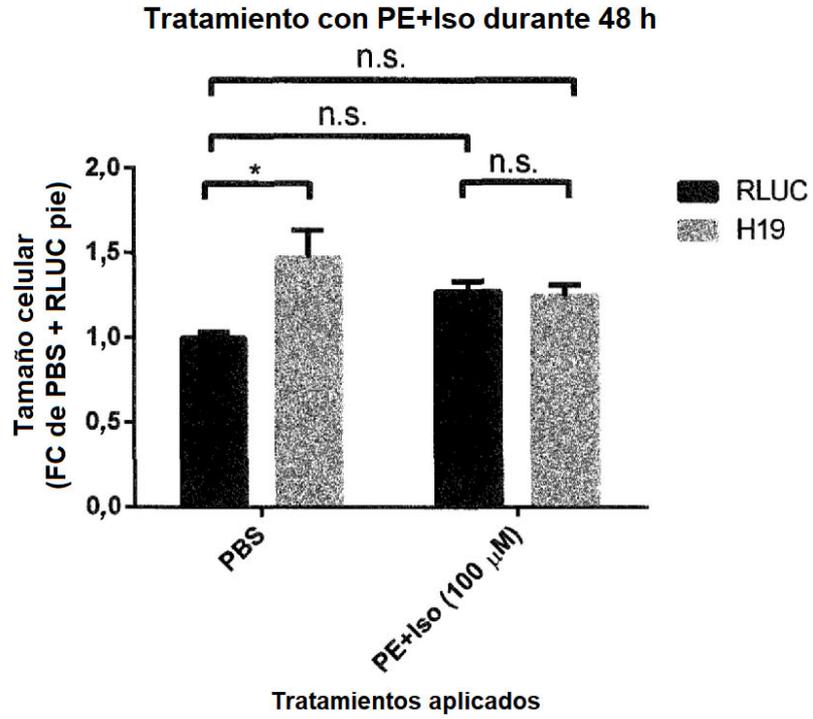


Figura 27 continuación

B

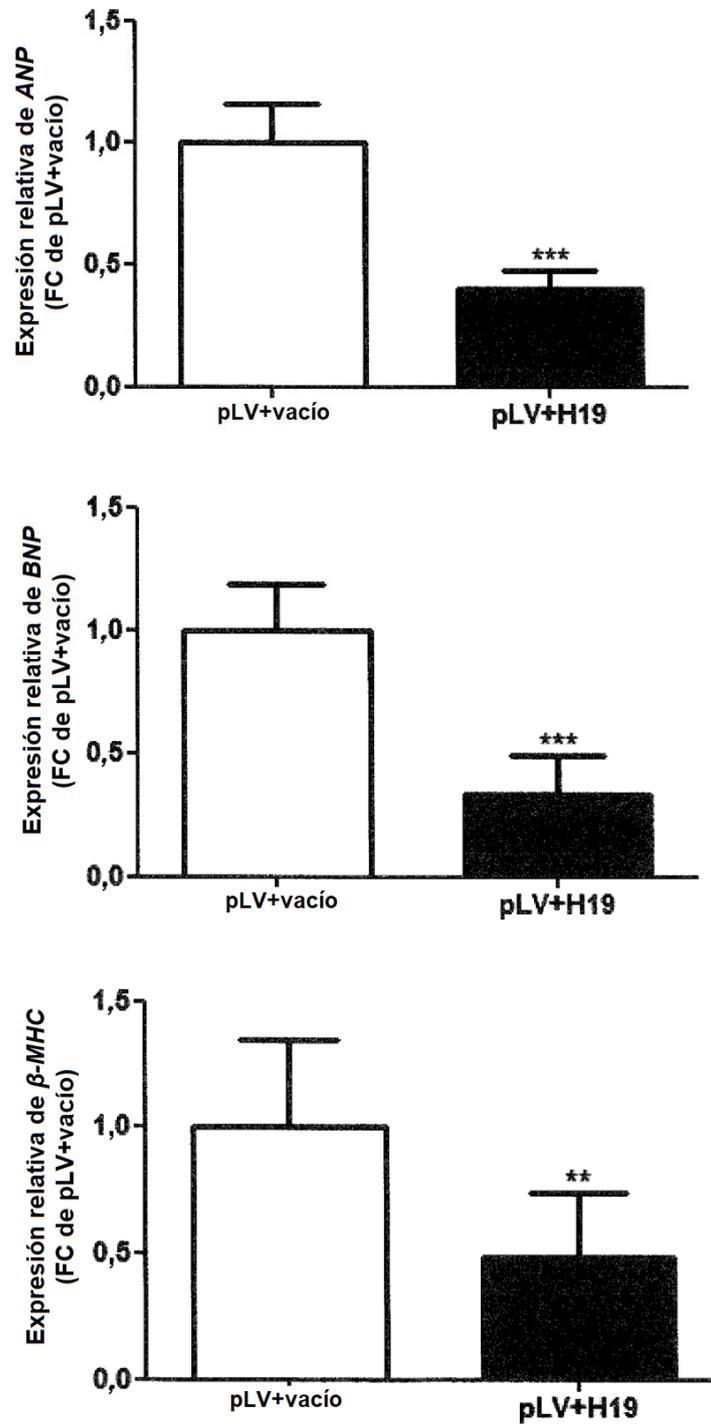


Figura 28

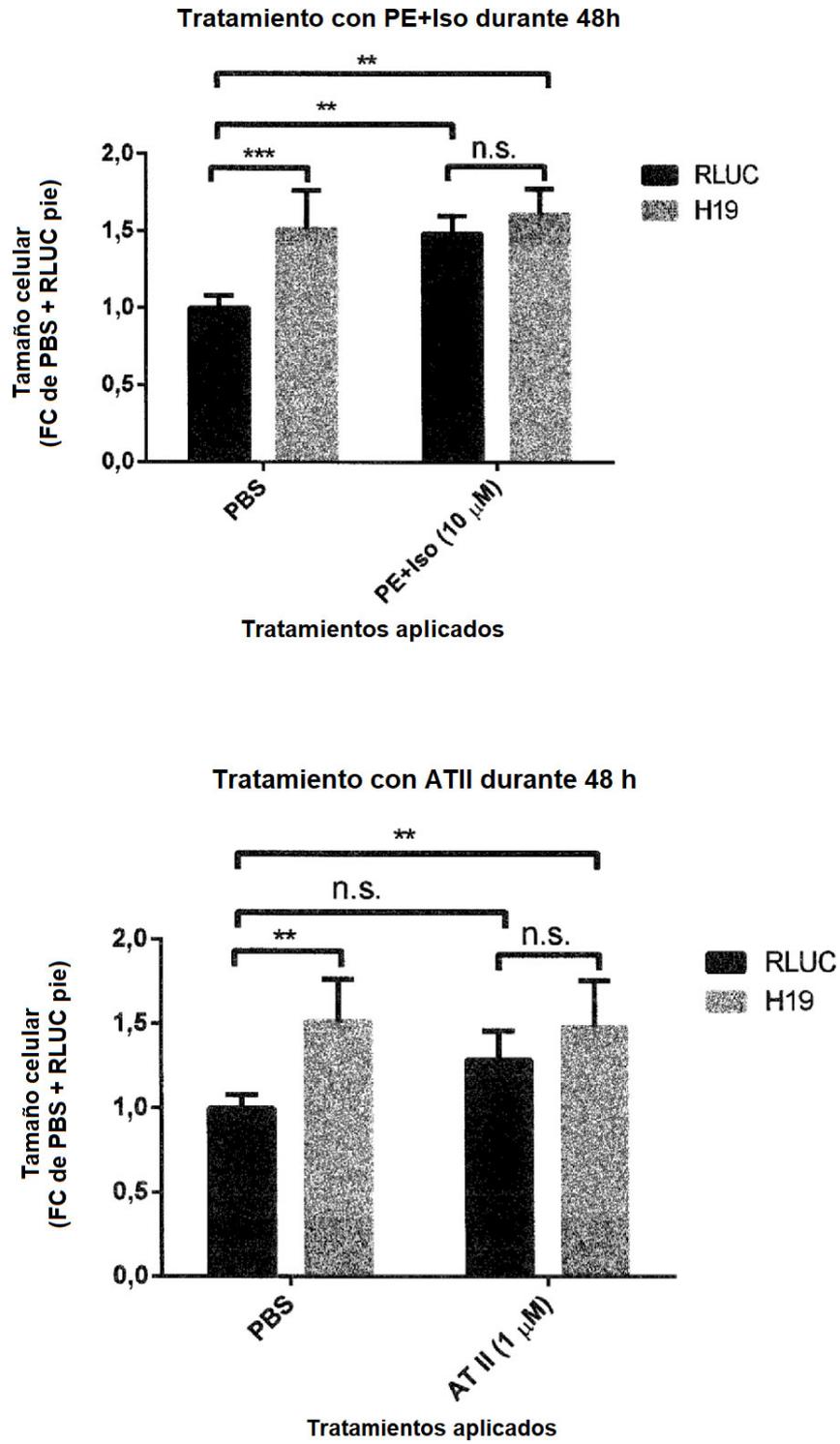


Figura 29

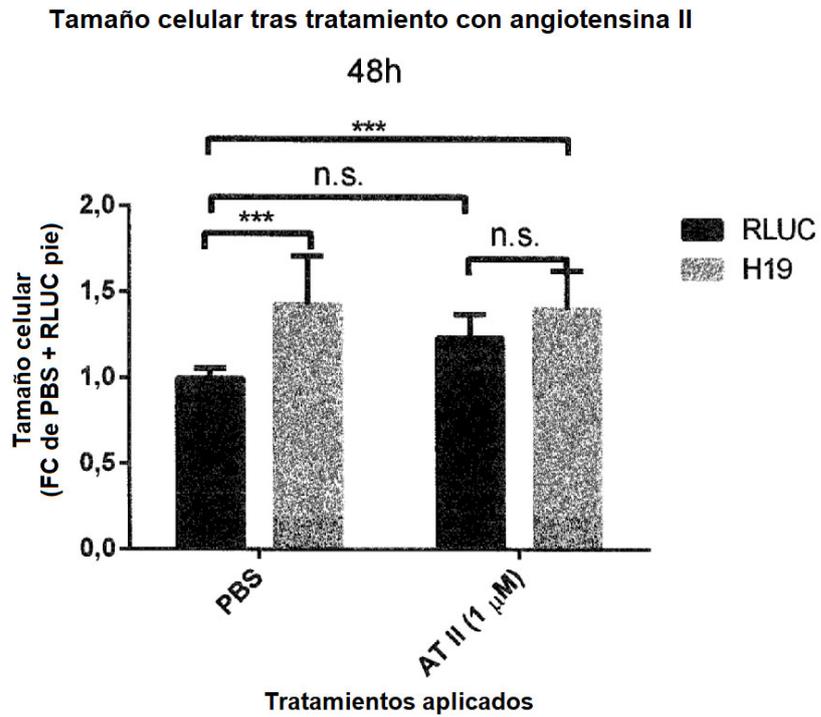
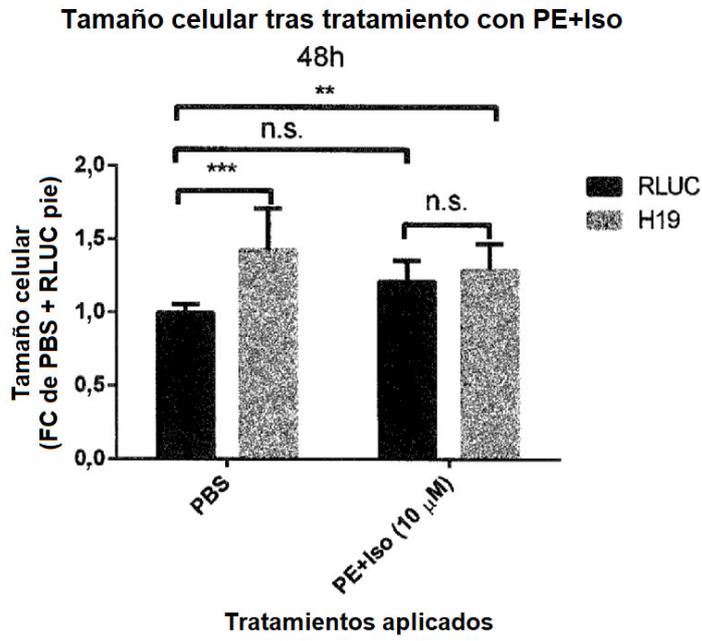


Figura 30

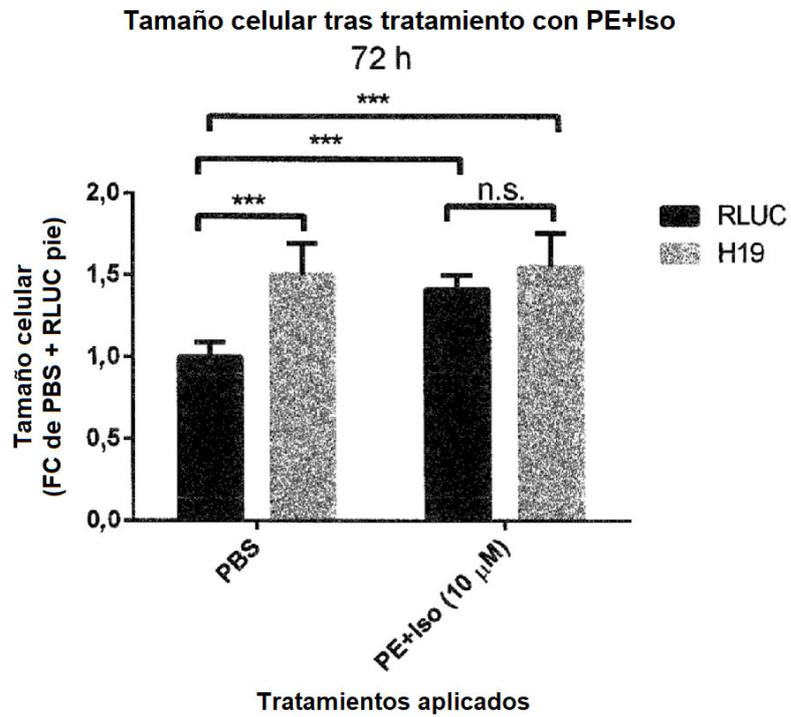
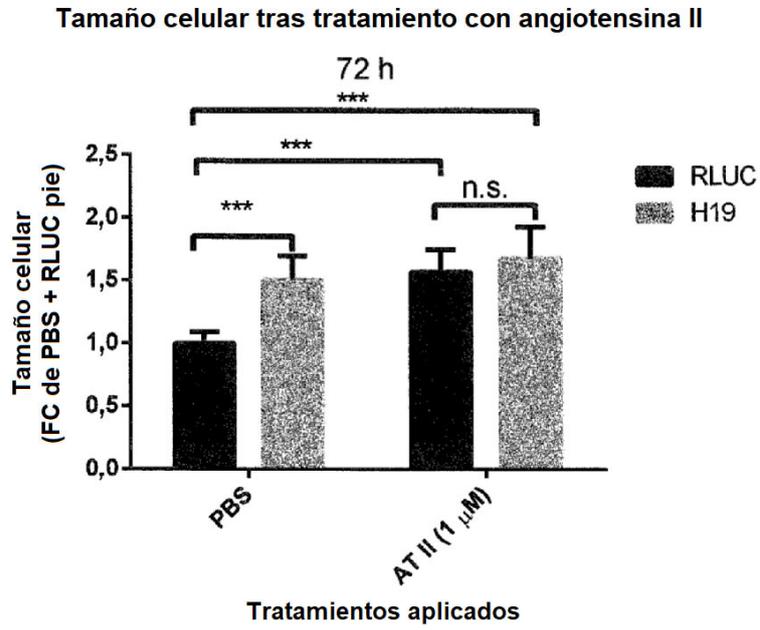


Figura 31

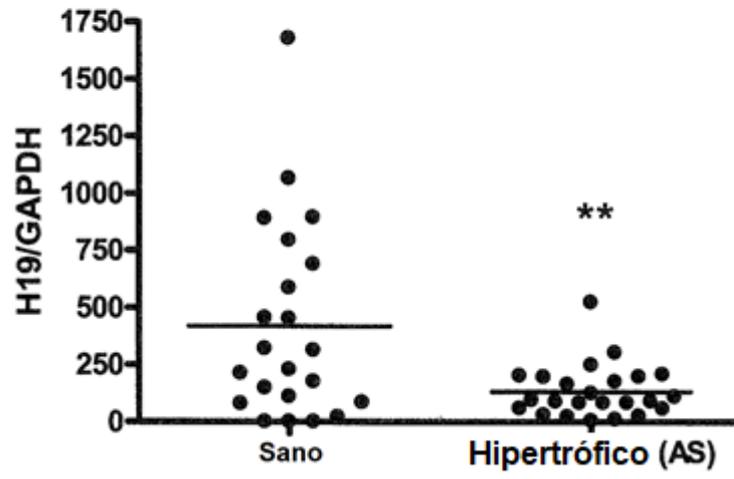


Figura 32

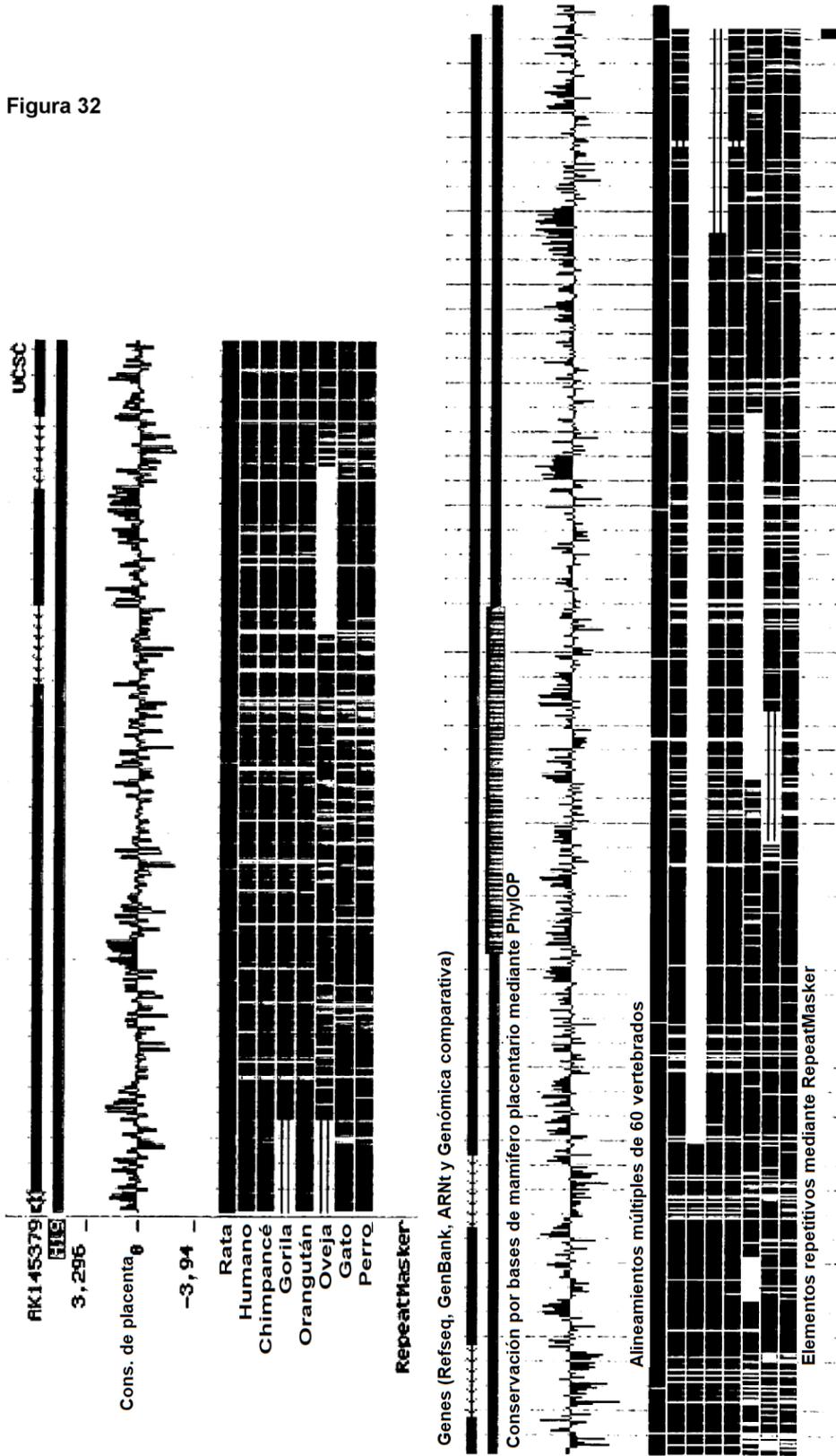


Figura 33

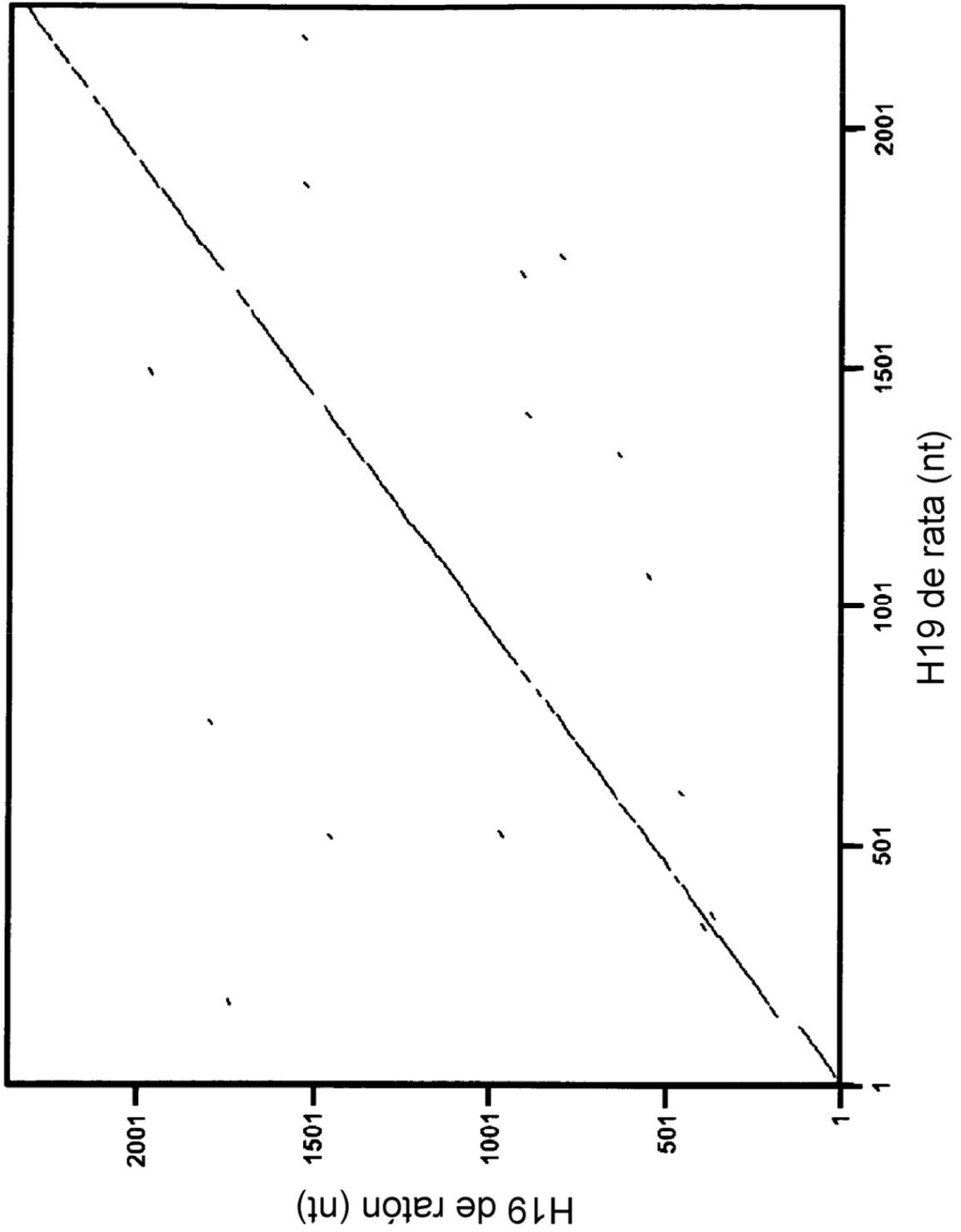


Figura 33 - continuación

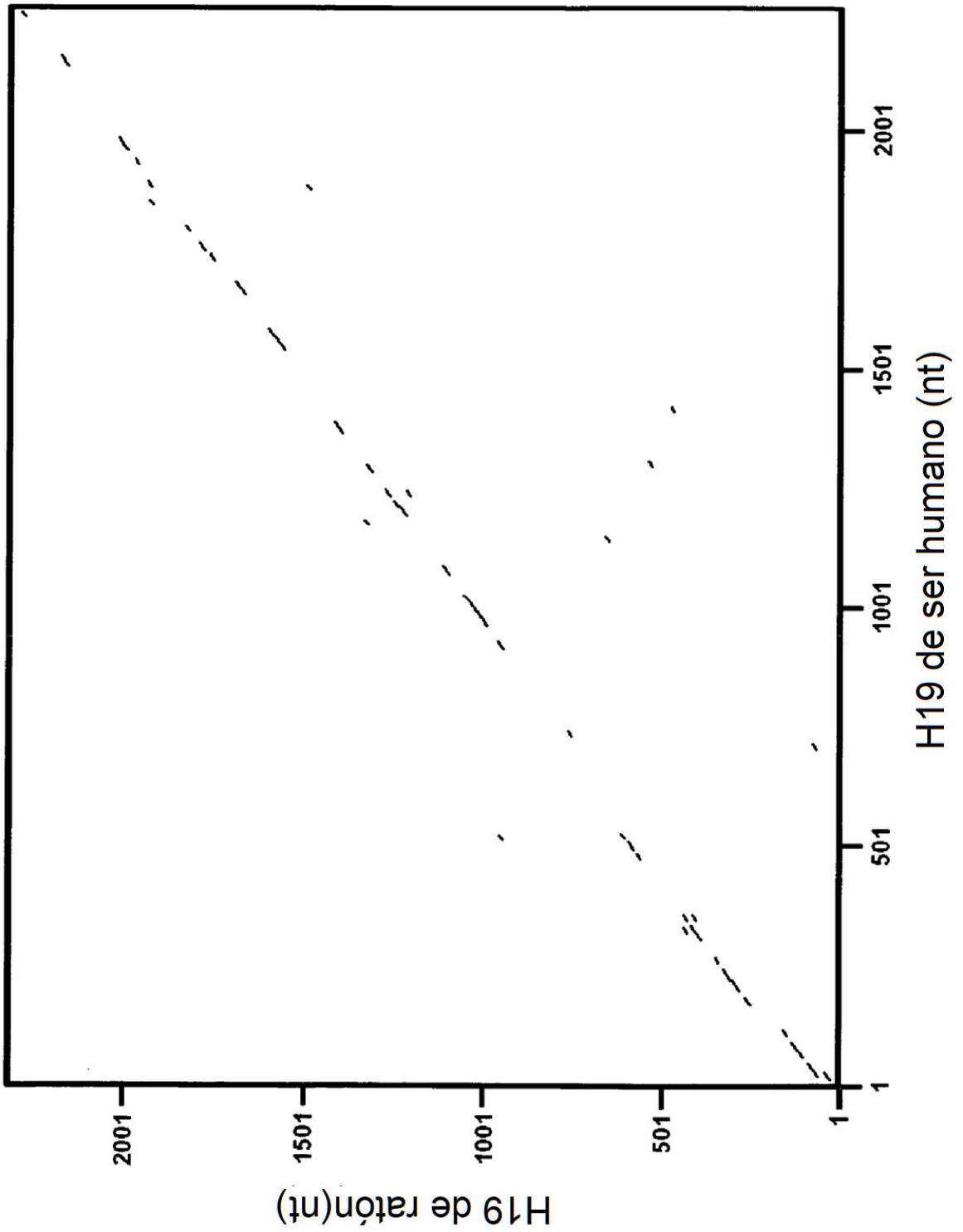


Figura 33 - continuación

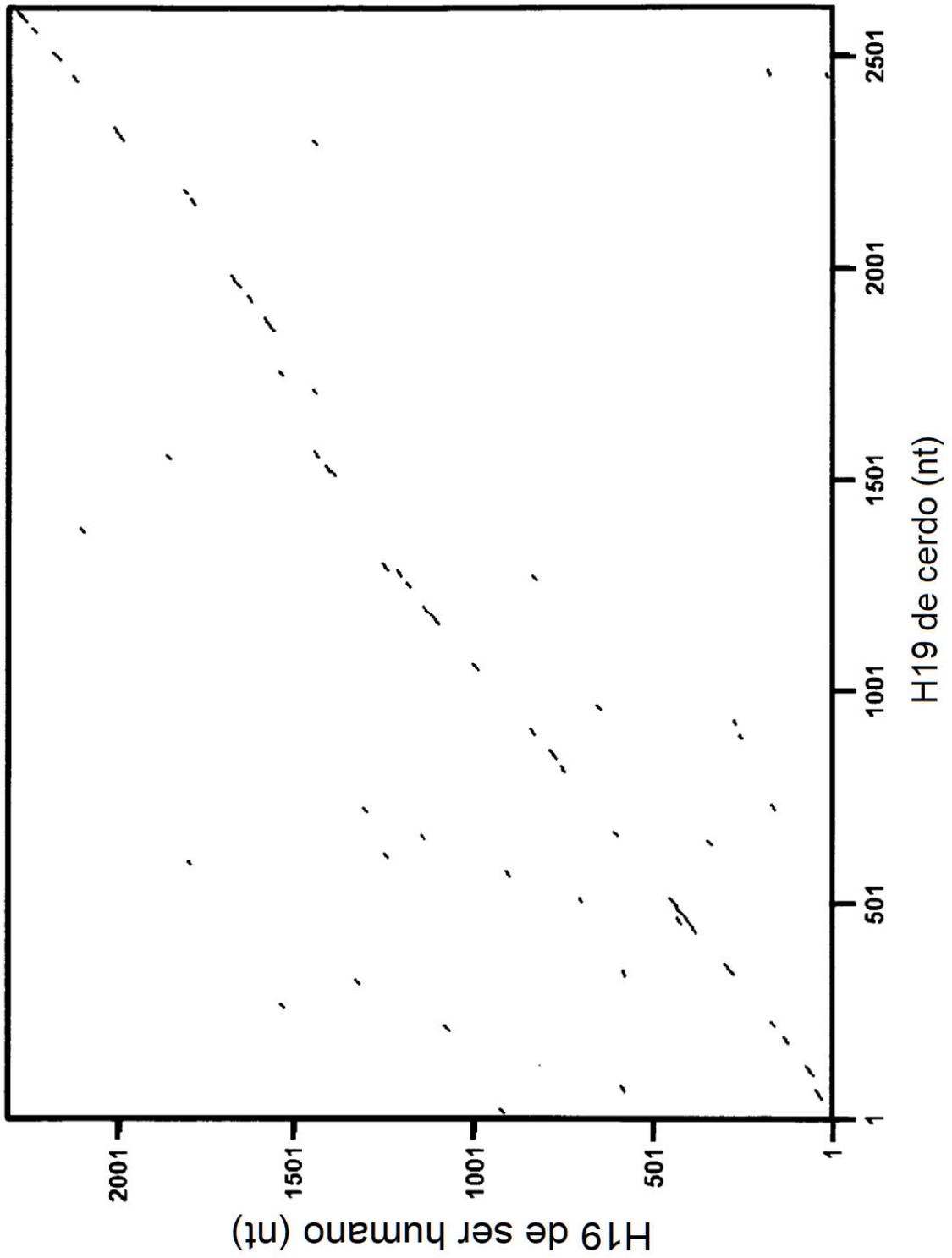


Figura 34

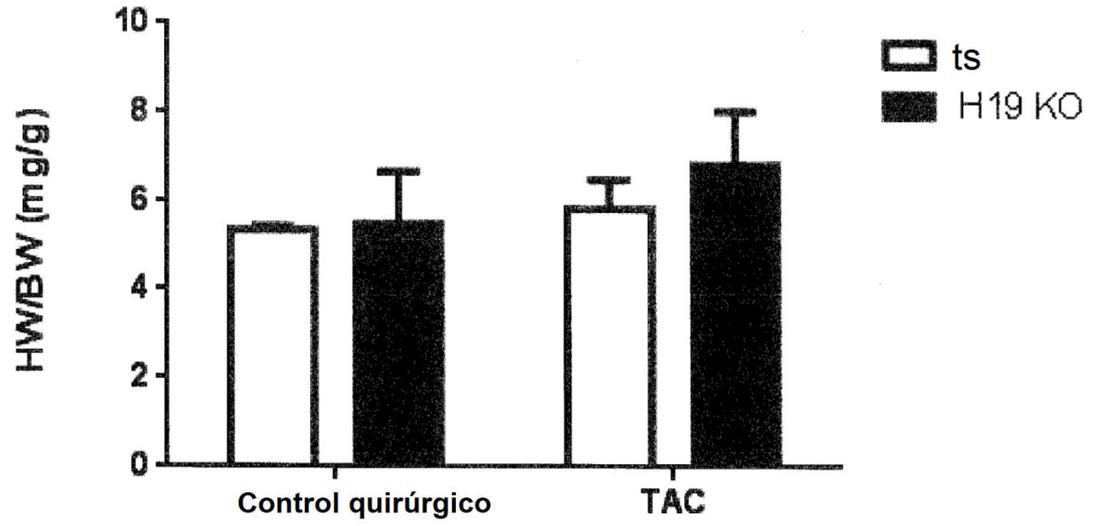


Figura 35

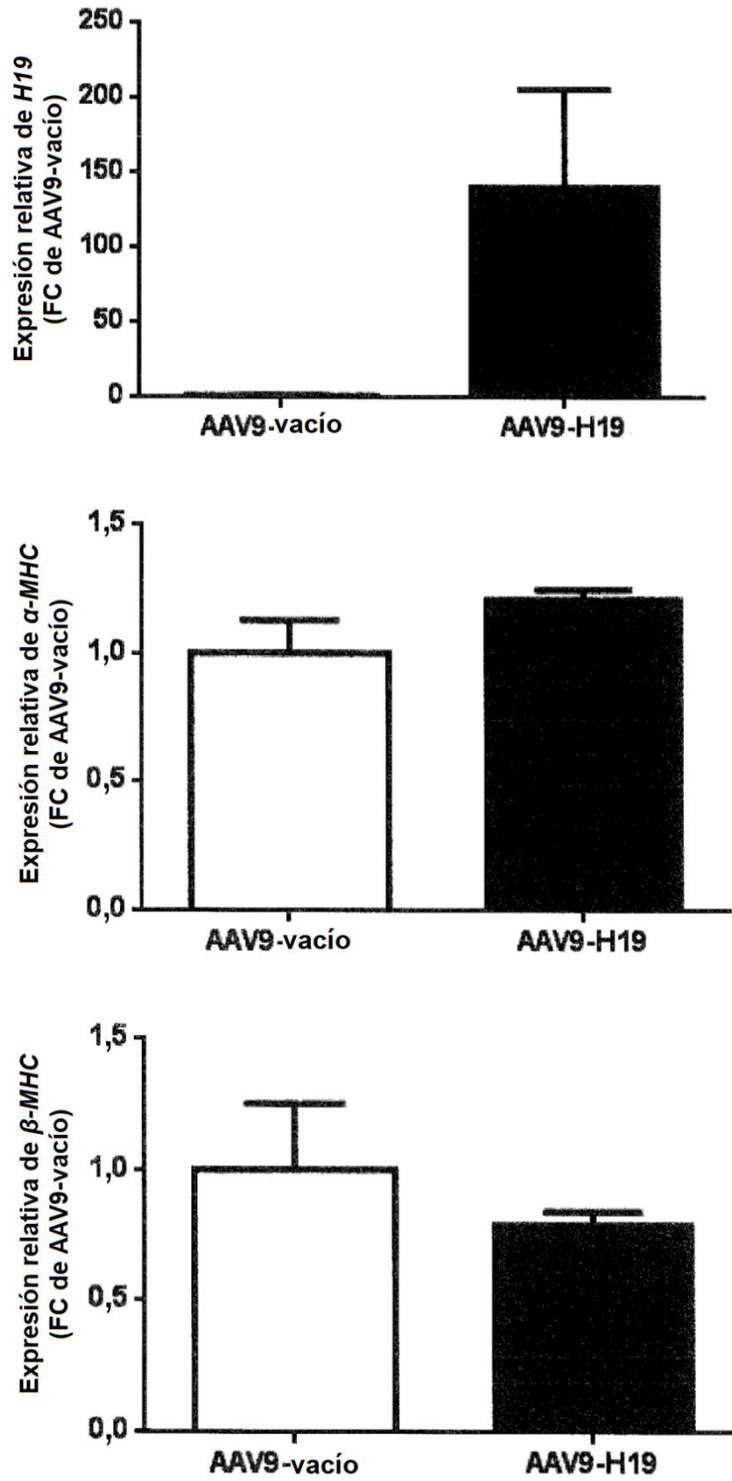


Figura 36

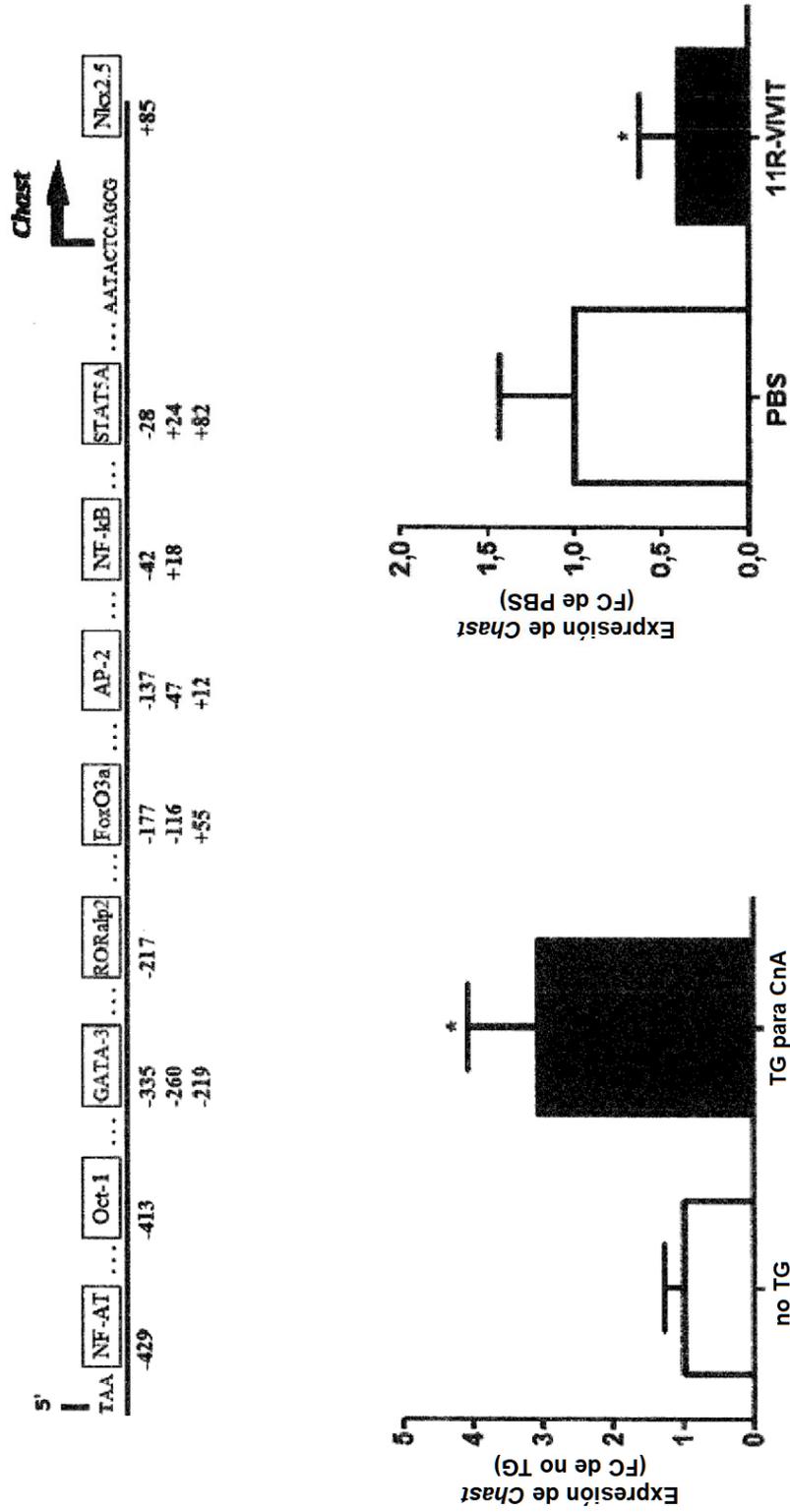


Figura 37

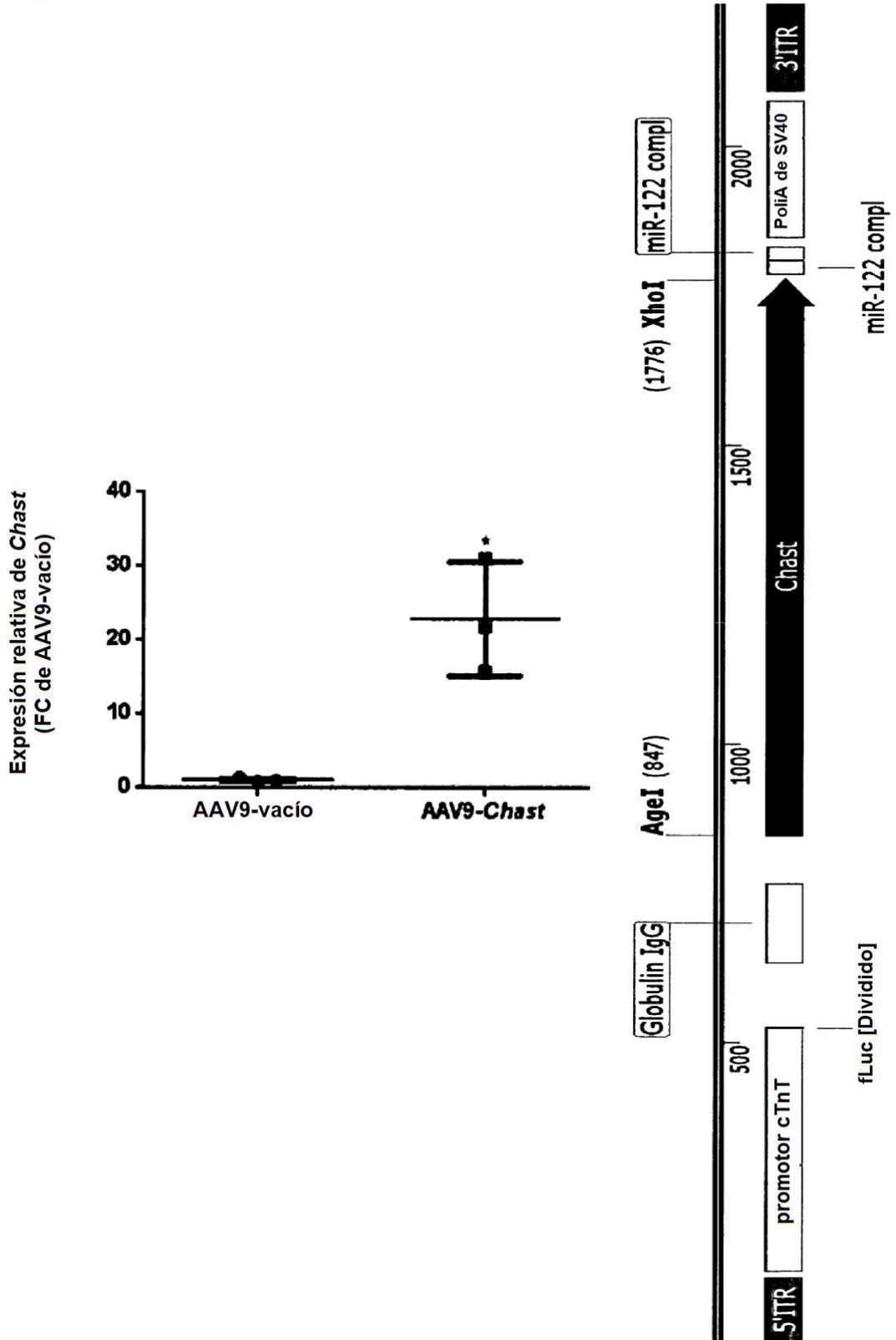


Figura 38

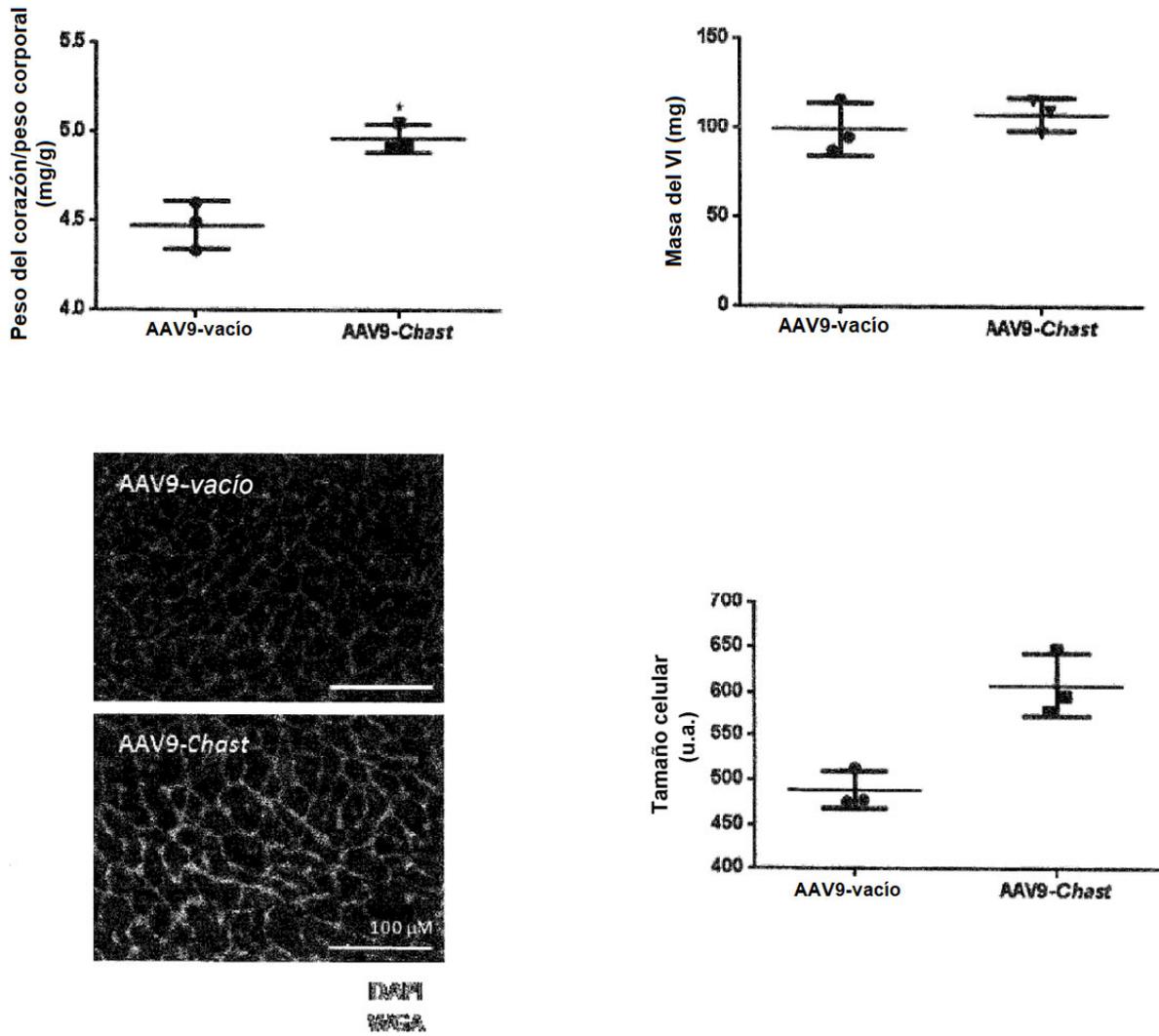
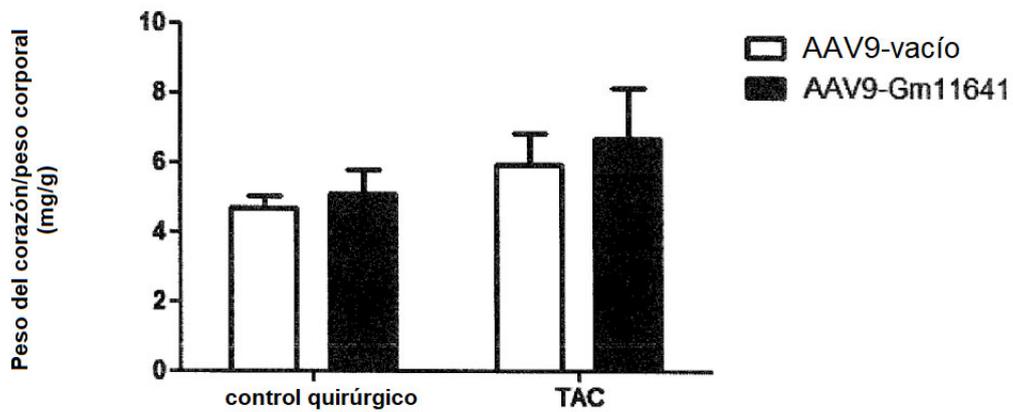


Figura 39



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2004031359 A [0005]
- US 6080560 A [0051]
- US 4946778 A [0051]
- EP 14165504 A [0172]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- THUM et al. *Nature*, 2008, vol. 456 (7224), 980-4 [0003]
- UCAR ; GUPTA et al. *Nat Commun.*, 2012, vol. 3, 1078 [0003]
- FIEDLER et al. *Circulation*, 2011, vol. 124 (6), 720-30 [0003]
- SCHONROCK et al. *Circ Res.*, 26 October 2012, vol. 111 (10), 1349-62 [0004]
- CALEY et al. *ScientificWorldJournal.*, 2010, vol. 10, 90-102 [0004]
- KLATTENHOFF et al. *Cell.*, 2013, vol. 152 (3), 570-83 [0005]
- GROTE et al. *Dev Cell.*, 2013, vol. 24 (2), 206-14 [0005]
- ISHII et al. *J Hum Genet.*, 2006, vol. 51 (12), 1087-99 [0005]
- MCPHERSON et al. *Science*, 2007, vol. 316 (5830), 1488-91 [0005]
- KOROSTOWSKI et al. *PLoS Genet.*, 2012, vol. 8 (9), e1002956 [0005]
- WANG et al. *Circ Res.*, 25 April 2014, vol. 114 (9), 1377-88 [0005]
- Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press, 2010 [0011]
- ZIMMERMANN et al. *Nature*, 2006, vol. 441, 111-114 [0013]
- ESAU et al. *JBC*, 2004, vol. 279, 52361-52365 [0013]
- GRIBBINGS et al. *Nature Cell Biology*, 2009, vol. 11, 1143-1149 [0013]
- FREY N ; OLSON EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.*, 2003, vol. 65, 45-79 [0020]
- DEALMEIDA et al. *J Vis Exp.*, April 2010, vol. 38 [0021]
- ELBASHIR et al. *Nature*, 24 May 2001, vol. 411 (6836), 494-8 [0031]
- MELANI et al. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 2897-2901 [0033]
- DE FOUGEROLLES et al. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, vol. 8, 280-285 [0037]
- ZAHER ; UNRAU. *RNA*, 2007, vol. 13 (7), 1017-1026 [0045]
- TOMLINSON et al. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 2004, vol. 22 (5), 521-522 [0052]
- KRÜTZFELDT et al. *Nature*, 2005, vol. 438, 685-689 [0054]
- BOECKER. *Mol Imagin.*, 2004, vol. 3 (2), 69-75 [0059]
- AUSUBEL et al. *Hum Gene Ther.*, April 2011, vol. 22 (4), 489-97 [0060]
- ALLAY et al. *Hum Gene Ther.*, May 2011, vol. 22 (5), 595-604 [0060]
- GHAHROUDI et al. *FEBS Letters*, 1997, vol. 414, 521-526 [0061]
- MURPHY et al. *Biochem J.*, 1991, vol. 227, 277-279 [0061]
- BEBBINGTON et al. *BiolTechnology*, 1992, vol. 10, 169-175 [0061]
- SAMBROOK ; RUSSEL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001, vol. 3 [0061]
- OWENS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 1471-1476 [0062]
- BUSTIN. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, vol. 29, 23-39 [0075]
- CALZA ; BALWITAN. *Methods Mol Biol.*, 2010, vol. 673, 37-52 [0075]
- MESTDAGH et al. *Genome Biol.*, 2009, vol. 10 (6), R64 [0075]
- MCCORMICK et al. *Silence*, 2011, vol. 2, 2 [0075]
- VERMEULEN et al. *BMC Res Notes.*, 2009, vol. 2, 235 [0090]
- MESTDAGH et al. *Genome Biology*, 2009, vol. 10, R64 [0090]
- CBIANCA et al. *Cell.*, vol. 11; 149 (4), 819-31 [0116]
- CBIANCA et al. *Cell.*, vol. 11;149 (4), 819-31 [0144] [0159]