

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 032**

21 Número de solicitud: 201700154

51 Int. Cl.:

A61K 31/155 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

06.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.10.2017

Fecha de concesión:

10.07.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.07.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA (100.0%)
Oficina de Transferencia de Resultados de
Investigación (OTRI). Vicerrectorado de
Investigación e Internacionalización. Campus
Universitario de Espinardo, Edificio Rector Soler,
1ª planta
30100 Espinardo (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**PASCUAL FIGAL , Domingo Andrés ;
ASENSIO LÓPEZ , María Del Carmen y
LAX PÉREZ , Antonio Manuel**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Composición para promover la recuperación cardiaca tras un infarto de miocardio (IM)**

57 Resumen:

Composición para promover la recuperación cardiaca tras un infarto de miocardio (IM).

La presente invención ofrece una solución a la falta de compuestos capaces de evitar de manera eficiente el deterioro del músculo cardiaco tras un IM, y de mejorar el pronóstico a largo plazo de pacientes que han sufrido un IM. La presente invención reivindica compuestos capaces de inhibir la expresión del factor de transcripción Yy1 en células cardiacas, reduciendo así la expresión del gen ST2s y permitiendo la activación de la cadena de señalización cardioprotectora IL33/ST2L. La presente invención también describe un método de cribado que permite identificar compuestos capaces de mejorar el pronóstico a largo plazo de pacientes que han sufrido un IM. Este método se basa en identificar los compuestos capaces de inhibir la expresión de Yy1 y/o de activar la cadena de señalización cardioprotectora IL33/ST2L en células cardiacas.

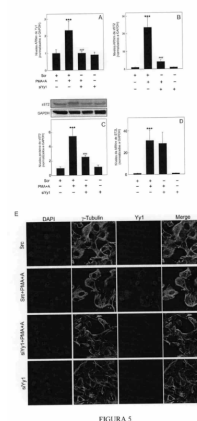


FIGURA 5

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 637 032 B1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN PARA PROMOVER LA RECUPERACIÓN CARDIACA TRAS UN INFARTO DE MIOCARDIO (IM).

Campo de la invención

- 5 La presente invención pertenece al campo de compuestos, y métodos para identificar compuestos, capaces de mejorar la recuperación cardiaca de pacientes que han sufrido un Infarto de Miocardio (IM).

Antecedentes de la invención y estado de la técnica

- 10 Las enfermedades cardiovasculares provocan más muertes que cualquier otra condición en Occidente, y el IM es todavía un problema sanitario de primer rango. Lo provoca el bloqueo repentino del suministro coronario de sangre, lo que lleva a la irreversible muerte de cardiomiocitos. A pesar de que los niveles de supervivencia de los pacientes que han sufrido IM han aumentado en los últimos años, el pronóstico a largo plazo aún es malo debido a los efectos estructurales y funcionales provocados por la necrosis de los cardiomiocitos. Tras el IM, se ponen en marcha una serie de mecanismos de
- 15 reparación local en el tejido infartado, fundamentalmente inflamación y fibrosis, que conllevan un riesgo de arritmia ventricular y de deterioro de la función miocárdica sistólica y diastólica. Es por ello que el IM conlleva un elevado riesgo de muerte y evolución a la insuficiencia cardiaca.

El tratamiento de los pacientes que han sufrido un IM depende del tamaño del infarto, pero a grandes rasgos suele basarse en los siguientes tipos de fármacos:

- 20 - Ácido acetilsalicílico, heparina, clopidogrel, prasugrel o ticagrelor para inhibir la agregación plaquetaria.
- Betabloqueantes para inhibir el efecto estimulante de la adrenalina en el corazón, regulando así el ritmo cardiaco, disminuyendo así la necesidad de oxígeno por parte del músculo cardiaco.
- Medicamentos reductores del colesterol (estatinas).
- 25 - Fármacos para bloquear los efectos nocivos de la angiotensina y la aldosterona (inhibidores ECA o antagonistas de los receptores de la angiotensina ARA II, y antagonistas del receptor mineralocorticoide de la aldosterona).

- Estos tratamientos están enfocados principalmente a evitar el riesgo de sufrir un nuevo infarto, y a evitar la aparición de complicaciones, arritmias ventriculares e insuficiencia cardiaca. Sin embargo,
- 30 tal y como se menciona más arriba, hoy en día el pronóstico a largo plazo sigue siendo malo debido al

deterioro progresivo de la función cardíaca. Por tanto, son necesarios nuevos tratamientos y nuevas estrategias para identificar nuevos medicamentos y/o dosis de administración más eficaces y capaces de evitar el deterioro del músculo cardíaco tras un infarto y así prolongar la vida de estos pacientes.

La proteína Suppression of Tumorigenicity-2 (ST2) pertenece a la familia de receptores de la interleucina 1 (IL1). Existe la isoforma transmembrana ST2-ligand (ST2L) y la isoforma soluble ST2s. Recientemente, se ha identificado a la Interleucina 33 (IL33) como un ligando específico de ST2L. La interacción de IL33 con ST2L activa una respuesta cardioprotectora. La isoforma ST2s también puede unirse a IL33, pero la interacción ST2s/IL33 provoca la inhibición de la interacción de ST2L/IL33 (Pascual-Figal DA et al., Clinical relevance of ST2s in cardiac diseases. Clin Chem Lab Med CCLM FESCC 2015; Kakkar R, Lee RT, The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008). Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de ST2s está relacionada con hipertrofia cardíaca, fibrosis y disfunción ventricular (Sanada S et al., IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007). También se ha propuesto que tanto IL33 como ST2s puedan ser posibles dianas en tratamientos de la remodelación adversa tras un IM (Sanchez Más, J. et al., Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers, *European Journal of Clinical Investigation*, 2014).

Los mecanismos de regulación de la expresión de las dos isoformas de ST2 se desconocen. Por ahora parece que sólo se ha demostrado que están reguladas por dos regiones promotoras diferentes que contienen zonas consenso para varios factores de transcripción.

El factor de transcripción Yin Yang 1 (Yy1) es una proteína “zinc finger” multifuncional que pertenece a la familia GLI-Kruppel de proteínas nucleares. Yy1 puede iniciar, activar o reprimir la transcripción de genes dependiendo de su interacción con otros factores. Se ha observado que está sobre-expresada en pacientes con hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca (Sucharov C.C. et al., Yin Yang 1 is increased in human heart failure and represses the activity of the human α -myosin heavy chain promoter, *The journal of biological chemistry*, 2003; Mariner P.D., Yin yang 1 represses α -myosin heavy chain gene expression in pathologic cardiac hypertrophy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004; Glenn D.J. et al., Endothelin-stimulated human b-type natriuretic peptide gene expression is mediated by Yin yang 1 in association with histone deacetylase 2, *Hypertension*, 2009). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que indiquen una relación entre Yy1 con infarto de miocardio o con la regulación de ST2s.

En la presente invención, los inventores muestran como Yy1 regula la transcripción de ST2s y utilizan éste descubrimiento para tratar los problemas cardíacos que surgen tras un IM. Proponen utilizar compuestos que reducen la cantidad de proteína Yy1 en células para así reducir la expresión de ST2s y así mejorar la recuperación de los pacientes que han sufrido un IM, evitando el deterioro progresivo

del músculo cardíaco. Esta estrategia permite tratar, e identificar compuestos capaces de tratar, el deterioro del corazón tras un IM.

Breve descripción de la invención

En la presente invención, los inventores muestran como la inhibición de Yy1 resulta en una inhibición de la expresión de ST2s. Dado que ST2s compite con ST2L para interaccionar con la IL33, la inhibición de ST2s se asocia con una activación de la cascada cardioprotectora ST2L/IL33.

En efecto, tras un IM, se observa un incremento en la expresión de Yy1 y de ST2s. Pero la inhibición de Yy1 mediante siRNAs en células H9C2 expuestas a estrés biomecánico, resulta en una reducción de los niveles del ARNm codificante de ST2s y de la proteína ST2s.

Los inventores también muestran como la metformina, conocida por su capacidad terapéutica tras un IM (Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; Bhamra GS et al., Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*. 2008; Calvert JW et al., Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 2008; Paiva M et al., Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; Gundewar S. et al., Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*. 2009) tiene un efecto parecido a la inhibición de Yy1 mediante siRNAs en la cascada cardioprotectora IL33/ST2L. En efecto, la metformina reduce los niveles de expresión Yy1 y de ST2s. Sin embargo, en este caso el efecto parece estar mediado, al menos en parte, por un aumento de los niveles de expresión de HDAC4 y por una disminución de los niveles de fosforilación de HDAC4, resultando en un incremento de HDAC4 en el núcleo de células cardíacas. Un aumento de los niveles de HDAC4 en el núcleo se asocian con una inhibición de la expresión de genes regulados por Yy1 (Han S et al.; Recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription. *Biochem J*. 2006; Mathiyalagan P. et al., Chromatin modifications remodel cardiac gene expression. *Cardiovasc Res*. 2014).

En resumen, los inventores han desarrollado un nuevo método para tratar a pacientes que han sufrido un IM, basado en la reducción de la expresión de Yy1, que se traduce en una reducción de la expresión de ST2s tras un IM. Esta invención también permite detectar compuestos con propiedades cardioprotectoras. En efecto, compuestos con efectos similares a los descritos para la metformina en la cascada IL33/ST2L, preferiblemente que resultan en la inhibición de la expresión de Yy1, son potencialmente interesantes para el tratamiento de pacientes que han sufrido un IM.

Breve descripción de las figuras

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con unos ejemplos preferentes de realizaciones prácticas de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un
 5 juego de figuras en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1: La figura 1 muestra como la metformina modula el sistema IL-33/ST2 en el infarto de miocardio.

(A-C), niveles de expresión de moléculas de ARNm implicadas en la señalización IL-33/ST2: IL-33, ST2L y ST2s. Western-blot representativo de IL-33 (D) y niveles de proteína para ST2s (E) en tejido
 10 infartado de rata y datos del análisis densitométrico. Los datos se expresaron como veces el control. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ comparando con el grupo control. ## $p < 0,01$ comparando con el grupo IM. MET= metformina; IM= Infarto de miocardio; IL= Interleucina; ST2L= ST2 ligada; ST2s= ST2 soluble; GAPDH= gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

Figura 2: La Figura 2 muestra como la metformina regula los niveles de ST2s a través de la modulación del factor de transcripción Yy1.

(A) Análisis de la expresión de ARNm de Yy1 por RT-PCR. (B) Western-blot representativo de la proteína Yy1 en núcleo y citoplasma de tejido infartado, y análisis densitométrico calculado como
 20 ratio de Yy1 núcleo/citosol. *** $p < 0,001$ comparando con el grupo control. ### $p < 0,001$ comparando con IM. Yy1= factor de transcripción Yin-yang 1; Cit= citosol; otras abreviaturas como en la figura 1.

Figura 3: La Figura 3 muestra como la metformina regula la actividad del factor de transcripción Yy1 a través de la modulación del factor HDAC4.

(A) Niveles de ARNm para HDAC4. (B) Western-blot representativo de los niveles de proteína para
 25 HDAC4 en tejido infartado de ratas y análisis densitométrico. (C) Western-blot representativo de la proteína fosforilada Ser-632-HDAC4 en las fracciones nuclear y citosólica en tejido infartado y análisis densitométrico calculado como ratio de Ser-632-HDAC4 núcleo/citosol. *** $p < 0,001$ comparando con el grupo control. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ comparando con IM. HDAC4= histona deacetilasa 4; Hist H3= proteína histona 3; otras abreviaturas como en figuras anteriores.

Figura 4: La figura 4 muestra que, bajo estrés biomecánico, la metformina previene del incremento de ST2s inducido por Yy1.

(A-D), Análisis por RT-PCR de IL-33, ST2s, Yy1 y HDAC4 usando un modelo de estrés biomecánico. (E) Western-blot representativo de los niveles de ST2s en tejido infartado y análisis
 35 densitométrico normalizado a niveles de GAPDH. (F) Western-blot representativo de la proteína fosforilada Ser-632-HDAC4 citosólica en tejido infartado y análisis densitométrico calculado como

ratio de Ser-632-HDAC4/GAPDH. *** $p < 0,001$ comparando con el grupo control. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparando con IM. PMA= acetato de forbol miristato; A= Ionóforo A23187; otras abreviaturas como en figuras anteriores.

Figura 5: La figura 5 indica la eficacia inhibitoria de siYy1 y su efecto en la expresión de ST2s.

(A, B y D) Análisis por RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión de ARNm de Yy1, ST2s y ST2L usando un modelo celular de estrés biomecánico. (C) Western-blot representativo de niveles proteicos de ST2s y análisis densitométrico. (E) Imágenes de microscopía confocal para caracterización de la expresión de Yy1 (rojo) y γ -tubulina (verde) por microscopía confocal en células H9c2. Los núcleos en azul (DAPI). Escala de barra: 50 μm . *** $p < 0,001$ comparando con sham. ### $p < 0,001$ comparando con IM. siYy1= ARN pequeño de interferencia; src= *scramble* como control negativo de silenciamiento mediante siRNA; otras abreviaturas como en figuras anteriores.

Figura 6: La figura 6 muestra como el efecto de cada Yy1 siRNA por separado tiene el mismo efecto que los 4 siRNAs en conjunto.

Las células H9c2 fueron preincubadas con *scramble* siRNA (scr), una combinación de cuatro siRNAs para Yy1 (siRNA Yy1_ a+b+c+d) o con un sólo siRNA antes de la inducción de estrés biomecánico, durante 6 horas. Los niveles de ARNm de Yy1 (A) y sST2 (B) fueron analizadas mediante RT-PCR. *** $p < 0,001$ vs scr; ### $p < 0,001$ vs estrés biomecánico.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- En el contexto de la presente invención, el término “expresión génica” se refiere al proceso por el cual los ácidos nucleicos de un gen se utilizan para dirigir la transcripción resultando en la síntesis de proteínas. El proceso de expresión génica comprende 2 pasos principales:

1) La transcripción: la producción de ARN mensajero (ARNm) por una ARN polimerasa utilizando la secuencia de ADN como molde. Esta etapa continúa con el procesado o maduración de la resultante molécula de ARNm.

2) La traducción: el uso de ARNm para dirigir la síntesis de proteína. Después de esta segunda etapa pueden producirse modificaciones post-traduccionales de la proteína.

Además, en algunos casos, la expresión génica conlleva la producción de otras formas de ARN que no se traducen en proteínas, como ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomales (ARNr), ARNs largos no codificantes (ARNlnc), o ARNs de interferencia (ARNi).

- En el contexto de la presente invención, "secuencia reguladora" se refiere a un segmento de una molécula de ácidos nucleicos que es capaz de aumentar o reducir la expresión de genes específicos en un organismo. Algunos ejemplos de secuencias reguladores serían promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, sitios de corte y empalme etc.

5

- En el contexto de la presente invención, "ARN de interferencia (ARNi)" se entiende como una molécula de ARN que suprime la expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos globalmente como ribointerferencia o interferencia por ARN. Los ARN interferentes son moléculas pequeñas (de 20 a 25 nucleótidos) que se generan por fragmentación de precursores más largos. Se
10 pueden clasificar en tres grandes grupos de moléculas:

15

- ARN interferente pequeño (o siRNA del inglés small interfering RNA). Son moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias de aproximadamente 20 ó 21 nucleótidos (nt) con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura proviene del procesamiento llevado a
cabo por Dicer, una enzima que corta moléculas largas de ARN bicatenario (dsRNA, double stranded RNA) en varios siRNAs. Una de las hebras del siRNA (la hebra 'antisentido') se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (RNA-induced silencing complex), que utiliza la hebra de siRNA como guía para identificar el ARN mensajero complementario. El
complejo RISC cataliza el corte del ARNm complementario en dos mitades, que son
degradadas por la maquinaria celular, bloqueando así la expresión del gen. Los siRNA pueden
ser también introducidos de forma exógena en las células utilizando métodos de transfección basándose en la secuencia complementaria de un gen en particular, con la finalidad de reducir
significativamente su expresión.

20

25

- miARN (o miRNA del inglés micro-RNA o miRNA) son pequeños ARNs interferentes que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas (hairpins) intramoleculares que contienen segmentos de
complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en
dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Una de
las hebras del miRNA (la hebra 'antisentido'), como ocurre con los siRNA, se incorpora a un
complejo similar al RISC (del inglés RNA-induced silencing complex). Dependiendo del
grado de complementariedad del miRNA con el ARNm, los miRNAs pueden bien inhibir la
traducción del ARNm o bien inducir su degradación. Sin embargo, a diferencia con la vía de
los siRNA, la degradación de ARNm mediada por miRNA se inicia con la eliminación
enzimática de la cola de poli(A) del ARNm.

30

- ARNs asociados a Piwi (piARNs): se generan a partir de precursores largos monocatenarios, en un proceso que es independiente de Drosha y de Dicer. Estos ARN pequeños se asocian con una subfamilia de las proteínas 'Argonauta' denominada proteínas Piwi.

- En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido antisentido de ARN" se refiere a una cadena simple de ARN que es complementaria a una secuencia específica. Esta secuencia de ARN antisentido hibrida con un determinado ARNm inhibiendo así su traducción, ya que la traducción del ARNm requiere una cadena simple de ARN. De este modo, el oligonucleótido antisentido de ARN inhibe la síntesis de una proteína determinada. Por otro lado, la RNasa H degrada complejos de ARN-ADN, de modo que la hibridación del oligonucleótido antisentido de ARN a una secuencia específica de ADN también provocará la degradación de dicha secuencia de ADN.

- En el contexto de la presente invención, el término "plásmido" se entiende como la molécula de ADN extracromosómico circular que se replica y se transmite independientemente del ADN cromosómico. Los plásmidos están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras. Los plásmidos se utilizan como vectores de clonación en ingeniería genética por su capacidad de reproducirse de manera independiente del ADN cromosomal así como también porque es relativamente fácil manipularlos e insertar nuevas secuencias genéticas en ellos. Suelen incluir secuencias reguladoras, como promotores que se utilizan para sintetizar el ARN de interés, que en la mayoría de los casos se acaba traduciendo en una proteína determinada.

- En el contexto de la presente invención, el término "vector" se refiere a un pequeño fragmento de ADN, obtenido de un virus, de un plásmido, o de una célula de un organismo superior en el que se pueden insertar fragmentos genéticos heterólogos y que se usan habitualmente para transportar de manera artificial este material genético heterólogo a otra célula, donde puede replicarse, expresarse y/o insertarse en el genoma de la célula huésped. En general, el vector mismo es una secuencia de ADN que consiste en un transgen y en una secuencia más larga que sirve de "esqueleto" del vector. Puede ser de simple o de doble cadena. Opcionalmente, puede estar formado, o comprender, ácidos nucleicos modificados, como por ejemplo metilfosfato o cadenas principales de fosforotioato.

- En el contexto de la presente invención, el término "célula cardíaca" se refiere a una célula que forma parte del corazón. Entre las diferentes células cardíacas se encuentran principalmente cardiomiocitos, pero también otras como por ejemplo fibroblastos o células endoteliales del corazón. En el contexto de la presente invención, el término "cardiomiocito" se refiere a una célula del miocardio o músculo cardíaco capaz de contraerse de forma espontánea e individual.

- En el contexto de la presente invención, el término "aumento" o "aumentar" se refiere a aumentos por encima de un nivel de referencia o control. Por ejemplo, los niveles de referencia o control son los

que se observan antes de, o en ausencia de, la adición de un compuesto activador o de la acción activadora. El aumento se podrá evaluar por una persona experta de en la técnica específica, pero en los aspectos y realizaciones descritas en esta invención, se refiere a aumentos de al menos un 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o de 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más veces respecto del niveles control.

- En el contexto de la presente invención, el término "reducción", "reducir", "inhibir" o "inhibición" se refiere a reducciones por debajo de un nivel de referencia o control. Por ejemplo, los niveles de referencia o control son los que se observan antes de, o en ausencia de, la adición de un compuesto inhibidor. La disminución se podrá evaluar por una persona experta en la técnica, pero en los aspectos y realizaciones descritas en esta invención, se refiere a disminuciones de al menos un 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o de 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más veces respecto del niveles control.

- En el contexto de la presente invención, el término "polinucleótido" se refiere a una secuencia de varios nucleótidos, formado por al menos en torno a 20 nucleótidos. Puede estar formada desoxirribonucleótidos o por ribonucleótidos y constituir por tanto moléculas de ADN o de ARN. En la presente invención también pueden estar formados por nucleótidos sintéticos o modificados. Pueden incluir por ejemplo cadenas principales de fosforotioato, o la adición de acridina. Para los fines de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos descritos en este documento pueden ser modificados por cualquier método disponible en la técnica.

- En el contexto de la presente invención, el término "método de cribado" se entiende como un método que permite seleccionar compuestos capaces de promover un cambio determinado medible por métodos *in vitro* conocidos en la técnica, en una muestra biológica o en un animal modelo no humano a los que se les ha administrado dicho compuesto, en comparación con una muestra biológica o animal modelo no humano similares y comparables, a los que no se les ha administrado el compuesto. Dicho método de cribado también puede incluir una fase adicional de aislamiento del compuesto seleccionado o de los compuestos seleccionados.

- En el contexto de la presente invención, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere al compuesto que se mezcla de alguna manera con ingredientes activos para estabilizarlos y

solubilizarlos y administrarlos a animales vivos, incluyendo los seres humanos. Esto incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, tal uso en las composiciones está contemplado.

Los inventores identifican una nueva estrategia para promover la recuperación tras un IM. Esta estrategia se basa en reducir los niveles de expresión del factor de transcripción Yy1, que resultará en una reducción de la expresión de la proteína ST2s. La interacción entre la isoforma ST2L y la IL33 activa una cascada de reacciones que promueve la recuperación cardíaca tras un IM (Sanchez Más, J. et al., Modulation of IL-33/ST2 system in postinfarction heart failure: correlation with cardiac remodelling markers, *European Journal of Clinical Investigation*, 2014). Dado que ST2s compite con ST2L para interaccionar con la IL33, la inhibición de ST2s se asocia con un efecto positivo en la activación de la cascada mediada por la interacción IL33/ST2L.

Un primer aspecto de la presente invención, se refiere al uso de una composición que comprende un compuesto capaz de reducir la expresión del gen Yin yang 1 (Yy1), en células cardíacas, preferiblemente en células cardíacas que han sufrido un estrés biomecánico idéntico o similar al de un infarto de miocardio (IM), de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del compuesto en dichas células, seleccionado de la lista que consiste en:

- ARN de interferencia (ARNi) del gen Yy1,
- un oligonucleótido antisentido de ARN correspondiente al gen Yy1,
- una secuencia de ácidos nucleicos que se introduce en el gen o secuencias reguladores del gen Yy1 inhibiendo su expresión;

para elaborar un medicamento que inhibe la expresión del gen que codifica la proteína soluble suppression of tumorigenicity-2 (ST2s) para promover la recuperación cardíaca tras un infarto de miocardio (IM).

Como se acaba de indicar, la inhibición de la expresión génica de Yy1 se puede conseguir utilizando ARN de interferencia (ARNi). Este ARNi comprende una secuencia única y complementaria al ARN mensajero (ARNm) del gen Yy1 para inhibir la traducción de dicho ARNm. Alternativamente, se puede utilizar un oligonucleótido antisentido de ARN formado por una secuencia única del gen Yy1 complementaria al ARNm Yy1 que puede unirse a dicho ARNm y también inhibir su traducción. Esta metodología es conocida en la técnica. Estas construcciones de ARN deben ser capaces de hibridar con una secuencia del ARNm diana Yy1 de manera selectiva y específica, de modo que son idénticas

a una secuencia complementaria del ARNm Yy1 en al menos un 90% de sus nucleótidos, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o un 99.5 %. La secuencia de ARNm Yy1 es idéntica a la secuencia SEQ1de Yy1 del genoma humano (o a la secuencia homóloga codificante de una proteína con funciones homólogas en otros genomas animales) en al menos un 90% de sus nucleótidos, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o un 99.5 %. Alternativamente, se pueden introducir secuencias de nucleótidos en el genoma de la célula de interés en el gen o secuencias reguladoras del genYy1 para inhibir su expresión. Los métodos para introducir estas secuencias en el genoma de la célula son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la técnica de CRISPR-Cas.

Para introducir moléculas de ARN descritas justo arriba en las células diana, se pueden utilizar diferentes estrategias. Por ejemplo, se puede simplemente inyectar los siRNAs u oligonucleótidos antisentido en el entorno de las células para que éstos entren en contacto con las células. El medio en el que se encuentran estos ARNs puede ser cualquier vehículo farmacéutico compatible con la estabilidad de los ARNs y compatible con las células y, en caso de administración a un sujeto, con la salud física del sujeto. Este vehículo es conocido en la técnica, como por ejemplo una solución salina. También se pueden utilizar nanopartículas biodegradables, como liposomas. Los liposomas son vesículas formadas por lípidos que contienen en su interior moléculas de interés (en este caso los siRNAs u oligonucleótidos antisentido) y que pueden fusionarse con una membrana celular y liberar su contenido en dicha célula. Para aumentar la especificidad de las células en que se libera el contenido de los liposomas, se pueden añadir proteínas que mejoren la dirección a célula, como marcadores específicos de las células diana. También se pueden electroporar las células.

Otra opción es introducir en las células la secuencia de ADN correspondiente a la molécula de ARN, , como las descritas anteriormente. Esta secuencia de ADN se podrá transcribir en las células diana. Para ello, se pueden utilizar vectores o plásmidos capaces de introducirse en las células diana. Para introducirse en dichas células se pueden utilizar varias estrategias, que son conocidas en la técnica. Al igual que para introducir el ARN, se pueden utilizar liposomas, también se puede utilizar métodos basados en la electroporación o biobalística. Alternativamente se pueden utilizar vectores virales, como por ejemplo adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, virus vaccinia, virus de la polio, virus del SIDA, virus trófico neuronal, Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo entre estos, virus con la estructura del VIH. También se prefieren las familias virales que comparten las propiedades de estos virus que los hacen adecuados para su uso como vectores. Los retrovirus son virus de la leucemia murina de Maloney, MMLV, y retrovirus que expresan las propiedades deseables de MMLV como un vector. Los vectores retrovirales son capaces de llevar una carga útil genética más grande que otros vectores virales, es decir, un gen y/o transgen marcador, y por esta razón son un vector comúnmente usado. Sin embargo, no son tan útiles en células no proliferativas. Los vectores de adenovirus son relativamente estables y fáciles de utilizar, y pueden ser transfectados en células que no se dividen. Los vectores virales de la viruela son grandes y tienen varios sitios para la inserción de

genes, son termoestables y pueden almacenarse a temperatura ambiente. Los lentivirus son capaces de infectar a todo tipo de células, tanto quiescentes como en división, permiten insertos de tamaño medio y se integran en el genoma de la célula huésped, dando lugar a una expresión a largo plazo. Una realización preferida es un vector viral que ha sido diseñado con el fin de suprimir la respuesta

5 inmunitaria del organismo huésped, provocados por los antígenos virales.

Por tanto, otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al uso del primer aspecto de la invención, donde dicho compuesto está comprendido en un vector o plásmido capaz de transportar o suministrar dicho compuesto a las células cardíacas. Preferiblemente, dicho vector es un vector viral. Más preferiblemente, dicho vector viral está seleccionado de la lista que consiste en

10 vectores adenovirales, lentivirales, retrovirales y adenoasociados.

Una vez dentro de las células, la transcripción de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los ARNs de interés capaces de silenciar la expresión del gen Yy1 se producirá dentro de las células diana, bajo el control de unos promotores pre-determinados y presentes en los vectores o plásmidos utilizados. En otra realización preferida de la invención, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica

15 a los ARNs de interés capaces de silenciar la expresión del gen Yy1 se inserta en el genoma de la célula cardíaca en la que se ha introducido.

Para cualquiera de las realizaciones preferidas descritas hasta ahora, se puede incluir en los polinucleótidos de la invención nucleótidos sintéticos modificados. Un número de tipos diferentes de modificación de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Éstos incluyen por ejemplo cadenas

20 principales de fosforotioato, o la adición de acridina.

El uso de la composición según cualquiera de las realizaciones preferidas descritas hasta ahora está dirigido a reducir el tamaño del infarto de miocardio y/o previene el remodelado cardíaco adverso tras un IM.

Los compuestos se pueden administrar localmente en las células de interés, los cardiomiocitos, o bien de formar parenteral, intravenosa, o intramuscular. También se puede administrar oralmente, siempre y cuando, cualquiera de estas formas de administración permita transportar y suministrar el compuesto descrito en cualquiera de las realizaciones anteriores a las células cardíacas de interés. Por tanto, en una realización particular del primer aspecto de la invención, la composición se administra de manera local en las células del corazón. En otra realización de la invención, la composición se

25 administra de manera intravenosa.

30

La composición utilizada en cualquiera de las realizaciones anteriores además puede comprender un vehículo farmacéutico aceptable y opcionalmente un principio activo adicional. En este sentido, el compuesto se puede administrar *in vivo* junto con un vehículo farmacéutico aceptable. El vehículo,

naturalmente, se selecciona para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo (o de los ingredientes activos, en caso de contener un principio activo adicional) y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como es bien conocido para un experto en la técnica y tal y como está indicado en las definiciones. Por tanto, en una realización de la invención se refiere al uso según cualquiera de las realizaciones anteriores donde dicha composición además comprende un vehículo farmacéutico aceptable y opcionalmente un principio activo adicional. Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método de cribado para identificar compuestos capaces de reducir la expresión del gen que codifica la proteína ST2s que comprende:

a) Obtener una librería de compuestos.

b) Determinar si una administración a células cardíacas, preferiblemente sometidas a un estrés similar o idéntico al que produce un IM, de uno o más de los compuestos del paso a) resulta en una reducción de los niveles intracelulares del factor de transcripción Yy1 y/o de la expresión del gen que codifica el factor de transcripción Yy1 respecto de las células cardíacas, preferiblemente sometidas a un estrés biomecánico similar o idéntico al que produce un IM, a las que no se les administra/n dicho/s compuesto/s.

c) Seleccionar aquellos compuestos que promueven la reducción descrita en el paso b).

Dicho método de cribado se puede realizar con muestras biológicas *in vitro*, o con animales modelo no humanos.

En el ejemplo 3, se observa cómo un incremento en la expresión del factor de transcripción Yy1 se relaciona con un aumento en la expresión de ST2s y cómo el silenciamiento de Yy1 con ARNs de interferencia pequeños (siRNAs) se traduce en una reducción de la expresión de ST2s. Por tanto, es esperable que compuestos capaces de inhibir la expresión de Yy1, de manera similar a los siRNAs, también acaben inhibiendo la expresión de ST2s. Como se ha comentado más arriba, la alta expresión de ST2s se traduce en una inhibición de la interacción entre IL33 y ST2L, inhibiendo así la cascada cardio-protectora IL33/ST2L y sus efectos beneficiosos en la recuperación tras un infarto de miocardio. Por tanto, los compuestos capaces de reducir la expresión de Yy1, y en consecuencia de ST2s, parecen desencadenar mecanismos moleculares capaces de promover la recuperación cardíaca tras un IM. Por ello, éstos compuestos son seleccionados en el paso c) del método de cribado descrito más arriba. Para medir el efecto que tiene un compuesto en la expresión de Yy1, se cultivan células que expresan el factor de transcripción Yy1, preferiblemente células cardíacas que comprenden cardiomiocitos, que aún más preferiblemente han sufrido un estrés biomecánico idéntico o similar al de un infarto de miocardio (MI) y se les administra el compuesto. El estrés biomecánico es conocido en la técnica y preferiblemente consiste en el que se describe en Neshati Z et al. (Neshati Z et al.,

Development of a new model of cardiac hypertrophy with pro-arrhythmic features to study the role of hypertrophy in arrhythmogenesis. *Eur Heart J.* 2013).

Alternativamente, para medir el efecto que tiene un compuesto en la expresión de Yy1, se administra el compuesto a animales modelo no humanos, preferiblemente mamíferos no humano, y más preferiblemente, cuyas células cardíacas han sufrido un estrés similar o idéntico al de un IM, y se mide el nivel de expresión de Yy1 en las células cardíacas de interés, preferiblemente en cardiomiocitos. La vía de administración tanto en células en cultivo como a animales modelo, dependerá del tipo de compuesto. En caso de tratarse de ARNs de interferencia o de oligonucleótidos antisentido, se pueden encontrar en las mismas formas que se han descrito en el primer aspecto de la invención, e introducirlos en las células cardíacas tal y como se describe en el primer aspecto de la invención. En caso de tratarse de otro tipo de moléculas (como la metformina), se podrá adaptar el método de administración al descrito en la técnica. Para comprobar si el compuesto promueve una disminución de los niveles de proteína Yy1, en células en cultivo o en células cardíacas de animales modelo descritas anteriormente, se medirán estos niveles en las células cardíacas a las que se ha administrado el compuesto (o de animales modelo a los que se les ha administrado el compuesto) y en células cardíacas a las que no se les ha administrado el compuesto (o de animales a los que no se les ha administrado el compuesto). En caso de que haya un menor nivel relativo de Yy1 en las células cardíacas que sí han recibido el compuesto (o de animales a los que sí se les ha administrado el compuesto), se concluirá que el compuesto promueve una reducción de los niveles intracelulares del factor de transcripción Yy1. Esta reducción se evaluará por una persona experta en la técnica, y se entiende que para considerarse una disminución debe ser como la descrita en las definiciones más arriba. Para medir los niveles de proteína Yy1 intracelular, se podrán utilizar diferentes métodos conocidos en la técnica, comparando una muestra control (células cardíacas a las que no se les ha administrado el compuesto o de animales a los que no se les ha administrado el compuesto) con la muestra celular a la que se le ha administrado el compuesto (o de animales a los que se les ha administrado el compuesto). A modo de ejemplo se podrá utilizar la técnica de western blot, inmunohistoquímica, o la técnica de “fluorescence-activated cell sorting” (FACS). Otro indicativo, o confirmación, de que hay una reducción en los niveles de proteína Yy1 intracelular es que se produzca una reducción en los niveles de expresión génica. Esta reducción se evaluará por una persona experta en la técnica. Se entiende por reducción lo mismo que se ha indicado para el caso en que se miden los niveles de proteína y como se ha indicado en las definiciones. Para medir la expresión génica, se podrán utilizar cualquiera de las metodologías conocidas en la técnica, como por ejemplo la “Real Time - Polymerase Chain reaction” (RT-PCR), la “Real Time – Quantitative Polymerase Chain reaction” (RT-QPCR) o “micro-arrays”.

En los ejemplos 2, 3 y 4, se observa una correlación entre la expresión de HDAC4, su fosforilación, la expresión de Yy1 y la expresión de ST2s. Más específicamente, se observa cómo tras inducir un IM o

un estrés biomecánico a células cardíacas H9C2, la fosforilación de HDAC4 aumenta. Al administrar metformina, se produce un aumento en la expresión del HDAC4, y una disminución de su nivel de fosforilación (fig 3, 4). Las Figuras 2 y 4 muestran como la metformina reduce los niveles de Yy1 y de ST2s que habían aumentado a raíz de un IM o de un estrés biomecánico en células H9C2.

- 5 Teniendo en cuenta que Yy1 activa la transcripción de ST2s tras un IM o estrés biomecánico, los resultados sugieren que HDAC4, que es capaz de interaccionar con Yy1 (Han S et al., recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription. *Biochem J.* 200615; Mathiyalagan P. et al., Chromatin modifications remodel cardiac gene expression. *Cardiovasc Res.* 2014), impide que Yy1 active la transcripción de ST2s. La fosforilación de HDAC4
- 10 impide su importación al núcleo celular (Backs J et al., CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest.* 2006; Walkinshaw DR et al., The tumor suppressor kinase LKB1 activates the downstream kinases SIK2 and SIK3 to stimulate nuclear export of class IIa histone deacetylases. *J Biol Chem.* 2013; Wang X. et al., YY1 restrained cell senescence through repressing the transcription of p16. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.*
- 15 2008), por lo que su defosforilación favorece su importación al núcleo, donde puede interaccionar con Yy1, traduciéndose en la represión de la transcripción de ST2s. En resumen, un compuesto que promueve un aumento en la expresión de HDAC4, y/o reduce su fosforilación, también resulta en una reducción de la expresión de ST2s por la inhibición de la actividad de Yy1. Por tanto, en una realización preferida de la invención, en el método de cribado descrito en el segundo aspecto de la
- 20 invención, también se incluye, en el paso b) determinar si la administración de dicho/s compuesto/s en comparación con células cardíacas, preferiblemente sometidas a un estrés biomecánico similar o idéntico al que produce un IM, a las que no se les administra/n resulta en:

- un aumento de los niveles de la proteína histona desacetilasa 4 (HDAC4) o de la expresión del gen que codifica la proteína HDAC4 y/o

- 25 - una disminución de los niveles de fosforilación de la proteína HDAC4 y/o

- un aumento en la cantidad de proteína Yy1 que está unida a HDAC4 y/o

- un aumento de la expresión de la Interleucina 33 (IL33) o de la expresión del gen que codifica la proteína IL33, y/o

- una disminución de los niveles de ST2s o de la expresión del gen que codifica la proteína ST2s, y

- 30 c) seleccionar aquellos compuestos que producen uno o varios de los efectos descritos en b).

Los métodos para determinar el aumento o disminución de los niveles de proteína, o de expresión génica de las diferentes proteínas mencionadas en esta realización preferida de la invención, se realizarán de manera similar a la descrita anteriormente en el segundo aspecto de la invención. En

cuanto a la medición de los niveles de fosforilación de HDAC4, de nuevo se utilizarán los métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo el western blot, la inmunohistoquímica o el uso de FACS. Para comparar la cantidad de proteína Yy1 unida a HDAC4 en presencia y ausencia del compuesto, se podrán utilizar metodologías conocidas en la técnica, como por ejemplo la inmunoprecipitación de Yy1 y seguida por un western blot para detectar proteína HDAC4 unida a Yy1.

Para evaluar o confirmar el efecto terapéutico de los compuestos que producen los cambios descritos en las reivindicaciones anteriores, el compuesto se administra a animales modelo de infarto de miocardio, y se evalúa el tamaño del infarto tal y como se observa por ejemplo en la Figura 6b de trabajo de Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011. La evaluación del tamaño del infarto se puede hacer utilizando la metodología conocida en la técnica, como la resonancia magnética o especialmente al utilizar animales modelo por cirugía. Los animales modelo podrán ser animales modelo de laboratorio, preferiblemente, ratas, ratones o cerdos, a los que se les realiza un ligamiento de la arteria coronaria descendiente. Por tanto, un tercer aspecto de la invención consiste en un método donde además de los pasos descritos en cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención, se incluye un paso d) en el que se evalúa en animales modelo de infarto de miocardio no humanos, preferiblemente en mamíferos no humanos, si la administración del/de los compuesto/s evaluado/s en los pasos a) y b), o seleccionado/s en el paso c), reducen el tamaño del infarto de miocardio.

El método de cribado también se puede realizar para determinar los rangos de administración más adecuados para conseguir la mayor eficacia del compuesto terapéutico. Por tanto, en otra realización de la invención, se determina un rango de cantidad del/de los compuesto/s administrado/s que provoca con mayor intensidad los efectos descritos en cualquiera de las reivindicaciones de los aspectos 2 y 3, preferiblemente el efecto descrito en el segundo aspecto de la invención que se refiere a los niveles del factor de transcripción Yy1, en muestras biológicas *in vitro*, o en animales modelo no humanos.

En cualquier caso, los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes como para producir el deseado efecto de recuperación cardíaca tras un IM. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, o similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la agresividad del IM, la vía de administración, o si se están administrando otros fármacos adicionales. La dosis puede variar, y puede ser administrada en una o más administraciones, pueden ser dosis diarias, durante uno o varios días. Se pueden encontrar orientaciones en la bibliografía para las dosificaciones apropiadas para las clases dadas de productos farmacéuticos.

La composición que comprende el compuesto de cualquiera de las realizaciones anteriores del segundo y tercer aspecto de la invención puede estar formado por el compuesto que se está testando en el método de cribado, y un vehículo farmacéutico aceptable. En este sentido, la composición farmacéutica resultante se puede administrar *in vivo* a un animal modelo no humano. El vehículo, naturalmente, se selecciona para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como es bien conocido para un experto en la técnica y tal y como está indicado en las definiciones. . La proporción de compuesto y de vehículo farmacéutico adecuadas se podrá determinar haciendo uso del mismo método de cribado descrito anteriormente. Por tanto, en una realización particular de la invención, se determina un rango de cantidad de compuesto testado por el método de cribado y de vehículo que provoca con mayor intensidad cualquiera de los efectos de los aspectos 2 y 3 de la invención, preferiblemente el efecto descrito en el segundo aspecto de la invención que se refiere a los niveles del factor de transcripción Yy1. En otra realización preferida de la invención, se determina el modo de administración del compuesto que provoca con mayor intensidad cualquiera de los efectos de los aspectos 2 y 3 de la invención en animales modelo no humanos, preferiblemente el efecto descrito en el segundo aspecto de la invención que se refiere a los niveles del factor de transcripción Yy1. En una realización preferida, en el método de cualquiera de las realizaciones del segundo y tercer aspecto de la invención, la librería de compuestos está formada por biguanidas. Dado que la metformina es un compuesto bien conocido por su capacidad para tratar la recuperación tras un IM (Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; Bhamra GS et al., Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*. 2008; Calvert JW et al., Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 2008; Paiva M et al., Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; Gundewar S. et al., Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*. 2009)) y que como se ve en los ejemplos 1 a 4, reduce la expresión y los niveles de proteína Yy1, aumenta los de HDAC4, reduce la fosforilación de HDAC4 y reduce a expresión de ST2s y, por último, reduce el tamaño del infarto de miocardio (Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011), este compuesto se puede utilizar como compuesto de referencia, o cómo control positivo, en los métodos de cribado descritos en el segundo y tercer aspecto de la invención. Por tanto, en otra realización particular de la invención, en el método de cualquiera de las realizaciones del segundo y tercer aspecto de la invención, la metformina se utiliza como control positivo.

Un cuarto aspecto de la invención hace referencia a un producto que contenga la información de los resultados obtenidos por el método de cribado descrito en cualquiera de las realizaciones anteriores.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia a un método de obtención de uno o más compuestos que comprende la identificación del/de los compuesto/s según cualquiera de las realizaciones del segundo y tercer aspecto de la invención y su aislamiento y/o purificación.

Descripción de un modo de realización preferente de la invención

Materiales y métodos

A. Modelo animal.

Animales

10 Se usaron ratas Wistar macho adultas (con un peso entre 220-250 g, y con 6-8 semanas de edad). Todos los protocolos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad (A13150105). Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio, en unas instalaciones libres de patógenos y bajo estricta vigilancia veterinaria. Mantenidos en habitaciones controladas con ciclos de luz/oscuridad de 12h, los animales recibieron dieta comercial de ratas y agua *ad libitum*.

15 Inducción del IM experimental en ratas.

El IM agudo fue inducido mediante ligación permanente de la arteria coronaria anterior descendente izquierda (LAD). Para demostrar la elevación del ST y, por tanto, confirmar el éxito de la cirugía, se utilizó la electrocardiografía. El grupo control fue sometido al mismo procedimiento que los otros grupos excepto a la ligadura de la LAD.

20 Grupos experimentales y diseño.

Los animales fueron divididos en tres grupos:

- Ratas operadas sin LAD (grupo sham, n=10) y con placebo (0.9% NaCl en gelatina).
- Ratas operadas sin LAD (grupo sham + MET, n=10) y tratamiento con metformina: 250 mg/kg de dosis oral diaria, administrada en gelatina.
- 25 - Ratas operadas con LAD y con placebo (grupo MI, n=15).
- Ratas operadas con LAD y tratamiento con metformina: 250 mg/kg de dosis oral diaria, administrada en gelatina (grupo IM+MET, n=20).

La administración de metformina comenzó tres días antes de la inducción del IM y se mantuvo hasta el sacrificio, el cual se realizó entre 1 y 4 semanas después de la inducción de IM. La dosis de

metformina se fue ajustando semanalmente de acuerdo al peso corporal de cada animal. La metformina usada se adquirió de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO).

El día del sacrificio, el área infartada del ventrículo izquierdo (VI) fue cuidadosamente extraída y procesada para su análisis. Las variables de la función del VI fueron valoradas usando una ecografía transtorácica. En el momento del sacrificio se cuantificó la concentración de metformina en plasma con HPLC (High-performance liquid chromatography).

Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.

Tejido fresco procedente del VI fue lavado usando PBS en frío y triturado en baño de hielo de forma manual usando un bisturí. El aislamiento del ARN y la RT-PCR cuantitativa se llevaron a cabo siguiendo los protocolos usados anteriormente por el grupo (Lax A et al., Mineralocorticoid Receptor Antagonists Modulate Galectin-3 and Interleukin-33/ST2 Signaling in Left Ventricular Systolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction. *JACC Heart Fail.* 2015), sin ninguna modificación significativa.

Fracción proteica y *Western blotting*.

Aproximadamente 30 mg de miocardio infartado fueron homogeneizados por sonicación y centrifugados a 20.000 xg durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante fue alicuotado y congelado a -80°C. Las fracciones citosólica y nuclear fueron separadas usando el método descrito por Dimauro I. et al. (Dimauro I, et al., A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes.* 2012). La concentración proteica fue determinada por el método del ácido bicinonínico (Smith PK, et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985). El *Western blotting* se realizó con un sistema de electroforesis con SDS-PAGE.

Las bandas inmunoreactivas se detectaron usando ECL y mediante el uso del sistema *ChemiDoc™ XRS+* con el software de imagen de *BioRad Laboratories Inc. (Berckley, CA)*. Un análisis cuantitativo se realizó con el programa *Gel-Pro Analyzer 3.1* de *Sigma*.

B. Modelo celular.

Modelo de estrés biomecánico.

Células H9c2 fueron mantenidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 2 mM de glutamina y 10% FBS. Para la realización de los ensayos, las células fueron privadas de suero durante 24 h. El estrés biomecánico se llevó a cabo siguiendo el diseño

experimental de Neshati Z et al. (Neshati Z et al., Development of a new model of cardiac hypertrophy with pro-arrhythmic features to study the role of hypertrophy in arrhythmogenesis. *Eur Heart J.* 2013).

Inmunofluorescencia.

- 5 Inicialmente las células fueron fijadas con formaldehído al 4% (v/v), permeabilizadas con Triton X-100 y tratadas con el potenciador de señal *kit Image-iT™ FX*, siguiendo el protocolo experimental descrito por Thermo Fisher Scientific (Molecular Probes, I36933). A continuación, las células se incubaron a 4 °C durante toda la noche con los anticuerpos anti-Yy1 (dilución 1:1000) y γ -Tubulina (dilución 1:1000) y posteriormente a 37 °C durante 1 hora con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor® 488 (dilución 1:200) o anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 593 (dilución 1:200). La fluorescencia de las células se analizó con un equipo confocal de Leica Microsystems seleccionando las ventanas de emisión en 508–550 nm y 610–650 nm, respectivamente. Además, los núcleos fueron teñidos usando DAPI.

Silenciamiento por *small interfering RNA* (siRNA)

- 15 siRNA específicos de Yy1 ó siRNA control (Dharmacon, Lafayette, CO) fueron usados para transfectar células usando *Lipofectamina 2000* de acuerdo con el protocolo proporcionado por la casa comercial. Para prevenir efectos *off-target*, se usó una mezcla comercial de cuatro siRNAs específicos (ON-TARGETplus™ Yy1), descritos previamente (Liu Q. et al., Prostaglandin F2alpha suppresses
20 rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. *Endocrinology.* 2007). El gen estudiado fue Yy1, mientras que GAPDH fue usado como gen de control interno. Las secuencias diana fueron:

ON-TARGET plus SMARTpool siRNA Yy1	Secuencia diana (5'-3')
J-091624-05	CAUCUUAACACACGCUAAA
J-091624-06	AGGGAUAACUCUGCUAUGA
J-091624-07	GGGCGACACCCUCUACAUU
J-091624-08	GCGCCGACCCGGGUAUAUA

Se incubaron células H9c2 en placas de seis pocillos en medio completo. Al día siguiente, estas células fueron transfectadas usando 25nM de cada uno de los siRNA durante ocho horas, seguidas de un periodo de recuperación en medio con suero. Tras 24h de la transfección el cultivo celular se lavó dos veces con PBS atemperado a 37 °C, antes de iniciar los tratamientos.

5 Extracción de ARN y RT-PCR cuantitativa.

Las células fueron sedimentadas por centrifugación a 480 xg, durante 10 min a 4 °C. Para el resto del procedimiento ver modelo animal.

Fracción proteica y *Western blotting*.

10

Ver modelo animal.

Análisis estadístico

15

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar o desviación estándar según se indica. Se realizaron análisis para muestras independientes y pareadas, o análisis de la varianza, según correspondiera en cada caso. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS statistics v. 19 (SPSS Inc., USA), y los gráficos fueron construidos mediante el programa SigmaPlot v. 11.0. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

20

Resultados

1- Efectos protectores de la terapia de metformina.

Con el objetivo de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para tratar pacientes con IM, se buscó un mecanismo regulador de la cascada de señalización IL-33/ST2. Para ello se buscó un compuesto capaz de tratar pacientes con IM y que actuara sobre dicha cascada de señalización, para utilizarlo como condición de referencia. La metformina es ampliamente conocida por su capacidad terapéutica tras un IM (Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; Bhamra GS et al., Metformin protects the ischemic heart by the Akt-mediated inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Basic Res Cardiol*. 2008; Calvert JW et al., Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 2008; Paiva M et al., Metformin prevents myocardial reperfusion injury by activating the adenosine receptor. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; Gundewar S. et al., Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res*. 2009). En efecto, Yin M. et al. muestran como el tratamiento con metformina reduce el tamaño del IM en ratas tratadas con metformina (Figura 6B en Yin M et al., Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat

25

30

35

model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011). Por tanto, se examinó si el efecto terapéutico de la metformina tras un IM está relacionado con el sistema IL-33/ST2. Para ello analizamos la modulación espacio-temporal de la señalización IL-33/ST2 mediante RT-PCR cuantitativa y Western Blot con (+) y (-) metformina y (+) y (-) IM. Los niveles de expresión de IL-33, ST2L y de ST2s aumentaron una semana después de provocar un IM y se mantuvieron elevados 4 semanas después, en comparación con el grupo sham ($p < 0.001$) (Figura 1 A-C). La terapia de metformina se asoció con un incremento de IL-33 y una reducción de ST2L y de ST2s a nivel de ARNm (Figura 1 A-C). Se obtuvieron resultados parecidos al evaluar los niveles de proteína IL-33 y ST2s por WB (Figura 1, paneles D y E). En ausencia de IM, la terapia de metformina no cambió los niveles de expresión de ARNm ni los niveles de proteína. Por tanto, parece que tras un IM, la metformina aumenta los niveles de IL33 y reduce los de ST2L y sST2.

2- Respuesta de los factores que actúan en trans Yy1 y HDAC4 al IM y a la terapia de metformina.

Los niveles de expresión del factor de transcripción Yy1 mostraron un aumento considerable tras 1 y 4 semanas de haber provocado un IM, de manera similar a los cambios de ST2s (Figura 2A). En efecto, los niveles de expresión de Yy1 se correlacionaron positivamente con la expresión de ST2s ($r_s = 0.362$, $p = 0.018$). La terapia de metformina resultó en una reducción de los niveles de expresión de Yy1, al cabo de 4 semanas de haber inducido el IM y tras la prolongación del tratamiento con metformina hasta la semana 4 ($p < 0.001$) (Figura 2A). El análisis del extracto proteico citosólico y nuclear de la zona infartada también mostró un aumento de la acumulación de proteína Yy1 en el núcleo, en comparación con el grupo sham ($p < 0.001$, Figura 2B). La administración de metformina también redujo significativamente los niveles de proteína Yy1 en el núcleo ($p < 0.001$). En ausencia de IM, la terapia de metformina no modificó la distribución de Yy1 en comparación con el grupo sham. Por tanto, el efecto terapéutico de la metformina parece estar relacionado con una regulación de la expresión del factor de transcripción Yy1 tras un IM.

Tal y como se muestra en la Figura 3A, no se observó un cambio significativo de HDAC4 a nivel de ARNm tras un IM en comparación con el grupo sham. Sin embargo, la terapia de metformina indujo un aumento significativo de ARNm HDAC4 al cabo de 1 semana. Este efecto fue mayor cuando el tiempo de tratamiento se prolongó hasta 4 semanas ($p < 0.001$) (Figure 3A). Las ratas tratadas con metformina en ausencia de IM también mostraron niveles elevados de HDAC4 ($p < 0.001$) en comparación con el grupo sham. Cuando se evaluaron los niveles de proteína HDAC4 al cabo de 4 semanas, los resultados fueron similares (Figura 3B). Para determinar el papel de HDAC4 en la regulación de la actividad de Yy1, estudiamos los niveles de fosforilación y la distribución de HDAC4 en tejidos infartados (Figura 3C). El análisis por WB de los extractos proteicos citosólicos y nucleares mostraron un aumento en la acumulación de proteína HDAC4 fosforilada en ratas infartadas

en el citosol ($p < 0.001$). El tratamiento de metformina redujo significativamente estos niveles ($p < 0.001$). En ausencia de IM, el tratamiento de metformina no alteró la distribución de HDAC4 fosforilada (Figura 3C). En conclusión, la reducción de la fosforilación de HDAC4 resultado de la administración de metformina induce la translocación de HDAC4 al núcleo, donde al actuar como co-represor del factor de transcripción Yy1 termina bloqueando la expresión del gen que codifica ST2s.

3- Yy1 modula la expresión de ST2s.

Para evaluar si Yy1 participa en la modulación de la expresión del gen codificante de ST2s, y para evaluar la implicación de HDAC4, utilizamos un modelo bioquímico de estrés celular. Los patrones de expresión génica resultantes se analizaron por RT-PCR cuantitativa y por WB. Como se muestra en la figura 4, y de manera similar a los resultados obtenidos con tejidos del VI infartados, el estrés biomecánico se asoció con un aumento de IL-33 ($p < 0.001$), ST2s ($p < 0.001$), Yy1 ($p < 0.01$) y no afectó a la expresión del ARNm HDAC4. La terapia de metformina no afectó a la IL-33 pero redujo de manera significativa los niveles de expresión de ST2s ($p < 0.001$), Yy1 ($p < 0.001$) y aumentó los niveles de expresión del ARNm HDAC4 ($p < 0.001$) (Figura 4 A-D). Se obtuvieron resultados similares al evaluar los niveles de proteína ST2s por WB (Figura 4E). Además, cuando estudiamos la distribución celular de HDAC4 fosforilada, los resultados fueron similares a los obtenidos en el modelo animal (Figura 4F). En ausencia de estrés biomecánico, la terapia de metformina no cambió los niveles citosólicos de la proteína fosfo-HDAC4.

Para evaluar si Yy1 está implicado en la modulación de la expresión del gen que codifica ST2s, se utilizaron pequeños ARNs de interferencia (en inglés small interfering RNA, "siRNA") para silenciar Yy1. La eficiencia inhibitoria de siYy1 sobre la expresión endógena de Yy1 se verificó por RT-PCR cuantitativa, WB e inmunofluorescencia por microscopía confocal (Figura 5). Como muestra la figura 5A, el aumento en la expresión del ARNm Yy1 inducido por el estrés biomecánico ($p < 0.001$) se bloqueó completamente al silenciar la expresión de Yy1 utilizando un grupo de 4 siRNAs específicos ($p < 0.001$). El silenciamiento de Yy1 no tuvo efecto en ausencia de estrés biomecánico. En un ensayo paralelo, descartamos la posibilidad de un efecto "off-target", al estudiar individualmente el efecto de cada siRNA sobre los niveles de expresión de los ARNms Yy1 y ST2s. Como se muestra en la figura 6, los resultados fueron similares a los obtenidos cuando utilizamos un grupo de 4 siRNAs (Figura 5A). Como muestra la figura 5B, el estrés biomecánico aumentó la expresión de ST2s ($p < 0.001$); sin embargo, en células donde la expresión de Yy1 fue silenciada, el estrés biomecánico no resultó en un aumento de ST2s intracelular; y finalmente, el silenciamiento de Yy1 en ausencia de daño no tuvo efecto en la expresión de ST2s, en comparación con el respectivo control. Se obtuvieron resultados parecidos cuando se evaluó el nivel de proteína ST2s por WB (Figura 5C). La expresión génica de ST2L no se vio alterada cuando Yy1 endógeno se silenció (Figura 5D). Utilizando estos modelos de estrés celular, probamos la activación de Yy1, y la efectividad del silenciamiento génico por inmunofluorescencia (Figura 5E). Un incremento en la

tinción nuclear de Yy1 en células bajo estrés biomecánico, en comparación con las condiciones control, corroboró que Yy1 se activa en respuesta a estrés biomecánico. Imágenes representativas se muestran en la figura 5E; en este caso, el color violeta en imágenes superpuestas es coherente con la localización nuclear de Yy1. Un análisis de co-localización proporcionó un coeficiente de Pearson de 0.96 ± 0.04 y un coeficiente de Manders de 0.98 ± 0.02. De manera similar, el silenciamiento de Yy1 endógeno previno este efecto mediado por estrés biomecánico.

En conclusión, el bloqueo de la expresión de ST2s tras el silenciamiento del factor de transcripción YY1, demuestra que Yy1 está implicado en la modulación de la expresión de la isoforma ST2s.

10 SEQ ID 1

YY1 (Homo sapiens, humans)

>NC_000014.9:100238765-100279034 Homo sapiens chromosome 14, GRCh38.p7
gene="YY1"
gene_synonym="DELTA; INO80S; NF-E1; UCRBP; YIN-YANG-1"
15 mRNA_join(1..1159,23540..23702,35934..35994,37726..37884,
38654..40270)
product="YY1 transcription factor"

20 5' - AGGGCGAACGGGCGAGTGGCAGCGAGGCGGGGCGGGCTGAGGCCAGCGCGGAAGTCTCGCGAGGCCGGGC
CCGAGCAGAGTGTGGCGGCGGGCGGCGAGATCTGGGCTCGGGTTGAGGAGTTGGTATTTGTGTGGAAGGAG
GCGGAGGCGCAGGAGGAAGGGGGAAGCGGAGCGCCGGCCCGGAGGGCGGGAGGAGGCGCGGCCAGGGCGG
GCGGTTGCGGCGAGGCGAGGCGAGGCGGGGAGCCGAGACGAGCAGCGGCCGAGCGAGCGCGGGCGCGGGC
GCACCGAGGCGAGGAGGCGAGGGAAGCCCCCGCCGCGCGCGCGGCCCGCCCTTCCCCCGCGCCCGCC
25 CCCTCTCCCCCGCCCTCGCCGCCTTCCCTCCCTTCGCTTCCCTTCCCCACGGCCGCGCTCCTCGC
CCGCCCCCGCGCAGCCGAGGAGCCGAGGCCGCGCGCGCGTGGCGGCGGAGCCCTCAGCCATGGCCTCGG
GCGACACCCCTCTACATCGCCACGGACGGCTCGGAGATGCCGGCCGAGATCGTGGAGCTGCACGAGATCGA
GGTGGAGACCATCCCGGTGGAGACCATCGAGACCACAGTGGTGGGCGAGGAGGAGGAGGAGGACGACGAC
GACGAGGACGGCGGCGGTGGCGACCACGGCGGCGGGGGCGGCCACGGGCACGCCGGCCACCACCACCACC
30 ACCATCACCACCACCACCACCCGCCCATGATCGCTCTGCAGCCGCTGGTCAACGACGACCCGACCCAGGT
GCACCACCACCAGGAGGTGATCCTGGTGCAGACGCGCGAGGAGGTGGTGGGCGGCGACGACTCGGACGGG
CTGCGCGCCGAGGACGGCTTCGAGGATCAGATTCTCATCCCGGTGCCGCGCCGGCCGGCGGCGACGACG
ACTACATTGAACAAACGCTGGTCAACGTGGCGGCGGCCGGAAGAGCGGCGGCGGCGGCTCGTCGTCGTC
GGGAGGCGGCGCGCTCAAGAAGGGCGGCGGCAAGAAGAGCGGCAAGAAGAGTTACCTCAGCGGCGGGGCC
35 GGCGCGGCGGGCGGCGGCGGCGGCCACCCGGGCAACAAGAAGTGGGAGCAGAAGCAGGTGCAGATCAAGA
CCCTGGAGGGCGAGTTCTCGGTCAACATGTGGTCCCTCAGGTGAGCGCCGCGCGCGCCCCGGCCCCGGG
ATGTTTTTGTGTTTGAAGGGAAGCCATGTTTTATGTGTGTGATGGGCGCCGCCATCTTCTTCGCCAGGGCA
AGTATGGCGGCCCCAAAAGATGGCGGGCCGTGCGGCGGCGGGGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGGC
CGCGAAGATGGCGGCAGGCCGCGGGGGGAGGGGCGGCGCCCGCCGGCTAGGCCGCAATGGCGTAGTTT
40 CTCCGAGAGGGGGAAGCGCCGCGGGGCGGAGACGGCCGGGGGAGGGGCGGCGCGCTCGCTCCCCGAC
GCCCTCGCTCCCCGCGCCGCATCAACGGGCGCGCCCGCGCGCCGTTGTGGCGGCGAGTGCAGCGCCCCC
GGCCCCGGGCGGGACGCGGGAGGTGCTTGGCGGGGCTGCGCCGCGGCCTCGCGGGCCAGGGATTGCTGCCT
CCGGGACGCGCGCCCCCGCCCCCGCCGCGCTGCCGTTACCCCATCGGCCGCTGGAGGGCGCCGCGGGC
GCTTGCCCCGCCCCGCCCAACTTCCCCGGAATCCCAACTGCTCCCCGGTGGCACCTTCCAGAAGGAGGG
45 GGCTTGGCACTCGTGGGCGCCCTCCGGCCTCCTTGCTCCCCGCCACCCAGCGCCGGGCTGGACCCTGCC
CCGGCGGTACGCTCGCCCAAGTCGTCGTTTGTGCGGGGCGGGACTTGGGGCTGCACGTAGGGCTCGCG
TGTGCGGGCTCCGAGCGTCAGTCGGAGCCTGTCACCGCGTGGCAGCGAATTCCTGGCCTTTTCGCCTT
CCTGCGGTACCTAGTGGAAAGGGCCTGTGAATGTTAGCGAATAATTCTTAGTCACTTACGTTTTGGGAAA
GCTTTTTTTTTTTTCCCTCAAGTATTTAGCTCTTCTGAATAGGTTGGGTTAGTTTACTCAACTGTGGACAT
50 TTGCCAGTAAATAAAATCGGGTAGTTTAATTTTAAGCCTTTATGGTTTTTACTTTGTAGAAAGGTATCTA

TTTTCCCATGAAAAGAACGATAATAGAAAGCGGGTTTTTTTGGAGTTTTGTTTTACTGTTTTAATACTAC
 TTTTAACGAAGGCCTGAAAACCATCTAGAGCAAAGGATCTTATCTGCCTGTGTAAAATCTGTTTTTACT
 TCAAAGGCAATTATTAATTCAATGCTGGTTTTTTTAGGTCAGTATCCTATTAGTATATTTCATATGCTACCT
 AGCTAAATTGCTGAGATACTAAATAGACTGAGAATAATCCTGCCATCGTAGTTAATCTAATGCCTGTGAT
 5 GATTACGTTTAGTACTCCATATAAGCGGTGGAACCTCTTCCCTATAAGTACTTTAAAGCTTCATAAATTC
 TCAGAACTGAATGGAGACTCAAAATATGGTGACCTTTGAGTATTTAAAGATCGTTAAATTCGGAGGAAT
 GAATGAAACAGAAATGAAAAGGCTGGACTGAAAAAGCTAGTTTGTATCTGGTGAAAGCCTCAAGATGAGA
 CAACTACAGCTGGGTGGATCTGTGATTGAAAGAGGCCTGAGCAAAGGGATCTAGGAGCTGTCAAAATCTA
 ATAGGAAGGTGCTAACAGGCGCTGTCTGCATCCAGGGTGCCTTGTAGAATTCATAGCAGTTTGAGTTTA
 10 GCAGAACTATGTTTAAATGAAACATGAATACTTTAGTACTTAATGGTTATCAAAAGATAATTTCCATGT
 ATTTTGGTAGCTCAAGAGATTACATACTGATCATGTTGGAACATAAAGTCATGGTTTTGGCCGGGCGCGG
 TGGCTCACGCCCTGTAATCCCAGCAGTTTGGGAGGCTGAGGCCGGTGGATCACTTGAAGTCTGGAGTTCGA
 GACCAGCTGGCCATCATAGTGAACCCCATCTCTACTAAAAATATAAAAATTAGCCAGGCGTGATGGCGG
 GAGCCCGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGCAGAGGTAA
 15 CAGTGAGCCGAGATTGCACCATACTCCAGCCTGGGTGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAGGGGGG
 GGGGGGCATTTTTTTTTTGTAAATACCAATGAGTAAGGGATGGGGTTTTAGTTATTGATGAATTTGCAGA
 ATTCAGAATACGATTTGAAATAAGATATTTAGGTAAAGATACATTAACCACAAAAGTAAATTTACTTTTT
 CTCATAGTGTGTGGAATTAGAGGAATTTAGAAAACCGACATATTTTACATGATCTGCATTTTATCTTAA
 CAAATTGCTGGTCCACTTTTCCACATCCAGAGAAGCTGGTAGTGTACGGCTTTGCTTGCTGAAGTGGTAT
 20 GTATGGAGTCAGCCAGTTAGGGGAGAAAGTCTGAGGGGCTTGACTGATGGAAGTCAATTTACAATTAAGT
 GAGCATTTACAAGTGTGCAAGTGGCTGTTTTGTTTTGTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTGAGATGGAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGCTGGTGTGCAAGTGGCATGATCTCGGCTCACGGCAAGCTCC
 GCCTCCCGAGTTTACGCCATTCTCCTGCCTCACCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCACCACCA
 CGCCCGGCTAATTTTTTGTGTTTTTAGTAGAGACAGGGTTTCACCATGTTAGCCAGGATGGTCTTGATCT
 25 CCTAACCTCGTGATCCGCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGCGCCCA
 GCCAAGTGGCTGCTTTTAAGGTGGCACAGTTTGGGGTTGTTTTCACGTCCGTTTCTTTCTCTCTTTTC
 TTTTTTAATTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGTACGATCTTGGCTCAC
 TGCAACCTTCACCTCCCGGATTCAAGGGATTCTCATGTCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTGCAGGCA
 TCCACCACCACCCCTGGCTATAATGTCCATTTCTTTAAAGCGCTGGTTGTCTAGCTAGTGTGGTAGAGTA
 30 CGCTGTGCATAAGGGTAGTTATAAATATTTGATGGCAGTAACATAGGATGGCCTGTTTCTCGGACATGTG
 TTTTGTGGTAACTATCCCCCTTACTTTTCTTGTGATTTGGAATTATTACTAAAGAGAAGCTAAAGAGC
 TTATGGATAACTCTGCATTTCCCAAGCTGAAATCTGAAGGTGATTTTCATCTTCAGAACTGAAATGACGT
 GATATACTCAGTATAATTCATAACAAGTGGAGAAATGAAAGTGGGTTAATTGTTGGGTAAATCTGTATG
 TATGTGTACATATGGTTGAGCATGGTGGGCAGCATTAAGTCTTCTGTTACTTGATCTCATTTGATCCT
 35 AGGCGTAGAGTTTTAACTACACTTTAGTTTCACTAAAAATAGCCCTTAGTTTGAATGAAGTGTGAAGT
 AACAGTTTTGCATAAGCCCCAAGCTGAGTTACTTGAAGTCTTATAAAAAATAGTTGTACATACAGGGTAT
 TCCCCGAGGGTCTAGTTACTTCTTAGACCCTCTTGGTTTTAAAAAGCAAAAAGATCAGGCTGGGTGCAGTG
 GCTCACACCTGTAGTCCCAAGACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGAGGATCGCTTAAGCCCAGGAGTTCGAGA
 TGAACCTTGGCAATATAGTGAGACCCCGTCTCTGCAAAAAAACAAAAACCCACAAAAATTAGCCAGTC
 40 ATGGTAGCACATGCCTGTAGTCACTCTCAGCTACTTGGTAGATTGAGGTGGGAGGATCTCCTGAGCCTGG
 GAAATCGAGGCTGCAAGTCAGCGGTGATTACACCACTGTACTCCAGCCTAGGTGACAGTGAGACACTGTC
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTGGCCGGGCGCGGTGGCTGACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAG
 GCGGGTGGGTACAGAGCTCAGGAGATCGAGACCATCCTGCCTAACACGGTAAAACCCTGTCTCTACTAAA
 AATACAAAAAGAAATTAGCCGGGCGCTGTGGCGGGTGCCTGTAGTGCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCA
 45 GGAGAATGGCGTGAACACGGGAGGCGGAGCTTGCCGTGAGCCGAGATAGCGCCACTGCACTCCAGCCTGG
 GCGACAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGTGGGAGTCATCATATTTCTGGAACCC
 AAATGGGTTTTCTTTTGGCACATGCCATGTTCTTTAATTTCCACAGTAAGAGCACTCTGGTGGGCATC
 TTTTGAATGTAATATCAGTATAGGAATCTAATAGTTTTTTTAGTAGTTTTTAGGCCTTATAGGATCCTTAGA
 GATTGGCTTTTTTTTTTCTTTTTTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGGGGTCTCACTCTGG
 50 CACCCAGGTTTTGAGTGCAGTGTGAGATCTCGGCTCACTGCAACCTCCACCTCCGAGTAGCACGTGCCAC
 CATGCCTGGCTAATTTTGTGTATTTTTGGTAGAGACGAAGTTTCGCCATGTTGCCAGGCTTGTCTTGA
 ACTCCTGATCTCAGGTGATTACCCACCTCGGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTACCAACCTGCCCGCCCCA
 CTCCCCACCCCTTACTTTTTTTTTTTTTGAGGCAGGGTCTCATTCTGTACCCAGGCTAGAGTGCAGTGAGA
 CAGTCACGGCTCACGGCAGCCTCAACCTCCCGGGCTGAAGCGATCCTCCACCTCAGCCTTCCAAGCAGC
 55 TGGGACCACAGGCTAATGTTTTAATTTTTTAGGCATGGGGTCTCCTTATGTTGCCAGGCTGGTGTCAA
 CTCTGGGCTCCAGCAATCCTTCCCTCAGCCTTCCAGAGTGATGGGATTATGGGTGTGAGCCACTGTGCCT
 GACCTCTTTATTTTTTCTAAATTTTTAATTTGTGCATACACATGTTTAGTTTCTTCTGTATTTATTTTTAT
 TTATTTATTTTTTATTTCTTATTTTTTTTTTGGAGACAGAATCTCGCTCTGTACCCAGGCTAGAGTGCAGT
 GGCACGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCACCTCCCGGGTTACACCATTTCTCCTGCCTCAGCCTCCAGAG
 60 TAGCTGGAACCTACAGGCGCCCGCTGCCACACCCGGCTAATTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTC
 ACCATGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCCGCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTG

GGATTACAGGCGTGAGCCACTGCGCCTGTCTGTTTCTTCTGTATTTAACCTGAATATACTTAACTGTTT
 AGTGTGTGAGAGAACTCTGTGCATCTGGAGTTTTTTAGTTGTTGCTTTTTTAAATTAGAGATGGGGTCTTG
 CCTTGTTGCCTAGGCTGGCCTTGAATTCCTGGGTTGAGAGTATCTTCTGCCTCAAATTCCTGAGTAACT
 5 GGGACTACAGACACCCAGCTTCAACTATGTTTTGAATAATCTTAATCAATTGCTTTAATGCCAGTGTTTA
 CTTTGGCCTTTTTTCACTATATATGATTAATAAACATTTTCACTGTTGATAGATTGGGGCACAGTACTATAT
 ATTTTTTCCCTAGATACTAATGCTGTTACATAGGAGTAACAGTTGTTGTGGGGTTTTTTGGGTTTTTTTT
 GAAACGGAGTCTCGCTTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCAC
 CTCCCGGGTTACAGACATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAACCTGGGATTACAGACGTGTGCCACCATG
 10 CCCGGCTAATTTTTGTATTTTTAATAGAGTCTGGGTTTCTCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCAAACCTCT
 GACTTCAGGTGATCCACCCACCCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGACGTGAGCCACCGCGCCAG
 CCAGGAGTAACTGTTTTATAACTTAGTTAATTATAAACTAAGCCACTTAACCATTGCATTTAATAGGGAA
 GATAATGATAAAACTGAGAATTTAAACATTTAGTTTACAGAGAGAAATTTAGGTGATTTTAAATCTTGA
 GATTTTCAAGTGGTGACAACTGTGACCTCTCTAAGGCTGTTGATATTTAATTTCGGAGCAGAAGTTGCA
 TTGCCATGTGCATAAACTGCCGCATAGATGCCCTGGAACCTGGAAACAAGCCAGCATGTCCATGGTCACC
 15 CCCACCCCGTTTCCATTTCCATACATGGGTTTTGTGAGGTGAGGCCATCATGTGCATAGTGCCTGCCAT
 GGCTAATGAGGATAGCACAGGTGCGGGGCCAGTGTCCCCCATTCTGTCCCGTGCCAGTCAGCACAGCT
 TGGGTTGTGGGGGACATGTGCCTTCTCAAAGTGCTGGCAGCTGAGTGGCACCTCCTTCACGCCTAGGAGT
 CGATGGTCCCTCCCTGGTGTGCCAGGTTGGCCTCATGCTCCGGGTAGAGAACCCTTGTGTTGGACCTTG
 TGGGGATGTGGGGTGGTGAGACCCACCTGAGCTGTGACCTTCTGAGAGGAGACAAATTAACCTGCTGAA
 20 GGAGAGGCCAAAATAATAATCATTATTCTGTTACACTGAATAGAGAAGCGGCTTGTGCTGGATTAAGCAA
 AACCTGTAAGACCAGAAAACCATTTGATACAAATCAGTAAATGCAAGGAAGTTGAAATGCATTGAATTTT
 TCCCAATTTTATAAGTTTCAAGATGCAGGTTTGCACAAATCACTAGTCATGACCGTTTGGCATTCTCTC
 TGTGGGTTTTTACACCCCTCCCTCCCGAGTAGAACTGCGCTGTTTATCACTAAGATGCTATAAACATGA
 ATTTCCATGGAGCCAAGCTCAAAAAGCCCTCCAAAGTAATCACTTCACCCCATGACCTACATAGGGTAG
 25 CCTAAGTCATAGATCTCGAATCCTGATCTGGTAGCTCTGAAAGGTTTAGCTTCCTAATAAAGCCTCTTGT
 GCTGTGAGACTCTCCCTCCAGGTTATTAACCTTGCTTTTCCCTCCCACTATCAACAACCTGACTCCCC
 TAGTGGGAAAAGAAAAATCCGTATCAGGAAAAGGTGAGGTTTCTGTCTATCTACAGTTAGTATTTTAT
 AGGCTTTTGGAAAGAGGGTAAATTTTTTAAACATCCATGTTGGACTCCTAGGTGGATATTTACAAAAGGC
 ATTTCTATTTTGTGTTTTGAAACCTGCTTAACAAGGTGAGTCTGTTTAAAGGCTGGGAAACTTAGGTATA
 30 TTAGCAAAGCAGTTATTGCAATGAATGTTACTTAGTATTTGCATTCTTTTATTTAACTCTTGATCTGCTC
 AGGTGACCATTTTTATTCTCTCTGTGCTCTTACTACTTCCAATAGGAAGAGTAAGCAAAAATGAATTTT
 CTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTCGAGACAGGGTCTCACTTTGTCACCAGTCGGGAGTACAGTGGCAC
 AATCTCAGCTCATTGCAGCTCGACCTCGACCTCTGGGCTCAAGCAGTCTCTGCTCAGTGCCCCAAGAGCTG
 GGACTACAGGCACACCAGGCATGGCTAATTTTTGTAGAGACAGGGTTATCAGAATCATGACTTTG
 35 GATGCAGAAGATAACATTATGTAATTACTGCAGAGTATTAGGAAGAGCCAAGGGAGATGTTAGAAGTTA
 GCTGATTGTTGGGGGGCTTGACCTTTTTCATGTGTGATGGACTTTTATAACAGCACGTAAGGGGAGCCAA
 GCCATTTCTCTGTTCTAAGTATCTTCTCAGTAGGTTCCATTCTGTTTAACTTCATGAATAATTATCAAGA
 ACAGAAAGCCAGCAGCATCATATTTCTCTCTAGAGGGGACTGACCTTGAGATCTTTCTAAAATGAGTTG
 GGGTAGCGGTATCCTTAAAGTCACTTTGAATCTTTATAGCAGGAAATTTCTATTCCTTTACAAACAGAACA
 40 ATATACTCAATTTCTTTCTTTCTTTCTTTTACAGAGTCTTACTCTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTG
 GTTTGATCTGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGAGTTCAAACAATTTTCTGCTCAGCCTCCTGAGTA
 GCTGGGATTACAGGTGTGCACCACCACGCCCGGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACAGTC
 TCGCTCTGTCACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCTTCCCGGGTTC
 ATACCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCACCACCACGCCTGGCTAATT
 45 TTTTTTCTTTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTACCGTATTAACCAGGATGGTCTCAATCTCCTGAC
 CTCGTGATCCGCCCCGCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCATGAGCTACTGTACCCAGCCTAC
 TCAATTTCTTAAAGCAAGAGTCTTCCATTTTAAATGACCTGGCAAATGAGATATTAGGAACTCTTGAGA
 AAAAAAATTTTTTGGAGACGGGTTTTTGCTATGTTGTTGAACTGGAGTGCAGTGGCTATTACAGGTG
 TGATCATTTGTGCGCTACAGCCTTGAACCTCTGGGCTCAAGCGGTTCTCTGGCCTTAGCCTCCCTAGTAGC
 50 TGGGACTAGAGGTGTGTGCCATTCACCCAGCTTGAGTAAATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAT
 TGAAACGGTGTCTCGCTCTGTCACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCTG
 CCTCCCGGGTTACACCATTTCTCCTTCCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCACCACCAT
 ACCTGGCTAATTTTTTTGTATTTTTGGTAGAGACGGGTTTACCGTGTAGCCAGGATGGTCTTGATCTC
 CTGACCTCATGATCGGCCCGCTTGGTCTCCCAAAGTGCTAGGATTACAGGCGTTAGCCATCACGCCAG
 55 CCAAGTAAAATTTCTTAATAGCCATTCAGTTACTTTGGTTTTACACAGTGGTTTTCAAATGTGGTTTTAGCAT
 TAAAACAATATAAATGGTTGTTTGTGATGGACTCTTCTCGTGTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTTTTGGGAGACAGAGTTTTGCTCTGTTGCCAGGCTGGAGTTCACTGGCACGATCTCGGCTCA
 CCTGCAACCTTCACCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAACTGGGATTACAGG
 CTTGCACTACTACACCAGCTAATTTTTGTACTTTTAGTAGAGATGGGGTTGCACCATGTTGGCCAGGCT
 60 GGTCTTGAACCTCTGACCTCAAGTGATCTGCCTGCCTCAGCCTCCAAAGTTCTGGGATTACAGGCGTGAG
 ACACCGTGCTGGCTTTCTTGTGTAAATTAATTTCCCTTCTCAAATAGAAGATCTGTGAGTCAGGGAAAG

CCAAAGTACTGGGATTTCAGGCATGAGCCACTGCGCTGGGCCAGGGTTAATACTTTTTTAACAAAGATTTTT
 ATTATTATTATTTTTTATAATTTTCTTTTTTTGAGATGGAGTCTCACTGTTGTTGGCTCAGGGTGGAGTG
 CAATGGCATGATCTCAGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCTGGGTTCTAGCAGTTCTCCTGCCTTGCCTTCC
 CAGTAGCTGAGATTACAGGTGCCCCGCTACCACACCTATAATCTTTTTTTTTTATATATTTTTTGCTAGAGGT
 5 GGGGTTTCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGATCCACCCGCTCGGCCTCT
 CAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCCACCACACATGGCCAAGATATTTTTTTGAACAAAGAAAGAAAC
 ATATGTACATATGGCCTGTAATGTAATAAATAAAAAATTACTAGCTTCTTTTACAGCATCATAAATTTCTA
 TTCTATTTGGTAAAAACTTCTGATTTTCTTTTTGCAAAAATTAGCAAAATGGCCAAATGATAGCAAAATAT
 TGACATTATTTAATGTATTGCTTTATTGTGTGTCCAGCTTGTGAAAATGAGGCAGGTCAAATATTGTCTCT
 10 TTTGATTTCTTCTGGCAACAAAAGCCAGTGTCTTTTGTCAATTTCTCTAGAAGTCTTTTTGCAGCTTTTTCT
 CTATATGTTTCTTTTCTCTTTTCTTTTCTTTTTCGACGGAGTCTTACTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAG
 TGGTGCAATTTTCAGCTTACTGCAAACTCTACCTCCCAGGTTCAAGCGGTTCTTTTGCCTCAGTCTCCCGA
 GTGGCTGGGATTAAAGGCACACGCCACCACACCTGCTAAATTTTGTATTTTAGTCAAGATGGATTTTGT
 CCATGTTGGCCGGGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTTAGGTGATCAGCCCACCTTGGCCTCCCAAAATGCT
 15 AAGATTACAGGTGCGAGCCACCATGCCCTAGCCTATTTTATTTATTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTT
 CGAAGTCTCAGAGTGTGCGCCGGGCTAGAGTGCAGTGGTGTGATCTTGGCTCACTGCAACCTCCGCCTCC
 TGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTTAGCTGGGATTACAAGCGCCCGCCACCACGCCC
 AGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTATTTTTTAGTAGTGACGGGATTTCACTATGTTG
 GCCAGGCTGGTCTCAAACCTACTGACCTCGTGATCCACCACCTTGGCCTCCCAAGTGCTAGGATTACAG
 20 ATGTGAGCCACTGTGCCCAGCCAGCCTATTTTCTTATATTTTCTTGTTCACAATTTCTGTGCAGTGGTCT
 TTGGAGAGTTCTAGTTATCTTCCCTGTAGGAAACACTGTTTTTAAAGGAATAAGTCATAAATGTGATAAC
 ATGTGTCTTAAATCTGTATCTTACGAGAATGTACAATAACCACAAAAATTTATTTCAAACCTAGACCAACA
 AAATATGTTTTATTTTAAAGCAAGAACTGATATTATTTGAAAGTGTGGGAGGGCCGGGCACGGTGGCTC
 ATGCCTGTAATCCCAGCAGTTTGGGAGGCTGAGGTGGGCGGATCACCTGAGATCAGGAGTTAGAGACCAG
 25 CCTGGCCAACATGGTGAAACCCCATCTCTGCTAAAAATACAAAAAATAGCTGAGCGTGGTGGTGTGCCCC
 TGTGATCCCAGCTACTTGAAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCAGGGAGGCAGAGGTTGCGGTGA
 GCCAACATTGCACCCTGCACTCCAACCTGGGGGGGACAGAGCGAGACTCCATCTCAGGAAAAATAAATA
 AATAAATAAGTGTGGAATGTGGTAATGATCAAGAGTACACTTATTTTCAGCCAGTTTTATTATGGTTTTTA
 AAATTATGTACAGACCATGCAGCCTCTCTTGTCTGTGCTTAGGGCAAACCTGCTTTTGTGTATGCCACTT
 30 GGCCTTGATACGTCAGTACAGTTTTCTTTAGACAGAGCTAGTTGTCTCCCTACTTGTGGACATCT
 CTCTTCAGTCTCCTTTGCAAAGTCTTCCCTCATCTCTTAATATTAGAATTGTTGAGGTTTTGATTATAAT
 CCTTCTCCTCTCTGACTGTATTCTTTTTCAGTAGATAATCTTACAATGTCTTTCTGGGGCTTTCAATGCA
 GTCTGAGTCAGGCATGGTATTGTGGGCTGTAGTCCCACCTACTTGGGAGGTTGCAGCAGGAGGTCAGT
 TGAGTCCAGGAGTTTGAAGCTGCAATGAGCTATGATCATGCAGACTATGATCACTCTAGTCTGGTCAACA
 35 GAGCCAGACCCTGTCACAAAAAATAAATACATCTATATGCCAGTGATTCTCACAGATTACGATATAATT
 CTCTCTGACCTAGGTTTTCTTATCCCCATACATGATATTTAGTTGCCTTTTTGAGGTCTGCCATTAGA
 TTTTGCACAGATACCTCAAACCAAAGAGGAACCTTAAATCTTCTGCACATCATCTCTTTCACACTCTTGT
 CCTCCATCTCATCAAATGACACCACCATCTTCTAAAAATTAGAAGCAAGAACTCAGGTGGCATACTTGG
 CATCCCTGTTCCCTCCCCAACCCATCTGATTAATTATCTAGCCATGTTTATTTCTCCATCCATTAACAGAT
 40 GGACAAAATGGTATGTATGTACAGAATATTATTCAGCCATGAAGAGGAATGGAATGTTGTTATATGTTAC
 AACAGGTGGGTCTTAAAAACATTATGCTTAGTGAAATAAACAGGCATGGATGGCAAATACTGTATGATT
 CAACTGGTATGAGGTACCTGAAATAGGCAAATTCATAGAGACAGAAAGTAGAATTGAGGTTAGCAGGTGC
 TGAGGGGAAGTGAAAGTTCTTGCAATAATGGGTATAGAGTTTTTTCGCGGAATGAAGAAAATATTTTGGGT
 ATAGATAGTGGTGATGGTTACACATTCTGAATGTATTAATGGCACTGAAGTGTACACTTACATATGGTT
 45 AAAATGAGAAGTATTATGGTAATGTATATTTTACCACAATTTTTTTTTTTTTTACGAAAACCGTGAAAT
 ATAGAGGTTGGATTGGCCAACTGGCTGTACTAGTTGATTCTCTGATATAGGTCAAAAGTCTTGTGAGCG
 TCTACTTTAGGCTTCTTTCATATATTTTTTTGGTTTTCTGATTCTGAATATTTTAGTGACCATCCTGAGG
 GTTCTTGATATTCTTCAGTGTGGTAGTGATGCCACTTGCACCTGATATGTCGCTAAGTTCTCTTTAGA
 CAGAGCTAGTTGTCTCCCTACCTGTGGATATACCTCTTCAGTCTCCTTTGCAAAGTATTCCTCAGTCTTT
 50 CAATATTAGAATTGCTCAGATTGGGTTCTGAGCCCCACTCAAGAAGTATTTCTCATTTGACTTCCCTC
 ACTAGACTGTAAGTTCCCTTGAGAGCAGATACTTTGTTTCTAGCTTTTATTTCCAGTGCCGAGAACAATGC
 CAGGCACATAGGAGGCCCTCAATATGTGTAGAACTAATGATAATAATCATTTAGCCTGTGATTCTTTTAT
 GCCATGAGTTTCACTTCTGTCTCAGCACACTTGAACATGCCCTCTGGGGTAGACTGCATGTTTGTGTC
 TCTCCCAGATTCTATGTGTTGAAATCTTAACCCCCAATGTGATGGTATTAGAGGGTAGGTCCTTTGGAAGG
 55 TAATTTAGGTCTGAGGGTAGAACCCTAATGCATGGGATTAGTGCCCTATAAAAGAGACTCCAGAGTGCTA
 GCCCTCTGGTTCTCTCTATGCTATGTGACAAGACAGTGTGAAGATGGCTATCTGCAAACCAGGGAGTAGG
 TCCTCACCAAGAACACCACCATGCTGGCACCTTGATCTTGGACTTCTAGCTTCCGAACCTGTGGGAAATAA
 ATGTTGCCTTAAGCCACCTAATCTATATTTTTTGTGTAGCAGCCCAAATGGATTAAAGACACTTTCATCAG
 TAGCTTATTCAGAGTAGCACTGATTCTCAACATTGCTATCATTCTGTATCAGAAATATAAAACATGGCCC
 60 ACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGTAGGCCAAGGCGGATTGCTTCAGCCCAGGAGTTCGAAACCAGCCTA
 GGTAACATAGTGAGACCACATCTCTACAAAAAATAAAATTAGCTGGGCATGGTGGTGGCCGTCTGTGGTC

[illegible]

ATCTCATGATGTGTTTCAGATGAAAAAAGATATTGACCATGAGACAGTGGTTGAAGAACAGATCATTG
 GAGAGAACTCACCTCCTGATTATTGAGAATATATGACAGGAAAGAACTTCCTCCTGGAGGAATACCTGG
 CATTGACCTCTCAGATCCCAACAACCTGGCAGAATTTGCTAGGTAAGTTATAAGAAGCTTTCTTTCTTTT
 AATTATAGAAAGTGCTTGAGTCTTGCCAGCTATGTTTTCTGTGCCTAAGTCAAAATGGTGGTTTGTATT
 5 CTTTCTCTAGGGAAATTCCTGAAAACAAAAGCAGTCAGTTTTATTTGTTTGTGTTTTTGTTCCTTTTTTT
 GAGATGGAGCCTCGCTCTGTTGCCAGACTGGAGTGCAGTGGTGGCATCTCGACTCACTGCAGCCTCTGC
 CTCCCGGGTTCAAGCAATTCTGACAGTCAGTTTTATTTTTAGTAGTAACATATGCTATTAATGTGAGTGGC
 AGCATTTTAGATCCTTGAGTAAGATGAAGCAAATACCCTTAAATAGGCATTGCATTTGAGTAAATAAAA
 TTGCACGTAATTTGTTTTGGAATAGATATCTTCCACACTGCCTTATGGCTTCTTGGTACACATTTTATTT
 10 TTTATTTTTTTGAGACAAGAGTCTTGCTTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAATCTCAGCTCACT
 GCAACCTCCACCTCCCTGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGATTACATGCGT
 GTGCCACCACGCCCAGCCAATTTTGTGTGTTTAGTAGAGACAGGGTTTCATCCTGTTGGCCAGTCTGGT
 CTCGAACCAGTCTGGCCTCAAGTGATCCGCCTGCCTTGGCCTCCCAAGTGCTAGGATACAGGCATGAG
 CCACGTGTGCCAGCCTGTAGTACACATTTAAATTTGGGTGTGTTGTATTGGTCTATGCTGCTGGAGACC
 15 TGGGTCTGTACTGTACTCATCCAGCTGACCCTGGAAGGATTTATAAATTCGTGTTTGTCTTGTCTATC
 AGTTAAGCTCCTGGTATGTTAATTTAAGCTGGCATGACAGGAGGAGATCAAGTATTTATGGCTTGGACAT
 GGCGAGCAGTGGAGAACTCTGAACCCATTGGTTGGGTGTGTTGTTTTGCCTAAAGTGGGCTGGGTTCT
 TATAGAAGCCTACTTTTTGTGTTACTTTCTAGTACTGTTTGGCAGTTTGTACAAGGAGCTGAAAATACCA
 CAAAGATGTAACTTTTAAGTTAAATGAATAATAAATCTGGAGCAGAAAGCCTAATGCCTTTCCATAC
 20 CTGAGGTTGGTTGGAACCTGGAATAGCTCAGGAAATTTGGGCAAGGGCAGGATCAAGAAGAAAGAAATCC
 TTTTGATCTTGACATTCTAAGAACAGAGTGGGTGCTTTTTTTTTTTTTCTTTTGGAGAGCAGAGTGGTAGA
 GGTGGAGACCGTTCAGTGTCTTGGCTTCTTCTTGGCCCTGCCGAAAACAAGGTGGGCGAGTTTCTGCCAC
 CTGGAGCTCGTTTCCCCACCTGTCAAATGGGCGTTAAGAATTCATTGTGGTTTGATACATGGAGGTTCT
 CACTGTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTAGCATGATGATAGCTCACTACAGCCTCAAGCAATCCTCCTGC
 25 CACACCTCCCGAGTAGCTGGAACACAGGTGTGTGCCACCATGCCTGGCTAATTTTTTTATTTTATTTTA
 TTTTATTTTTTTGTAGAGATGGAGTCTCACTATGTTGCCAGGCTGGCCTCAAACCTCCTGGCCTCAAGTGA
 TCCTCCTGCCTCGGTCTCTCAAATGTTGGGATGACAGGTATGAGCCACTGCACATGGCCCAAGAGTTTT
 TGTTTGTAGTTTTGTTTTTTGAGATGGATTTTCACTCATCTCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTATGACCT
 CGGCTCACTGCAACCCCCACCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTACCTCAGCCCCCAAGTAGCTGGGAT
 30 TACAGGTGCATGCCACCATGCCTGGCTGATTTTTGTGTTTTTAGTAGAGACGGAGTTTACCATGTTGGC
 CAGCCTGGTCTCGAATCCTGACCTAAAGTGATCCACCCACCTTGGCTTCCCAAAATGATTATAGACGTG
 AGCCACTGCACCCAGCTGGCCCTAGAGTTTGTATAGAGATGGAGGTTTACTGGGAATTAGGGCGCTTCC
 AGGGAAATGATGGAGTTGAGGTAACTGGAACCATGATTAAGGGCGATGAATCCTAGGCCAGGCTGT
 GCAGACATTTCTCATATGCAGTGGGCGAGCTACTGCAGACTTTGAGCTGGGGAGAAGGGGCTGTGTAGTA
 35 GAGCGTTAACTTGGGAGAAGTCCTTTGAGCTGTCTGTGCAGGCTAGATTATACAGGCACAGGAAATGA
 GAGAGGTGAGTTGAACAAGAGTTAATGAAGGCCTGAGTTAGAATTGTGGCAGTCAAGTAACAAGGAATA
 AATGTGATAGAAATTACAAGAGACCAGCTGGGCTCTGTGGCTCAAGCCTGTAACCTCAACACTTTGGGAA
 GCTGAGGTGGGATCGCTTGAGGCCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGGGCAAAATGATGAGACTCCATCTCTA
 AAAGCTCAGTTTGGTGATATGCAGCTAGCTTCTTGGGAGGCTGAGTGGGAGGATCGTTTGAACATGGGAG
 40 GTCAAAGCTGCAGTGAAGCTCATGCCACTGCCCTCCAGCTTGGGTGACAGAGCAAAATGTCTCTAAAAA
 GAAGGAACTGAACCAGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGTGG
 ATCGCCTGAGGTGAGGATTCAGAGCAGCCTGGCCAACATAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAA
 AAACGTAGCTGGGCTTGATGGCAGGCGCCTGTAATCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATTGC
 TTGAACCCAGGAGGGGGAGGTTGCAGTGAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
 45 GGAACTCCTTCCCCGCCTCCCCACCAAAAAAAGAGAAAGAAAAAACTACAAAAGATAATGGAAAA
 GATTTAGAAACAGACTGTGTGCTCAGTTGGGGGCGAGGGGGGAGGAGTAAGAGCATGCTTACCGTTTTGAT
 GCTTTTAGCCACTGCTCATTAGATGACTCCAGCCCCAACTTACTTCTTAAAAACCACCTCAAGTCCAACA
 TGGATGTTTTTATTATTAACAGCATCTCAAACCAATACTGACTACTCTGAGCCCCAAACCAGAACACTGA
 AGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATGGAGTCTCACTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGA
 50 CCTCGGCTCACTGCAGCCTCTTCCACCCGGGTTCAAGTGATCTCATGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGG
 ATTACAGGCGCCTGCCACCGTACCCGGCTAATTTTTGTATTTTTCATAGAGACAAGGTTTACCATCTTG
 GCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTAACCTCATGATCCACCCGCCTCGGCCTCCCAAGGGCTGGGATTACAG
 GTGTGAGCCACCGTGCTTGGCCTTTTGAACCTTTAAATTACAATTGTGATTCTCCCGTGTCCACATGGCT
 GGGGAGGCTCAGAATCATGGCAGGAGGCAAAAGGCATTTCTTACTTGGTGGCGGCAAGAGAAAAATGAG
 55 GTAGAAGCAAAAGTGGAAACCCCTGATAAACCCATCTCAGATCTCGTGAGACTTACTATCATGAGAATAA
 CATGGGAAAGATTGGTCCCCATGATTAGTTACCTCCCCCGGGTCCCACCTACAACATGTGGGAATCCT
 GGGAGATAGAATTCAAGTTGAGATTTGGGTGAGGACGCAGCGAAACCATGTGAGAGGTAAGAGGTCCCA
 GTGGCAGAGTAAAAGCATCATTCAGACAAATAGAAGGAGACTCAGGAGGTACGAGAGAGAGGAATAAAAC
 CTCTTTGGATTATACATTGTGAAGGAGTTGCAGTGGAGGGGCGGAGGGCTGAAGGAAAGTTTTGAAGAG
 60 AGAGGGAATCTATGGGTGGTGAAGCATTAGGTGTTGGTGACCCTTGGCACTGCTCACCCTCC
 TTGGAGCATTGGAGCAGCTGATCTAAAAGTTTGTCCCCAGTCTTCTGAGCAGAAAATCCAGGGACACATG

TCAGGAGTTGAGAAAGTCTGGGCAACATGGTGAACCAACCATCTCTACAAAAACAAAATAAAAAAATGTT
TCAGTAGAATTTTCAAAGAATAAGTGTTCACTCTTAATTGGGAACATTAAAACTTAAAAAAAAAAAAATAG
GCTGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCCGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAGGCGGATCACGAGGTCA
GGAGATCGAGACCATCCTGGCTAACACGGTAAGAAACCCCGTCTCTGCTAAAAATACAAAATATTAGCCG
5 GGCATAGTGGCGGACACCTGTAGTCCCACTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCATGAACCTGGG
AGGCAGAGCTTGCAGTGAGCTGAGATTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCTGCC
TCAAAAAATAAATAAATTAATTAAATTAATTAATAAATAATGTTTGAGTGGAATAGAGACCTTTCA
TATCAATCACTGTTATTTTCCAACTGATGTAACCTCAAGGTGGCGCAGTGGCACCAAACCTTTGTCTA
10 CCTGATTTTGTGAACTCAGGCCAGAACTCCAGGATTTATTTGTATTTAAGATAAGAAAGGCTAGTTCAGA
GTCCTGTTTACAACAGGCACCTTAAAAAACTTGCTAACTGGTATTACAGGTTGAGCATCCTTTATTCAAA
ATGCTTAGGAACAGTAGCACTTTGGATTTTGGGGTTTTGCATATGCATAATGAGTTATCTTAAGGCTAGG
ACTCGGGTTTAAATACGAAATTTGAAATTCATTTGTGTTTCATTACACCTTATACACATAGCCTGAAGGC
AATTCTGTACTTTTTTTTTTTTTGAAACAAGGTCTCGTTCTGTCAACGAAGTTGGATCGCAGCCTCAAAAT
CCTGGGCTGAAAGGATTTCTACCTCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTGTAGGCATGTGCCACCACGCC
15 TGGCTAACTTTTTTATTTTTTTAGAGACGGGGTGTTGCTTTCTTGCCAGGCTGTTATACAGTATTTTAA
ATAATTTTGTACACGAAACAAAGTTTTCTACTGTGACCCTATCACACGAGTGCATCATGTTAGCATAAGA
TAGTTTCAGATTTTGGATTTTGGATGTTAGGGATGCTCAATCTATAATCCATTTACGAGAAAGGACGAAT
ATCTACAGGGTTGGGAAGGGGGAGGACACTGAATTGAAAATGTTCTCGTGGGTGGGCGGATCACGAGGTC
AGGAGATCAAGACCATCCTGGCTAACATGGTGAACCCCATCTCTACAAAAATACAAAAAATTAGCCGG
20 GCATGGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACAGGAGAATGGCATGAACCTGGGA
GGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATAGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACTCTGTCT
CAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAGGAAAAGAGAAAATGTTCTCGTAGAATTTAAATAACAAATATGTA
TAGTATCGGACCAACTCCATGGAGATAAGTGATAGTTACCAGATCTGTTGTTCCCTCATATACTCCTAGGG
CTGGAAAGTTTAAACCAATGATTTTCATGTGTTTCAAGTTACAGATCAGGTCATCCTTTTCCAGATTATAAG
25 TGAAGAAGGACATTGTTAGGGCCTTCACAACTTAAAAGATCACAGAATTAATTTTTTTTTTAAAGGAGTAT
TTTTTTTGTAAACAAAAGAGTGGTGGTAAATTAGCTCTTGCTTTTAAAGGATTCACTTAGGTGGGCTTTTT
TTTTTCGACTTTGACTTTTTTAAAAAATTTCAATAGCTTTTGGTGTATAAGTGGTTTTTGGTTACATGGAT
GAATTCTATATTGATGAATTCTGAGGTCCGAGTGCACCCCTCGCCAGAGCAGTGTACACTGTATCCGGTA
TGATAGTCTTTTATCCACACCATTCTTTCCCTACTAAGTCCCCAAAGTCCATTATATCACTTGTATCCTC
30 ATAGCTTAGTTCACACTTATAAGTGAGGACATACCGCGTTTGATTTTCCATTCCCTGAGTTACTTCACTCA
GAGTAGTGGCCCCCAGCTAGTTTTTTGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACGGTATTTCCCTT
CTTGCCGCTAGGCTGGAGTGCAGTGGCACGATCCCGGCTCACGGCAACCTCCGCCCTCTGGCTGAAGC
AATTCTCCTCCCTCAGCCTCCTCCTAAGTAGCTGGGATTACAGGCATCTGCCACCACACCCGGCTAATTT
TTGTATTTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATGTTGGCCAACATAGTGTCAAACCTCTGGCCTCAAGTGA
35 TCCATCTACCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACTACGCCCAGCTATGGTTTTTT
AAATTATTATTTTATTTATTTTTTTTAAATCCAATACAGAGTTTCGTTCTGTCACTTAGGCTGGAATGCAG
TGACACAGTCACTGGCTTACTCGAGCCTTGACCTTCTGGGCTCAAGTGACTTACTGCCTTCGGCTTCCCG
AGTGGTTGGGACTATCGACACACACCACCATGCCTGGCTGATTTTGGGGGATTTTTGTTTGTGTGTTCA
TTTGTTTTTGTATAGACAGGGTTTTGTCCATGTTGCCAGGCTTAATTTTTTTTTTTTGTGTAGAGACA
40 GAGTCTCACTGTGTTTTCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCTGGGCTCAAGCAATCCTCCAGTTTGGCCTCCC
AAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGACCCACCACACCCGGCTGATTTATTTATTTATTAATATGAACCATC
ATGGAGGGGTGTGAGAGGGGTAAAACCTAGGGACAAAAGAAAATCTGTTTCCGAGATTTAAATTTATTCT
CTAGTTTTTTTAGGAACGCTTAATTTCTCACCCCCCTACCACACACAGATCTATAGGGAATATTTGGAGA
GAAAGTTTTGACAAAAGTCCAAAGCTTGATTCACTGGAGAAGCAGGTAGGTAAGTTACCAAACCAGGAGG
45 CTCTCTGGACAGTAATTTACCTGGGGCTCTGCCAGACGGTTACCACATTACCAGGACTCTTGGTACAAA
TGAGAACTTCCAAGCCCCCATCCAGAAGTAGGGTAACAGTATGAGAGTATGTGGTGTTCCTCATGTCCA
CCAGGCCCTAGGAGCTCTCTCCCCAAAGTAACCTGGTGTAAATGGTTTTGTCTGTGTCTTCCAGAGATAT
TTGATATTTAATATCTATAAATCTTGATTTAAAAGGACTCTTCTGTACCCTTTAAATGATATATTTTAA
AGATCATTCGTGTCACTAATTTGGACCCATTTCTGTGTATAGAGATGGATATTTTAGGACACTCCTGTG
50 TTCACCGCTTCTTTTTTATAAGGCACCTTCATCATCGCAGCAGCTGCCTTTGGAATCTTCCCTTGCCCTC
TCACAAGGAGATTCATCTGATTGTCTGAGTTGATTTTTTGTGTTTTTTTTTAAAGGGTTTGGAGTTAAGAAC
AGGTATGTGAATCACACAGATCATAGTGCCATTCTAAGCTGCACCAGCTTATTAGCTATGAGACTGTAGG
CGGCAACTCGATGTTTCTAGCCTGAGCATCCTTATCTGTAAGATGGGAAGAGTGCTTCACAGTCATTGGT
ACTTAGTGAATGCAAGTTGTCTCATCCTTTCTGCTTCATGGAATGTATCATAATTTTAGTTGGGTACC
55 TATAAGGAAAGCATTTTAGGGACTATATGATTTATGCCAGTTGAGTCTACCCACTCCTACAAATCTGTCT
GTCTCTCTTTTTCTTTTGATAAGAATGAAGCCAAGAAAAATTAAGAAGATGATGCTCCAAGAACAAATAG
CTTGCCCTCATAAAGTAAGTAATGCTAGAGGGAGAGTGTTCACTTAACTGTTGATGAAGTTTTAGAGAGT
TATAAGAAATTTGACATTAAGTTTTGTTTCTGCTTGTGATAATTTAAATGAAGCAAGGAATAGAATCTTCGGT
TCTAAATCCAAGAGATGAAGTTTTGTTTATTAGTAAAGGCAACTTTTTAAATACTGTTAAATGGGATGAC
60 TGCAGGGAGCCGTTGCTTGATTACTGTGTGTTGACTCTACTGTTAGCGTTTTCATTTCTTTTTGGATTATA
TTAACAAGTCCGCTCTAAGATCCTGGGTTGTGTCTCACCTATTGACCTTTATGGGAATGTAGGCTTGTA

CTGAAATTTGAAAATTATTTTGGATGTTGCTAAAATAAGCCAAATAAAGACTTAATAATTGTGTGTGATT
 AGAGAGGCACTTAATTGTTTTCAAATGTAGTTAGTCTTTAAAATAAAAGGATAACCTGAAAAGTACTTTT
 GAGATATTTGTTGGGGGCTATTTTCAAACCTTAATTGGATATGAGACTAACAGAAAAATCAAGTATCACAT
 AGGTACAGAGAACAAGTAGGAGAGATTGAGTGGAATAAAGAATGTTAAAAATGAACAATCGGAGCAGGC
 5 TACATTTAGTTTACGGTCTCTTCCCTGTAATGACTGTGCACTAGCAAGTCCTTCCTGTTCTTTGTCAGC
 GTTCTTGATGTGGCGATTTGAAATGTAAACGTATCTCCATTAGGGCCGAAATAACAAGCATTGAAAACA
 GTTAGGCTGGAAGTGCCATGCCATCCCTTTAGCTTCTCTGAAGTTTTCTTTATAATGGACACATAATAC
 TTGTACATATTTATGGGGTACCGTGTGATGTTTCAATGCATGTATACATTGTGTACCAGTTAAATTTTTT
 AAATTTCCATTTTCTAAATGGAATTCACCTAGGGGTAAAGGCGGAAAACTGGGGCTTCCCTCTCCCT
 10 TCTGCCTGTGAGCTGTCTAGTGACTTGTGCTGTCTTCTGTCTATGCTGTCTTATCATTTCCCCATTCACT
 CCATTACTGGGCAACAACCTGCAGAAGAAATTGTTGAGGACATGCTTCTCGAGCGCCACACATCCATCTGC
 CTTTCCCGCCCTGCACTGGTATCAATTTGCCTGCTTCTTCCCTTTTCTAGTGTCTCACAAAATAAATTTCT
 TTCTGTAGTTGCCATTCCCTGGAGACCTCTTGCTTCTTCTCTGTCAAGAAGGGGAAAGAGGCCAAAGAG
 AGAAGAGGGAACAGTAGGCGATGGAGAATGACAGTCCATTGTTGCAGCACAGAATATGGGGCCACCAAAG
 15 GTAGTGGTGGACTACCGTCATTTTAACTCCATTTGCTTAGCAGTGCTTCTGTTACTTCTTTGGGGGAC
 ATAGTCGGGTGAGGTGGCTGTGGTAGAGCTGGAAGCCAGGGTGTTGGGTTCTATTCCAGTTTGGCTACT
 ACTAGTAGTGTGACCTTGGGCAAGTCTACTTAAAGACATCTCTAAGCCTCAGTTTCTCATCTGTAAAC
 TAGGGTTTGCATTGAATGATGACTTTTTTCACTGTCTGCTTTTTGTCTTAAATGATATTAATGTTCTACC
 GTAATACTAAGTAAAATTTAAATGGGGGTTGGGGAGGTGGTTTTGTTTTAATATGTCAGTAAAGGCTGT
 20 TAAATGGTTGAATCCTTTCTAACAGTTTGCAATGTGAACCTTCTAAGCTGCTTTCTCTGTTTTAAGGGCTG
 CACAAAGATGTTCAAGGATAACTCGGCCATGAGAAAACATCTGCACACCCACGGTCCCAGAGTCCACGTC
 TGTGCAGAATGTGGCAAAGCTTTTGTGAGAGTTCAAACTAAAACGACACCAACTGGTTCATACTGGAG
 AGAAGCCCTTTCAAGTAGAGCCAGTTCCTCTCTTCCCCACACTGCCTTGCCTGTCTGAACACTGCAAGT
 GTAGGTGGTGTGGTGATGAGGCAGGAGGCCAGCCCAGAGACTCAGGGTCTTATTACTCCTTGGTGAGA
 25 AACAAAACCTTCTCCTGGGGAGTCGCTTAGAAGGGTTGCCGGGGCTCTGGACATCCTTGTCTATACTCTGT
 GGTACTGGGTACGCAATGTATTGGTGTTGATGGAGTACACTTTATGGCAGGAGGAGAACAGGATTGAAGA
 GCATACCTAAAACCTCAATTTCTACTTCATTACAGGATTGAAGTAATTTATTTTTGGTAGTTAATAG
 TATAATTACTAAGTATAAGTTTCTAGAGTGTAAGTATAGGTAATACTTTAGCCCATAAATAAGTGAAA
 GAACTAGCAGTGCAGCTAGTAAATCTAACGTGGTCTTTTTTGGACAACCTGACACCAGAACCCCTTAATCAT
 30 TTGTATTTTACTGTTGGAAATGTTTACAGCAGCACTAGGACTCTAGCCTGCATTTAGGAAGACTTGCCAT
 TTTGCCAAGTGTTTTAAACAGTTCGTGAGGGCTCTCCTTGGGTTTTCGGGGTTGTCCAACCTGCCTGCTG
 ATTTCTAGACTATATCCACAAAGTTCACCCAGGGCAGGAATGAAAAGTGTGTTGGTAAAATAAATAGGCTGT
 TCTCTAGCAAAGCAGTGAGCTCCTGACTCCAGGGTCTGGTCAGAGTTGCTGAGTGGGTTGATCTCTGTT
 CTTTCTTGGACAGTGCAGTTCGAAGGCTGTGGGAAACGCTTTTCACTGGACTTCAATTTGCGCACACAT
 35 GTGCGAATCCATACCGGAGACAGGCCCTATGTGTGCCCTTCGATGGTTGTAATAAGAAGTTTGTCTAGT
 CAACTAACCTGAAATCTCACATCTTAACACATGCTAAGGCCAAAAACAACCAGTGAAGAAGAGAGAAG
 ACCCTTCTCGACCACGGGAAGCATCTTCCAGAAGTGTGATTGGGAATAAATATGCCTCTCCTTTGTATAT
 TATTTCTAGGAAGAATTTTAAAAATGAATCCTACACACCTAAGGGACATGTTTTGATAAAGTAGTAAAAA
 TTAATAAAAAAAAAACTTTACTAAGATGACATTGCTAAGATGCTCTATCTTGCTCTGTAATCTCGTTTTCAA
 40 AAACACAGTGTTTTTGTAAAGTGTGGTCCCAACAGGAGGACAATTGTAAGTTCGCATCAAAAGACAAT
 TCTTTATACAACAGTGCTAAAAATGGGACTTCTTTTACATTCTTATAAATATGAAGCTCACCTGTTGCT
 TACAATTTTTTTAATTTTGTATTTTCCAAGTGTGCATATTGTACACTTTTTTGGGGATATGCTTAGTAAT
 GCTACGTGTGATTTTTCTGGAGGTTGATAACTTTGCTTGCAGTAGATTTTCTTTAAAAGAATGGGCAGTT
 ACATGCATACCTCAAAAGTATTTTCCCTGTAAAAAAGGTTATATAGGTTTTGTTTGCTATCTTAAT
 45 TTTGGTTGTATTCTTTGATGTTAACACATTTTGTATAATTGTATCGTATAGCTGTATTGAATCATGTAGT
 ATCAAATATTAGATGTGATTTAATAGTGTTAATCAATTTAAACCCATTTTAGTCACTTTTTTTTTTCCAAA
 AAAACTGCCAGATGCTGATGTTCAAGTGAATTTCTTTGCCTGTTCAAGTACAGAAAGTGGTGCTCAGT
 TGTAAGATGTATTGTACCTTTTAAACACCTGATGTGTACATCCCATGTAACAGAAAGGGCAACAATAAAAT
 AGCAATCCATAAGCAAGAAATATGGCAGAACAAAGATCTGTAAGCACAGTCTTATTTCTTTTGTGTCCAG
 50 AATACTTATAATTCTTGAGCCTCCAGAAATGGAAGCTAAATAAAGCAACTCAAGTTTCTTTTGTGTCCAG
 CACTCAATTACAGTGATTATTGATGAAAGCGATGCATGGATATTTTAACTTCTTACATGTCCTGACTT
 CTGAAAGAGAGTAGGTAACAGGCATCCCGAGTTCAGGAACCTCAGAACACCCCGAGGCCAGGTTGGTCT
 ATAGGCTGTGATTTTAGCCCCCGCAAGTGTGAGTGAAGCATCTGTACCACCGCGCAGGCTGAGCGCCTG
 CGCAGGGTAAGGTGCCACCTGGCAGTGGGGCACACAGAGGGAAGACCAGGCCTGTCCATCAGCCGGCTGC
 55 CTTCAGAGGCAGCTCCAGCAGGACCTTGGCTTGTCTGACAGGAAATGCTTGTGGTCGTTGGTTATTTGGT
 TTGAGAGCCCTTGTTCCTCCATCTAGTGGAGTCCTTATTAAATGCTAGCAATGTGGCAATTGAGTGCCAG
 TAGCTTAATTTTCATGTTTCT-3

REIVINDICACIONES

- 5 1- Uso de una composición que comprende un compuesto capaz de reducir la expresión del gen Yin yang 1(Yy1), en células cardíacas de un sujeto humano o animal con respecto a la expresión observada en ausencia del compuesto en dichas células, para elaborar un medicamento que inhibe la expresión del gen que codifica la proteína soluble suppression of tumorigenicity-2 (ST2s) para promover la recuperación cardíaca tras un infarto de miocardio (IM).
- 10 2- El uso según la reivindicación 1, donde dicho medicamento se usa para reducir el tamaño del infarto de miocardio y/o previene el remodelado cardíaco adverso tras un IM.
- 3- El uso de la reivindicación 1 a 2 donde la composición se administra de manera local en las células del corazón
- 4- El uso de la reivindicación 1 a 2 donde la composición se administra de forma intravenosa
- 5- Un método de cribado para identificar compuestos capaces de reducir la expresión del gen que codifica la proteína ST2s que comprende:
- 15 a) Obtener una librería de compuestos
- b) Determinar si una administración a células cardíacas, de uno o más de los compuestos del paso a) resulta en una reducción de los niveles intracelulares del factor de transcripción Yy1 y/o de la expresión del gen que codifica el factor de transcripción Yy1 respecto de células cardíacas a las que no se les administra/n dicho/s compuesto/s
- 20 c) Seleccionar aquellos compuestos que promueven la reducción descrita en el paso b)
- 6- El método de la reivindicación 5 donde también se incluye, en el paso b) determinar si la administración de dicho/s compuesto/s en comparación con células cardíacas a las que no se les administra/n resulta en:
- 25 - un aumento de los niveles de la proteína histona desacetilasa 4 (HDAC4) o de la expresión del gen que codifica la proteína HDAC4 y/o
- una disminución de los niveles de fosforilación de la proteína HDAC4 y/o
- un aumento en la cantidad de proteína Yy1 que está unida a HDAC4 y/o
- un aumento de los niveles de la Interleucina 33 (IL33) o de la expresión del gen que codifica la proteína IL33, y/o

30

- una disminución de los niveles de ST2s o de la expresión del gen que codifica la proteína ST2s, y

5 c) seleccionar aquellos compuestos que producen uno o varios de los efectos descritos en b)

7- Un método dónde además de los pasos descritos en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 se incluye un paso d) en el que se evalúa en animales modelo de infarto de miocardio si la administración del/de los compuesto/s evaluado/s en los pasos a) y b), o seleccionado/s en el paso c), reducen el tamaño del infarto de miocardio.

10 8- El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde se determina un rango de cantidad del/de los compuesto/s administrado/s que provoca con mayor intensidad los efectos descritos en las reivindicaciones 10 a 12, preferiblemente el efecto descrito en la reivindicación 10.

9- El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde el compuesto está formado por un principio activo y un vehículo farmacéutico aceptable.

15 10- El método de la reivindicación 9 donde se determina un rango de cantidad de principio activo y de vehículo que provoca con mayor intensidad cualquiera de los efectos de las reivindicaciones 10 a 12, preferiblemente el efecto descrito en la reivindicación 10.

11- El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 donde se determina el modo de administración del compuesto que provoca con mayor intensidad cualquiera de los efectos de las reivindicaciones 5 a 7, preferiblemente el efecto descrito en la reivindicación 5.

20 12- El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 donde la librería de compuestos está formada por biguanidas.

13- El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 donde la biguanida Metformina se utiliza como control positivo.

25 14- Un producto que contenga la información de los resultados obtenidos por el método de cribado descrito en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13.

15- Un método de obtención de uno o más compuestos que comprende la identificación del/de los compuesto/s según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 y su aislamiento.

30

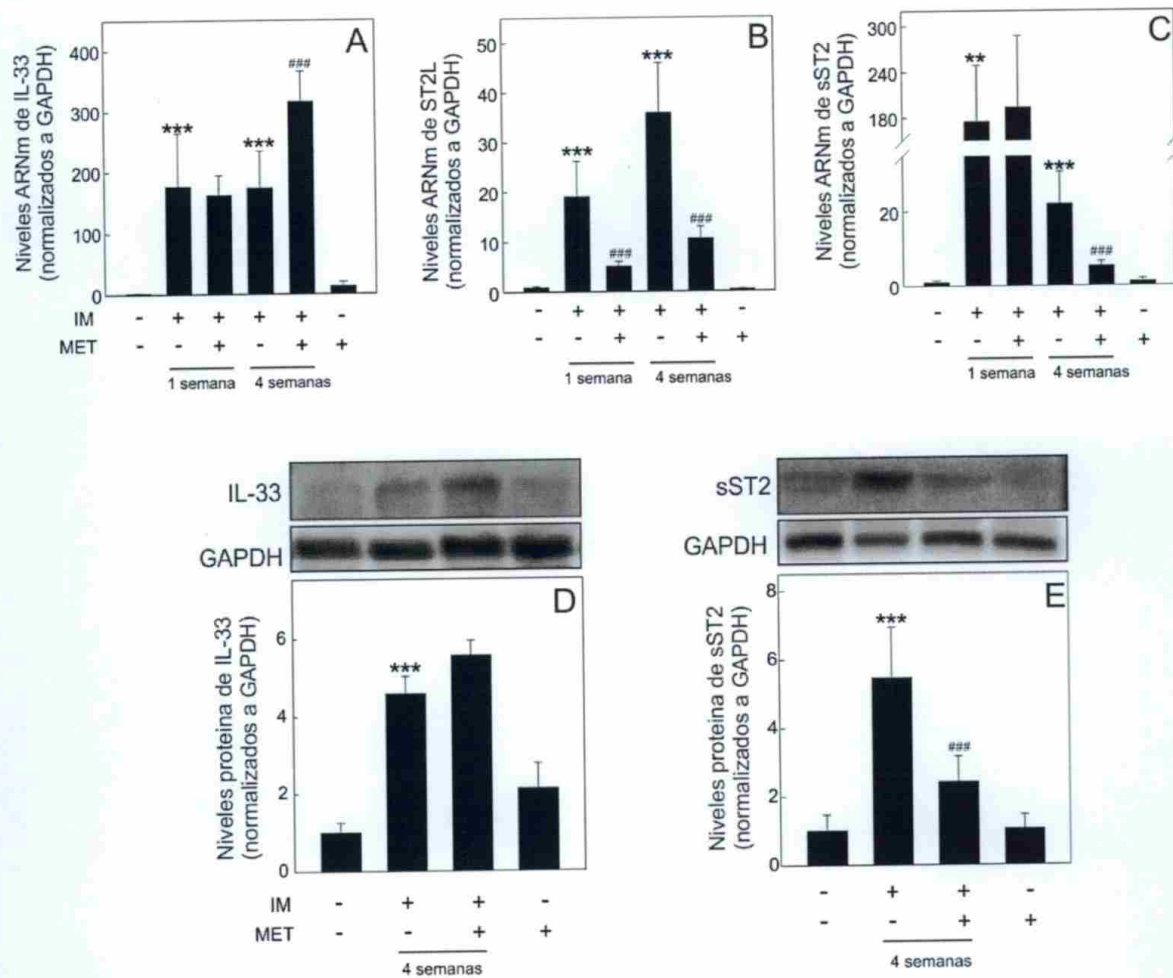


FIGURA 1

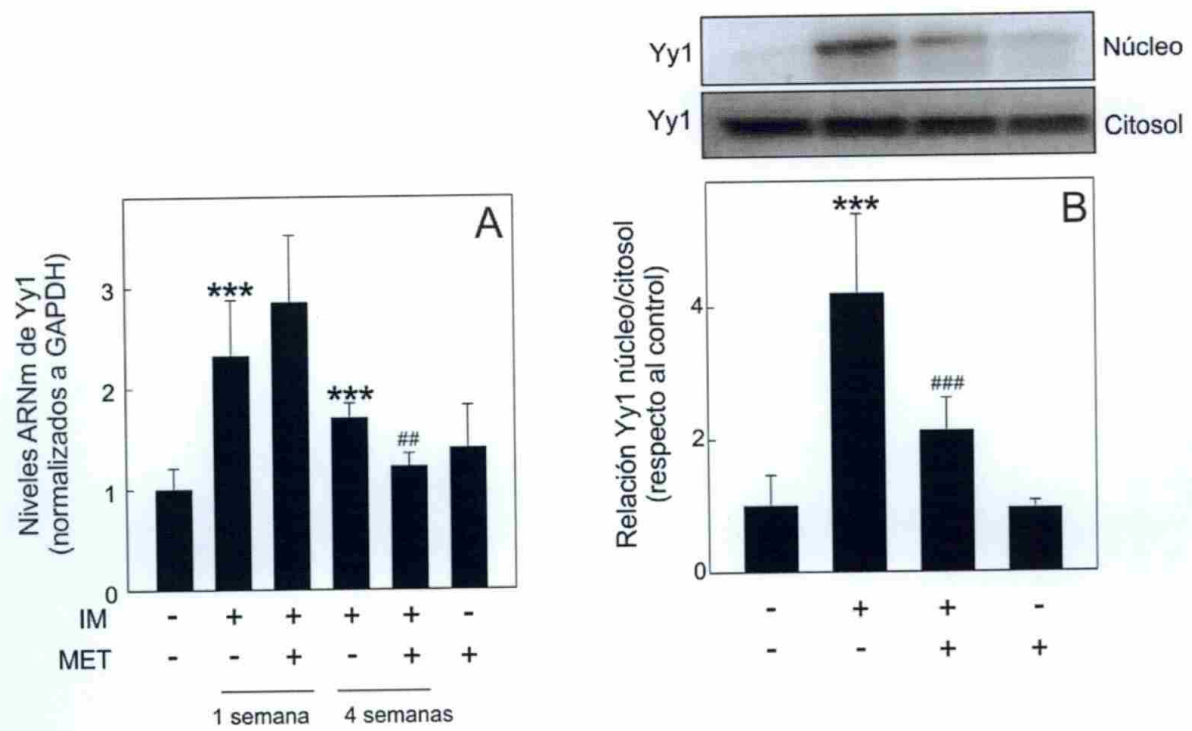


FIGURA 2

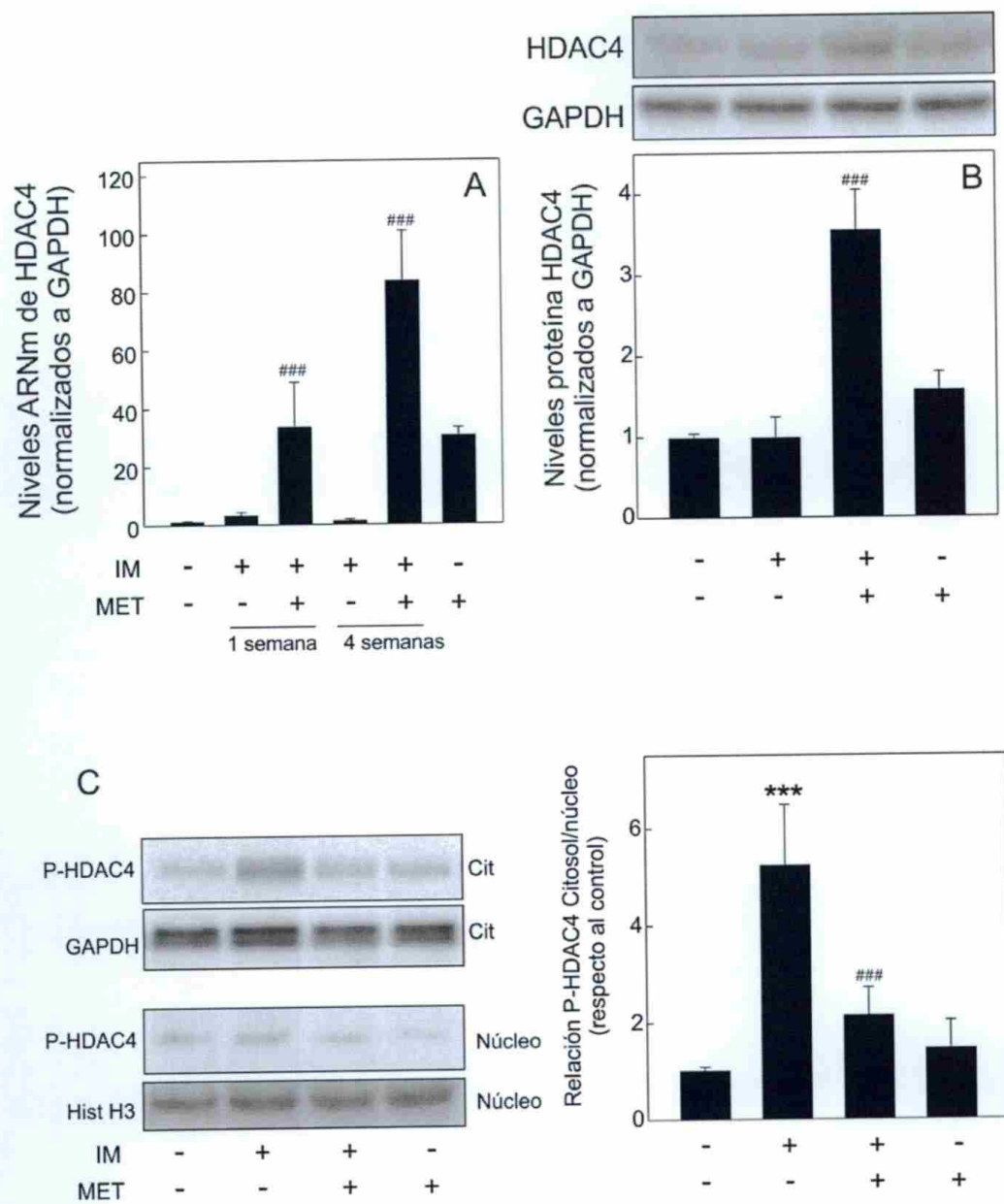


FIGURA 3

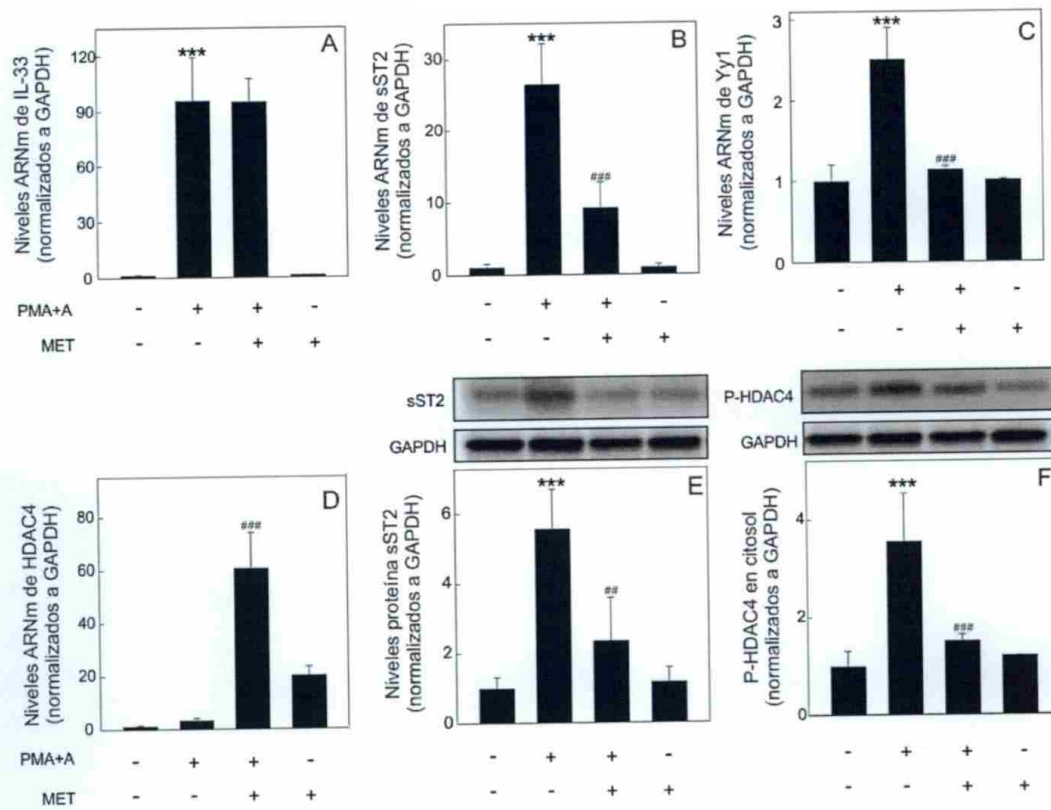


FIGURA 4

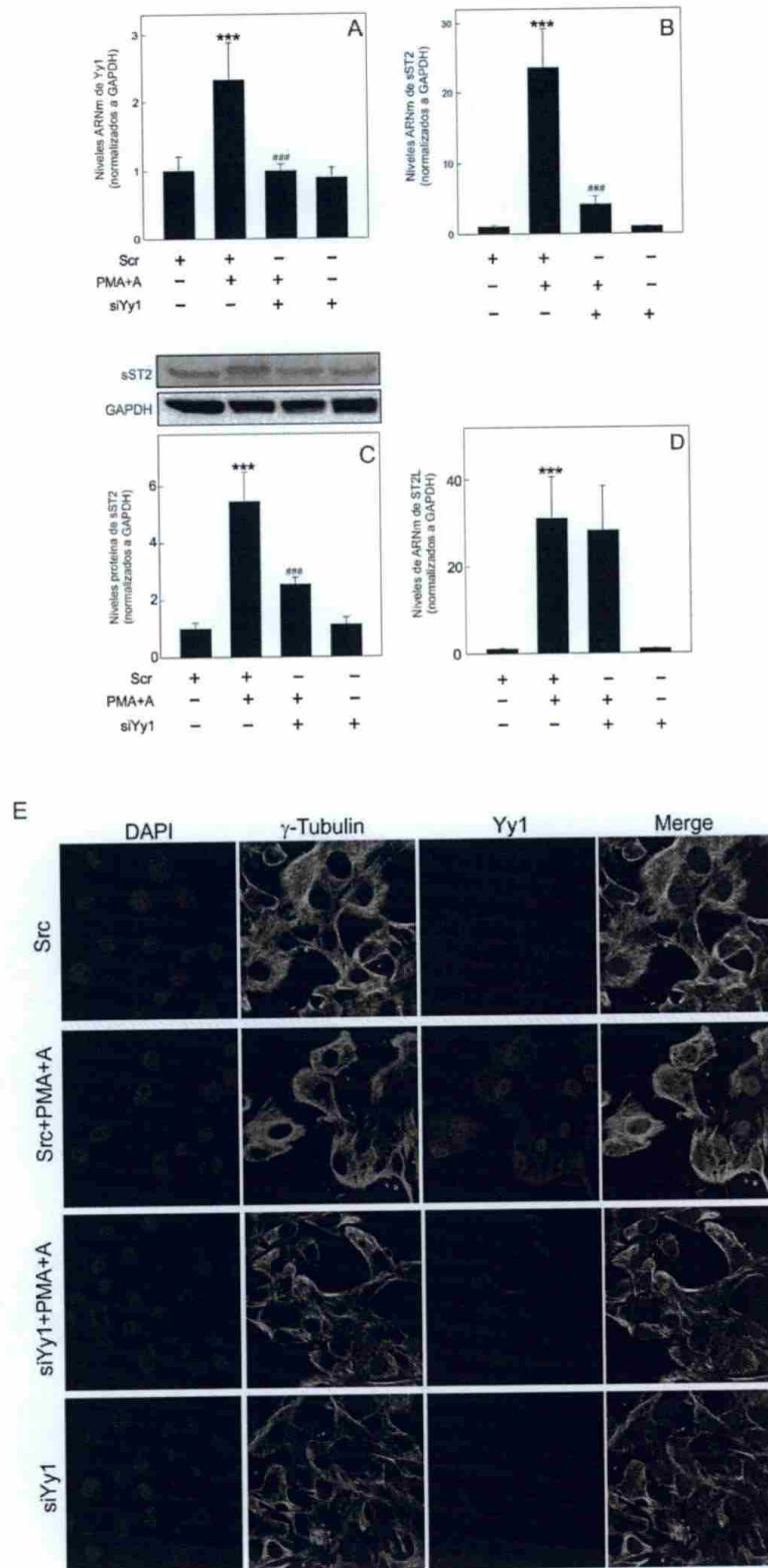


FIGURA 5

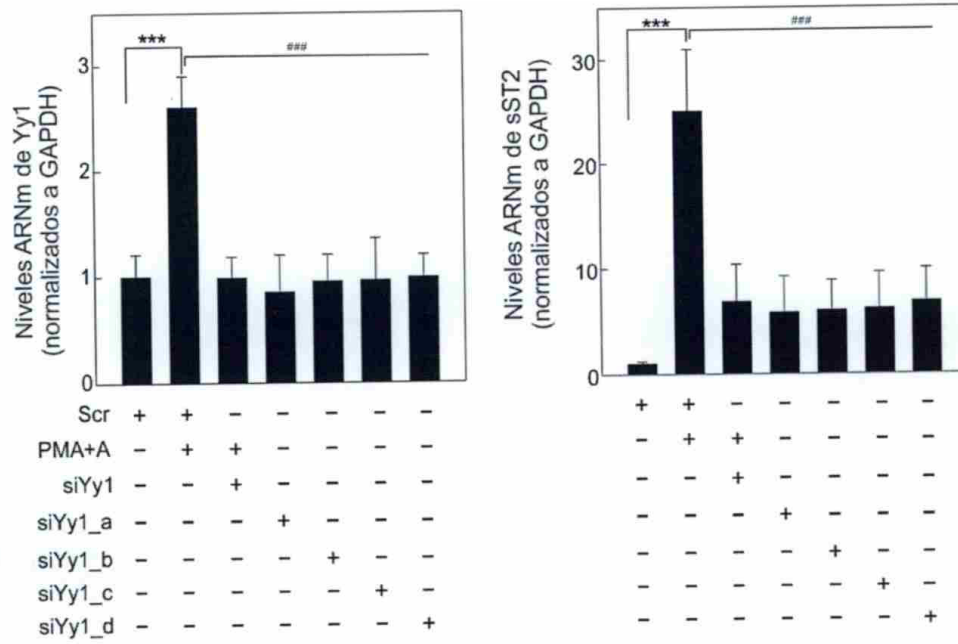


FIGURA 6



- ②① N.º solicitud: 201700154
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.02.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/155** (2006.01)
A61P9/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Yin Meimei et al.. METFORMIN IMPROVES CARDIAC FUNCTION IN A NONDIABETIC RAT MODEL OF POST-MI HEART FAILURE. 31/07/2011, Vol. 301, Páginas H459-H468, ISSN 0363-6135(print) ISSN 1522-1539(electronic), <DOI: doi:10.1152/ajpheart.00054.2011>. ver apartado "discussion"	1-4
A		5-15
X	Calvert John W et al.. ACUTE METFORMIN THERAPY CONFERS CARDIOPROTECTION AGAINST MYOCARDIAL INFARCTION VIA AMPK-ENOS-MEDIATED SIGNALING. 29/02/2008, Vol. 57, Páginas 696-705, ISSN 0012-1797, <DOI: doi: 10.2337/db07-1098>. ver apartados "Results" y "Discussion"	1-4
A		5-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
02.10.2017

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/5



- ②① N.º solicitud: 201700154
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.02.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/155** (2006.01)
A61P9/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SUCHAROV CARMEN C et al.. YIN YANG 1 IS INCREASED IN HUMAN HEART FAILURE AND REPRESSES THE ACTIVITY OF THE HUMAN ALPHA-MYOSIN HEAVY CHAIN PROMOTER. 15/08/2003, Vol. 278, Páginas 31233 - 31239, ISSN 0021-9258, <DOI: doi:10.1074/jbc.M301917200>. Todo el documento.	1-15
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 02.10.2017	Examinador M. d. García Coca	Página 2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, y bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.10.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5-15	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5-15	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Yin Meimei et al. METFORMIN IMPROVES CARDIAC FUNCTION IN A NONDIABETIC RAT MODEL OF POST-MI HEART FAILURE. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology AUG 2011. Vol. 301, Nº 2, Páginas H459-H468, ISSN 0363-6135(print) ISSN 1522-1539(electronic), <DOI: doi:10.1152/ajpheart.00054.2011>	31.07.2011
D02	Calvert John W et al. ACUTE METFORMIN THERAPY CONFERS CARDIOPROTECTION AGAINST MYOCARDIAL INFARCTION VIA AMPK-ENOS-MEDIATED SIGNALING. Diabetes MAR 2008. Vol. 57, Nº 3, Páginas 696-705, ISSN 0012-1797, <DOI: doi:10.2337/db07-1098>	29.02.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga que una administración continuada de metformina tras un infarto de miocardio promueve la recuperación cardiaca, reduciendo el tamaño del infarto de miocardio y previniendo el remodelado cardiaco adverso tras dicho infarto (ver apartado "Discussion").

El documento D02 divulga que la administración (vía inyección) de una única dosis de metformina tiene un efecto protector frente al infarto de miocardio, promoviendo la recuperación cardiaca, reduciendo el tamaño del infarto de miocardio (ver apartados "Results" y "Discussion").

Aunque en los documentos D01 y D02 se indica que la metformina actúa modulando la expresión de distintos genes, entre los que no se encuentran ni el gen Yin yang (YY1) ni el gen que codifica la proteína soluble *suppression of tumorigenicity-2* (ST2s), el efecto obtenido es el mismo que el reivindicado en las reivindicaciones 1-4. El hecho de que el compuesto actúe modulando unos genes u otros, no se considera una característica técnica esencial, sino la descripción de su mecanismo de acción, lo que constituye un descubrimiento científico. Dado que la definición de un mecanismo de actuación no confiere novedad y a la vista de los documentos D01 y D02, la invención definida en las reivindicaciones 1-4 carece de novedad en el sentido del artículo 6.1 LP 11/1986 y no implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 LP 11/1986.

No se ha recuperado en el estado de la técnica ningún documento relevante relacionado directamente con el objeto de las reivindicaciones 5-15, ya que no se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que relacione el gen Yin yang (YY1) con el gen que codifica la proteína soluble *suppression of tumorigenicity-2* (ST2s). Por lo tanto, el objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 5-15, se considera nuevo en el sentido del artículo 6.1 LP 11/1986 y que implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 LP 11/1986.

En consecuencia, se considera que la invención según se define en las reivindicaciones 1-4 no cumple los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 de la Ley 11/1986 de Patentes. Por el contrario, se considera que las reivindicaciones 5-15 satisfacen dichos requisitos de patentabilidad.