

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 498**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 29/16 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011** **E 11700371 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2525806**

54 Título: **Proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGPTL4) para el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular**

30 Prioridad:

20.01.2010 EP 10305063

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

17.07.2014

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**GERMAIN, STÉPHANE;
GALAUP, ARIANE;
MONNOT, CATHERINE;
TISSIER, RENAUD;
GHALEH, BIJAN y
BERDEAUX, ALAIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 477 498 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGPTL4) para el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en el mantenimiento la integridad de la barrera celular del endotelio vascular y en la reducción del fenómeno de ausencia de perfusión con infarto de miocardio.

Antecedentes de la invención

- La cardiopatía representa la primera causa de muerte en los países ricos y la segunda causa de muerte en los países pobres, y habría que priorizar los tratamientos que disminuyan al mínimo los daños microvasculares para proteger el miocardio lesionado como recomiendan las directrices de la ACC/AHA. La restauración rápida del riego sanguíneo en la arteria infartada obstruida, lo que puede limitar el daño del tejido inducido por la isquemia después del comienzo de los síntomas isquémicos, es un determinante clave de la evolución a corto y largo plazo para los pacientes con un infarto agudo de miocardio (IAM). El restablecimiento del riego sanguíneo en el tejido isquémico cardíaco restaura verdaderamente el aporte de oxígeno y nutrientes en el miocardio inane y, así pues, limita la extensión del IAM, pero también induce la disfunción microvascular, la inflamación y el daño oxidativo.

- El incremento de la permeabilidad vascular contribuye de forma importante al edema y al daño del miocardio que aparecen tras los episodios isquémicos. El desarrollo del edema determina la pérdida de la integridad, lo que es perjudicial para la recuperación y también permite la extravasación de la fibronectina y del fibrinógeno que forma la red de la matriz provisional utilizada por los leucocitos para la infiltración. El daño vascular también contribuye al fenómeno de ausencia de perfusión que se observa en el 30% de los pacientes con una perfusión tras la isquemia miocárdica de la pared anterior y que está asociada a una incidencia mayor de muerte. Por lo tanto, el aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos del corazón contribuye a la progresión de la enfermedad. La prevención de la permeabilidad vascular y del edema de las células del endotelio y del miocardio mejora el riego sanguíneo del miocardio durante el perfusión tras el infarto de miocardio agudo y su modulación en respuesta al infarto representa una estrategia pertinente para mejorar los tratamientos en marcha que podrían limitar el tamaño del infarto, mejorar el funcionamiento del corazón y prolongar la supervivencia. En la actualidad, todavía no hay ningún tratamiento farmacológico que actúe selectivamente sobre el fenómeno de ausencia de perfusión.

- Las angiopoyetinas son los principales reguladores de la estabilización de los vasos y de la extravasación gracias a que se fijan a los receptores Tie2. Las proteínas del tipo angiopoyetina (pseudoangiopoyetinas ANGPTL1-7), que pertenecen a la familia de las angiopoyetinas, comparten algunas propiedades estructurales y funcionales con las angiopoyetinas.

- La ANGPTL4 se induce por hipoxia y la sintetizan las células vasculares en las enfermedades isquémicas, tal como la isquemia crítica de la extremidad posterior. La ANGPTL4 es una proteína secretada de 55 kDa que se procesa en fragmentos de 20 kDa y 35 kDa, que comprenden el dominio superhelicoidal y el dominio de tipo fibrinógeno, respectivamente. El dominio superhelicoidal interviene en su oligomerización, que es necesaria para su actividad. Los estudios para caracterizar la importancia de la ANGPTL4 sobre la angiogénesis proporcionaron resultados complejos: factor de supervivencia o modulador de la adhesión de las células endoteliales *in vitro*, e inductor así como inhibidor de la angiogénesis en diferentes modelos *in vivo* que podrían depender de si es soluble o interacciona con la matriz extracelular a través de los proteoglicanos con sulfato de heparano. La ANGPTL4 también aparece como modulador clave del desarrollo de los vasos linfáticos en el intestino y del funcionamiento de los vasos sanguíneos a través de la modulación de la permeabilidad vascular. De hecho, la ANGPTL4 inhibe la hiperpermeabilidad vascular aguda de la piel inducida por la histamina o por el VEGF, así como la intravasación y la extravasación de las células tumorales metastásicas a través de la inhibición de la permeabilidad vascular. En línea con la actividad de las angiopoyetinas dependiente del contexto, la ANGPTL4 indujo el incremento de la extravasación de las células tumorales en un modelo de tumor de mama con metástasis en el pulmón mediado por el TGF. La ANGPTL4 también inhibe la lipoproteína (LPL) y las lipasas hepáticas (HL). En el ratón, la sobreexpresión hepática de la ANGPTL4 induce la hipertrigliceridemia, mientras que la delección genética del *angptl4* o el tratamiento con anticuerpos anti-ANGPTL4 ocasionan una disminución de la trigliceridemia. Sin embargo, la función de la ANGPTL4 en la regulación del metabolismo de los lípidos no está clara, ya que los ratones sin el *angptl4* mostraban una concentración más baja de HDL que los ratones de control. En los humanos, la ANGPTL4 posee distintas variantes, de las cuales la E40K está asociada a una concentración de triglicéridos (TG) en el plasma significativamente más baja y a una concentración más alta del colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Resulta interesante que, aunque presentan un perfil lipídico ateroprotector, los individuos que llevan la variante E40K inactiva de la ANGPTL4 están sometidos a un incremento del riesgo de cardiopatía coronaria. Estos datos recientes sugieren que la ANGPTL4 interviene en cardiopatías a través de un mecanismo todavía sin caracterizar.

- Ito Y. et al.: *Cancer Research, American Association for Cancer Research*, Baltimore, MD., EE.UU., vol. 63, n.º 20, 15 de octubre de 2003, páginas 6651-6657; Ito Y. et al.: *Arvo Annual Meeting Abstract Search and Program Planner*, 4 de mayo de 2003; Galaup Ariane et al.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n.º 49, diciembre de 2006, páginas 18721-18726, describen que el polipéptido de la ANGPTL4 reduce la extravasación/permeabilidad/angiogénesis vascular. Los usos terapéuticos descritos son el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, la retinopatía diabética o la metástasis. Kim I. et al.: *Biochemical Journal*, The Biochemical Society, Londres, GB, vol. 346, n.º 3, 15 de marzo de 2000 (2000-03-15), páginas 603-610 describe un efecto protector del polipéptido de la ANGPTL4 sobre las células endoteliales.

Compendio de la invención

- 10 La invención se refiere a un polipéptido de la ANGPTL4 que se usa para prevenir la ausencia de reperusión durante el tratamiento de una cardiopatía coronaria.

Descripción detallada de la invención

- Los inventores muestran que se incrementa la permeabilidad vascular, la hemorragia, el edema, la inflamación y la gravedad del infarto en los ratones que carecen del *angptl4*. La disminución de la expresión del *vegfr2* y de la ve-
- 15 cadherina tras la isquemia, así como el incremento de la fosforilación de la Src cinasa vía abajo del VEGFR2, se realzaron en la microcirculación coronaria de los ratones deficientes en el *angptl4*. Ambos fenómenos condujeron a una alteración de la formación del complejo VEGFR2/VE-cadherina y a una ruptura de las uniones adherentes en las células endoteliales de los ratones deficientes en el *angptl4* que se correlacionaba con un incremento de la ausencia de reperusión. En cambio, la ANGPTL4 humana recombinante evitó en las células endoteliales la disociación del
- 20 complejo VEGFR2/VE-cadherina impulsado por el VEGF y limitó las hemorragias, redujo el tamaño del infarto del miocardio y la extensión de la ausencia de reperusión en los conejos. De acuerdo con esto, la vasculoprotección debida a la ANGPTL4 es crucial para la cardioprotección secundaria durante el IAM y podría constituir una diana relevante para la intervención terapéutica.

Usos terapéuticos y procedimientos de acuerdo con la invención:

- 25 En la presente memoria se describe un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «barrera celular del endotelio vascular» se refiere a la capa de células que reviste la superficie interna de los vasos sanguíneos y que actúa de barrera selectiva entre la luz del vaso y el tejido circundante, y con ello controla el tránsito de entrada y salida de líquidos, materiales y células,
- 30 tal como las células mieloides y los glóbulos blancos, del torrente circulatorio. El incremento excesivo o prolongado de la permeabilidad de la barrera celular del endotelio vascular conduce a edema o tumefacción del tejido. De acuerdo con esto, la terminología «mantener la integridad de la barrera celular del endotelio vascular» significa el mantenimiento de la barrera celular del endotelio vascular al evitar o limitar la permeabilidad de dicha barrera.

- Más en particular, en la presente memoria se describe un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en el
- 35 mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular durante el tratamiento de las afecciones isquémicas.

- En el contexto de la invención, la terminología «tratar» o «tratamiento», tal y como se utilizan en la presente memoria, significa revertir y aliviar, inhibir el progreso de la afección isquémica a cuya afección se aplica la terminología. Típicamente, el tratamiento de las afecciones isquémicas consiste en el restablecimiento del riego
- 40 sanguíneo (reperusión) del órgano isquémico (p. ej., corazón) mediante angioplastia (p. ej.; angioplastia coronaria, renal o carótida), trombólisis o intervención coronaria. La terminología «intervención coronaria percutánea (ICP)» significa la angioplastia coronaria que es un procedimiento terapéutico para tratar las arterias coronarias del corazón con estenosis (estrechadas) hallado en la cardiopatía coronaria. La terminología «trombólisis» significa la administración de trombolíticos. Los trombolíticos disponibles en la actualidad incluyen la reteplasa (r-PA o
- 45 Retavasa), alteplasa (t-PA o activasa), urocinasa (Abbocinasa), prourocinasa, complejo activador de la estreptocinasa purificado y anisolado (APSAC) y estreptocinasa.

- La terminología «afecciones isquémicas» se refiere a toda afección que es resultado de una restricción del torrente circulatorio en al menos un órgano o tejido. Estas afecciones típicamente se deben a la obstrucción de un vaso sanguíneo. Por ejemplo, las afecciones isquémicas incluyen, pero sin limitarse a ellas, la isquemia renal, isquemia
- 50 retiniana, isquemia encefálica e isquemia del miocardio. Más en particular, la terminología incluye, pero sin limitarse a ellas, intervención de injerto de derivación de la arteria coronaria, isquemia cerebral global debido a paro cardíaco, infarto cerebral focal, hemorragia cerebral, infarto por hemorragia, hemorragia hipertensiva, hemorragia debida a una ruptura de anomalías vasculares intracraneales, hemorragia subaracnoidea debido a la ruptura de aneurismas arteriales intracraneales, encefalopatía hipertensiva, estenosis u oclusión de la carótida que conduce a isquemia
- 55 cerebral, tromboembolia cardíogena, accidente espinal y lesión de la médula espinal, enfermedades de los vasos

sanguíneos cerebrales: p. ej., aterosclerosis, vasculitis, degeneración macular, infarto de miocardio, isquemia cardíaca y taquiarritmia supraventricular.

La invención da a conocer un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en la cardioprotección tras el infarto agudo de miocardio al mantener una integridad vascular que reduce el tamaño del infarto, de la hemorragia y de la ausencia de perfusión.

La invención se refiere a un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en la prevención de la ausencia de perfusión en el tratamiento de la cardiopatía coronaria, en especial en el infarto de miocardio.

Más en particular, la invención se refiere a un polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en la prevención de la ausencia de perfusión en el tratamiento del infarto de miocardio con elevación del segmento ST.

La terminología «ausencia de perfusión» se está utilizando cada vez más en los informes médicos publicados para describir la obstrucción microvascular y la reducción del riego sanguíneo del miocardio tras abrir una arteria ocluida. En su significado más amplio, la terminología «prevenir la ausencia de perfusión» o «prevención de la ausencia de perfusión» se refiere a reducir o evitar la ausencia de perfusión.

La terminología «paciente» se refiere a cualquier paciente (preferiblemente humano) aquejado de afecciones isquémicas.

En una opción concreta, al paciente se le diagnostica un trastorno coronario, más en concreto, al paciente se le ha diagnosticado la presencia de uno de los siguientes trastornos coronarios:

- trastornos isquémicos crónicos sin necrosis del miocardio, tal como angina de pecho por un esfuerzo o estable;
- trastornos isquémicos agudos sin necrosis del miocardio, tal como angina de pecho inestable;
- trastornos isquémicos con necrosis del miocardio, tal como infarto de miocardio con elevación del segmento ST o infarto de miocardio sin elevación del segmento ST.

La terminología «ANGPTL4» tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína 4 de tipo angiopoietina. La ANGPTL4 también se denomina HFARP (proteína hepática relacionada con la angiopoietina y el fibrinógeno), PGAR (proteína relacionada con la angiopoietina PPARy) y FIAF (factor adiposo inducido por el ayuno). La terminología incluye la ANGPTL4 que se produce de forma natural y las variantes conservativas de la función y formas modificadas de las mismas.

La ANGPTL4 puede proceder de cualquier fuente, pero típicamente es una ANGPTL4 de mamífero (p. ej., primate humano y no humano) y, más en particular, una ANGPTL4 humana. La secuencia de la proteína ANGPTL4 y de los ácidos nucleicos que codifican tales proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, GenBank n.º de acceso NM_139314 y NM_001039667 y el n.º de acceso de GenBank AAH23647 proporcionan la secuencia de aminoácidos completa de la ANGPTL4 de *Homo sapiens*. Sin embargo, se debe entender que, como los expertos en la técnica son conscientes de la secuencia de estas moléculas, se puede utilizar cualquier proteína o variante de secuencia génica de la ANGPTL4 con tal de que mantenga las propiedades de una ANGPTL4.

Las «variantes conservativas de la función» son aquéllas en las que un determinado resto de aminoácido en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global ni la función del polipéptido, que incluye, pero sin limitarse a ello, el reemplazo de un aminoácido por otro que tiene unas propiedades similares (tal como, por ejemplo, polaridad, potencial de formación de puentes de hidrógeno, acidez, basicidad, hidrofobia, aromático y similares). Los aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de tal forma que el porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos o de la proteína entre cualesquiera dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como el procedimiento de aglomeración, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una «variante conservativa de la función» también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60% según se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente de al menos el 75 %, lo más preferiblemente de al menos el 85 % e incluso más preferiblemente de al menos el 90 %, y que tiene las mismas, o sustancialmente similares, propiedades o funciones que la proteína nativa u original con la cual se compara.

De acuerdo con la invención, la terminología polipéptido de la «ANGPTL4» se refiere a cualquier polipéptido que comprende el fragmento aminoterminal de 20 kDa de la ANGPTL4 (o función conservativa de la misma) y, más específicamente, el dominio helicoidal del fragmento aminoterminal como describen Ge, H. et al. «Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4». *J. Biol. Chem.* 279, 2038-45 (2004); Mandard, S. et al., «The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment».

J. Biol. Chem. 279, 34411-20 (2004) y Chomel, C. et al. «Interaction of coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antangiogenic activity». *FASEB J* 23, 940-9 (2009). Por consiguiente, la terminología engloba a la propia ANGPTL4 o a los fragmentos de la misma que comprenden el fragmento aminoterminal de 20 kDa.

- 5 En las opciones específicas se contempla que los polipéptidos de la ANGPTL4 utilizados en los procedimientos terapéuticos de la presente invención se puedan modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de los compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, incrementar el tiempo en circulación o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de los compuestos posiblemente terapéuticos importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con una serie de vehículos portadores del fármaco que
10 modifican la biodistribución.

- Una estrategia para mejorar la viabilidad de los fármacos es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha demostrado que distintos polímeros hidrosolubles modifican la biodistribución, mejoran el modo de la captación por la célula, cambian la permeabilidad de las barreras fisiológicas; y modifican la velocidad a la que se eliminan del cuerpo. Para conseguir un efecto de liberación continua o bien una acción selectiva, se han sintetizado polímeros
15 hidrosolubles que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte del esqueleto, o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

- El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente como vehículo de fármacos, dada su elevada biocompatibilidad y lo fácil que resulta modificarlo. Se ha demostrado que el acoplamiento a diferentes fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede conjugar con agentes activos a
20 través de los grupos hidroxilo de los extremos de la cadena y mediante otros procedimientos químicos; no obstante, el propio PEG está limitado como mucho a dos agentes activos por molécula. En una estrategia diferente se exploraron copolímeros de PEG y aminoácidos a modo de nuevos biomateriales que retuvieran las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de presentar numerosos puntos de adhesión por molécula (lo que proporciona una mayor carga de fármaco) y cuya síntesis se podría diseñar para que se adapten a
25 muy diversas aplicaciones.

- Los expertos en la técnica son conscientes de las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de los fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N. J) ha utilizado polímeros para la administración de los fármacos que consisten en polímeros alternantes de PEG y monómeros trifuncionales tales como lisina. Las cadenas de PEG (típicamente de 2000 Da o menos) están unidas a los grupos amino α y ϵ de la lisina a través de enlaces de uretano
30 estables. Tales copolímeros mantienen las propiedades deseables del PEG, al mismo tiempo que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden utilizar para la modificación, entrecruzamiento o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para la generación de profármacos estables de larga vida en circulación por variación de la masa molecular del polímero, de la masa
35 molecular de los segmentos de PEG y del enlace escindible entre el fármaco y el polímero. La masa molecular de los segmentos de PEG afecta al espaciado del complejo entre el fármaco y el grupo conector, y a la cantidad de fármaco por masa molecular de conjugado (los segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga del fármaco). En general, al incrementar la masa molecular global del conjugado del copolímero en bloque se incrementará la semivida en circulación del conjugado. No obstante, el conjugado debe poderse degradar con
40 facilidad o bien debe tener una masa molecular por debajo del umbral limitante de la filtración globular (p. ej., menos de 45 kDa).

- Además de que el esqueleto del polímero es importante para mantener la semivida en circulación y la biodistribución, se deben utilizar los conectores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta que se libere del esqueleto del polímero mediante un desencadenante específico, típicamente una actividad enzimática en el tejido de
45 diana. Por ejemplo, este tipo de administración de fármaco con activación en el tejido es particularmente útil cuando se necesita administrarlo en un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en el sitio de la enfermedad o cerca de él. Los expertos en la técnica conocen las colecciones de grupos conectores que se utilizan para la administración de fármacos activados y se pueden basar en la cinética enzimática, en la prevalencia de la enzima activa, y en la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionada (véanse,
50 p. ej., las tecnologías establecidas por VectraMed, Plainsboro, N. J.). Tales conectores se pueden utilizar para modificar los polipéptidos de la ANGPTL4 descritos en la presente memoria para la administración terapéutica.

De acuerdo con la invención, los polipéptidos de la ANGPTL4 se pueden producir mediante los procedimientos convencionales de síntesis automática de péptidos o mediante la expresión recombinante. Los principios generales para diseñar y fabricar proteínas los conocen bien los expertos en la técnica.

- 55 Los polipéptidos de la ANGPTL4 utilizados en la invención se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con las técnicas convencionales. En el mercado están disponibles una serie de sintetizadores automáticos y se pueden utilizar de acuerdo con los protocolos conocidos. Los polipéptidos de ANGPTL4 de la invención se pueden sintetizar también mediante la tecnología de fase sólida con el empleo de un sintetizador de

péptidos de ejemplo, tal como el modelo 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier proteína determinada, generada a través de la síntesis automática de péptidos o a través de métodos recombinantes, se puede determinar con el análisis por HPLC de fase inversa. La autenticidad química de cada péptido se puede establecer por cualquier procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica.

- 5 A modo de alternativa a la síntesis automática de péptidos, se puede emplear la tecnología del ADN recombinante, en la que en un vector de expresión se introduce una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de elección, se transforma o se transfecta en una célula hospedadora adecuada, y se cultiva en las condiciones adecuadas para que se exprese según se describe más adelante en la presente memoria. Los procedimientos recombinantes son especialmente preferidos para producir los polipéptidos más largos.
- 10 Se pueden utilizar una serie de sistemas de vectores de expresión y hospedadores para contener y expresar la secuencia que codifica la proteína o el péptido. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido o vectores de expresión del ADN cosmídico; levadura transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión víricos (p. ej., baculovirus); sistemas de células vegetales transfectadas con los vectores de
- 15 expresión víricos (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión bacterianos (p. ej., los plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Los expertos en la técnica conocen bien las diferentes técnicas para optimizar la expresión de proteínas de mamíferos. Las células de mamífero que son útiles para la producción de proteínas recombinantes incluyen, pero sin limitarse a ellas, las células VERO, las células HeLa, las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), células COS
- 20 (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Los expertos en la técnica conocen los protocolos de ejemplo para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o los polipéptidos de fusión en las bacterias, levadura u otros invertebrados, y se describen brevemente a continuación en la presente memoria. Los sistemas de hospedadores mamíferos para la expresión de proteínas recombinantes también los conocen bien los expertos en la técnica. Las cepas de células hospedadoras se pueden elegir por una
- 25 capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir determinadas modificaciones postraduccionales que serán útiles a la hora de proporcionar la actividad de la proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero sin limitarse a ellas, la acetilación, la carboxilación, la glucosilación, la fosforilación, la lipidación y la acilación. El procesamiento postraduccional que escinde una forma «prepro» de la proteína también puede ser importante para la inserción, el plegamiento y/o la función correctos. Diferentes células hospedadoras, tales como CHO, HeLa,
- 30 MDCK, 293, WI38 y similares, tienen la maquinaria celular específica y los mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales, y se pueden elegir para garantizar que la proteína foránea introducida se modificará y procesará correctamente.

- En la producción recombinante de los polipéptidos de la ANGPTL4 de la invención sería necesario emplear vectores que comprenden moléculas de polinucleótidos que codifican las proteínas procedentes de la ANGPTL4. Los
- 35 expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para preparar tales vectores, así como para producir células hospedadoras transformadas con tales vectores. Las moléculas polinucleotídicas utilizadas para tal cometido se pueden unir a un vector, que generalmente incluye un marcador de selección y un origen de replicación, para su propagación en un hospedador. Los expertos en la técnica conocen bien estos elementos de las construcciones de expresión. Por lo general, los vectores de expresión incluyen el ADN codificante de la proteína dada operativamente
 - 40 unido a secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales, tales como las procedentes de genes de un mamífero, de un microorganismo, de un virus o de un insecto. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen los promotores transcripcionales, los operadores, o los potenciadores, los sitios de fijación al ribosoma en el ARNm, y las secuencias adecuadas que controlan la transcripción y la traducción.

- Las terminologías «vector de expresión», «construcción de expresión» o «casete de expresión» se utilizan
- 45 indistintamente a lo largo de esta especificación y en su significado incluyen cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico en el cual parte o todo el ácido nucleico que codifica la secuencia es capaz de transcribirse.

- La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los péptidos o de los polipéptidos de la invención dependerá por supuesto de la célula hospedadora específica a utilizar, y está dentro de la pericia del
- 50 experto en la técnica. Los procedimientos para la construcción de vectores de expresión de mamíferos se describen, por ejemplo, en la patente europea EP-A-0367566 y en la patente internacional WO 91/18982.

- En general, los vectores útiles para la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos de origen vírico o bacteriano que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de
- 55 secuencias de ácido nucleico oligonucleotídicas, antisentido, de siRNA, de shRNA o de ribozimas. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero sin limitarse a ellas, secuencias nucleotídicas de los virus siguientes: retrovirus, tal como un virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor de mama murino y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus del polio; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus de la variolovacuna; virus de la

poliomielitis; y virus de ARN tal como un retrovirus. Uno puede emplear fácilmente otros vectores que no se han nombrado, pero que se conocen en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que los genes no esenciales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (p. ej., lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN genómico del virus en ADN con la posterior integración del provirus en el ADN de la célula hospedadora. Los retrovirus se han autorizado para ensayos de genoterapia humana. Los más útiles son los retrovirus que tienen una replicación deficiente (esto es, son capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovíricos genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción muy eficaz de genes *in vivo*. Los protocolos estándares para producir retrovirus de replicación deficiente (que incluyen las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento que lleva un plásmido, producción de retrovirus recombinantes en la línea de células de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de los medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas víricas) se conocen bien en la técnica.

Los virus preferidos para determinadas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados (AAV, por su nombre en inglés), que son virus de ADN bicatenario que ya se han autorizado para el uso en la genoterapia humana. En la actualidad se conocen 12 serotipos de AAV diferentes (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos de tejido. Los AAV recombinantes proceden de AAV2 dependientes de parvovirus. Los virus adenoasociados de los tipos 1 a 12 se pueden manipular genéticamente para que tengan una replicación deficiente y para que sean capaces de infectar un amplio abanico de tipos y especies celulares. Además tiene ventajas tales como la termoestabilidad y la estabilidad en disolvente lipídico; la alta frecuencia de transducción en las células de diversas estirpes, entre ellas las células hematopoyéticas; y la ausencia de inhibición por sobreinfección, todo lo cual permite múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica de sitio, lo que disminuye el mínimo la posibilidad de la mutagénesis por inserción, y la variabilidad de la expresión del gen insertado, que es característica de la infección retroviral. Además, la infección de los virus adenoasociados se ha seguido en el cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un fenómeno relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen los vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito de manera extensa en la técnica y los conocen bien los expertos en la técnica. En los últimos años se han utilizado los vectores plasmídicos como vacunas de ADN para introducir en las células *in vivo* los genes que codifican el antígeno. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que con muchos de los vectores víricos. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso corriente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Los expertos en la técnica conocen también otros plásmidos. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse de forma personalizada con el uso de enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos del ADN. Los plásmidos pueden introducirse mediante una serie de vías parentales, de la mucosa y tópicas. Por ejemplo, el ADN del plásmido se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También puede administrarse mediante pulverizaciones o gotas intranasales, supositorios rectales y por vía oral. También puede administrarse en la epidermis o en una superficie de la mucosa mediante un disparo biolístico del gen. Los plásmidos se pueden dar en una solución acuosa, secarse en partículas de oro, o con otro sistema de introducción de ADN que incluyen, pero sin limitarse a ellos, liposomas, dendrímeros, coqueado y microencapsulación.

La expresión requiere que se aporten las señales adecuadas en los vectores, tales como potenciadores/promotores de origen vírico y de mamíferos que se pueden utilizar para impulsar la expresión de los ácidos nucleicos de interés en las células hospedadoras. Normalmente, el ácido nucleico que se quiere expresar está bajo el control transcripcional de un promotor. Un «promotor» se refiere a una secuencia de ADN que es reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o por la maquinaria sintética introducida, que se necesita para iniciar la transcripción específica de un gen. Las secuencias nucleotídicas están unidas operativamente cuando la secuencia reguladora está funcionalmente relacionada con el ADN que codifica la proteína de interés (a saber, ANGPTL4, una variante y similares). Así pues, una secuencia nucleotídica del promotor está operativamente unida a una secuencia de ADN determinada si la secuencia nucleotídica del promotor dirige la transcripción de la secuencia.

De igual forma, la frase «bajo control transcripcional» significa que el promotor está en la localización y orientación correcta respecto al ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. Puede utilizarse cualquier promotor que impulse la expresión del ácido nucleico. El promotor concreto que se emplea para controlar la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés no se cree que sea importante, con tal de que sea capaz de impulsar la expresión del ácido nucleico en la célula diana. Así pues, cuando se quiere que actúe selectivamente en una célula humana, es preferible colocar la región codificante del ácido nucleico de manera adyacente a, y controlada por un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, tal promotor podría incluir un promotor humano o bien vírico. Los promotores habituales incluyen, p. ej., el

promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus humanos (CMV), el promotor temprano del SV40, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, la β -actina, el promotor de la insulina de rata, el promotor de la fosfoglicerol cinasa y el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, todos los cuales son promotores bien conocidos y de fácil adquisición por los expertos en la técnica, y que se pueden utilizar para obtener un alto nivel de expresión de la secuencia codificante de interés. Se contempla también el uso de otros promotores de fagos bacterianos o de células de mamíferos que se conocen bien en la técnica para conseguir la expresión de una secuencia codificante de interés, siempre y cuando el nivel de expresión sea suficiente para que se produzca un rendimiento recuperable de la proteína de interés. Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el perfil de expresión de la proteína de interés tras la transfección o transformación. Se pueden utilizar también promotores inducibles.

Otro elemento regulador que se utiliza en la expresión de proteínas es un potenciador. Se trata de elementos genéticos que incrementan la transcripción de un promotor localizado en una posición distante de la misma molécula de ADN. Cuando una construcción de expresión emplea un inserto de ADNc, típicamente se deseará incluir una secuencia señal de poliadenilación para que el transcrito del gen se poliadenile correctamente. Cualquier secuencia señal de poliadenilación reconocida por las células de las especies animales transgénicas seleccionadas es adecuada para la práctica de la invención, tales como la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana o bovina y del SV40.

Otro aspecto de la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la ANGPTL4 para ser usado en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular, tal y como se describe más arriba.

Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN que se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector vírico tal y como se describe más arriba.

Así pues, un objeto más de la descripción se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la ANGPTL4 para ser usado en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular, tal y como se describe más arriba.

Un objeto más de la descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la ANGPTL4 (o un vector que comprende un ácido nucleico del mismo) para mantener la integridad de la barrera celular del endotelio vascular, tal y como se describe más arriba.

Los mismos ácidos nucleicos y vectores también pueden ser útiles para ser usados en la prevención de la ausencia de reperusión en el tratamiento de la cardiopatía coronaria, en especial en el infarto de miocardio (no se reivindica).

La presente invención da a conocer un procedimiento para tratar una afección isquémica en un paciente que lo necesita, que comprende las etapas que consisten en:

- i) restaurar el riego sanguíneo en el órgano o tejido isquémico
 - ii) mantener la integridad de la barrera celular del endotelio vascular de dicho órgano o tejido isquémico mediante la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos de la ANGPTL4 (o los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la ANGPTL4 o los vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la ANGPTL4; esto no se reivindica) de acuerdo con la invención.
- Más en particular, la presente invención da a conocer un procedimiento para tratar el infarto agudo de miocardio en un paciente que lo necesita, que comprende las etapas que consisten en:
- i) restaurar el riego sanguíneo en el tejido isquémico cardíaco.
 - ii) mantener la integridad de la barrera celular del endotelio vascular de dicho tejido isquémico cardíaco mediante la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos de la ANGPTL4 (o los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la ANGPTL4 o los vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la ANGPTL4; esto no se reivindica) de acuerdo con la invención.

En una opción particular, las etapas i) y ii) según se describe más arriba se pueden realizar de forma secuencial o simultánea.

Con «cantidad terapéuticamente eficaz» se hace referencia a una cantidad suficiente de los polipéptidos de la ANGPTL4 (o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de la ANGPTL4 o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la ANGPTL4; esto no se reivindica) para mantener la integridad de la barrera

- celular del endotelio vascular en una proporción beneficio/riesgo razonable que se puede aplicar a cualquier tratamiento médico. Se sabrá que el uso total de los compuestos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico de cabecera dentro del alcance del criterio médico acertado. El nivel de la dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente concreto dependerá de una serie de factores, entre ellos el trastorno a
- 5 tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, la masa corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o que coincidan en el tiempo con el polipéptido específico empleado; y los factores parecidos bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que hay que
- 10 comenzar las dosis del compuesto con una cantidad más baja que la requerida para conseguir el efecto terapéutico deseado, y que hay que incrementar gradualmente la dosis hasta que se consigue el efecto deseado.

Composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención:

- Un objeto más de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de ANGPTL4 (o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4 que no se reivindica) para ser usado en el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular según se
- 15 describe más arriba. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son útiles para ser usadas en la prevención de la ausencia de reperusión en el tratamiento de la cardiopatía coronaria, en especial el infarto de miocardio.

- Típicamente, el polipéptido de ANGPTL4 (o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4 o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4; no se reivindica) se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y, de manera optativa, matrices de liberación lenta, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.
- 20

- «Farmacéuticamente» o «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inadecuada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un humano, cuando sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido no tóxico, semisólido o relleno líquido, diluyente, material de encapsulación o ayudante de formulación de cualquier tipo.
- 25

- En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, en monoterapia o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y a seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y yugal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.
- 30
- 35

- Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstas pueden estar como soluciones salinas estériles e isotónicas concretas (fosfato de monosodio o de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones especialmente liofilizadas o secas que tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o de una disolución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.
- 40

- Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la presentación debe ser estéril y debe ser líquida hasta el punto de que se recoja con facilidad con jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe proteger de la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 45

- Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En las condiciones habituales de conservación y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.
- 50

- El polipéptido de ANGPTL4 (o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4 o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4; no se reivindica) se puede formular en una composición en una presentación neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales por adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y
- 55

similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- El vehículo puede ser también un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de los tensioactivos. La acción de los microorganismos se puede prevenir con el uso de diferentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

- Se preparan soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de los polipéptidos activos en la cantidad necesaria y en el solvente adecuado con otros de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesiten, y después se esteriliza por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diferentes ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado a partir de una solución de los mismos que se ha esterilizado por filtración con anterioridad.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosis y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran con facilidad en una serie de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

- Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si fuera necesario y hay que volver isotónico primero el diluyente líquido con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en concreto son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Tal variación de la dosis se producirá necesariamente según la afección del paciente a tratar. La persona responsable de la administración, en cualquier circunstancia, determinará la dosis adecuada para cada paciente.

- Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación retardada; y cualquier otra forma utilizada corrientemente.

Productos sanitarios de acuerdo con la invención:

- La presente invención también da a conocer el uso de un polipéptido de ANGPTL4 (o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4 o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4; no se reivindica) para la preparación de biomateriales o productos sanitarios para administración seleccionados entre prótesis endovasculares, tales como implantes intravasculares, injertos para derivación, parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular y catéter para angioplastia.

- En este sentido, la invención se refiere más en particular a biomateriales o productos sanitarios para administración según se menciona más arriba, revestidos con tal polipéptido de ANGPTL4 (o el ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4 o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de ANGPTL4; no se reivindica), expresión y/o actividad según se define más arriba, dichos biomateriales o productos sanitarios se seleccionan entre prótesis endovasculares, tales como implantes intravasculares, injertos para derivación, parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular y catéter para angioplastia. Tales biomaterial o producto sanitario para administración locales se pueden utilizar para reducir la estenosis como un adyuvante para los procedimientos de revascularización, derivación o injerto realizados en cualquier localización vascular, que incluye arterias coronarias, arterias carótidas, arterias renales, arterias periféricas, arterias cerebrales u otra localización venosa o arterial, para reducir la estenosis anatómica tal como en el caso del acceso por diálisis arterio-venosa con o sin un injerto de politetrafluoroetileno, y con o sin implante intravascular, o junto a cualquier otro procedimiento de trasplante o cardíaco, o intervenciones vasculares congénitas.

Con propósitos ilustrativos, tales prótesis endovasculares y procedimientos para revestir los polipéptidos de

- ANGPTL4 en ellas se describen más en particular en la patente internacional WO2005094916, o son los utilizados habitualmente en la técnica. Los compuestos utilizados para revestir las prótesis deben permitir preferiblemente una liberación controlada de dicho inhibidor. Tales compuestos pueden ser polímeros (tales como suturas, policarbonato, Hydron y Elvax), biopolímeros/biomatrices (tales como alginato, fucanos, matrices de colágeno, sulfato de heparano)
- 5 o compuestos sintéticos tales como moléculas sintéticas de tipo sulfato de heperano o combinaciones de las mismas. Otros ejemplos de materiales poliméricos pueden incluir materiales biocompatibles que se pueden degradar, p. ej., orcopoliésteres de poliésteres de lactona, p. ej., polilactida; polilactida-glucólido; policaprolactona-glucólido; poliortoésteres; polianhídridos; poliaminoácidos; polisacáridos; polifosfacenos; copolímeros de poli(éter-éster), p. ej., PEO-PLLA, o mezclas de los mismos; y materiales biocompatibles que no se degradan, p. ej., polidimetilsiloxano;
- 10 poli(etilenvinilacetato); polímeros o copolímeros de acrilato, p. ej., polibutilmetacrilato, poli(metilmetacrilato de hidroxietilo); polivinilpirrolidona; polímeros fluorados tales como politetrafluoroetileno; ésteres de celulosa. Cuando se utiliza una matriz polimérica, puede comprender 2 capas, p. ej., una capa de base en la cual se incorpora dicho inhibidor, tal como etilen-co-vinilacetato y polibutilmetacrilato, y un revestimiento superior, tal como polibutilmetacrilato, que actúa como control de la difusión de dicho inhibidor. Otra alternativa es que dicho inhibidor
- 15 puede estar comprendido en la capa de la base y el adjunto puede estar incorporado en la capa externa, o viceversa.

- Tal biomaterial o producto sanitario para administración puede ser biodegradable o se puede fabricar de metal o aleación, p. ej., Ni y Ti, u otra sustancia estable cuando se diseña para que el uso sea permanente. El inhibidor de la invención también puede quedar atrapado en el metal del implante intravascular o del injerto corporal que se ha modificado para que contenga microporos o canales. También se pueden utilizar para la administración local
- 20 parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular o un manguito vascular hecho de polímero u otros materiales biocompatibles según se describen más arriba que contienen el inhibidor de la invención.

- Dicho biomaterial o producto sanitario para administración permite que el inhibidor se libere desde dicho biomaterial o producto sanitario para administración a lo largo del tiempo y que entre en el tejido circundante. Dicha liberación se
- 25 puede producir durante 1 mes a 1 año. La administración local de acuerdo con la presente invención permite una concentración alta del inhibidor de la invención en el sitio de la enfermedad con una concentración baja del compuesto en circulación. La cantidad de dicho inhibidor utilizada para tales aplicaciones de administración local variará según los compuestos utilizados, la enfermedad a tratar y el efecto deseado. Para los propósitos de la invención, se administrará una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 30 La administración local de dicho biomaterial o producto sanitario para administración tiene lugar preferiblemente en, o cerca de, la posición de las lesiones vasculares. La administración puede ser mediante una o varias de las vías siguientes: mediante catéter u otro sistema para administración intravascular, por vía intranasal, intrabronquial, interperitoneal o por el esófago. Los implantes intravasculares se utilizan habitualmente como una tubular que se deja en el interior de la luz de un conducto para aliviar una obstrucción. Se pueden insertar en la luz del conducto de
- 35 una forma no expandida y, a continuación, se expanden de manera autónoma (derivaciones autoexpandibles) o con la ayuda de un segundo dispositivo *in situ*, p. ej., un balón de angioplastia montado en el catéter que se infla dentro del vaso, o pasaje corporal, estenosado para cizallar y alterar las obstrucciones relacionadas con los componentes de la pared del vaso y para obtener una luz más grande.

Procedimientos diagnósticos de la invención:

- 40 Un aspecto más de la descripción se refiere a un procedimiento para analizar un paciente que se cree que tiene o que está predispuesto a padecer la disfunción microvascular, que comprende la etapa de analizar una muestra biológica de dicho paciente para:
- (i) detectar la presencia de una mutación en el gen que codifica la ANGPTL4 y/o su promotor asociado; y/o
- (ii) analizar la expresión del gen que codifica la ANGPTL4.
- 45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «muestra biológica» se refiere a cualquier muestra de un paciente tal como sangre o suero.

- Las técnicas típicas para detectar una mutación en el gen que codifica la ANGPTL4 pueden incluir la detección de polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción, técnicas de hibridación, secuenciación del ADN, resistencia a las exonucleasas, microsecuenciación, extensión en fase sólida con ddNTP, extensión en solución con
- 50 ddNTP, ensayos con oligonucleótidos, procedimientos para detectar polimorfismos mononucleotídicos tales como la hibridación dinámica específica de alelo, reacción de ligación en cadena, minisequenciación, chips del ADN, hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo con sondas con marcaje doble o simple combinada con PCR o con Molecular Beacons y otros.

- El análisis de la expresión del gen que codifica la ANGPTL4 se puede valorar mediante cualquiera de una amplia
- 55 gama de procedimientos bien conocidos para detectar la expresión de un ácido nucleico transcrito o una proteína

traducida.

En una opción preferida, la expresión del gen que codifica la ANGPTL4 se valora mediante el análisis de la expresión del ARNm transcrito o de precursores del ARNm, tal como el ARN naciente, de dicho gen. Dicho análisis se puede valorar mediante la preparación de ARNm/ADNc de las células en una muestra biológica de un paciente, e hibridar el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia. El ARNm/ADNc preparado se puede utilizar en los ensayos de hibridación o amplificación, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, análisis de tipo Southern y Northern, análisis por reacción en cadena de la polimerasa, tales como PCR cuantitativa (TaqMan), y matrices de sondas tales como las matrices de ADN GeneChip^(TM) (AFFYMETRIX).

Ventajosamente, el análisis del nivel de expresión del ARNm transcrito del gen que codifica la ANGPTL4 implica el procedimiento de amplificación del ácido nucleico, p. ej., mediante RT-PCR (la realización experimental presentada en la patente de los EE.UU. n.º 4.683.202), reacción de la cadena de la ligasa (BARANY, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, páginas 189-193, 1991), replicación de secuencia automantenida (GUATELLI et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 57, páginas 1874-1878, 1990), sistema de amplificación transcripcional (KWOH et al., 1989, *Proc. Natl. Sci. USA*, vol. 86, páginas 1173-1177, 1989), replicasa Q-β (LIZARDI et al., *Biol. Technology*, vol. 6, páginas 1197, 1988), replicación en círculo rodante (patente de los EE.UU. n.º 5.854.033) u otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas mediante las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de las moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en cantidades muy pequeñas. Tal y como se utiliza en la presente memoria, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico capaces de alinearse a las regiones 5' o 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre ellas. En general, los cebadores de amplificación son de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En las condiciones adecuadas y con los reactivos los adecuados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica flanqueada por los cebadores.

En otra opción preferida, la expresión del gen que codifica la ANGPTL4 se valora mediante el análisis de la expresión de la proteína traducida a partir de dicho gen. Dicho análisis se puede valorar con un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), una modificación de un anticuerpo (p. ej., un conjugado de anticuerpo con un sustrato o con la proteína o el ligando de una proteína de un par proteína/ligando (p. ej., biotina-estreptavidina)), o un fragmento de anticuerpo (p. ej., un anticuerpo de cadena única, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se fija específicamente a la proteína traducida desde el gen que codifica la ANGPTL4.

Dicho análisis se puede valorar mediante una serie de técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, inmunoensayo enzimático (EIA, por su nombre en inglés), radioinmunoensayo (RIA, por su nombre en inglés), análisis de transferencia Western e inmunoensayo enzimático (ELISA, por su nombre en inglés).

El procedimiento puede comprender la comparación del nivel de expresión del gen que codifica la ANGPTL4 en una muestra biológica de un paciente con el nivel de expresión normal de dicho gen en un control. En la muestra biológica de un paciente, un nivel de expresión significativamente más bajo que el nivel de expresión normal de dicho gen es una indicación de que el paciente tiene o está predispuesto a padecer una disfunción microvascular. El nivel «normal» de expresión del gen que codifica la ANGPTL4 es el nivel de expresión de dicho gen en una muestra biológica de un paciente que no está afectado por la disfunción microvascular. Preferiblemente, dicho nivel normal de expresión se valora en una muestra de control (p. ej., muestra de un paciente sano, que no está aquejado por un incremento de la permeabilidad vascular retiniana) y, preferiblemente, el nivel de expresión medio de dicho gen en varias muestras de control.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1: tamaños de los infartos (expresados como un porcentaje del área en riesgo) en los conejos de control y en los conejos a los que se inyectó la ANGPTL4 recombinante humana a 100 ng/ml. Los círculos huecos representan el tamaño de cada infarto y los círculos rellenos representan la media $\pm$ EEM. * $p < 0,05$ (A). La extensión de la zona de ausencia de reperusión expresada como el porcentaje del tamaño del infarto (B) o expresada como el porcentaje del área en riesgo (C) en los conejos de control y en los conejos a los que se inyectó la ANGPTL4 recombinante humana a 100 ng/ml. Los círculos huecos representan cada zona de ausencia de reperusión y los círculos rellenos representan la media $\pm$ EEM. * $p < 0,05$. Imágenes al microscopio del miocardio de conejo infartado (D, barra de escala = 250 μ m). La tinción con HE reveló áreas isquémicas difusas caracterizadas por hemorragias que se señalan con una flecha (A) y que son más prominentes en los conejos de control en comparación con los conejos a los que se inyectó la ANGPTL4 recombinante humana a 100 ng/ml.

Ejemplos

Ejemplo 1: cardioprotección por mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular mediante la pseudoangiopoietina 4.

Materiales y métodos:

- 5 Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normativas oficiales editadas por el Ministerio de Agricultura Francés. Este estudio sigue los estándares del INSERM (el Instituto Nacional de Salud Francés) en cuanto al cuidado y al uso de los animales de laboratorio, se realizó de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EEC).

- 10 Animales y genotipado: Se determinó por PCR el genotipo del ADN genómico de la cola utilizando las condiciones siguientes: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto y 15 segundos, 30 ciclos. Los ratones C57BL/6 de tipo silvestre (*angptl4*^{+/+}) y con genosupresión *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ}, de 8 a 12 semanas de edad, se sometieron a protocolos de infarto de miocardio o se utilizaron como control de las condiciones de referencia.

- 15 Experimentos de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio: Se anestesiaron los ratones *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio. El infarto de miocardio por oclusión transitoria de la arteria coronaria izquierda se realizó durante 45 min y, a continuación, se restableció el riego sanguíneo de los tejidos durante 1 h a 3 semanas. Para el estudio de la expresión de *angptl4*, los ratones WT se sometieron a 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas de restablecimiento del riego sanguíneo (2 animales por grupo). Para valorar el tamaño del infarto y para la inmunohistoquímica (IHC, por su nombre en inglés) o los estudios ultraestructurales, a los ratones macho *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} se les restableció el riego sanguíneo durante 4 h o bien 48 h después de la isquemia (4 o 5 animales por grupo). Para los análisis de la permeabilidad sólo se restableció el riego sanguíneo durante 4 h en los ratones *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} (3 a 5 animales por grupo). El área en riesgo se identificó mediante tinción con azul de Evans y el área infartada se identificó mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, por su nombre en inglés). La región que no se tiñó de azul definió el área en riesgo y se expresó como el porcentaje del peso del ventrículo izquierdo. El área infartada se identificó como la zona negativa al TTC y se expresó como un porcentaje del área en riesgo. Se realizaron análisis ultraestructurales con un microscopio electrónico Hitachi H-9500.

- 30 Experimentos con conejos: se anestesiaron conejos de Nueva Zelanda (2,5-3,0 kg) utilizando zolazepam, tiletamina y pentobarbital (todos a 20-30 mg/kg i.v.). Se intubaron los animales, se mantuvieron con ventilación mecánica y se les realizó una toracotomía izquierda. Se pasó una sutura por debajo de una rama mayor de la arteria coronaria izquierda. Los extremos de la ligadura se pasaron por un tubo de propileno pequeño para formar un nudo corredizo. A continuación, los conejos recibieron aleatoriamente vehículo o bien la *angptl4* recombinante humana (10 µg/kg i.v.; 100 ng/ml). Cinco minutos después se indujo la oclusión de la arteria coronaria (OAC) durante 30 min empujando el nudo corredizo a través del tubo. Posteriormente se indujo el restablecimiento del riego sanguíneo mediante la liberación del nudo corredizo. A continuación, el tórax se cerró en capas. Cuatro horas después del comienzo del restablecimiento del riego sanguíneo se volvió a abrir el tórax y, rápidamente, se infundió tioflavina S (4 %; 1,5 ml/kg) a través de la aurícula izquierda. A continuación se sacrificaron los conejos con pentobarbital seguido de cloruro de potasio. Tras la escisión, cada corazón se perfundió de forma retrógrada con azul de Alcian (0,5 %) y se prepararon cortes seriados. Se fotografiaron las rodajas con luz UV para identificar la región de ausencia de reperfusión. El área de ausencia de reperfusión, la infartada y la zona de riesgo se determinaron como en los ratones.

- 45 Análisis de hibridación *in situ* (ISH) y de inmunohistoquímica (IHC): El marco abierto de lectura (ORF, por su nombre en inglés) del *angptl4* completo de ratón o de humano se amplificó por PCR, se subclonó en el pGem.T (Promega) y se utilizó para generar una sonda antisentido del *angptl4* de ratón con ³⁵S-RNA. Se utilizó una sonda sentido como control negativo y se utilizó como plantilla. Se realizaron experimentos de ISH con sondas sentido y sondas antisentido del *angptl4* de ratón o de humano, y de IHC por inmunomarcación anti-CD45, anti-Mac3 y anti-CD31 tal y como se describió anteriormente (Brecht, N. et al. «Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice». *PLoS ONE* 3, e3950 (2008)). En los cortes de los corazones infartados humanos se realizaron ISH para detectar el *angptl4* humano combinadas con la IHC que utiliza el anticuerpo anti-CD34 (R & D System).

- 50 Ensayo de Miles modificado: los ratones macho *angptl4*^{-/-} y *angptl4*^{+/+} se anestesiaron con pentobarbital. Para las condiciones de referencia, a los ratones se les inyectó azul de Evans al 1 % (200 µl) en la vena de la cola y se sacrificaron 4 h después. Para las condiciones de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia, se sometió a los ratones a una oclusión coronaria durante 45 min y se les inyectó por vía intravenosa azul de Evans al 1 % (200 µl) antes de las 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo. En el momento del sacrificio, los ratones se perfundieron a través de la aorta con tampón de citrato, pH 4, con una cánula de 18 galgas. La sangre, el colorante y el tampón salían a través de una abertura en la aurícula derecha. El azul de Evans se eluyó durante 18 h a 70 °C en 1 ml de formamida. Tras la centrifugación, se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro. Se determinó

el azul de Evans (ng) extravasado a partir de una curva estándar y se normalizó por el peso (g) del tejido. Los datos se presentan como la media $\pm$ EEM de 3 o 5 ratones por genotipo.

Estudio de inmunofluorescencia y análisis confocal en criocortes: se sometió a los ratones a isquemia y, tras 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo, se anestesiaron con ketamina y se les inyectó xilazina por vía intraperitoneal.

- 5 Se les inyectaron perlas con FITC (20 μ l) en la vena femoral según se ha descrito anteriormente (Baffert, F., Le, T., Thurston, G y McDonald, D. M. «Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules». *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H107-18 (2006)). Se abrió rápidamente el tórax y se perfundió la vasculatura durante 2 minutos a una presión de 120 mmHg con paraformaldehído al 1% como estcha descrito para el ensayo de Miles modificado. A continuación, el corazón se colocó en paraformaldehído al 1 %
- 10 durante 1 h a temperatura ambiente, se enjuagó varias veces con PBS, se infiltró durante una noche con sacarosa al 30 %, y se congeló para hacer cortes con un criostato. Los cortes de 80 μ m de grosor se incubaron en suero de cabra normal al 5 % en PBS con Triton X-100 al 0,3 %, soroalbúmina bovina al 0,2 %, durante 1 hora a TA para bloquear la fijación inespecífica del anticuerpo y se incubaron durante una noche con los anticuerpos primarios. Se identificaron las células endoteliales, los pericitos y las uniones adherentes con los anticuerpos anti-CD31 (BD
- 15 Pharmingen), anti-NG2 de conejo (Chemicon) y anti-VE-cadherina de rata (regalo personal de E. Dejana, IFOM), respectivamente. Tras varios enjuagues con PBS, los especímenes se incubaron durante 3 h a la temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (antirrata o anticonejo; Molecular Probes) marcados con fluorescencia (Alexa 555 y Alexa 647) y diluidos a 1:500. Finalmente, se montaron los especímenes en Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes confocales se tomaron con un microscopio Leica TCS SP5. Los cortes confocales se
- 20 visionaron en un microscopio Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH) con un objetivo de inmersión de 63 aumentos (NA = 1,4). Se utilizó un incremento de 0,117 μ m entre los cortes. La reconstrucción tridimensional de las diferentes estructuras se obtuvo con los módulos LABELVOXEL y SURFACEGEN del programa informático Amira 5.2.1 (Visage Imaging GmbH).

- 25 Aislamiento de los cardiomiocitos y ensayo de la viabilidad: una vez anestesiados, el corazón se retiró del tórax y se canuló. El corazón se infundió durante 4 min con tampón de Tyrode ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; y el pH ajustado a 7,46 con NaOH a 1 N) a presión constante y a 37 °C. La infusión se cambió a una solución enzimática ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; CaCl₂ 0,0125; con el pH ajustado a 7,46 con NaOH 1 a N) que contenía 0,1 mg/ml de la liberasa
- 30 Blendzyme IV, (Roche Diagnostics) y 0,4 mg/ml de tripsina (Sigma). Cuando los corazones se hincharon y se volvieron ligeramente pálidos, se les retiró las aurículas y la aorta; se cortó el ventrículo izquierdo en trozos pequeños y se trituraron con suavidad. La suspensión celular se transfirió al tampón de parada ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; CaCl₂ 0,0125; suero de ternera 5%; y el pH ajustado a 7,46 con NaOH a 1 N). El calcio extracelular se añadió
- 35 incrementalmente a 1,0 mM. Todas las células estudiadas tenían forma de bacilo, tenían estrías cruzadas transparentes y carecían de vesículas visibles en su superficie cuando se observaban al microscopio óptico. Los cardiomiocitos se incubaron en una cámara anaerobia que contenía una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y N₂ al 95 % durante 3 h. El medio experimental se cambió a un medio sin suero y sin glucosa. El medio experimental normóxico se equilibró en incubadores cubiertos de agua en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y aire. La
- 40 supervivencia de los cardiomiocitos se midió con la tinción de las células en placas de cultivo de tejidos con una solución de azul tripano (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia) diluido a una concentración final del 0,4 %. Los miocitos se visualizaron en un microscopio de campo brillante a 100 aumentos. Se anotó el número de cardiomiocitos viables (sin teñir) e inviables (teñidos de azul) en tres campos aleatorios al microscopio, y se contaron al menos 100 células en cada campo. El porcentaje de supervivencia se definió como el número de miocitos sin teñir
- 45 contados en cada placa dividido por el número de miocitos totales (sin teñir y teñidos) en cada condición.

Análisis por ultrasonidos de los parámetros cardíacos: los ratones se sometieron a mediciones ultrasónicas con un ecocardiógrafo (Vivid 7, GE Medical Systems Ultrasound) equipado con un sensor lineal de 12 MHz.

Análisis estadísticos: los análisis se realizaron con el programa informático StatView (versión 5,0; Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA).

50 Resultados:

- Expresión de la ANGPTL4 tras el infarto de miocardio en los humanos: como la ANGPTL4 se induce por hipoxia y se expresa en diferentes afecciones patológicas en los humanos, tal como la isquemia crítica de la extremidad posterior y en numerosos tipos de tumores, aquí deseamos estudiar si la ANGPTL4 se expresa en el corazón humano tras la isquemia del miocardio. Los cortes de tejido de pacientes que murieron de un infarto de miocardio agudo, obtenidos
- 55 del Departamento de Patología del hospital europeo Georges Pompidou de París, Francia, permitieron visualizar el área infartada. Utilizando la ISH, la expresión del ARNm del *angptl4* se analizó en los cortes posteriores. Se observó un patrón de tinción desigual alrededor de las áreas infartadas. El análisis a más aumentos demostró que la expresión del ARNm del *angptl4* estaba inducida en los cardiomiocitos, en las células inflamatorias mononucleares,

probablemente en los macrófagos, y en las células endoteliales que dan positivo para el CD34.

El tamaño del infarto y los daños del tejido están incrementados en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. a continuación se analizó la expresión del ARNm de *angptl4* en los ratones C57/B16 de modelo de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio. Era detectable *in situ* en el área infartada mediante ISH a tan solo 3 h de la isquemia y hasta 2 semanas después de el restablecimiento del riego sanguíneo. Para determinar la función que la ANGPTL4 podría tener durante el infarto de miocardio, se generaron ratones con el *angptl4* genosuprimido, en los que el locus del *angptl4* se había reemplazado por un gen indicador *lacZ*, y se cruzaron con los ratones C57/B16 durante más de 8 generaciones. Se observó cierta letalidad durante el desarrollo, pero los recién nacidos con *angptl4*^{LacZ/LacZ} que lograban sobrevivir, que se obtuvieron con una frecuencia de aproximadamente el 25 % de la esperada, eran viables y fértiles y no mostraron defectos en el funcionamiento del corazón.

Se restauró el riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio en los ratones *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ}. El tamaño del infarto expresado como el porcentaje de la zona en riesgo (TI, % del área en riesgo) se incrementó en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} (47 ± 3 %) en comparación con los ratones de control (36 ± 3 %).

En los cortes teñidos con HE de las secciones de corazón infartado en ambos genotipos cuantificamos a continuación la hemorragia, el edema y la inflamación. De acuerdo con el incremento del tamaño del infarto, los análisis histológicos de los cortes teñidos con HE revelaron que la necrosis del tejido aumentaba en buena parte en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} en comparación con los de control (puntuación histológica de 2,5 en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} frente a 1,2 en los *angptl4*^{LacZ/+}). Una lesión tisular más intensa en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los *angptl4*^{LacZ/+} también se cuantificó en términos de edema (2,3 frente a 0,8), hemorragias (2,3 frente a 1,1) e inflamación (2,8 frente a 1,1).

En los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} está modulada la inflamación tras la isquemia, pero no la densidad capilar: como la respuesta inflamatoria tras la isquemia también puede influir en el daño tisular, analizamos a continuación la densidad de macrófagos por inmunotinciones con Mac3 de las áreas infartadas y sin infartar delineadas en los cortes adyacentes teñidos con HE, en ambos genotipos. La densidad de macrófagos era significativamente más elevada en las áreas infartadas en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los *angptl4*^{LacZ/+} (la densidad media de los macrófagos alcanzó 1822 ± 117 frente a $438 \pm 71/\text{mm}^2$, $p = 0,017$), mientras que no se observó ninguna diferencia estadística entre ambos grupos en las áreas sin infartar de control (157 ± 120 frente a $111 \pm 48/\text{mm}^2$, $p = 0,33$).

La red vascular cardíaca de los adultos también se analizó con CD31 y no se cuantificó ninguna diferencia entre ambos genotipos, ni en las condiciones de referencia ni en las áreas infartadas (4510 ± 124 frente a 4380 ± 117 de densidad capilar media/ mm^2 , respectivamente, $p = 0,22$). En las áreas infartadas más alteradas (áreas infartadas centrales) se observó de igual forma una disminución de la densidad microcapilar en ambos genotipos (la densidad capilar media alcanzó 1115 ± 56 en *angptl4*^{LacZ/LacZ} frente a 1030 ± 48 / mm^2 en *angptl4*^{LacZ/+}, $p = 0,16$).

La viabilidad de los cardiomiocitos de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} no se ve afectada por la hipoxia: a continuación se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* para vislumbrar qué mecanismos podrían ser responsables del incremento del tamaño del infarto y de los daños tisulares en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. Ya que el ARNm del *angptl4* se indujo por hipoxia mediada por el factor 1 inducible por hipoxia en los cardiomiocitos, primero pensamos que habría un efecto autocrino directo de la ANGPTL4. Así pues, los cardiomiocitos de ambos genotipos se aislaron y sometieron a un ensayo de supervivencia *in vitro* a la hipoxia. La viabilidad de los cardiomiocitos se determinó bien en normoxia (4 h en O₂ al 20 %) o en hipoxia (3 h en O₂ al 1 % seguido de 1 h en O₂ al 20 %). A diferencia con los resultados *in vivo* sobre el tamaño de los infartos de miocardio, no se observó ninguna diferencia de supervivencia entre ambos grupos ni en normoxia ni en hipoxia, lo que sugiere que los efectos protectores de la ANGPTL4 tras el infarto no estaban relacionados con una protección directa de los cardiomiocitos, sino más bien relacionados con un efecto sobre la vasculatura coronaria durante el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia.

El restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia indujo alteraciones vasculares serias en los ratones con genosupresión de *angptl4*: a continuación se realizaron estudios por microscopía electrónica de transmisión para comparar la lesión tisular tras la isquemia en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y en los ratones *angptl4*^{LacZ/+} a nivel ultraestructural. Los cardiomiocitos en los que se ha restablecido el riego sanguíneo no mostraron diferencias entre ambos grupos. El análisis ultraestructural mostró unas grandes áreas edematosas, pocas células inflamatorias al cabo de 48 h de restablecimiento del riego sanguíneo en las áreas infartadas de los ratones *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que las células inflamatorias habían invadido la región edematosa en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. Se observaron neutrófilos polimorfonucleados, macrófagos, linfocitos y depósitos de fibrinógeno. Mientras que los ratones *angptl4*^{LacZ/+} mostraron una cobertura normal de pericitos alrededor de las células endoteliales, se observó un gran espacio edematoso entre las células endoteliales y los pericitos en los vasos de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. En conjunto, estos datos demuestran un incremento de las alteraciones vasculares que se correlacionan con un incremento del infiltrado inflamatorio y del tamaño infartado en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}.

Valoración de las áreas con ausencia de reperusión y del potencial terapéutico de la ANGPTL4: como las alteraciones vasculares están asociadas a la ausencia de reperusión, analizamos más en detalle la ausencia de

reperfusión en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y *angptl4*^{LacZ/+}. La zona anatómica sin restauración del riego sanguíneo se delineó mediante tinción con tioflavina S, que se fija al endotelio intacto y hace que el tejido con riego sanguíneo emita fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta. La zona de ausencia de reperfusión expresada como el porcentaje de la zona necrótica era más importante en el grupo *angptl4*^{LacZ/LacZ} (19 ± 1 %) que en el grupo *angptl4*^{LacZ/+} (11 ± 2 %) ($p < 0,05$).

A continuación pensamos que la atenuación de las alteraciones vasculares gracias a la ANGPTL4 recombinante podía conducir al realce del funcionamiento de la barrera endotelial, que en última instancia podría proteger a los ratones de este modelo de las consecuencias del restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia. No obstante, el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio no induce en estas condiciones la ausencia masiva de reperfusión en los ratones, lo que hace que sea un modelo en el que resulta difícil valorar cualquier posible efecto terapéutico. A modo de demostración preliminar, buscamos por lo tanto analizar el potencial terapéutico de la ANGPTL4 en una segunda especie que no sea un roedor, a saber, en un modelo de conejo con el tórax abierto para el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio en el cual se conoce bien el fenómeno de ausencia de reperfusión, tal y como se describió previamente (Hale, S. L., Mehra, A., Leeka, J y Kloner, R. A. «Postconditioning fails to improve no reflow or alter infarct size in an open-chest rabbit model of myocardial ischemia-reperfusion». *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H421-5 (2008)). Mientras que la cantidad de ANGPTL4 en circulación en las enfermedades isquémicas nunca se han estudiado ni en el hombre ni en ninguna otra especie, una publicación reciente identifica los determinantes fisiológicos de la cantidad de ANGPTL4 en el plasma de los humanos, tales como la restricción de energía y la cantidad de ácidos grasos libres en el plasma y en circulación de 20 a 100 ng/ml (Kersten, S. et al. «Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 969-74 (2009)). Así pues, realizamos una inyección i.v. de 100 ng/ml de la ANGPTL4 recombinante humana en los conejos, 5 min antes de el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia. El tamaño del infarto expresado como un porcentaje de la zona en riesgo (TI, % del área en riesgo) era del 57 ± 5 % en el grupo de control y del 34 ± 7 % en el grupo tratado con la ANGPTL4 (figura 1A); por lo tanto, la ANGPTL4 confirió cardioprotección. A continuación se estudió la zona de ausencia de reperfusión. Cuando se expresó como el porcentaje del área en riesgo, fue del 41 ± 2 % en el grupo de control y del 19 ± 6 % en el grupo tratado con la ANGPTL4 (figura 1B). Aún más importante, cuando se expresaba como el porcentaje del tamaño del infarto, fue del 73 ± 4 % en el grupo de control y del 55 ± 7 % en el grupo tratado con la ANGPTL4 (figura 1C). Los análisis histológicos demuestran que el infarto de miocardio consistía en un núcleo de necrosis y una gran hemorragia dentro de los espacios intersticiales del grupo de control. En el grupo tratado con la ANGPTL4, la extensión de la hemorragias, expresada como el porcentaje del área total de corte del corazón, disminuyó en comparación con el grupo de control ($5,7 \pm 2$ % frente a $21,9 \pm 6,4$ %, $p < 0,05$). Así pues, estos resultados demuestran por lo tanto que la ANGPTL4 induce el mantenimiento de la integridad de la red vascular en comparación con los controles y que reduce la extensión de la ausencia de reperfusión.

El control precoz de la permeabilidad vascular tras la isquemia es responsable de la protección del tejido cardíaco: ya que se observó una vasculoprotección en los conejos tratados con la ANGPTL4, comprobamos la hipótesis de que la hiperpermeabilidad vascular tras la isquemia temprana podría constituir un mecanismo que incrementara las alteraciones vasculares, la inflamación y el daño del miocardio observado en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. Por lo tanto, analizamos la permeabilidad vascular tras una isquemia de 45 minutos y sólo 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo en el corazón de ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y *angptl4*^{LacZ/+}. La densidad vascular era similar en ambos genotipos en las condiciones de referencia, y los estudios histológicos de los cortes con HE e inmunomarcación con CD31 y Mac3 tras 45 min de isquemia y 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo mostraron que en ambos grupos los tejidos no tenían distinta ni la necrosis ni la densidad vascular ni la inflamación. La extravasación del colorante azul de Evans desde las perlas cardíacas vasculares y que se acumulaba en el intersticio se midió a continuación en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}. Los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} mostraron un incremento de la permeabilidad vascular cardíaca en comparación con los ratones *angptl4*^{LacZ/+} 4 h después de la isquemia ($117,5 \pm 15,2$ frente a $84,8 \pm 2,7$, $p = 0,032$), mientras que no se observó ninguna diferencia significativa en las condiciones de referencia.

Entonces, para caracterizar mejor los fenómenos responsables del incremento de la permeabilidad al cabo de 4 h del restablecimiento del riego sanguíneo, realizamos a continuación la inyección de microesferas fluorescentes que permitieron localizar las zonas de permeabilidad vascular, con lo que pudimos llevar a cabo un análisis detallado de estas áreas mediante microscopia confocal. La densidad de los microvasos y de los pericitos era parecida en los dos grupos, según se determinó mediante la inmunorreactividad con CD31 y NG2. Ya que la estabilidad de la VE-cadherina en las uniones adherentes es decisiva para mantener la permeabilidad y la integridad endoteliales, nos pusimos por lo tanto a estudiar las uniones adherentes endoteliales. Se observó un patrón heterogéneo para la tinción de VE-cadherina en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}; tanto las señales intensas como las lineales eran adyacentes a las señales más tenues. En cambio, en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}, la lesión por restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia indujo daños más graves en las uniones endoteliales, que en su mayoría estaban interrumpidas, como se demuestra por una tinción de VE-cadherinas más discontinua. Además, la interrupción de estas uniones permitieron la extravasación masiva de las perlas de FITC. En comparación, la ausencia de perlas de FITC en los ratones *angptl4*^{LacZ/+} indicó que las uniones estabilizadas que quedaban eran suficientes para mantener el

funcionamiento de barrera en estos ratones.

Se realizaron análisis similares en paralelo en las condiciones de referencia. No se observó ninguna diferencia en términos de densidad vascular ni de cobertura de pericitos entre ambos genotipos. Mostramos una fuerte señal lineal de la VE-cadherina que marca una densa red vascular en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que esta señal aparecía también continua, pero más tenue, en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. De acuerdo con los datos obtenidos en el ensayo de Miles modificado que no reveló ninguna diferencia de permeabilidad vascular en las condiciones iniciales, no había extravasación de las perlas marcadas con FITC en ninguno de los dos grupos. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que mientras que la distribución de la VE-cadherina aparece menos continua y más tenue en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los ratones de control en las condiciones de referencia, esto no era suficiente para incrementar la permeabilidad vascular de referencia en el corazón. En cambio, las condiciones isquémicas indujeron adicionalmente un desmontaje de las uniones que finalmente condujo a una permeabilidad vascular más alta en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los ratones de control.

Estos resultados sugieren que la cardioprotección podría conseguirse a través de la vasculoprotección y el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular. En conjunto, aquí describimos que la ANGPTL4 es una nueva diana fisiológica pertinente durante la isquemia aguda de miocardio.

Discusión:

Tras la isquemia de miocardio, las proteínas del factor inducible por hipoxia (HIF, por su nombre en inglés), el principal factor de transcripción implicado en la regulación de las respuestas transcripcionales a la hipoxia, se activan rápidamente e inducen la expresión del VEGF-A que participa en la regulación de la respuesta angiogénica, pero también ocasiona la permeabilidad vascular y el edema que da lugar a una lesión extensa de los tejidos isquémicos. La primera onda de liberación del VEGF-A induce un incremento de la permeabilidad de las células endoteliales y del edema del tejido, lo que contribuye a la lesión por restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia, mientras que el segundo pico podría estar relacionado con la respuesta angiogénica reparadora. El HIF también desempeña una función esencial en el desencadenamiento de la protección celular y de las alteraciones metabólicas debidas a las consecuencias de la carencia de oxígeno. En esta memoria demostramos que el ARNm de *angptl4*, que previamente se ha demostrado que se inducía por la hipoxia de las células endoteliales y de los cardiomiocitos *in vitro*, así como en la isquemia crítica de la extremidad posterior y el accidente cerebrovascular, también se expresa en el tejido cardíaco de los pacientes que murieron de un IAM. Además demostramos que el ARNm de *angptl4* también se expresa en los ratones de un modelo de IAM y proporcionamos pruebas de que la ANGPTL4 interviene en la protección del daño tisular posisquémico mediante el mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular que limita la ausencia de reperfusión y la extensión del IAM.

En condiciones isquémicas patológicas, el incremento de la permeabilidad, que está controlado predominantemente por la estabilidad de las uniones endoteliales, es responsable de la alteración de la integridad vascular. Yang et al. demostraron que la cantidad de VE-cadherina del tejido miocárdico disminuyó significativamente en el miocardio con reperfusión y en ausencia de reperfusión en comparación con el del miocardio no isquémico, lo que sugiere que la integridad estructural microvascular quedó dañada por la isquemia o por el restablecimiento del riego sanguíneo (Yang et al. «Post-infarction treatment with simvastatin reduces myocardial no-reflow by opening of the KATP channel». *Eur. J Heart Fail* 9, 30-6 (2007)). En el presente estudio *in vivo* demostramos por primera vez que los ratones con genosupresión de *angptl4* ven reducida la estabilidad de las uniones adherentes e incrementada la permeabilidad vascular, lo que conduce a un incremento del tamaño del infarto de miocardio. La VE-cadherina que constituye el principal componente de las uniones adherentes en las células endoteliales se necesita *in vivo* en la vasculatura posnatal para mantener la integridad de las uniones endoteliales y el funcionamiento de la barrera. La VE-cadherina se asocia al VEGFR2 y regula la permeabilidad. De hecho, la estimulación del VEGF-A induce la disociación del complejo VEGFR2/VE-cadherina, que se puede prevenir mediante el bloqueo de Src, una molécula esencial que se necesita para favorecer la alteración de los contactos intercelulares del endotelio y la permeabilidad paracelular. Aquí demostramos que la distribución de la VE-cadherina está desorganizada en los ratones con el *angptl4* genosuprimido, lo que conduce a la desestabilización de las uniones adherentes, a la disminución de la integridad vascular y de la función de la barrera de células endoteliales después de un restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia cardíaca. Otros miembros de la familia de las angiopoyetinas también intervienen en la regulación de la permeabilidad vascular. En la vasculatura madura, la angiopoyetina-1 inhibe la permeabilidad inducida por el VEGF-A o por el aceite de mostaza, mientras que la angiopoyetina-2 ocasiona la inflamación *in vivo* al favorecer las extravasaciones. Es interesante que se haya demostrado que la angiopoyetina-1 fosforile la Tie-2 y la fosfatidilinositol 3-cinasa, lo que induce la activación de la GTPasa Rac1, necesaria para mantener la adhesión intercelular y para prevenir la hiperpermeabilidad. La angiopoyetina-1 también favorece la activación de mDia a través de RhoA, lo que da lugar a la asociación entre mDia y Src, con lo que se interfiere con la capacidad que tiene el VEGF-A para iniciar la activación de una señalización intracelular dependiente de Src. Queda fuera del alcance del presente estudio saber si la regulación de las vías de señalización de Src y/o Rac1 por ANGPTL4 puede afectar a la distribución de la VE-cadherina intracelular al estabilizarla en las uniones celulares a través de la modificación postraducciona, pero merecería un examen más profundo.

Además, el infarto de miocardio con restablecimiento del riego sanguíneo está asociado a la infiltración celular y a la respuesta inflamatoria aguda. La reparación cardíaca tras el infarto de miocardio es un proceso biológico complejo y dinámico que se puede dividir en la fase inflamatoria, la fase de proliferación y la fase de maduración. Mientras que la cascada inflamatoria es un requisito previo para la cicatrización del miocardio infartado, la reparación cardíaca eficaz depende de mecanismos que también suprimen la respuesta inflamatoria durante la remodelación vascular y que limitan la expansión de la fibrosis al miocardio sin infartar. Queda un punto crítico en el tratamiento contra la lesión tras la isquemia que contiene una respuesta inflamatoria en expansión y persistente que son perjudiciales. Aunque numerosos estudios se han centrado en la expresión y la importancia de los mediadores inflamatorios en el miocardio infartado, siguen sin conocerse los fenómenos moleculares y celulares responsables de la disminución y la contención de la cascada inflamatoria. Aquí demostramos que la modulación de la permeabilidad vascular debida a la ANGPTL4 podría constituir un punto de control que participa en la disminución de la respuesta inflamatoria tras el infarto y, así pues, limita la expansión del área infartada.

Además demostramos que la protección precoz de la integridad vascular debida a la ANGPTL4 induce el mantenimiento de la red microcirculatoria y disminuye la extensión de las hemorragias, y que ambas cosas participan en la limitación del alcance de la ausencia de perfusión. Este fenómeno es el resultado de cambios anatómicos que todavía no están completamente caracterizados relacionados con la microcirculación coronaria, en donde la ANGPTL4 podría desempeñar una función crucial a través de su efecto vasculoprotector.

La ANGPTL4 es también un inhibidor de la LPL que se expresa en gran cantidad en el corazón y que participa en la hidrólisis de las lipoproteínas como fuente de ácidos grasos para la captación. Yu et al. han demostrado que los ratones que sobreexpresan la ANGPTL4 en el corazón tienen hipertrigliceridemia en ayunas y desarrollan una disfunción del ventrículo izquierdo. Esto podría significar que los ratones en los que se ha eliminado el *angptl4* deben tener una mayor actividad LPL, lo que podría participar en la prevención de la muerte de los cardiomiocitos durante el infarto. Resulta interesante que si se produce este fenómeno *in vivo* en el corazón isquémico, este efecto es superado por los efectos vasculares perjudiciales observados en los ratones con el *angptl4* genosuprimido que describimos aquí, haciendo que estos ratones sean más sensibles a la lesión por restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia del miocardio. Además, se ha descrito que los productos generados por la hidrólisis lipoproteica mediada por lipasa de las lipoproteínas ricas en triglicéridos incrementan la permeabilidad de la capa endotelial a través de la reorganización radial de la unión adherente-1 (ZO-1) y la reorganización concurrente de la F-actina desde el cuerpo celular a los márgenes de las células en las células endoteliales aórticas de los humanos. Además, los hallazgos recientes colocan a la VE-cadherina por delante de la claudina-5, un componente clave de la unión estrecha endotelial, para el mantenimiento de las uniones entre las células endoteliales. Por lo tanto, nuestros resultados sobre la desorganización de las uniones adherentes endoteliales en los ratones con genosupresión del *angptl4* sugieren que la ANGPTL4 podría estimular el funcionamiento de la barrera endotelial a varios niveles.

Finalmente, mientras que los cardiomiocitos eran reconocidos principalmente como una diana terapéutica de la isquemia de miocardio desde el punto de vista clínico, pocos estudios se han centrado en la importancia de los vasos cardíacos. Más recientemente se están llevando a cabo tentativas clínicas para bloquear el aumento de permeabilidad mediada por el VEGF-A en los pacientes tras un infarto agudo de miocardio o tras un accidente cerebrovascular. Tal estrategia puede tener un impacto significativo a la hora de reducir la lesión del tejido y, por lo tanto, disminuir al mínimo las consecuencias a largo plazo. Nuestros hallazgos sugieren que la ANGPTL4, al contrarrestar la alteración, inducida por la isquemia, de las uniones de las células endoteliales y el posterior incremento de la permeabilidad observada en el IAM con restablecimiento del riego sanguíneo, podría ser prometedor para mejorar el tratamiento del infarto de miocardio.

Ejemplo 2: protección frente al infarto de miocardio y ausencia de reperusión a través del mantenimiento de la integridad vascular gracias a la pseudoangiopoyetina 4.

45 Material y métodos

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normativa oficial emitida por el Ministerio de Agricultura francés. Este estudio cumple los estándares del INSERM (el Instituto Nacional de Salud francés) de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EEC).

Experimentos de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio: se realizó el protocolo de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia en los ratones o en los conejos *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} mediante la técnica estándar descrita en los materiales complementarios. Los conejos recibieron aleatoriamente el vehículo o bien la ANGPTL4 completa recombinante de 55 kDa de humano (rhANGPTL4 10 µg/kg i.v.).

Ensayo de Miles modificado: los ratones macho *angptl4*^{LacZ/LacZ} y *angptl4*^{LacZ/+} fueron anestesiados con pentobarbital. Para las condiciones de referencia, a los ratones se les inyectó azul de Evans al 1 % (200 µl) en la vena de la cola y se les sacrificó 4 horas después. Para las condiciones de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia, se sometió a los ratones a una oclusión coronaria durante 45 min y se les inyectó por vía intravenosa azul de Evans al 1 % (200 µl) antes de las 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo. En el momento del sacrificio, a los ratones se

les infundió tampón de citrato a pH 4 a través de la aorta. La sangre, el colorante y el tampón salían por una apertura de la aurícula derecha. El azul de Evans se eluyó durante 18 h a 70 °C en 1 ml de formamida. Tras la centrifugación, se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro. Se determinó el azul de Evans extravasado (ng) a partir de la curva estándar y se normalizó por el peso del tejido (g).

- 5 Estudio de la inmunofluorescencia y análisis confocal de los criocortes: la tinción inmunofluorescente se realizó según se describió anteriormente (Brecht N, Gómez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, Cazes A, Alanio-Brecht C, Durand M, Philippe J, Silvestre J S, Van Rooijen N, Corvol P, Nicoletti A, Chazaud B, Germain S. «Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice». *PLoS ONE*. 2008; 3: e3950) y el análisis confocal en los criocortes se detalla en el material complementario.

- 15 Análisis de inmunoprecipitación y de inmunotransferencia: para las muestras *in vivo*, se anestesiaron los ratones sometidos a 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo tras una isquemia de 45 min, se les inyectó en la vena de la cola 1 mM de Na₃VO₄ y 2 mM de H₂O₂, y se diseccionaron para retirar el ventrículo izquierdo. Para los experimentos de HUAEC, se sedimentaron 40.000 células/cm² en medio de cultivo completo (Promocell) durante 72 h. Las células se mantuvieron en ayuno durante una noche y se trataron durante 5 min con 100 ng/ml de VEGF₁₆₅ humano recombinante (Sigma) o con una mezcla que contenía 100 ng/ml (10 nM) de VEGF y 5 µg/ml (360 nM) de ANGPTL4 recombinante humano (Chomel C, Cazes A, Faye C, Bignon M, Gómez E, Ardière-Robouant C, Barret A, Ricard-Blum S, Muller L, Germain S, Monnot C. «Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity». *FASEB J*. 2009; 23: 940-949) antes de lavarlas dos veces con Ca/MgPBS. Se extrajeron las proteínas, se inmunoprecipitó el VEGFR2 y se analizaron mediante transferencia Western según se describe en el material complementario.

- 20 Aislamiento de los cardiomiocitos y ensayo de viabilidad: se aislaron los cardiomiocitos según se describe en el material complementario y se incubaron en una cámara anaerobia que contiene una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % y N₂ al 95 % durante 3 h. Se cambió el medio experimental a un medio sin suero ni glucosa. Se midió la supervivencia de los cardiomiocitos mediante la tinción de las células con azul tripano (Sigma).

Análisis estadísticos: se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney o de Student para valorar las diferencias estadísticas entre los grupos o las condiciones (GraphPad Prism 4, GraphPad Software). Las barras de error indican el EEM y *, $P < 0,05$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$.

Material complementario

- 30 Métodos extensos y resultados

Animales y genotipado: se determinó el genotipo por PCR con el ADN genómico de la cola según se describió anteriormente (Gómez, 2010, enviado a publicar). Los ratones macho con genosupresión de *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} de ocho a 12 semanas de edad, cruzados con los ratones C57/B16 durante más de 8 generaciones, se sometieron a protocolos de infarto de miocardio o se utilizaron como control de las condiciones de referencia.

- 35 Experimentos de restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio en los ratones: se anestesiaron los ratones con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio. Se realizó el infarto de miocardio con oclusión de la arteria coronaria izquierda durante 45 min y se restauró el riego sanguíneo de los tejidos durante 1 h a 3 semanas. Para el estudio de expresión del *angptl4*, los ratones WT se sometieron 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas de restablecimiento del riego sanguíneo. Para valorar el tamaño del infarto y para los estudios de inmunohistoquímica (IHC) o ultraestructurales, a los ratones macho *angptl4*^{LacZ/+} y *angptl4*^{LacZ/LacZ} se les restauró el riego sanguíneo durante 4 h o 48 h tras la isquemia. Se identificó el área de riesgo mediante tinción con azul de Evans 48 h después de la isquemia, y se identificó el área infartada mediante tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). Se identificó el área de riesgo como la región que no es azul y se expresó en forma de porcentaje del peso del ventrículo izquierdo. Se identificó el área infartada como la zona negativa al TTC y se expresó en forma de porcentaje del área en riesgo. Para medir la ausencia de reperusión, se volvió a abrir el tórax y se infundió tioflavina S (4 %, 1,5 ml/kg) a través de la aurícula izquierda cuatro horas después del comienzo del restablecimiento del riego sanguíneo. A continuación, a los corazones se les infundió azul Alcian (0,5 %) de manera retrógrada y se llevaron a cabo cortes seriados. Cada corte se fotografió entonces con luz UV para identificar la región de la ausencia de reperusión. Las áreas del infarto y la zona de riesgo se determinaron según se define más arriba. Se realizaron análisis ultraestructurales en un microscopio electrónico Hitachi H-9500.

- 55 Estudio de inmunofluorescencia y análisis confocal de los criocortes: los ratones sometidos a isquemia y 4 h de restablecimiento del riego sanguíneo fueron anestesiados con ketamina y xilazina inyectadas por vía intraperitoneal. Se les inyectaron perlas con FITC (20 µl) en la vena femoral según se describe más arriba⁴⁴. Se abrió rápidamente el tórax, y se infundió la vasculatura durante 2 min a una presión de 120 mmHg con 1 % de paraformaldehído. A continuación se colocó el corazón en paraformaldehído al 1% durante 1 h a temperatura ambiente, se enjuagó con PBS y se congeló para cortarlo en el criostato. Se identificaron las células endoteliales, los pericitos y las uniones

adherentes con los anticuerpos anti-CD31 (BD Pharmingen), anti-NG2 de conejo (Chemicon) y anti-VE-cadherina de rata (regalo personal de E. Dejana, IFOM), respectivamente. Los cortes confocales se visionaron en un microscopio Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH) con un objetivo de inmersión en aceite de 63 aumentos (NA = 1,4). Se utilizó un incremento de 0,117 µm entre los cortes. Se obtuvo la reconstrucción tridimensional de las diferentes estructuras con los módulos LABELVOXEL y SURFACEGEN del programa informático Amira 5.2.1. (Visage Imaging GmbH).

Análisis de inmunoprecipitación y de inmunotransferencia: se extrajeron las proteínas en hielo en 20 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM de NaCl, 0,1 % de DOC, 0,5 % de NP-40, 10 % de glicerol, 1 mM de β-glicerolfosfato, 1 mM de NaF, 2,5 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de Na₃VO₄ y un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem). Se dividieron los lisados para la inmunoprecipitación y para la inmunotransferencia de los extractos totales. Para la inmunoprecipitación, los extractos se aclararon durante 60 min con perlas de proteína A-agarosa, se incubaron durante una noche con anti-VEGFR-2 (Cell Signaling), y se recogieron los inmunocomplejos en perlas de proteína A-agarosa durante 3 h. Las proteínas se eluyeron al hervirlas durante 10 min en el tampón reductor de muestra de Laemmli. Se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y luego transferencia Western en una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron los anticuerpos anti-VEGFR2 (Cell Signaling), anti-VE-cadherina (Santa Cruz), contra la familia de Src cinasas (Cell Signaling), contra la familia fosfo-Src en Tyr-416 (Cell Signaling). La señal se reveló mediante quimioluminiscencia de Attophos (Promega) y la intensidad de la banda se cuantificó mediante el programa informático Quantity One 1-D Analysis (Biorad).

Aislamiento de los cardiomiocitos y ensayo de la viabilidad: con anestesia, se extrajo el corazón del tórax y se canuló. Se perfundió el corazón durante 4 min con el tampón de Tyrode ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; con el pH ajustado a 7,46 con NaOH a 1 N) a presión constante y 37 °C. Se cambió la perfusión a una solución enzimática ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; CaCl₂ 0,0125; con el pH ajustado a 7,46 con NaOH a 1 N) que contenía 0,1 mg/ml de la liberasa Blendzyme IV (Roche Diagnostics) y 0,14 mg/ml de tripsina (Sigma). Cuando se hincharon los corazones y se volvieron ligeramente pálidos, se retiraron las aurículas y la aortas; se cortó el ventrículo izquierdo en trozos pequeños y se trituraron con suavidad. La suspensión celular se transfirió a un tampón de parada ([mM] NaCl 113; KCl 4,7; KH₂PO₄ 0,6; Na₂HPO₄ 0,6; HEPES 10; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 12; KHCO₃ 10; taurina 30; rojo fenol 0,032; glucosa 5,5; CaCl₂ 0,0125; suero de ternera al 5%; con el pH ajustado a 7,46 con NaOH a 1 N). Se añadió el calcio extracelular incrementalmente hasta 1,0 mM. Todas las células estudiadas tenían forma de bacilo, tenían estriaciones cruzadas transparentes y carecían de vesículas visibles en su superficie.

Experimentos con conejos: se anestesiaron conejos de Nueva Zelanda (2,5-3,0 kg) con zolazepam, tiletamina y pentobarbital (todos a 20-30 mg/kg i.v.). Se intubó a los animales, se les ventiló mecánicamente y se les realizó una toracotomía izquierda. Se pasó una sutura por debajo de la rama mayor de la arteria coronaria izquierda a través de un tubo de propileno corto para formar un nudo corredizo. A continuación, los conejos recibieron aleatoriamente el vehículo o bien la ANGPTL4¹² recombinante humana completa de 55 kDa (10 µg/kg i.v.). Cinco minutos después se indujo una oclusión de la arteria coronaria (OAC) durante 30 min al empujar el nudo corredizo por el tubo. Posteriormente se indujo el restablecimiento del riego sanguíneo mediante la liberación del nudo corredizo. Se cerró entonces el tórax en capas. Cuatro horas después del comienzo del restablecimiento del riego sanguíneo, se volvió a abrir el tórax y se infundió tioflavina S (4 %; 1,5 ml/kg) a través de la aurícula izquierda. A continuación se sacrificaron los conejos con pentobarbital seguido de cloruro de potasio. Tras la escisión, se perfundieron los corazones de manera retrógrada con azul de Alcian (0,5 %) y se realizaron cortes seriados. Los cortes se fotografiaron con luz UV para identificar la región de ausencia de reperusión. Las áreas infartadas y la zona en riesgo se determinaron como en los ratones.

Análisis por ultrasonidos de los parámetros cardíacos: los ratones se sometieron a mediciones de ultrasonidos con un ecocardiógrafo (Vivid 7, GE Medical Systems Ultrasound) equipado con un sensor lineal de 12 MHz.

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR): se anestesiaron los ratones sometidos a isquemia y 4 h o 18 h de restablecimiento del riego sanguíneo, se les inyectó en la vena de la cola y por vía intracardiaca 1 mM de Na₃VO₄ y 2 mM de H₂O₂, y se diseccionaron para retirar el ventrículo izquierdo. Se aisló el ARN total mediante extracción con TRIzol (Invitrogen). Se realizaron la transcripción inversa, la PCR cuantitativa (por triplicado) y el análisis como se describió anteriormente (Xu Y, Yuan L, Mak J, Pardanaud L, Caunt M, Kasman I, Larrivee B, Del Toro R, Suchting S, Medvinsky A, Silva J, Yang J, Thomas J L, Koch A W, Alitalo K, Eichmann A, Bagri A. «Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3». *J. Cell Biol.* 2010; 188: 115-130). El nivel de expresión del ARNm se normalizó por el gen de mantenimiento que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se calcularon las veces de cambio con el método del Ct comparativo.

Análisis por hibridación *in situ* (ISH) y por inmunohistoquímica (IHC): se obtuvieron bloques de parafina de miocardios humanos infartados del Departamento de Anatomopatología del hospital europeo Georges Pompidou de París, Francia. Se valoró la presencia de las áreas infartadas gracias a la tinción con HE estándar y los cortes consecutivos se utilizaron para los análisis de ISH e IHC. La ISH que utiliza sondas del *angptl4* de ratón o de

humano y las inmunomarcaciones para IHC con anti-CD45, anti-Mac3 y anti-CD31 se realizaron como se ha descrito anteriormente (Brecht N, Gómez E, Bignon M, Khallou-Laschet J, Dussiot M, Cazes A, Alanio-Brecht C, Durand M, Philippe J, Silvestre J S, Van Rooijen N, Corvol P, Nicoletti A, Chazaud B, Germain S. «Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice». *PloS ONE*. 2008; 3: e3950).

Resultados

La integridad inicial vascular tras la isquemia está alterada en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}

Se generaron ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} en los que el locus de *angptl4* está reemplazado por un gen indicador *lacZ*. Primero analizamos la permeabilidad vascular tras una isquemia de 45 min y un restablecimiento del riego sanguíneo de 4 h en el corazón de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y *angptl4*^{LacZ/+}. Los análisis histológicos demostraron que el daño tisular era equivalente en ambos grupos en estos primeros momentos. Los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} mostraban una mayor permeabilidad vascular que los ratones *angptl4*^{LacZ/+} 4 h después de la isquemia ($117,5 \pm 15,2$ frente a $84,8 \pm 2,7$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,05$), mientras que no se observó ninguna diferencia significativa en las condiciones de referencia. Es importante señalar que los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} no mostraron ningún defecto cardíaco funcional ni ninguna estructura vascular anormal en las condiciones de referencia o isquémicas.

A continuación se les inyectaron microesferas fluorescentes, lo que permitió localizar las áreas de extravasación. En las condiciones de referencia, las perlas con FITC no se extravasaron en ninguno de los grupos. Tras un restablecimiento del riego sanguíneo de 4 h después de una isquemia de 45 min no se observó ninguna perla con FITC en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que se detectó la extravasación de microesferas fluorescentes en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}, lo que indica que la integridad endotelial estaba alterada. Ya que la estabilidad de las uniones adherentes es decisiva para el mantenimiento de la permeabilidad y de la integridad endoteliales, nos dedicamos a estudiar la distribución de la VE-cadherina en las uniones adherentes en las condiciones de referencia y en un modelo de restablecimiento del riego sanguíneo tras una isquemia. En el miocardio no isquémico de ambos genotipos se observó una señal lineal de la VE-cadherina que marca una densa red vascular. En cambio, tras el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia se observó un patrón heterogéneo de tinción de la VE-cadherina en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}; las señales lineales e intensas eran adyacentes a las señales más débiles. En los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}, la lesión por restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia indujo daños más graves en las uniones endoteliales, que se habían alterado principalmente tal y como se muestra mediante una tinción de VE-cadherina discontinua más sistemática. Las imágenes tridimensionales reconstruidas a partir de las imágenes confocales de los cortes de corazón *angptl4*^{LacZ/LacZ} teñidos con anticuerpos anti-CD31 y anti-NG2 confirmaron adicionalmente la extravasación de las perlas con FITC desde los vasos sanguíneos.

Estas observaciones sugieren que la integridad vascular coronaria es frágil y que la desorganización de las uniones es más frecuente en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} durante las condiciones isquémicas, lo que conduce a un incremento de la permeabilidad vascular.

Disminución posisquémica de la expresión de VEGFR2 y de VE-cadherina combinada con un incremento de la fosforilación de la Src cinasa vía abajo del VEGFR2 en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}

En la vasculatura, el VEGFR2 y la VE-cadherina forman complejos que se disocian transitoriamente tras la fijación del VEGF al VEGF-R2. Durante el infarto de miocardio, la isquemia favorece la expresión del VEGF, lo que impulsa la permeabilidad vascular y el edema. Por lo tanto, estudiamos si la potenciación del desensamblaje del complejo VEGFR2/VE-cadherina podría constituir el mecanismo responsable de un incremento de la alteración de las uniones en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} tras una lesión por restablecimiento del riego sanguíneo después de una isquemia.

Se cuantificó por RT-qPCR la expresión del ARNm de *vegfr2* y de *ve-cadherina* en el ventrículo izquierdo en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} y *angptl4*^{LacZ/+}, en las condiciones de control o tras el restablecimiento del riego sanguíneo de 4 h o 18 h. La expresión del ARNm de *ve-cadherina* y de *vegfr2* era similar en ambos grupos en las condiciones de referencia. Tras restablecer el riego sanguíneo durante 4 h se observó una disminución masiva en la expresión del ARNm de *vegfr2* y de *ve-cadherina* en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} en comparación con los ratones de control (58 ± 3 frente a 34 ± 3 % para la *ve-cadherina*, y 70 ± 2 frente a 7 ± 5 para el *vegfr2*, $p < 0,001$). Esta disminución se mantuvo después de restablecer el riego sanguíneo durante 18 h para el ARNm de *vegfr2* (disminución del 66 ± 2 % para los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}, $p < 0,001$). La cantidad de proteína también estaba afectada tal y como se demuestra con los análisis de transferencia Western realizados con extractos totales de ventrículos izquierdos en las condiciones de control e isquémicas.

La Src cinasa se necesita para la permeabilidad mediada por el VEGF por su intervención en la disociación del complejo VEGFR2/VE-cadherina. Para determinar mejor el mecanismo que conduce a la alteración precoz de las uniones tras la isquemia en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}, la señalización de la Src cinasa vía abajo del VEGFR2 se analizó en las condiciones de control y después del restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia. El VEGFR2 se inmunoprecipitó desde los lisados de los ventrículos izquierdos y luego se detectó, por

inmunotransferencia, el VEGFR2, la VE-cadherina, la Src y la fosfo-Src. En las condiciones de referencia, el VEGFR2 y la VE-cadherina formaron complejos en ambos genotipos. Se observó una desestabilización transitoria de los complejos de VEGFR2 y VE-cadherina al restablecer el riego sanguíneo durante 4 h y se recuperó después de restablecer el riego sanguíneo durante 18 h en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que la VE-cadherina permanece disociada del VEGFR2 en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. Además, las inmunotransferencias demostraron que se incrementaba el reclutamiento y la fosforilación de la Src cinasa al cabo de 4 h y 18 h de restablecimiento del riego sanguíneo en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} en comparación con los *angptl4*^{LacZ/+}.

- Estos resultados demuestran que una disminución de la expresión del *vegfr2* y de la *ve-cadherina* combinada con un incremento de la fosforilación de la Src cinasa vía abajo del VEGFR2 conduce a una disociación del complejo de VEGFR2 y VE-cadherina responsable de la desorganización masiva de la VE-cadherina en las uniones adherentes endoteliales de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} después de restablecer el riego sanguíneo tras una isquemia.

En los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} aumenta el tamaño del infarto, la ausencia de perfusión y la inflamación posisquémica

- A continuación pensamos que la alteración de la integridad vascular en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} podría traducirse en un restablecimiento anormal del riego sanguíneo del miocardio y un mayor daño del tejido cardíaco al restablecer el riego sanguíneo durante 48 horas. De hecho, el tamaño del infarto era mayor en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los ratones *angptl4*^{LacZ/+} (47 ± 3 frente a 36 ± 3 %, $p < 0,01$). Además, la ausencia de perfusión fue más importante en los ratones del grupo *angptl4*^{LacZ/LacZ} que en los *angptl4*^{LacZ/+}, cuando se expresó como porcentaje de la zona necrótica (19 ± 1 frente a 11 ± 2 %, $p < 0,05$).

- También se cuantificaron las necrosis, las hemorragias y el edema (puntuación de 1 a 3) en los cortes teñidos con HE de corazones infartados de ambos genotipos. De acuerdo con un incremento del tamaño del infarto, la necrosis del tejido aumentó en buena parte en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} en comparación con los de control ($2,5 \pm 0,6$ frente a $1,2 \pm 0,2$). La valoración de las hemorragias y del edema reveló una lesión del tejido más grave en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} ($2,3 \pm 0,6$ frente a $1,1 \pm 0,2$ y $2,3 \pm 0,2$ frente a $0,8 \pm 0,2$, respectivamente). También se analizó la respuesta inflamatoria posisquémica en ambos genotipos. La densidad de macrófagos fue significativamente más alta en las áreas infartadas de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} que de los *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que no se observó ninguna diferencia estadística entre ambos grupos en las áreas sin infartar de control.

- A continuación analizamos la densidad vascular en el área central del infarto y en la periferia mediante la tinción de CD31. Se cuantificó una densidad microcapilar parecida y menor en ambos genotipos en las áreas centrales infartadas en comparación con la periferia. No se cuantificó ninguna diferencia entre ambos genotipos en ambas áreas.

- Además se realizó el estudio por microscopia electrónica de transmisión para valorar la lesión del tejido a nivel ultraestructural. El análisis de las áreas infartadas con restablecimiento del riego sanguíneo no mostró diferencias estructurales en los cardiomiocitos entre los dos grupos (véase «C_{1 a 4}» en la figura IVA y IVB), pero se observaron áreas grandes y edematosas y con pocas células inflamatorias en los ratones *angptl4*^{LacZ/+}, mientras que las células inflamatorias ya habían invadido la región edematosa en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. Sólo se observaron neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y depósitos de fibrinógeno en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}. En conjunto, estos datos indican que el incremento de las alteraciones vasculares se correlaciona con el incremento del infiltrado inflamatorio en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}.

- Ya que en los cardiomiocitos se ha descrito la activación por hipoxia del ARNm de *angptl4*, probablemente mediada por el factor 1 inducible por hipoxia, también hemos pensado que la ANGPTL4 podría afectar también a la supervivencia de los cardiomiocitos. De hecho, la tinción de LacZ realizada en los cortes montados enteros y teñidos con HE e inmunoteñidos con CD31 de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} también revelaron que los cardiomiocitos y las CE expresan el *angptl4* tras una lesión por restablecimiento del riego sanguíneo tras isquemia. La hibridación *in situ* (ISH) demostró además que la expresión del ARNm de *angptl4* se inducía desde las 3 h después de la isquemia y hasta 2 semanas después del restablecimiento del riego sanguíneo, mientras que el ARNm de *angptl4* no se expresaba en el área no isquémica. La ISH de las muestras cardíacas de pacientes que murieron de IAM también revelaron que se expresaba el ARNm de *angptl4* en los cardiomiocitos y en las CE. Por lo tanto, los cardiomiocitos de ambos genotipos se aislaron y se sometieron a un ensayo de supervivencia *in vitro*. No se observó *in vitro* ninguna diferencia de supervivencia de los cardiomiocitos entre ambos grupos, ni en normoxia ni en hipoxia, lo que indica que la ANGPTL4 no tiene un efecto directo sobre los cardiomiocitos.

La ANGPTL4 recombinante estabiliza el complejo VEGFR2/VE-cadherina en respuesta al VEGF

- A continuación estudiamos si la rhANGPTL4 podía hacer en las CE que los complejos VEGFR2/VE-cadherina estuviera protegidos del desensamblaje. Se estimularon HUAEC confluentes durante 5 min con el VEGF solo o con rhANGPTL4. En los lisados celulares se inmunoprecipitó el VEGFR2 y luego se realizó una inmunotransferencia para VEGFR2, VE-cadherina, Src y fosfo-Src. El complejo VEGFR2/VE-cadherina que ya existía y se observaba en

las condiciones de control se desmontaba rápidamente con una estimulación del VEGF de 5 min. Este complejo estaba protegido de la disociación en las células tratadas a la vez con el VEGF y la rhANGPTL4 (las inmunotransferencias de la Src cinasa y de la fosfo-Src revelaron que la desestabilización del complejo VEGFR2/VE-cadherina debida al VEGF se correlacionaba con un incremento de la fosforilación de Src vía abajo del VEGFR2, lo que estaba parcialmente bloqueado en células tratadas a la vez con el VEGF y la rhANGPTL4.

Estos experimentos *in vitro* proporcionan la prueba de que la rhANGPTL4 protege ante la desestabilización que induce el VEGF sobre el complejo VEGFR2/VE-cadherina a través de la inhibición de la señalización de la Src cinasa.

Valoración del efecto cardioprotector terapéutico de la rhANGPTL4

- 10 A continuación pensamos que la atenuación de las alteraciones vasculares ocasionadas por la rhANGPTL4 podrían conducir a reforzar el funcionamiento de la barrera endotelial, lo que finalmente podría proteger ante el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia. Ya que el restablecimiento del riego sanguíneo tras la isquemia de miocardio no induce una ausencia de perfusión masiva de los ratones en estas condiciones, nos dedicamos por lo tanto a analizar el potencial terapéutico de la ANGPTL4 en una especie no roedora, a saber, en un
- 15 modelo de conejo con el tórax abierto de restablecimiento del riego sanguíneo tras isquemia de miocardio en el cual el fenómeno de ausencia de perfusión se conocía perfectamente.

Por lo tanto, realizamos una inyección intravenosa de 10 mg/kg de rhANGPTL4 5 min antes de restablecer el riego sanguíneo tras la isquemia. El tamaño del infarto expresado como un porcentaje de la zona de riesgo (TI, % del área en riesgo) era del 57 ± 5 % en el grupo de control y del 34 ± 7 % en el grupo tratado con la rhANGPTL4 ($p < 0,01$). A continuación se estudió la zona de ausencia de perfusión. Cuando se expresaba como un porcentaje del área en riesgo, era del 41 ± 2 % en el grupo de control y del 19 ± 6 % en el grupo tratado con la rhANGPTL4 ($p < 0,05$). Aún más importante, cuando se expresaba como un porcentaje del tamaño del infarto, era del 73 ± 4 % en el grupo de control y del 55 ± 7 % en el grupo tratado con la rhANGPTL4 ($p < 0,05$). El análisis histológico demostró que el infarto de miocardio consistía en un núcleo de necrosis y una gran hemorragia dentro de los espacios intersticiales del grupo de control. En el grupo tratado con la rhANGPTL4, la extensión de las hemorragias disminuyó ($5,7 \pm 2$ % frente a $21,9 \pm 6,4$ %, expresado como porcentaje del área total del corte de corazón, $p < 0,05$).

Así pues, estos resultados demuestran que la rhANGPTL4 induce el mantenimiento de la integridad vascular que reduce el tamaño del infarto, la hemorragia y la ausencia de perfusión y, por lo tanto, le confiere cardioprotección.

Discusión

- 30 Tras el IAM, las proteínas del factor inducible por hipoxia (HIF, por su nombre en inglés), el principal factor de transcripción implicado en la regulación de las respuestas a la hipoxia, se activan rápidamente e inducen la expresión del VEGF-A que participa en la regulación de la respuesta angiogénica, pero que también provoca la permeabilidad vascular y el edema que da lugar a una lesión extensa. Demostramos en la presente memoria que el ARNm de *angptl4*, que se ha demostrado anteriormente que es inducido por hipoxia en las CE y en los
- 35 cardiomiocitos *in vitro* así como en la isquemia de la extremidad posterior crítica y el accidente cerebrovascular, también se expresa en el tejido cardíaco de los pacientes que murieron de IAM. Además, proporcionamos pruebas de que la ANGPTL4 interviene en la protección del daño posisquémico a través del mantenimiento de la integridad de la barrera celular del endotelio vascular que limita la ausencia de perfusión y la extensión del IAM.

- En condiciones isquémicas patológicas, el incremento de la permeabilidad, que está controlado por la estabilidad de las uniones endoteliales, es responsable de la alteración de la integridad vascular. La VE-cadherina, que constituye el principal componente de las uniones adherentes entre las CE, es necesaria *in vivo* en la vasculatura posnatal para mantener la integridad del endotelio y el funcionamiento de la barrera. Se demostró que la VE-cadherina del miocardio disminuye significativamente en el miocardio isquémico, lo que indica que la integridad microvascular queda dañada por la isquemia y perfusión. La VE-cadherina se asocia al VEGFR2 y regula la permeabilidad. De hecho, la inyección sistémica del VEGF-A, con lo que se activa el VEGFR2, induce la disociación del complejo VEGFR2/VE-cadherina. Aquí demostramos que la disociación de los complejos VEGFR2/VE-cadherina es duradera y que la distribución de la VE-cadherina en los ratones con genosupresión de *angptl4* está alterada, lo que provoca la ruptura de las uniones adherentes y la disminución de la función de barrera de las CE después del IAM. El análisis de la expresión génica reveló i) una disminución más prominente de la cantidad de ARNm de la *ve-cadherina*, ii) una
- 40 disminución prolongada de la cantidad de ARNm del *vegfr2* en los ratones con genosupresión de *angptl4* sometidos a un IAM. La disminución del nivel de la expresión del gen *ve-cadherina* y del gen *vegfr2* y, por lo tanto, de los complejos VEGFR2/VE-cadherina en respuesta a la isquemia, podría participar en la destrucción de las uniones y en la alteración de la integridad endotelial tras un IAM en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ}.

- La Src es una molécula esencial que se necesita para favorecer la alteración de los contactos de las CE y la permeabilidad paracelular. Aquí proporcionamos pruebas de que se potencia i) el reclutamiento de la Src cinasa en el complejo VEGFR2/VE-cadherina y ii) la fosforilación de la Src cinasa, lo que conduce a una desestabilización más

intensa del complejo VEGFR2/VE-cadherina en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} sometidos a un IAM. Otros miembros de la familia de las angiopoyetinas también intervienen en la regulación de la permeabilidad vascular. La angiopoyetina 1 fosforila el receptor Tie-2 y la fosfatidilinositol 3-cinasa, lo que induce la activación de la GTPasa Rac1, necesaria para mantener la adhesión intercelular y también activa la mDia, lo que da lugar a la desaparición de Src. Merecería dedicar más estudios a saber si la regulación, debida a la ANGPTL4, de las vías de señalización de Src/mDia o Rac1 puede afectar a la distribución de la VE-cadherina intracelular al estabilizarla en las uniones celulares mediante modificaciones postraduccionales.

Además, el infarto de miocardio en el que se ha restablecido el riego sanguíneo está asociado a la infiltración celular y la respuesta inflamatoria aguda. Un punto crítico del tratamiento posisquémico sigue siendo la contención de la extensión y de la persistencia de la respuesta inflamatoria perjudicial. Aquí demostramos que la alteración de la integridad vascular de los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} podría suprimir un punto de control que participa en la limitación de la respuesta inflamatoria tras el infarto y de la expansión del área infartada. También demostramos que la ANGPTL4 recombinante induce el mantenimiento de la red microcirculatoria y una menor extensión de las hemorragias, participando ambas cosas en la limitación de la extensión de la ausencia de reperusión. Este fenómeno es el resultado de cambios anatómicos de la microcirculación coronaria que aún no se han caracterizado completamente (Kloner R A, Ganote C E, Jennings R B. «The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog». *J. Clin. Invest.* 1974; 54: 1496-1508) en el que la ANGPTL4 podría tener una importancia crucial a través de su efecto vasculoprotector. Además, los hallazgos recientes colocan la VE-cadherina antes que la claudina-5, un componente clave de las uniones estrechas del endotelio, para el mantenimiento de las uniones intercelulares del endotelio. Por lo tanto, nuestros resultados sobre la desorganización de las uniones adherentes endoteliales en los ratones *angptl4*^{LacZ/LacZ} podrían sugerir que la ANGPTL4 podría favorecer el funcionamiento de la barrera endotelial a muchos niveles.

Finalmente, mientras que los cardiomiocitos eran reconocidos principalmente como una diana terapéutica de la isquemia de miocardio desde el punto de vista clínico, pocos estudios se han centrado en la importancia de los vasos cardíacos. Nuestros hallazgos demuestran que la ANGPTL4 contrarresta el incremento de la permeabilidad observada en el IAM con restablecimiento del riego sanguíneo. También hay tentativas clínicas en marcha para bloquear la permeabilidad mediada por el VEGF-A en los pacientes después de un infarto de miocardio agudo o de un accidente cerebrovascular. La búsqueda de estrategias combinadas tendrán ciertamente un impacto significativo a la hora de reducir la lesión del tejido, mejorar la microcirculación coronaria y, con ello, mejorar el tratamiento del infarto de miocardio.

Bibliografía

A lo largo de esta solicitud, diferentes referencias describen el estado de la técnica al cual pertenece la invención.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de ANGPTL4 para ser usado en la prevención de la ausencia de reperusión durante el tratamiento de una cardiopatía coronaria.
2. Polipéptido de ANGPTL4 para ser usado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha cardiopatía coronaria es el infarto de miocardio o el infarto de miocardio con elevación del segmento ST.

5

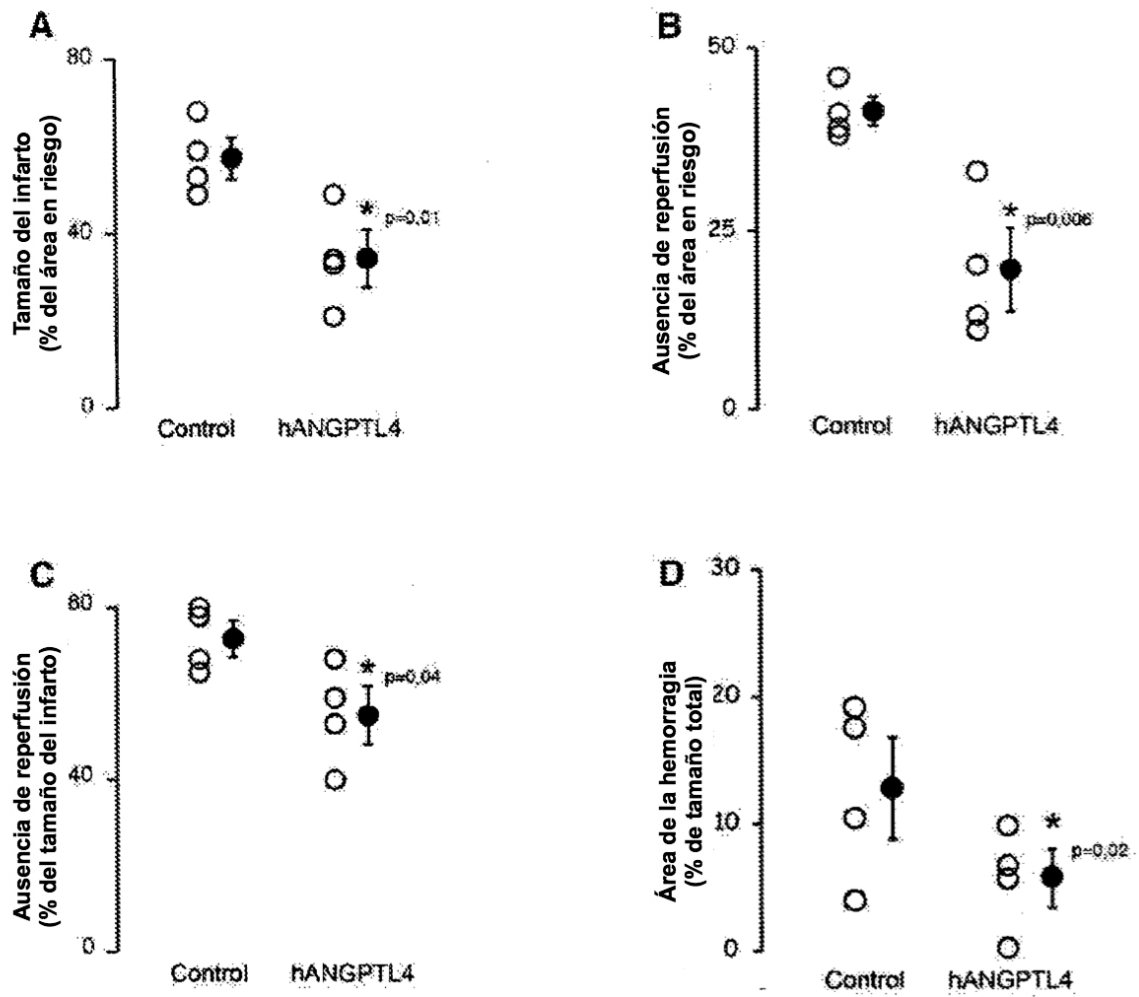


Figura 1