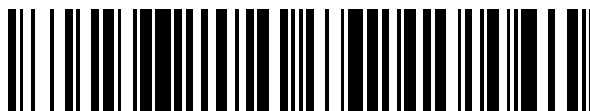


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 363**

51 Int. Cl.:

**A61L 29/04** (2006.01)

**A61L 29/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2009** **E 16152830 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017** **EP 3047861**

54 Título: **Infusión intracoronaria de IGF-1 para la reparación del miocardio**

30 Prioridad:

**01.12.2008 US 118829 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CORK-NATIONAL  
UNIVERSITY OF IRELAND, CORK (100.0%)  
Western Road  
Cork, IE**

72 Inventor/es:

**CAPLICE, NOEL**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 659 363 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

Infusión intracoronaria de IGF-1 para la reparación del miocardio

### 5 Campo técnico

La invención se refiere a un método para tratar músculo cardíaco dañado, especialmente músculo cardíaco dañado por infarto de miocardio, para estimular la supervivencia y la reparación del músculo cardíaco dañado o estimular la remodelación ventricular izquierda, en la que se administra y IGF-1 mediante infusión intracoronaria.

### 10 Antecedentes de la invención

El infarto de miocardio (formación de un infarto o zona de músculo cardíaco muerto) se produce cuando se interrumpe el suministro sanguíneo al corazón, que puede ser consecuencia de una oclusión (bloqueo) de una arteria coronaria, como a continuación de la rotura de la placa aterosclerótica vulnerable. El infarto de miocardio agudo (AMI) se produce como consecuencia del bloqueo repentino del suministro de sangre al corazón. La muerte irreversible del corazón o músculo cardíaco empieza a producirse si el suministro de sangre no es restablecido de forma suficientemente rápida (por ejemplo, en 20 a 40 minutos).

Si el flujo de sangre impedido al corazón se prolonga un tiempo suficiente, las células cardíacas mueren, a través de trayectorias celulares necróticas y/o apoptóticas, no vuelven a crecer y se forma una cicatriz de colágeno en su lugar. Esto puede dar lugar a un daño permanente del corazón y el tejido de cicatriz plantea también al paciente el riesgo de arritmias potencialmente peligrosas para la vida y/o puede dar lugar a la formación de un aneurisma ventricular.

Las enfermedades del corazón, como MI (infarto de miocardio), son la causa principal de muerte tanto en hombres como en mujeres. La enfermedad cardíaca coronaria es responsable de 1 de cada 5 muertes en los Estados Unidos. Aproximadamente 1,2 millones de personas en los EE.UU. padecen un ataque coronario nuevo o recurrente cada año y de ellos, aproximadamente 400.000 mueren como consecuencia del ataque.

### 30 Declaraciones de la invención

La invención se refiere también a un método para estimular la supervivencia o reparar el músculo cardíaco o estimular la remodelación ventricular izquierda, o en un mamífero que tiene el músculo cardíaco dañado, que comprende la etapa de administrar una dosis terapéutica de IGF-1 al músculo cardíaco dañado mediante suministro intracoronario. Normalmente, el mamífero que está siendo tratado ha sufrido un infarto de miocardio, aunque el método de tratamiento puede ser la respuesta a un músculo cardíaco dañado provocado por otros acontecimientos, por ejemplo, isquemia o trauma. El IGF-1 es administrado mediante infusión intracoronaria en la circulación coronaria, aunque están previstos otros métodos de suministro intracoronario como, por ejemplo, suministro intracoronario por medio de un dispositivo implantable de elución de IGF-1 como una endoprótesis. Normalmente, se administra una dosis terapéutica entre 25 pg y 950 pg de IGF-1 mediante suministro intracoronario, idealmente durante un periodo de 1 segundo a 24 horas.

La invención proporciona también un método para tratar un mamífero que ha sufrido un infarto de miocardio, para estimular la reparación y supervivencia del músculo cardíaco dañado por el infarto, o para estimular la remodelación ventricular izquierda, comprendiendo el método una etapa de administrar una dosis terapéutica de IGF-1 al músculo cardíaco dañado mediante suministro intracoronario. Normalmente, el mamífero que está siendo tratado ha sufrido un infarto de miocardio, aunque el método de tratamiento puede ser en respuesta a un músculo cardíaco dañado como consecuencia de otros acontecimientos, por ejemplo, isquemia o trauma. El IGF-1 es administrado mediante infusión intracoronaria en la circulación coronaria. Normalmente, se administra una dosis terapéutica entre 25 pg y 950 pg de IGF-1 mediante suministro intracoronario, idealmente durante un periodo de 1 segundo a 24 horas.

En los métodos de la invención, la dosis terapéutica de IGF-1 es adecuadamente de 50 a 900 pg, 100 a 850 pg, 150 a 800 pg, 200 a 750 pg, 300 pg a 700 pg, 350 pg a 650 pg, más preferentemente de 400 a 600 pg, más preferentemente de 400 a 550 pg, más preferentemente de 400 a 500 pg, más preferentemente de 420 a 480 pg. Normalmente, la dosis terapéutica es de al menos 30 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg, 125 pg, 150 pg, 175 pg, 200 pg, 250 pg, 300 pg, 350 pg, 380 pg, 390 pg, 400 pg, 410 pg, 420 pg, 430 pg, o 440 pg de IGF1. Generalmente, la dosis terapéutica es como máximo de 900 pg, 850 pg, 800 pg, 750 pg, 700 pg, 650 pg, 600 pg, 550 pg, 500 pg, 490 pg, 480 pg, 470 pg, o 460 pg de IGF1.

### 60 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización de CPC, conjunto de citoquinas de medios acondicionados (CM) y efecto de los CM sobre cardiomiocitos de ratas neonatas.

A: Unas CPC aisladas a partir de células mononucleares de sangre periférica fueron caracterizadas en cuanto a la

expresión de marcadores progenitores usando RT-PCR.

B: Los CM de CPC fueron seleccionados en cuanto a la presencia de aproximadamente 78 citoquinas diferentes de las que TGFβ2 e IGF1 fueron los factores de crecimiento predominantes.

C: Medios acondicionados protegieron significativamente los cardiomiocitos de ratas neonatales de la muerte celular inducida por apoptosis, mientras bloqueaban TGFβ e IGF1 usando anticuerpos neutralizantes específicos que anulaban los efectos protectores de los medios acondicionados. Para la neutralización de TGFβ e IGF1, los CM fueron incubados con anticuerpos TGFβ y/o IGF1 durante 15 minutos a 37 °C antes de exponerlos a los cardiomiocitos.

D: Péptidos de TGFβ e IGF1 purificados emularon los efectos de los CM a una gama de dosis muy estrechas. Los datos se expresan en forma de media ± SEM de % de actividad caspasa 9 respecto al grupo de X-Vivo en tres experimentos independientemente realizados.

Figura 2. Tinción TUNEL en el miocardio límite (200 x).

A: Medios acondicionados (CM) del grupo tratado redujeron significativamente ( $p < 0,001$ ) las señales TUNEL en el miocardio límite en comparación con el grupo tratado con X-Vivo.

B: Los efectos de los CM fueron bloqueados neutralizando TGFβ e IGF1 en CM. Las señales TUNEL de 5 secciones/cerdo (N=3-4) con una media de 5 campos de potencia elevada/sección se expresan en forma de media ± SEM.

C: Una imagen aumentada representativa (600 x) de miocardio límite que confirma la localización de la señal TUNEL en los cardiomiocitos.

Figura 3: Señal apoptótica de miocardio de zona límite 24 horas después del infarto de miocardio. La actividad de caspasa 3 (A), actividad de caspasa 9 (B) y expresión de proteína de caspasa 9 (C) se redujeron significativamente ( $p < 0,0001$ ) en los grupos tratados con medios acondicionados mientras que la proteína BCL2 anti-apoptótica (D) resultó significativamente sobrerregulada. Los efectos antiapoptóticos de los CM están mediados por TGFβ ( $p < 0,001$ ) e IGF1 ( $p < 0,01$ ). Los datos se expresan en forma de media ± SEM de muestras de miocardio de zona límite de 3-4 cerdos/grupo.

Figura 4. Señal apoptótica en miocardio de zona límite 8 semanas después del infarto de miocardio. Los marcadores apoptóticos, es decir, núcleos positivos TUNEL (A), actividad de caspasa 9 (B), actividad de caspasa 3 (C) y expresión de proteína BCL2 (D) no se efectuaron en valores de tiempo crónicos (8 semanas) después de la terapia de medios acondicionados. Los datos se expresan en forma de media ± SEM en las muestras de miocardio de zona límite de 3-4 cerdos/grupo.

Figura 5. Efecto de medios acondicionados en zona de infarto ventricular izquierdo.

A: La terapia de medios acondicionados (CM) no tuvo influencia sobre la zona de infarto ventricular izquierdo en las 24 horas posteriores al MI.

B: Sin embargo, la terapia de CM dio lugar a una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en la zona de infarto ventricular izquierdo en 8 semanas después del MI. Los datos se expresan en forma de media ± SEM de 6-7 secciones cruzadas ventriculares/corazón de cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

Figura 6: Análisis funcional ventricular izquierdo a las 24 horas después del MI.

La terapia de medios acondicionados (CM) mejoró significativamente la función ventricular izquierda, es decir, ± dp/dt (A), ± dv/dt (B), volumen sistólico (C) y fracción de eyección (D) a las 24 horas después del MI. Los efectos de los CM parece que están mediados por TGF e IGF1. Los datos se expresan en forma de media ± SEM 20-25 ciclos cardíacos/cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

Figura 7. Análisis funcional ventricular izquierdo a las 8 semanas después del MI.

La terapia de medios acondicionados (CM) mejoró significativamente la función ventricular izquierda, es decir, ± dp/dt (A), ± dv/dt (B) volumen sistólico (C) y fracción de eyección (D) a las 8 semanas después del MI. Los datos se expresan en forma de media ± SEM 20-25 ciclos cardíacos/cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

Figura 8. Efecto de medios acondicionados (CM) sobre el contenido de colágeno en la zona límite a las 24 horas (A) y 8 semanas (B) después del MI. La terapia de CM redujo significativamente el contenido de colágeno en el miocardio de la zona límite en el plazo de tiempo agudo (A) pero no crónico (B). Las secciones de la zona límite

fueron teñidas para colágeno usando rojo picosirus y se cuantificó usando el software NIH imageJ. La tinción de colágeno con rojo picosirus en 5 secciones/cerdo (n = 3-4) con una media de 5 campos de potencia elevada/sección se expresa en forma de media  $\pm$  SEM.

- 5 Figura 9. Efectos de medios acondicionados (CM) sobre hipertrofia de cardiomiocitos limítrofes. Los CM aumentaron significativamente ( $p < 0,001$ ) la hipertrofia de cardiomiocitos de zona limítrofe a las 8 semanas después del infarto de miocardio y este efecto estuvo mediado por TGF e IGF1. Se adquirieron imágenes de potencia elevada (600x) de cardiomiocitos de zona limítrofe usando un microscopio con focal NIKON y se realizó un análisis planimétrico usando un software de análisis de imágenes NIKON para cuantificar el tamaño de los cardiomiocitos. Se analizó un promedio de 300-400 cardiomiocitos de zona limítrofe por cerdo (con 3-4 cerdos/grupo) y los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de 1.000-1.600 cardiomiocitos/grupo.

Figura 10. La terapia de medios acondicionados no afectó al número total de núcleos en el miocardio de zona limítrofe. Se hizo un recuento del número total de núcleos positivos de DAPI/Campo de potencia alta y se expresó en forma de media  $\pm$  SEM de 10 secciones/animal.

Figura 11. El efecto antiapoptótico de una terapia de medios acondicionados (CM) en miocardio de zona limítrofe (BZ) *in vivo* (tinción TUNEL) fue anulado bloqueando IGF-1 en CM, usando un anticuerpo neutralizante selectivo.

- 20 Figura 12. El efecto de medios acondicionados sobre la zona de infarto ventricular izquierdo a las 8 semanas (A) después del infarto de miocardio (MI) se redujo significativamente mediante la terapia de CM, que aumentó también la relación de adelgazamiento (B) a las 8 semanas después del MI.

Figura 13. Efecto antiapoptótico de la terapia de IGF1 (50 y 500 pg/ml) sobre el miocardio de zona limítrofe (BZ) *in vivo*.

### Descripción detallada de la invención

- La solicitud se basa al menos en parte en el descubrimiento sorprendente de que las citoquinas, como las dos citoquinas que son factores celulares secretados a partir de células progenitoras endoteliales (EPC), TGF $\beta$ 1 (TGFBeta1) e IGF1, desempeñan una función principal en la reparación cardíaca después de un infarto de miocardio (un resultado de lo cual es la formación de un infarto de miocardio), como un infarto de miocardio agudo. Estos factores actúan como agentes cardioprotectores en cuanto que ejercen efectos beneficiosos antiapoptóticos y/o cardiotrópicos y otros sobre el tejido afectado o dañado, por ejemplo, en el lugar de un infarto de miocardio agudo.
- 35 Estas citoquinas ejercen sus efectos, por ejemplo, reduciendo o previniendo la apoptosis en el tejido afectado o dañado y/o aumentando o facilitando la hipertrofia de zona limítrofe regional en tejidos sanos y/o aumentando o facilitando la angiogénesis en la zona limítrofe.

- En la presente invención se proporcionan métodos para tratar un individuo que padece un infarto de miocardio agudo, que comprenden administrar al individuo, en dirección ascendente del infarto de miocardio, una cantidad terapéuticamente eficaz de un (al menos uno, uno o más) agente cardioprotector. En realizaciones específicas, se administra IGF1 o TGF $\beta$ 1 e IGF1 al individuo, en dirección ascendente del infarto de miocardio, en una cantidad suficiente para dar lugar al suministro al corazón de IGF1 o TGF $\beta$ 1 e IGF1 en concentraciones que reduzcan los efectos del infarto de miocardio sobre el individuo (por ejemplo, ejerciendo efectos beneficiosos antiapoptóticos y/o cardiotrópicos y otros sobre el tejido afectado o dañado, en particular estimulando la reparación o supervivencia de músculo cardíaco o estimulando la remodelación ventricular izquierda).

- El (o los) agente(s) cardioprotector(es) son suministrados desde el factor eluyente en la circulación del miocardio y suministrados al corazón a través de la circulación. En algunas realizaciones, el (o los) agente(s) cardioprotector(es) dirigen a diana en la zona limítrofe del infarto de miocardio agudo, que es una zona del corazón (ventrículo) entre/que separa un área de tejido cardíaco manifiestamente normal y tejido cardíaco infartado. La zona limítrofe del infarto es un sitio de tejido lesionado, parcialmente perfusionado, potencialmente salvable, que comprende miocitos y la periferia de infartos de miocardio en desarrollo.

- 55 En los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, el IGF1 o TGF $\beta$  e IGF1 pueden ser administrados en combinación con otros agentes cardioprotectores, como otras citoquinas (diferentes), agentes anticoagulantes, agentes que minimizan la elasticidad de los vasos, un agente vasodilatador, un agente bloqueador de calcio, agentes bloqueadores de canales de sodio o agentes antiinflamatorios.

- 60 Se proporcionan en la presente invención métodos para tratar individuos que tienen (que sufren) un infarto de miocardio agudo.

- Los individuos que se benefician del método descrito en la presente memoria descriptiva son seres humanos que están sufriendo o experimentando un infarto de miocardio agudo (AMI). El infarto de miocardio agudo es comúnmente conocido como un "ataque cardíaco".

La expresión “infarto de miocardio” se refiere a cambios en el músculo cardíaco (miocardio) que se producen debido a la derivación repentina de sangre en circulación, provocada por acontecimientos como arterioesclerosis (estrechamiento o taponamiento de las arterias coronarias) y trombosis (coágulo), que reducen el flujo de oxígeno al corazón. El cambio principal es la muerte (necrosis) del tejido del miocardio, que puede conducir al daño permanente o muerte del músculo cardíaco. La invención proporciona métodos para tratar un individuo que tiene un infarto de miocardio agudo. Estos métodos incluyen el tratamiento de un individuo mediante la inserción quirúrgica de un agente en un sitio de una oclusión aguda de arteria coronaria en dirección ascendente del sitio del infarto de miocardio agudo, por ejemplo, durante los procedimientos PCI o de angiografía coronaria descritos en la presente memoria descriptiva.

En una realización, el agente cardioprotector ejerce sus efectos cardioprotectores en las cercanías o en la zona limítrofe del infarto (un sitio de tejido moderadamente dañado, parcialmente perfusionado, potencialmente salvable, que comprende miocitos, en la periferia de los infartos de miocardio en desarrollo).

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria descriptiva comprenden adicionalmente una terapia adyuvante o se pueden combinar con cualquier forma de diagnóstico (por ejemplo, historial, ECG o marcadores cardíacos) y/o tratamiento (tratamiento profiláctico o estabilizante como administración de oxígeno, aspirina, trinitrato de glicerilo sublingual y/o agentes para aliviar el dolor así como un tratamiento con bloqueadores beta, agentes anticoagulantes, inhibidores ACE y/o antiplaquetarios) antes de la inclusión de la endoprótesis y también un tratamiento después de la endoprótesis (por ejemplo, tratamiento con agentes antilipémicos, agentes antiinflamatorios, agentes antitrombóticos, agentes fibrinolíticos, agentes antiplaquetarios, inhibidores de trombina directos, inhibidores de glicoproteína IIb/IIIa, agentes para unirse a moléculas de adhesión celular e inhibir la capacidad de los leucocitos a unirse a estas moléculas (por ejemplo, anticuerpos de moléculas de adhesión anticelular), bloqueadores alfa-adrenérgicos, bloqueadores beta-adrenérgicos, inhibidores de ciclooxigenasa-2, inhibidor del sistema de angiotensina, antiarrítmicos, bloqueadores de canales de calcio, diuréticos, agentes inotrópicos, vasodilatadores, vasopresores, tiazolodionas, bloqueadores de receptores cannabinoides-1 y/o cualquier combinación de los mismos).

Un factor o agente antiinflamatorio es, por ejemplo, una citoquina con acción inhibidora de la inflamación, como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 o galectina-3. Un factor angiogénico es, por ejemplo, una citoquina que transmite una señal para la estimulación de la angiogénesis como HGF, VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$  o TP.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “agentes cardioprotectores” se refiere a agentes que ejercen ciertos efectos, como efectos antiapoptóticos y/o hipertróficos, que son beneficiosos para el paciente o sujeto que sufre un infarto de miocardio agudo. Los agentes cardioprotectores de la invención pueden ejercer sus efectos beneficiosos sobre células como, por ejemplo, miocitos en tejidos como tejidos cardíacos, pero pueden ejercer también sus efectos sobre células como células epiteliales o endoteliales presentes, por ejemplo, en las arterias que suministran al corazón. Cuando se suministran suficientemente pronto después de la aparición del infarto de miocardio, los efectos beneficiosos pueden incluir una reducción o prevención de la muerte celular, como a través de necrosis o apoptosis, de los miocitos en la periferia de los infartos de miocardio en desarrollo y/o una inducción del crecimiento de miocitos supervivientes. Los agentes cardioprotectores pueden estimular también el crecimiento o prevenir la muerte celular de células epiteliales o endoteliales presentes en las arterias que suministran al corazón. Estos efectos pueden conducir a una reducción en el tamaño y/o una restauración parcial o completa del tejido moderadamente dañado y/o necrótico de la zona infartada. Efectos beneficiosos adicionales pueden incluir la disolución de los coágulos de sangre u otro material orgánico que conduce a estrechamientos u oclusiones arteriales, como placas ateroscleróticas vulnerables.

Los agentes cardioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva que ejercen efectos antiapoptóticos y/o hipertróficos incluyen TGF $\beta$ 1 e IGF1.

El TGF- $\beta$  es una proteína secretada que existe en tres isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. La familia de TGF- $\beta$  es una parte de una superfamilia de proteínas conocida como superfamilia de factor de crecimiento beta transformante que incluye inhibinas, activina, hormona antimülleriana, proteína morfogenética ósea, decapentaplégica y Vg-1.

Los factores de crecimiento de tipo insulina (IGFs) son polipéptidos con una analogía de secuencias elevada a la insulina y comprenden receptores de superficies celulares (por ejemplo, IGF1R e IGF2R), ligandos (por ejemplo, IGF-1 e IGF-2), proteínas de unión (por ejemplo, IGFBP 1-6) así como proteasas IGFBP asociadas. El factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1) es secretado principalmente por el hígado como consecuencia de una estimulación por la hormona del crecimiento (GH) y desempeña una función en el favorecimiento de la proliferación celular y la inhibición de la muerte celular (apoptosis). El factor de crecimiento 2 de tipo insulina (IGF-2) se cree que es un factor de crecimiento primario necesario para el desarrollo temprano mientras que la expresión de IGF-1 es necesaria para conseguir un crecimiento máximo.

Muchos agentes cardioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva, como TGF $\beta$ 1 e IGF1, están disponibles en el comercio en forma purificada o recombinante y han sido propuestos para muchos usos

terapéuticos como, por ejemplo, la curación de heridas (patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 4.861.757; 4.983.581 y 5.256.644) o la inducción del crecimiento óseo (patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 5.409.896 y 5.604.204).

Los agentes cardioprotectores descritos en la presente memoria descriptiva se pueden combinar también con agentes adicionales que tengan efectos complementarios, sinérgicos o aditivos. Por ejemplo, los fármacos que rebajan los niveles de colesterol, como las estatinas, pueden mejorar la sensibilidad de las células cardiovasculares a las acciones protectoras de TGF- $\beta$ , ayudando así prevenir el desarrollo de aterosclerosis y daño cardíaco. En otros ejemplos, agentes anticoagulantes como aspirina (ácido salicílico), heparina, cumadina, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), citrato, ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetraacético (EGTA), ácido dietilenotriamino-pentaacético (DTPA), ácido 1,2-diaminociclohexano-tetraacético (DCTA) y otros, se pueden combinar con agentes cardioprotectores para ayudar a prevenir el bloqueo arterial. Los agentes que minimizan la elasticidad de los vasos, como agentes bloqueadores alfa-adrenérgicos de haloalquilamina, por ejemplo fenoxibenzamina, isómeros de fenoxibenzamina y aminas terciarias de fenoxibenzamina y/o agentes vasodilatadores como lidocaína, xilocaína, tetracaína, procaína y otros vasodilatadores a corto plazo como papaverina, adenosina, agentes donantes de óxido nítrico, agentes bloqueadores de canales de calcio, agentes bloqueadores de canales de sodio y agentes reguladores de adenosina relacionados se pueden combinar también con agentes protectores. Agentes antiinflamatorios, como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) por ejemplo, ibuprofeno, aspirina y naproxeno o hierbas con efectos antiinflamatorios como hisopo, jengibre, cúrcuma, árnica montana y corteza de saúce se pueden combinar también con agentes cardioprotectores.

Los agentes cardioprotectores de la invención se pueden combinar también con agentes cardiovasculares adicionales, como antagonistas de receptores de aldosterona, inhibidores de enzimas de conversión de angiotensina, inhibidores de angiotensina II, agentes antiadrenérgicos de actuación periférica, agentes antiadrenérgicos, agentes antianginales, agentes antiarrítmicos, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, bloqueadores beta cardiosselectivos y no selectivos, agentes bloqueadores de canales de calcio, diuréticos (por ejemplo, diuréticos de ASA, ahorradores de potasio y tiazidas), inhibidores de anhidrasa carbónica, agentes inotrópicos, vasodilatadores, inhibidores de renina, agentes esclerosantes y antagonistas de vasopresina.

Ejemplos de bloqueadores de alfa-adrenérgicos incluyen: doxazocina, prazocina, tamsulosina y tarazosina.

Los agentes bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos son una clase de fármacos que antagonizan los efectos cardiovasculares de catecolaminas en angina de pecho, hipertensión y arritmias cardíacas. Los bloqueadores de receptores beta-adrenérgicos incluyen, pero sin limitación, atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimetoprolol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxipropoxi)-3-piridencarbonitrilHCl, 1-butilamino-3-(2,5-diclorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propiltio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, 7-(2-hidroxi-3-t-butilaminopropoxi)ftalida. Los compuestos anteriormente identificados pueden ser usados en forma de mezclas isómeras o su respectiva forma levorrotatoria o dextrorrotatoria.

Los pacientes sin una elevación de segmento ST se supone que están experimentando una angina inestable (UA) o un infarto de miocardio que no es de elevación de segmento ST (NSTEMI). El NSTEMI puede ser tratado con medicación (por ejemplo, agentes antiplaquetarios y anticoagulantes) para evitar que las arterias estrechadas se ocluyan, aunque a menudo se realiza un PCI durante la admisión hospitalaria. En pacientes que tienen bloqueos múltiples y que están relativamente estables, la cirugía de derivación de la arteria coronaria bloqueada puede ser una opción. La cirugía de derivación de la arteria coronaria implica que una arteria o vena del paciente es implantada a un estrechamiento u oclusiones de derivación en las arterias coronarias. Pueden ser usadas diversas arterias y venas, sin embargo, los injertos de arterias de mamíferos internos han demostrado índices de permeabilidad a largo plazo significativamente mejores que los injertos de vena safena magna. Posteriormente al MI, se pueden usar diversas medicaciones a largo plazo con el objetivo de prevenir acontecimientos cardiovasculares secundarios como infartos de miocardio adicionales, fallo cardíaco congestivo o accidente cerebrovascular (CVA). Se puede usar una terapia de fármacos antiplaquetarios como aspirina y/o clopidogrel, terapia de bloqueadores beta como metoprolol o carvedilol, terapia de inhibidores ACE, terapia de estatina, agentes antagonistas de aldosterona como eplerenona, ácidos grasos omega-3 y/o tratamiento de células madre mediante inyecciones en arterias coronarias de células madre derivadas de la médula ósea del propio paciente.

Las terapias para reducir el riesgo de un acontecimiento cardiovascular futuro incluyen, pero sin limitación, la dieta y/o ejercicio y/o terapias con: agentes antilipémicos, agentes antiinflamatorios, agentes trombóticos, agentes fibrinolíticos, agentes antiplaquetarios, inhibidores de trombina directos, inhibidores de receptores de glicoproteína IIb/IIIa, agentes que se unen a moléculas de adhesión celular e inhiben la capacidad de los glóbulos blancos para atacar a estas moléculas (por ejemplo, anticuerpos de moléculas de adhesión anticelular), bloqueadores alfa-adrenérgicos, bloqueadores beta-adrenérgicos, inhibidores de ciclooxigenasa-2, inhibidores de sistemas de angiotensina, antiarrítmicos, bloqueadores de canales de calcio, diuréticos, agentes inotrópicos, vasodilatadores, vasopresores, tiazolidinodionas, bloqueadores de receptores cannabinoides-1 y/o cualquier combinación de los mismos. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica" y sus variaciones en la

presente memoria descriptiva, está previsto que abarque los elementos citados con posterioridad y sus equivalentes así como elementos adicionales.

## Ejemplos

Se investigaron los efectos cardioprotectores de medios acondicionados (CM) derivados de células progenitoras en circulación autólogas (CPC) en un modelo de infarto de miocardio (MI) porcino y los factores celulares TGF $\beta$ 1 e IGF1 fueron implicados para desempeñar una función en los efectos beneficiosos observados. Cerdos Landrace (25-28 kg) experimentaron una generación de MI a través de oclusión de balón transluminal percutáneo de la arteria coronaria durante 80 minutos, seguido de 120 minutos de perfusión. Se administraron medios acondicionados (CM) intracoronarios a partir de CPC autólogas o CM + anti-TGF $\beta$ 1 o CM + anti-IGF1 o X-vivo 15 (testigo) durante la oclusión con balón de la arteria relacionada con el infarto. A las 24 horas o las 8 semanas posteriores al MI los animales fueron sacrificados y los corazones experimentaron una cuantificación del infarto. La apoptosis de cardiomiocitos en la zona limítrofe de MI (50% MI/ 50% miocardio normal/ campo de potencia alta) se evaluó mediante tinción TUNEL expresión de caspasa 9 y proteína BC1-2 junto con ensayo de actividad de caspasa 3 y 9. Se realizó un análisis funcional usando catéteres de presión/volumen de conductancia. La terapia de CM redujo significativamente el tamaño del infarto a las 8 semanas. Además, el CM redujo significativamente la señal apoptótica a las 24 horas y se observó una mejora significativa en la función cardíaca a las 24 horas así como a las 8 semanas posteriores al MI. Los efectos beneficiosos de los CM fueron atenuados bloqueando TGF $\beta$ 1 e IGF1. Por tanto, los medios acondicionados derivados de CPC reducen la apoptosis de cardiomiocitos en la zona limítrofe del MI 24 horas después de la generación del MI, conduciendo a una mejora en la función ventricular izquierda. Estos efectos beneficiosos de los CM están mediados sustancialmente a través de TGF $\beta$ 1 e IGF1.

## Materiales y métodos

### *Aislamiento y caracterización de células progenitoras en circulación a partir de sangre periférica:*

Se aislaron células progenitoras en circulación (CPC) a partir de 30-40 ml de sangre extraída de una vena de la oreja de cerdos Landrace hembras bajo una técnica aséptica 48 horas antes de la generación del infarto, como se describió anteriormente (Doyle BJ. et al., Stem Cells Dev. 18 de junio de 2008). Las células sanguíneas mononucleares fueron recogidas a partir de preparaciones de capas leucocitarias periféricas usando una separación Ficoll-Paque Plus (15 cc). Las células fueron analizadas en cuanto a la expresión de marcadores de CPC (CD133, CD34, cKit, FLK1, VE-Cadherin y eNOS) mediante RT PCR y se compararon con CPC humanas. Se aisló RNA total a partir de CPC humanas y de cerdo cultivadas 24 horas usando un estuche de aislamiento SV Total RNA (Progema, Southampton, Reino Unido). Se sometieron a transcripción inversa 5  $\mu$ g de RNA total usando un estuche de síntesis SuperScript III First-Strand con cebadores poli-dT (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usaron 2  $\mu$ l de cDNA para cada reacción de PCR para marcadores de células madre/endoteliales usando polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) con los cebadores y temperaturas de hibridación indicadas en la tabla 1 siguiente. Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% teñido con tinción de ácidos nucleicos SybrGreen I (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabla 1. Se usaron las siguientes secuencias de cebadores y condiciones de RT PCR

| Marcador/Cebador |           | Secuencia                        | Tamaño de producto | Tm de hibridación (°C) | Secuencia ID N° |
|------------------|-----------|----------------------------------|--------------------|------------------------|-----------------|
| CD133            | For       | 5'-TCCTGGGGTTGCTGTTTATT-3'       | 157 bp             | 58                     | 1               |
|                  | Rev       | 5'-CATATCACCAAGAGGGAAACG-3'      |                    |                        | 2               |
| cKit             | For       | 5'-GAGGAGATAAATGGAAAC-3'         | 385 bp             | 51                     | 3               |
|                  | Hum -Rev  | 5'-GAATCACGTTTCTTCTC-3'          |                    |                        | 4               |
|                  | Cerdo-Rev | 5'-GAATCACGTTTCCGTCTC-3'5'       |                    |                        | 5               |
| CD34             | Hum -F    | 5'-CCTGATGAATCGCCGAGCTGGAGC-3'   | 201 bp             | 58                     | 6               |
|                  | Hum -R    | 5'-CCAGAAACGGCCATTCAGCAAGACA-3'  |                    |                        | 7               |
|                  | Cerdo-F   | 5'-GCTGATGAACCGTCGGAGTTGGAGC-3'  |                    |                        | 8               |
|                  | Cerdo-R   | 5'-CCAGAAACGGCCATTCAGCGCAGGCA-3' |                    |                        | 9               |
| Flk-1            | For       | TTATCGGAGAAGAACGTGGT             | 412 bp             | 55                     | 10              |
|                  | Rev       | TAATGCTCAGCAGGATGGCA             |                    |                        | 11              |
| eNOS             | For       | 5'-GGTATGGATGAGTATGACGTG-3'      | 171 bp             | 51                     | 12              |
|                  | Rev       | 5'-TGTTCCGGCCGAGGG-3'            |                    |                        | 13              |

|             |     |                                 |        |      |    |
|-------------|-----|---------------------------------|--------|------|----|
| VE-Cadherin | For | 5'-AACTTCCCCTTCTTCACCC-3'       | 368 bp | 51   | 14 |
|             | Rev | 5'-AAGGCTGCTGGAAAATG-3'         |        |      | 15 |
| G3PDH       | For | 5'-CCATGTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'  | 251 bp | 59.9 | 16 |
|             | Rev | 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTC-3' |        |      | 17 |

*Generación de medios acondicionados a partir de células progenitoras en circulación:*

Para generar los medios acondicionados, las CPC se lavaron tres veces en MCDB 131 complementado con hidrocortisona, antibióticos y 10 ng/ml de VEGF. A continuación de esta etapa, las células se pusieron posteriormente en suspensión en medio X-vivo 15 (BioWhittaker) complementado con VEGF (1 ng/ml) y se sembraron en placas revestidas con fibronectina a una densidad de  $4,9 \times 10^3$  células por  $\text{mm}^2$  en una modificación de la metodología anteriormente expuesta (Assmus B. et al., Circulation. 2002; 106: 3009-17; Doyle BJ. et al., Stem Cells Dev. 18 de junio de 2008). Después de 48 de cultivo, los medios exentos de células acondicionadas se recogieron del cultivo celular por centrifugación (600x g durante 5 minutos) y filtración (0,2  $\mu\text{m}$ ) de los medios. Los medios acondicionados fueron seleccionados en cuanto a la presencia de citoquinas usando un estuche de conjuntos de anticuerpos de citoquinas humanas RayBio.

*Selección in vitro en cuanto a efectos antiapoptóticos de medios acondicionados usando cardiomiocitos neonatales:*

Se extirparon corazones de ratas Fisher de 1 día de edad y los cardiomiocitos se aislaron y se cultivaron como se describió anteriormente (Doyle BJ. et al., Stem Cells Dev. 18 junio 2008; Perez-Terzic C. et al., Circ Res. 1999; 84: 1292-301). En línea con una preparación de cardiomiocitos puros, estas células no mostraron evidencia de contaminación celular neural o vascular. Los cardiomiocitos se incubaron bajo condiciones hipóxicas (95% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$ ) durante 24 horas a 37 °C, seguido de condiciones durante 24 horas a 37 °C para inducir la muerte celular mediante apoptosis. Antes de la inducción de hipoxia los cardiomiocitos fueron tratados con las siguientes soluciones: medios de nueva aportación (X vivo-15 con 1 ng/ml de VEGF), medios acondicionados (CM) obtenidos a partir de cultivos de CPC porcinas (como se describió anteriormente), medios acondicionados que contenían un exceso 100 veces de anticuerpo neutralizante para TGF $\beta$  o IGF1 o IgG y TGF $\beta$  porcino purificado (10-1.000 pg/ml) o IGF1 (1-100 pg/ml). La señal de apoptosis en los cardiomiocitos se cuantificó usando un estuche de ensayo de actividad de caspasa 9 comercial (Chemicon International, California, EE.UU.) y los datos se expresan como porcentaje de grupo tratado con X-vivo.

*Modelo porcino de infarto de miocardio:*

Se usaron en este estudio 39 cerdos Landrace hembras que pesaban 25-30 kg de acuerdo con las normas del Comité Ético para animales experimentales de la University College Cork. 20 cerdos Landrace jóvenes criados en granja consanguíneos experimentaron una oclusión de balón percutáneo de la arteria coronaria circunfleja izquierda proximal (LCx) durante 80 minutos. El grupo de infarto crónico que comprendía 19 cerdos similares tuvo una oclusión por balón de la arteria coronaria descendente (LAD) anterior izquierda proximal percutánea durante un periodo de inflamamiento de balón idéntico. Este protocolo experimental ha sido descrito en detalle previamente (Klein HH. et al., Basic Res Cardiol. 1984; 79: 440-7). Brevemente, todos los animales fueron previamente medicados con amiodarona 400 mg, aspirina 75 mg y clopidogrel 75 mg diariamente durante 8-10 días antes de la generación del infarto. A continuación de una inyección intramuscular de cetamina y xilazina, los animales recibieron propofol intravenoso. Se llevó a cabo una ventilación mecánica usando un ventilador Harvard Apparatus para animales grandes y oxígeno complementario (4-6 l/min) combinado con isoflurano (1-4%) para mantener la anestesia general. Bajo fluoroscopia a 3,0 x 13mm (Boston Scientific, Galway, Irlanda) se insertó un balón de angioplastia en la LCx proximal (grupo de infarto agudo) o LAD proximal (grupo crónico) usando un catéter de guía 6F IMA (Boston Scientific, Galway Irlanda) introducido a través de una envoltura arterial 7Fr desde la arteria carótida interna derecha. El balón se infló a 6-8 atm, asegurando una oclusión angiográfica completa del vaso diana con una angiografía de verificación realizada cada 15-20 minutos durante el periodo de generación del infarto. La elevación significativa de segmento ST se confirmó sobre electrocardiografía en todos los casos. Las arritmias malignas fueron desfibriladas en la medida necesaria. Seguidamente el balón se desinfló y se retiró para permitir una reperusión durante un total de 120 minutos. Una angiografía de verificación confirmó un flujo de TIMI-3 en la arteria relacionada con el infarto al inicio de la reperusión. Seguidamente se colocó un balón coronario sobre el catéter (3,0 x 12 mm, Boston Scientific Galway, Irlanda) en el sitio de la oclusión del vaso previa. Se realizaron tres ciclos de inflamamiento del balón de 4 minutos con infusión intracoronaria de 4 ml de X-vivo/VEGF, medios acondicionados, CM + anti-IGF1, CM + anti-TGF $\beta$ 1 o CM + IgG, con un periodo de 4 minutos de desinflamamiento del balón entre cada ciclo. Para el grupo CM + anti-IGF1, CM + anti-TGF $\beta$ 1 o CM + IgG, el anticuerpo bloqueante o el IgG se mezcló en los CM 15 minutos antes del suministro intracoronario. Finalmente, una angiografía de verificación confirmó la permeabilidad de la arteria relacionada con el infarto (flujo de TIMI-3) y el animal se recuperó.

A las 24 horas (estudio agudo) o a las 8 semanas (estudio crónico) después de la generación del infarto, los animales experimentaron una angiografía coronaria repetida para confirmar la permeabilidad a TIMI-3 de la arteria

relacionada con el infarto, a través de la arteria carótida interna izquierda, como se describió anteriormente. Tras completarse el registro de los parámetros hemodinámicos con el catéter de conductancia, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbitona. Los corazones fueron extirpados, pesados y seccionados en rodajas transversales de 5 mm desde la cúspide hasta la base (6-8 rodajas/corazón). Una rodaja ventricular media representativa (3ª o 4ª rodaja) fue teñida con TTC al 2%. Se capturaron imágenes de las secciones usando una cámara digital de 10 megapíxeles. La zona del infarto fue cuantificada con planimetría de las imágenes usando un software NIH Image J (Maryland, EE.UU.). Se tomó el miocardio de las zonas de miocardio limítrofes y remotas para una inclusión en OCT y crioconservación en nitrógeno líquido.

#### Protocolo de enlace presión-volumen:

Se registraron los valores de enlace de presión-volumen usando un catéter de conductancia con cola de cerdo 5Fr (Miller Instruments, Houston Texas, EE.UU.) colocado en la cúspide ventricular izquierda bajo guía fluoroscópica antes de la generación del MI, durante la perfusión, tratamiento posterior e inmediatamente antes de sacrificar (grupo agudo de 24 horas, grupo crónico de 8 semanas). Se tomaron registros en el estado estacionario en ritmo sinusal durante un mínimo de 10 minutos usando una frecuencia de las muestras de 250 Hz, usando un dispositivo LabChart 5 Pro (AD Instruments Oxfordshire, Reino Unido) y se realizaron análisis fuera de línea de los parámetros emodinámicos usando software PVAN ultra 1.0 (AD Instruments Oxfordshire, Reino Unido). Se analizó un mínimo de 45 segundos de registros de presión-volumen en el estado estacionario por animal (n= 3 por grupo de tratamiento).

#### Histología

Se cortaron secciones de 5 µm de grosor de miocardio de zona limítrofe del infarto incluidas en OCT para análisis histológicos. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina, rojo Sirius o tricromo de Mason. Cultivos inclinados representativos de las zonas limítrofes del infarto del grupo crónico (como se definió anteriormente) fueron teñidas para el contenido de colágeno con rojo picosirus (Sirius red F3BA en ácido pícrico acuoso). Se adquirieron al menos 36 campos de potencia alta/grupo de tratamiento usando una cámara Nikon CCD unida al microscopio Nikon. El contenido de colágeno se cuantificó expresando las zonas teñidas con rojo picosirus como un porcentaje de la zona limítrofe del infarto total por campo de potencia elevada, empleando un sistema de análisis de imágenes automatizado (software de NIS Elements Basic Research).

#### Apoptosis en la zona limítrofe del infarto:

Las señales de apoptosis del miocardio de la zona limítrofe fueron cuantificadas usando tres metodologías establecidas diferentes, a saber TUNEL (inmunofluorescencia), expresión de proteínas de caspasa 9 y bcl-2 usando coágulos Western y midiendo la actividad de caspasa 3 y 9. La zona limítrofe del infarto se midió como un campo de potencia alta compuesto 50% de miocardio normal y 50% de zona de infarto. Se hizo un recuento del número de células positivas TUNEL en 25 campos de potencia alta por animal, derivados de 4 rodajas (grosor de 5 µm) tomadas de 3 rodajas ventriculares medias usando el estuche de detección In Situ Cell Death (Roche) según las instrucciones del fabricante. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. La detección de la señal positiva TUNEL en los cardiomiocitos fue validada mediante tinción dual del miocardio con anti-actina sarcomérica α (Sigma A2172) seguido IgM-anti-ratón de cabra conjugado con rodamina como anticuerpo secundario (Chemicon AP128R).

#### Extracción de proteínas y transferencia Western:

La expresión de caspasa 9 y bcl-2 se evaluaron mediante análisis de transferencia Western. El tejido de la zona limítrofe del infarto se lavó en PBS enfriado con hielo, se colocó en tampón de lisis (3 veces el peso de la muestra en volumen; 50 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de NaF, 50 mmol/l de pirofosfato de sodio, 5 mmol/l de EDTA, 5 mmol/l de EGTA, 2 mmol/l de Na<sub>3</sub>V<sub>4</sub>, 1% de Triton X-100, 10 mmol/l de HEPES; complementado con inhibidores de proteasa completos [Roche]) y se homogeneizó sobre hielo. Las mezclas se incubaron 1 hora sobre hielo y seguidamente se eliminó el debris celular por centrifugación (14.000 rpm; 10 minutos). Los niveles de proteínas se valoraron usando reactivo Bradford. Se prepararon 100 microgramos de proteína por muestra en tampón de muestra y se introdujeron al 12%, seguidamente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en leche al 5% y los anticuerpos primarios fueron aplicados caspasa 9 (Stressgen), bcl-2 (Abcam) durante una noche a 4 °C. Las membranas se lavaron y el anticuerpo conjugado de peroxidasa secundario apropiado (laboratorios Jackson) se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se visualizaron mediante quimioluminiscencia (SuperSignal, Pierce). Las bandas correspondientes al peso molecular correcto se cuantificaron usando Image J (software NIH).

#### Ensayo de actividad caspasa 3 y 9:

La extracción de proteínas se realizó como se describió anteriormente para las transferencias Western pero sin los inhibidores de proteasa completos. El lisado de tejido se usó para la estimación de la actividad de caspasa 3 y 9 usando el estuche de ensayo de actividad de caspasa 3 y 9 (Chemicon International, California, EE.UU.). El contenido de proteínas del lisado se determinó usando el método de estimación de proteínas de Bradford y las actividades de caspasa 3 y 9 se expresaron en forma de unidades/mg de proteína.

*Valoración de hipertrofia de cardiomiocitos:*

El tamaño medio de cardiomiocitos de cerdos de cada grupo crónico experimental se evaluó a partir de secciones congeladas de la zona limítrofe del infarto usando una metodología morfológica establecida (Doyle BJ. et al., Stem Cells Dev. 18 de junio de 2008; Senthil V. et al., Circ Res. 2005; 97: 285-92). Brevemente, las rodajas se incubaron con anticuerpo antilaminina (Sigma L8271) y anti-actina sarcomérica  $\alpha$  (Sigma A2172) y posteriormente se etiquetaron con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) y anticuerpo conjugado de rodamina IgM anti-ratón de cabra (Chemicon AP128R). Cell (Ref: patente de EE.UU de Al-Lamee et al US 2004/0241325 A1).

Ejemplo 1: Caracterización de células progenitoras en circulación y conjunto de citoquinas de medios acondicionadores.

Células progenitoras en circulación (CPC) aisladas de células mononucleares de sangre periférica fueron caracterizadas en cuanto a la expresión de marcadores progenitores (CD133, CD34, cKit, Flk1, VECadherin, eNOS) usando RT-PCR con GAPDH como testigo (figura 1A).

La presencia de citoquinas se midió en medios acondicionados exentos de células obtenidos a partir de CPC después de 48 horas de cultivo y se recogieron por centrifugación y filtración (0,2  $\mu$ m). Los medios acondicionados (CM) se seleccionaron en cuanto a la presencia de citoquinas usando el estuche de conjunto de anticuerpos de citoquinas humanas RayBio (figura 1A, panel inferior de la derecha).

Los CM de las CPC se seleccionaban en cuanto a la presencia de aproximadamente 78 citoquinas diferentes de las que TGF $\beta$ 2 e IGF1 fueron los factores de crecimiento predominantes (medidos en porcentajes de citoquinas totales, véase la figura 1B).

Ejemplo 2: Los efectos antiapoptóticos de medios acondicionados en cardiomiocitos neonatales están mediados por TGF $\beta$  e IGF1.

Los medios acondicionados protegieron significativamente (aproximadamente un 50%) los cardiomiocitos de ratas neonatas, aislados de corazones de ratas Fisher de 1 día de edad, a partir de muerte celular inducida por apoptosis, al ser incubados bajo condiciones hipóxicas. La apoptosis se redujo en aproximadamente 50% según se estimó mediante la actividad de caspasa 9. El bloqueo de TGF $\beta$  e IGF1 usando anticuerpos neutralizantes específicos anuló los efectos protectores de los medios acondicionados (figura 1C). Para la neutralización de TGF $\beta$  e IGF1, los CM fueron incubados con un exceso de 100 veces de anticuerpo anti-TGF $\beta$  y/o anti-IGF1 durante 15 minutos a 37 °C antes de exponerlos a los cardiomiocitos. Los péptidos de TGF $\beta$  e IGF1 purificados emularon los efectos de los CM a un intervalo de dosis estrecha (figura 1D). Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de actividad de caspasa 9 respecto a la del grupo de X-vivo en tres experimentos independientemente realizados.

Ejemplo 3: Los medios acondicionados protegen el miocardio de zona limítrofe de la apoptosis a las 24 horas después del infarto de miocardio.

Las señales de apoptosis del miocardio de zona limítrofe 24 horas después del MI fueron cuantificadas utilizando TUNEL (inmunofluorescencia), expresión de proteínas de caspasa 9 y bcl-2 (transferencia Western) y midiendo la actividad de caspasa 3 y 9 (estuche de ensayo de actividad de caspasa).

La zona limítrofe del infarto se definió como un campo de potencia alta (200x) compuesto por 50% de miocardio normal y 50% de zona infartada. El grupo tratado con medios acondicionados (CM) tenía señales TUNEL significativamente reducidas ( $p < 0,001$ ) en el miocardio de zona limítrofe en comparación con el grupo tratado con X-vivo (figura 2A, comparación del panel superior con el panel inferior).

Los efectos de los CM fueron bloqueados neutralizando TGF $\beta$  e IGF1 en los CM (figura 2B). Las señales TUNEL de 5 secciones/cerdo ( $n = 3-4$ ) con una media de 5 campos de potencia alta/sección se expresan en forma de media  $\pm$  SEM. Una imagen aumentada (600x) representativa de miocardio de zona limítrofe que confirma la localización de la señal TUNEL en los cardiomiocitos. Núcleos de cardiomiocitos fueron contrateñidos con DAPI y el carácter de los cardiomiocitos fue validado mediante tinción dual del miocardio con anti-actina sarcomérica  $\alpha$  (figura 2C).

Se midió la señal apoptótica en el miocardio de zona limítrofe 24 horas después del infarto de miocardio mediante actividad de caspasa 3 (figura 3A), actividad de caspasa 9 (figura 3B) y expresión de proteína de caspasa 9 (figura 3C). La actividad de caspasa 3 y caspasa 9, así como la expresión de proteína de caspasa 9 se redujeron significativamente ( $p < 0,0001$ ) en el grupo tratado con medios acondicionados (CM), mientras que la proteína antiapoptótica BCL2 (figura 3D) fue significativamente sobreexpresada. Los efectos antiapoptóticos de los CM están mediados por TGF $\beta$  ( $p < 0,001$ ) e IGF1 ( $p < 0,01$ ), ya que los anticuerpos neutralizantes para TGF $\beta$  e IGF1 redujeron significativamente los efectos antiapoptóticos de los CM. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de las muestras de miocardio de zona limítrofe de 3-4 cerdos/grupo.

Se analizó la señal apoptótica en el miocardio de zona limítrofe 8 semanas después del infarto de miocardio. Los marcadores apoptóticos, núcleos positivos TUNEL (figura 4A), actividad de caspasa 9 (figura 4B), actividad de caspasa 3 (figura 4C) y expresión de proteína BCL2 (figura 4D) no se efectuaron en el valor de tiempo crónico (8 semanas) después de la terapia de medios acondicionados. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de las muestras de miocardio de zona limítrofe de 3-4 cerdos/grupo.

Ejemplo 4: Los medios acondicionados reducen el nivel de zona de infarto ventricular izquierdo a las 8 semanas pero no a las 24 horas después del infarto de miocardio.

El efecto de medios acondicionados sobre la zona de infarto ventricular izquierda se analizó 24 horas (estudio agudo) o las 8 semanas (estudio crónico) después de la generación del infarto, los animales experimentaron una angiografía coronaria repetida para confirmar la permeabilidad TIMI-3 de la arteria relacionada con el infarto, a través de la arteria carótida interna izquierda, se sacrificaron y los corazones fueron extirpados, pesados y seccionados en rodajas transversales de 5 mm desde la cúspide hasta la base (6-8 rodajas/corazón). Una rodaja ventricular media representativa (rodaja 3ª o 4ª) fue teñida con TTC al 2%.

La terapia de medios acondicionados (CM) parece que no tiene influencia sobre la zona de infarto ventricular izquierda a las 24 horas después del MI (figura 5A). Sin embargo, la terapia de CM dio lugar a una reducción significativa ( $p < 0,01$ ) en la zona de infarto ventricular izquierda a las 8 semanas del MI (figura 5B). Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de 6-7 secciones transversales ventriculares/corazón de cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

Ejemplo 5: La terapia de medios acondicionados mejora la función ventricular izquierda.

La función de la cúspide ventricular izquierda fue analizada 24 horas y 8 semanas después del MI. La terapia de medios acondicionados (CM) mejoró significativamente la función ventricular izquierda, es decir,  $\pm$  dp/dt (figura 6A),  $\pm$  dv/dt (figura 6B), volumen sistólico (figura 6C) y fracción de eyección (figura 6D) 24 horas después del MI. Los efectos de los CM parece que están mediados por TGF e IGF1. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM 20-25 ciclos cardiacos/cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

La terapia de medios acondicionados (CM) mejoró significativamente la función ventricular izquierda, es decir,  $\pm$  dp/dt (figura 7A),  $\pm$  dv/dt (figura 7B), volumen sistólico (figura 7C) y fracción de eyección (figura 7D) a las 8 semanas después del MI. Los efectos de los CM a las 8 semanas parece que son menos dependientes de TGF e IGF1. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM 20-25 ciclos cardiacos/cerdo con 3-4 cerdos/grupo.

Ejemplo 6: Efectos de los medios acondicionados sobre el contenido de colágeno de la zona limítrofe.

Se analizó el efecto de medios acondicionados (CM) sobre el contenido de colágeno de la zona limítrofe a las 24 horas y 8 semanas después del MI.

La terapia de CM redujo significativamente el contenido de colágeno en el miocardio de zona limítrofe en el plazo de tiempo agudo (24 h, figura 8A) pero no en el crónico (8 semanas, figura 8B). Las secciones de zona limítrofe se tiñeron para colágeno usando rojo picrosirus y se cuantificaron usando el software NIH image J. La tinción de colágeno con rojo picrosirus en 5 sección/cerdo ( $n = 3-4$ ) con una media de 5 campos de potencia alta/sección se expresa en forma de media  $\pm$  SEM.

Ejemplo 7: Los medios acondicionados aumentan la hipertrofia de cardiomiocitos de la zona limítrofe a las 8 semanas del MI.

Se analizaron los efectos de medios acondicionados (CM) sobre la hipertrofia de cardiomiocitos de zona limítrofe. Se incubaron cardiomiocitos con anticuerpo anti-laminina y anti-actina sarcomérica  $\alpha$  y posteriormente se etiquetaron. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Al menos 3 secciones distintas de la zona limítrofe del infarto en cada animal, y un mínimo de 1.000 de cardiomiocitos, fueron estudiados en cada grupo de tratamiento.

Los CM aumentaron significativamente ( $p < 0,001$ ) la hipertrofia de cardiomiocitos de la zona limítrofe a las 8 semanas después del infarto de miocardio (según se midió mediante el área de superficie celular de la zona limítrofe) y este efecto estuvo mediado por TGF e IGF1, ya que los anticuerpos neutralizantes para TGF e IGF1 disminuyeron los efectos hipertróficos mediados por los CM (figura 9). Se analizó una media de 300-400 cardiomiocitos de zona limítrofe por cerdo (con 3-4 cerdos/grupo) y los datos se expresaron en forma de media  $\pm$  SEM de 1.000-1.600 cardiomiocitos/grupo.

La terapia de medios acondicionados no afectó al número total de núcleos en el miocardio de la zona limítrofe a las 24 h después del MI (figura 10). Se hizo un recuento del número total de núcleos positivos de DAPI/campo de potencia alta y se expresó en forma de media  $\pm$  SEM de 10 secciones/animal.

Ejemplo 8: El efecto antiapoptótico de terapia de medios acondicionados (CM) en miocardio de zona limítrofe (BZ) *in vivo* (tinción TUNEL) fue anulado bloqueando IGF1 en los CM usando un anticuerpo neutralizante selectivo. Estos datos sugieren que el IGF1 es el factor citoprotector clave en los CM. Los datos del histograma se expresan en forma de media  $\pm$  SEM (n=4). \*P< 0,01 frente al grupo tratado con CM. Figura 11.

Ejemplo 9: El efecto de los medios acondicionados sobre la zona de infarto ventricular izquierda a las 8 semanas (A) después del infarto de miocardio (MI) se redujo significativamente mediante la terapia de CM, que aumentó también la relación de adelgazamiento (B) a las 8 semanas después del MI. El anticuerpo neutralizante para IGF1 en los CM invirtió estos efectos beneficiosos. Los datos se expresan en forma de media  $\pm$  SEM de 7 secciones transversales ventriculares/corazón de cerdo (cada una de 5 mm de grosor) con 4 cerdos/grupo. \*P< 0,01 frente al grupo tratado con CM. Figura 12.

Ejemplo 10: Efecto antiapoptótico de terapia de IGF1 (50 y 500 pg/ml) sobre miocardio de zona limítrofe (BZ) *in vivo*. Se observó una reducción significativa en la tinción TUNEL en el miocardio BZ del grupo tratado con IGF1. Todos los datos del histograma se expresan en forma de media  $\pm$  SEM (n= 4-5). \*P< 0,05 frente al grupo testigo. Figura 13.

#### Listado de secuencias

<110> UNIVERSITY COLLEGE CORK, NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, CORK

<120> IGF1 PARA REPARACIÓN DEL MIOCARDIO

<130> 10412wo/BP

<150> USSN: 61118829

<151> 2008-12-01

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CD133 - cebador directo

<400> 1

tcctgggggtt gctgtttatt 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CD133 cebador inverso

<400> 2

catatcacca agagggaac g 21

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cKIT cebador directo

<400> 3

gaggagataa atggaac 18

<210> 4

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cKIT cebador inverso humano  
 <400> 4  
 gaatcacgtt ttctctc 18  
 10 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> cKIT cebador inverso de cerdo  
 <400> 5  
 20 gaatcacgtt tccgtctc 18  
 <210> 6  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CD34 cebador directo humano  
 30 <400> 6  
 cctgatgaat cgccgcagct ggagc 25  
 <210> 7  
 <211> 25  
 35 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> CD34 cebador inverso humano  
 40 <400> 7  
 ccagaaacgg ccattcagca agaca 25  
 <210> 8  
 45 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> CD34 cebador directo de cerdo  
 <400> 8  
 gctgatgaac cgtcgcagtt ggagc 25  
 55 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> CD34 cebador inverso de cerdo  
 <400> 9  
 65 ccagaaacgg ccattcagcg aggca 25  
 <210> 10

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Flk-1 cebador directo  
 <400> 10  
 ttatcggaga agaacgtggt 20  
 10 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Flk-1 cebador inverso  
 <400> 11  
 20 taatgctcag caggatggca 20  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> eNOS cebador directo  
 30 <400> 12  
 ggtatggatg agtatgacgt g 21  
 <210> 13  
 <211> 15  
 35 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> eNOS cebador inverso  
 40 <400> 13  
 tgttccggcc gaggg 15  
 <210> 14  
 45 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> VE-Cadherina cebador directo  
 <400> 14  
 aactcccct tctcaccc 19  
 55 <210> 15  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> VE-Cadherina cebador inverso  
 <400> 15  
 aaggctgctg gaaaatg 17  
 65 <210> 16

## ES 2 659 363 T3

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> G3PDH cebador directo

<400> 16  
ccatgtcgtc atgggtgtga acca 24

10 <210> 17  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

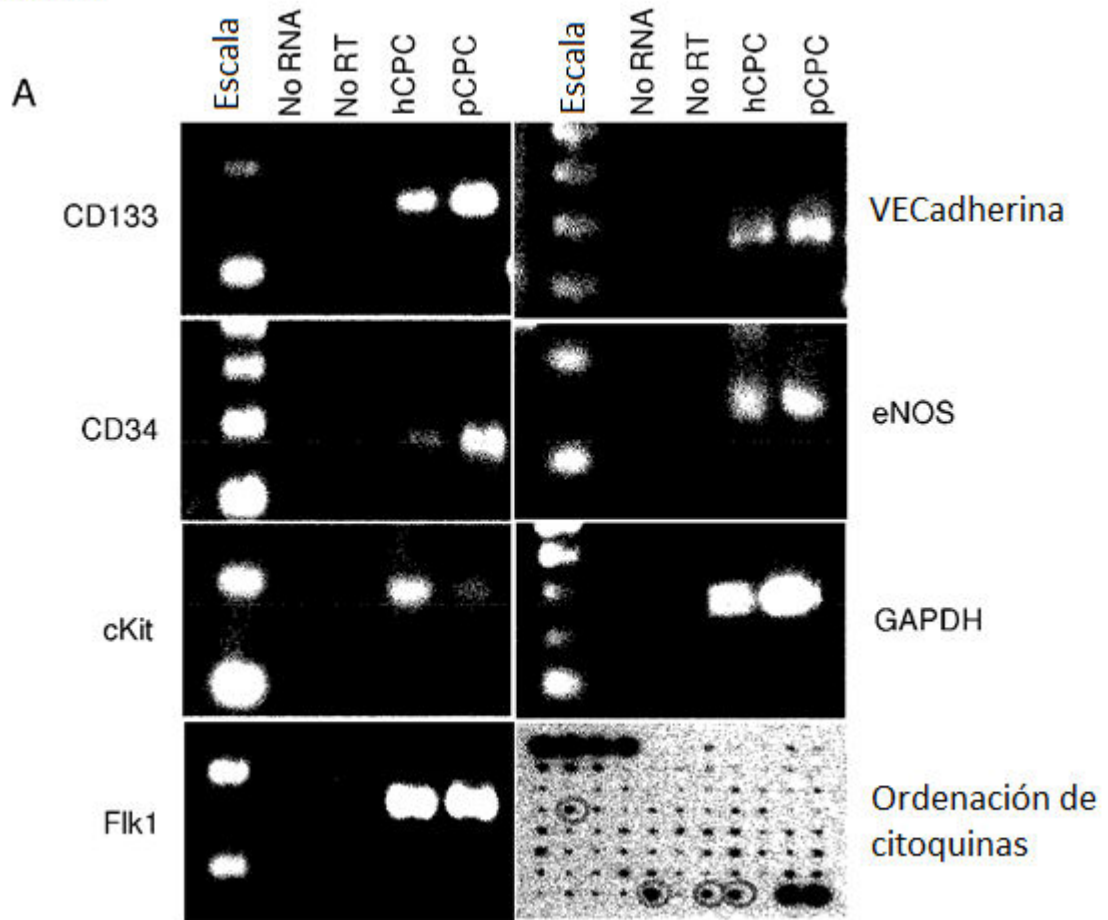
15 <220>  
<223> G3PDH cebador inverso

<400> 17  
20 gccagtagag gcagggatga tggtc 25

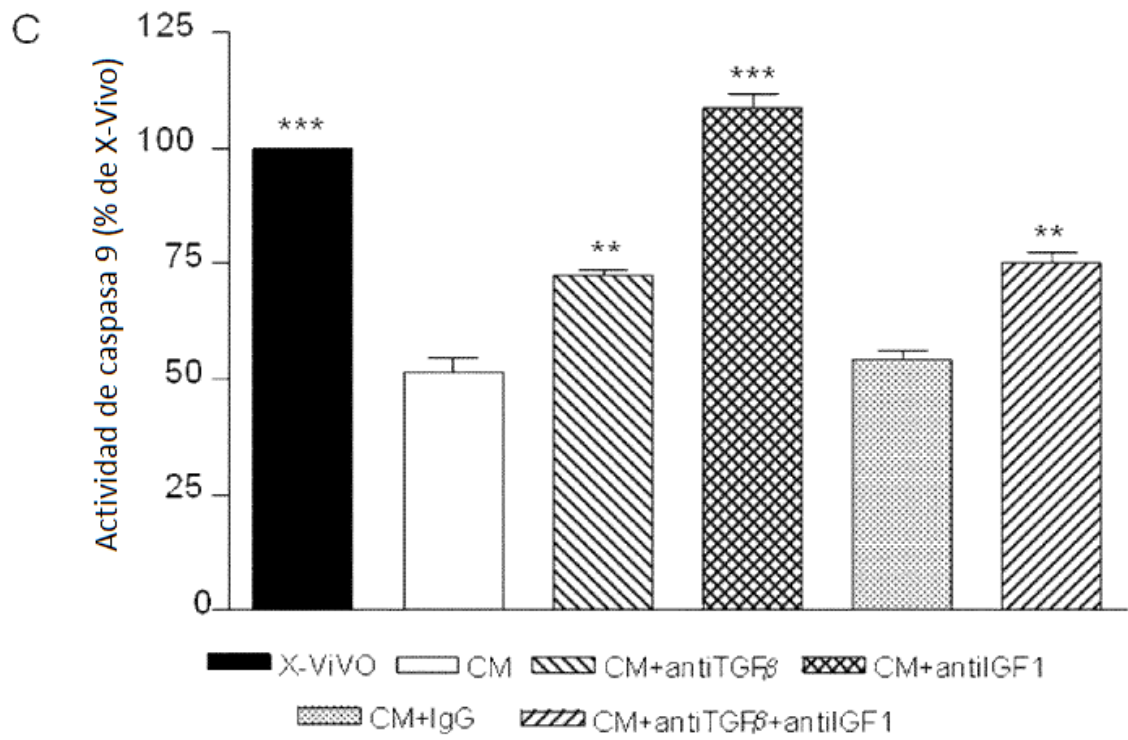
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. IGF-1 para uso en el tratamiento de un mamífero que ha sufrido un infarto de miocardio para estimular la reparación o supervivencia del músculo cardíaco, o para estimular la remodelación ventricular izquierda, en que el IGF-1 es administrado al individuo mediante infusión intracoronaria aguas arriba del infarto de miocardio en una cantidad suficiente para reducir los efectos del infarto de miocardio sobre el individuo.
- 10 2. IGF-1 para uso según la reivindicación 1, en el que el IGF-1 es administrado en una pluralidad de infusiones intracoronarias normalmente alternadas con periodos durante los cuales el IGF-1 no es infundido.
3. IGF-1 para uso según la reivindicación 1 o 2, en que la infusión intracoronaria es suministrada a través de un balón de angioplastia.
- 15 4. IGF-1 para uso según la reivindicación 3, en que el balón es inflado durante los periodos de infusión y normalmente desinflado durante los periodos de no infusión.
5. IGF-1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que el IGF-1 es suministrado a una concentración de 1 a 100 pg/ml.

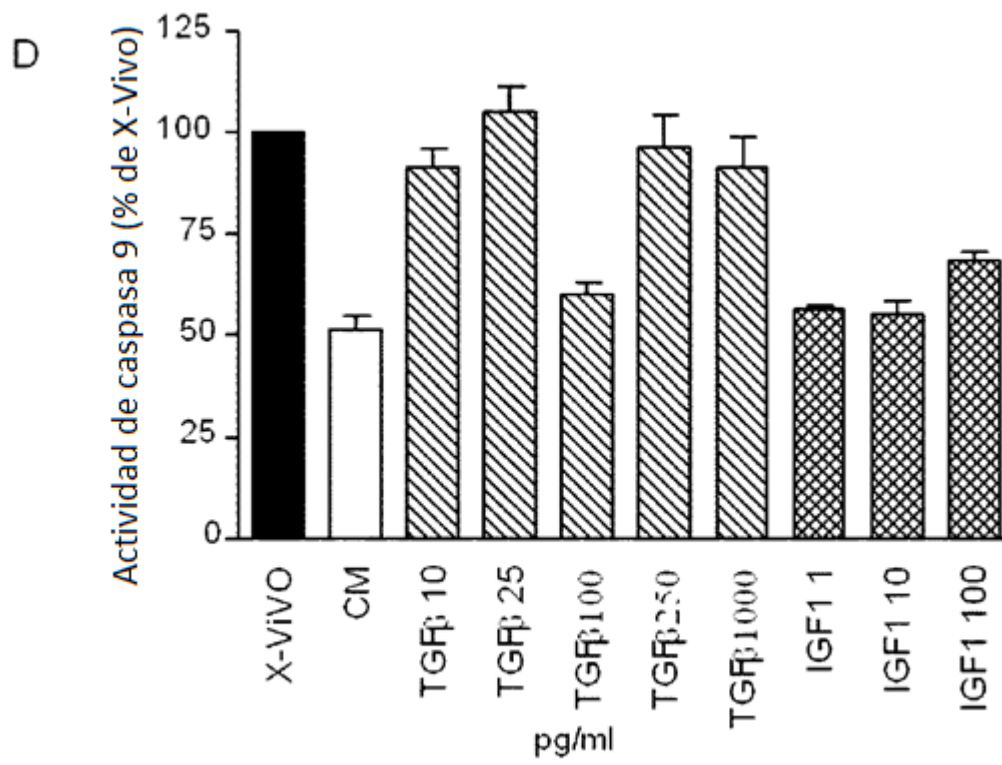
**Figura 1**



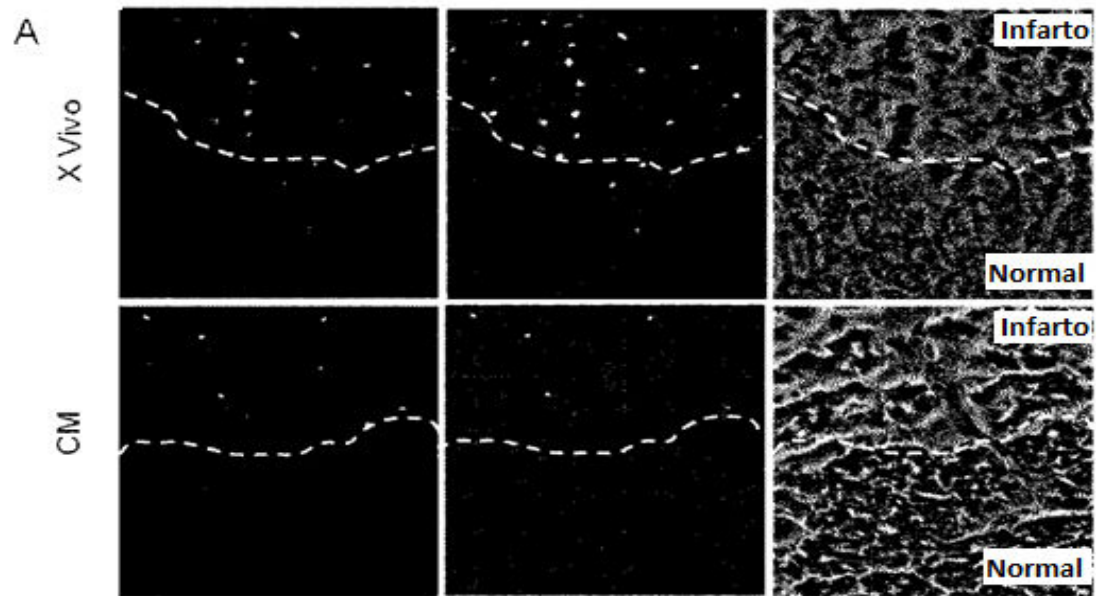
**Figura 1**



### Figura 1



**Figura 2**



**Figura 2**

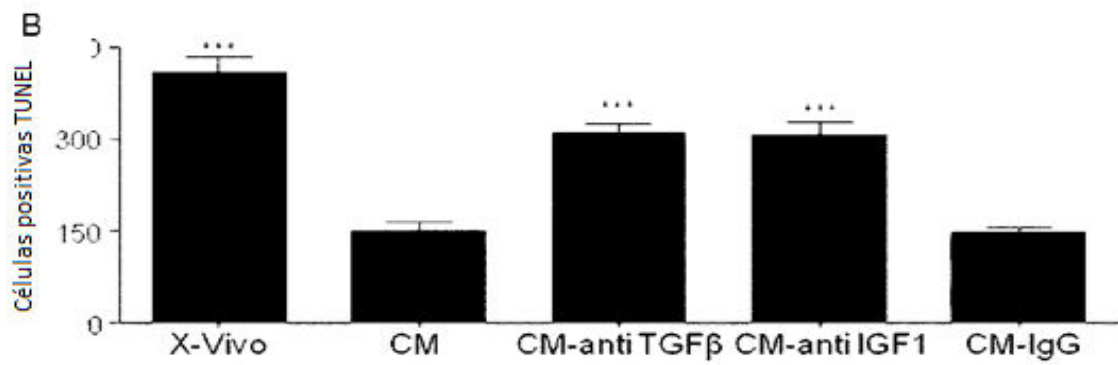


Figura 2  
C

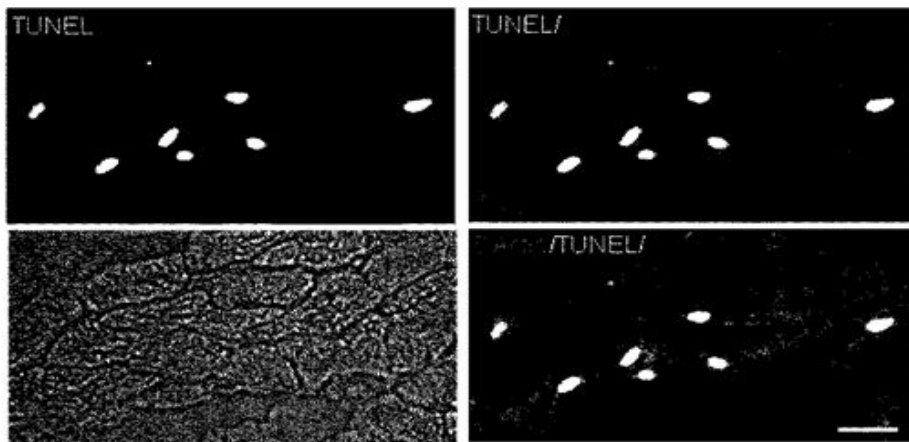
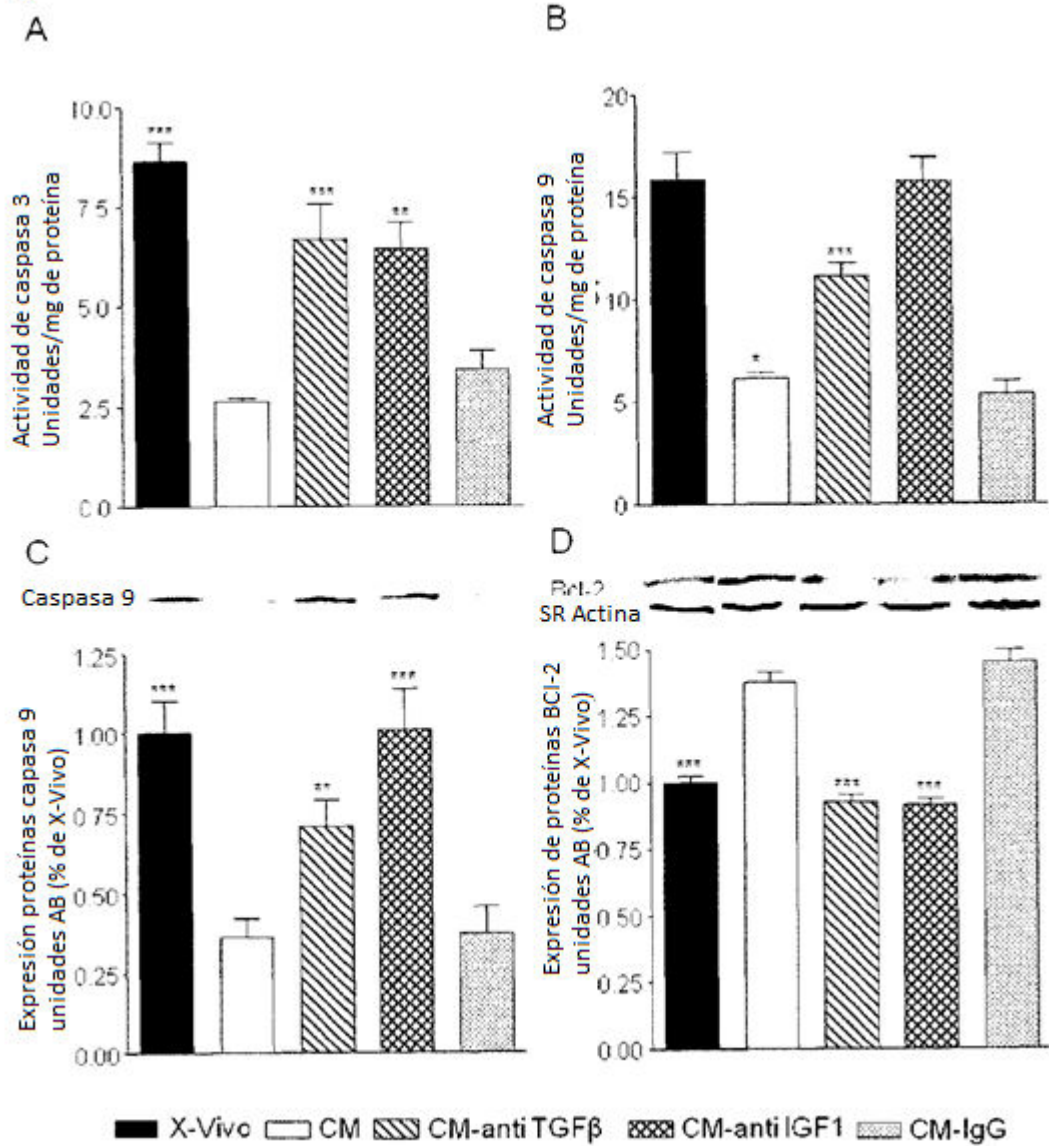
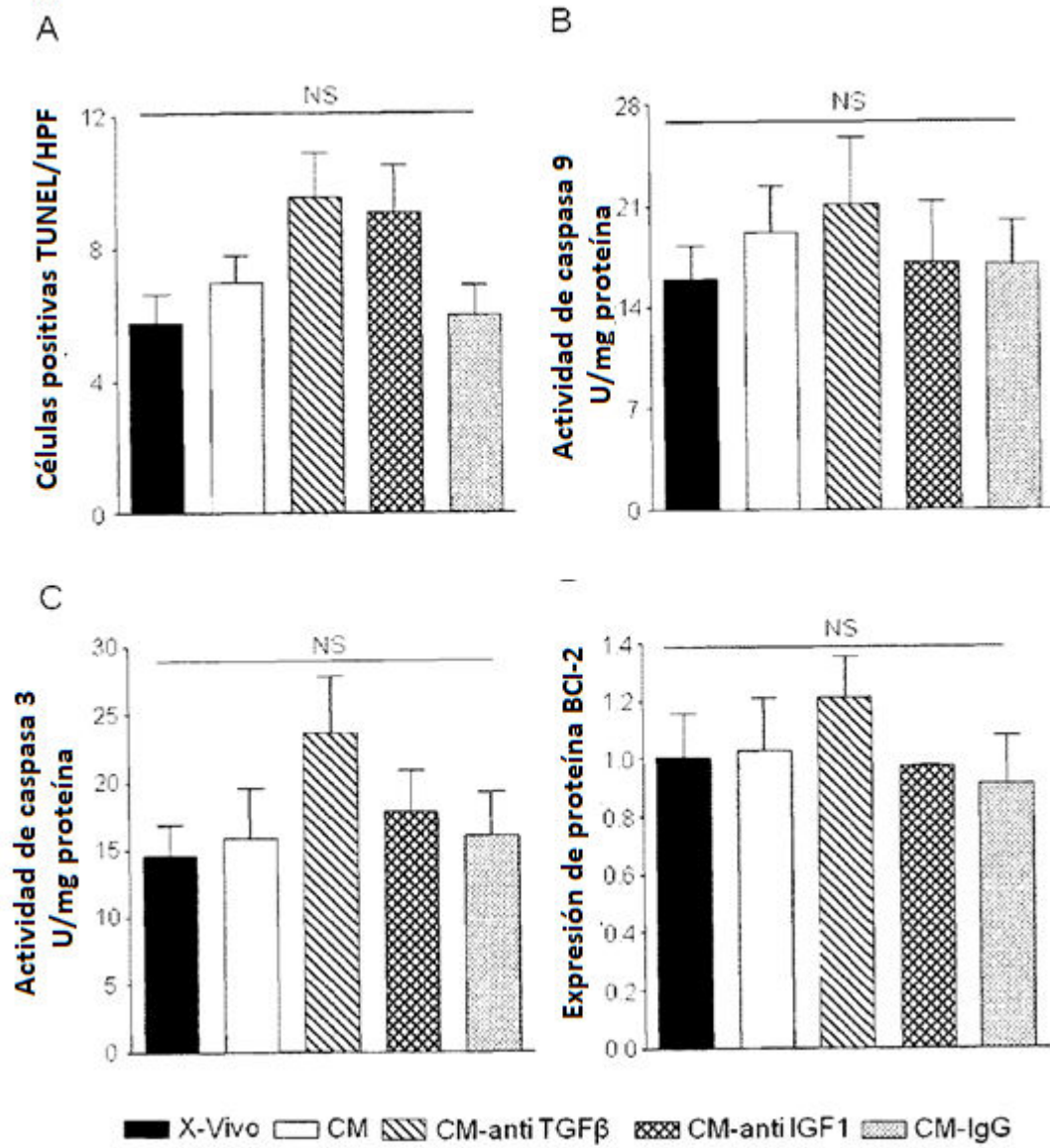


Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**

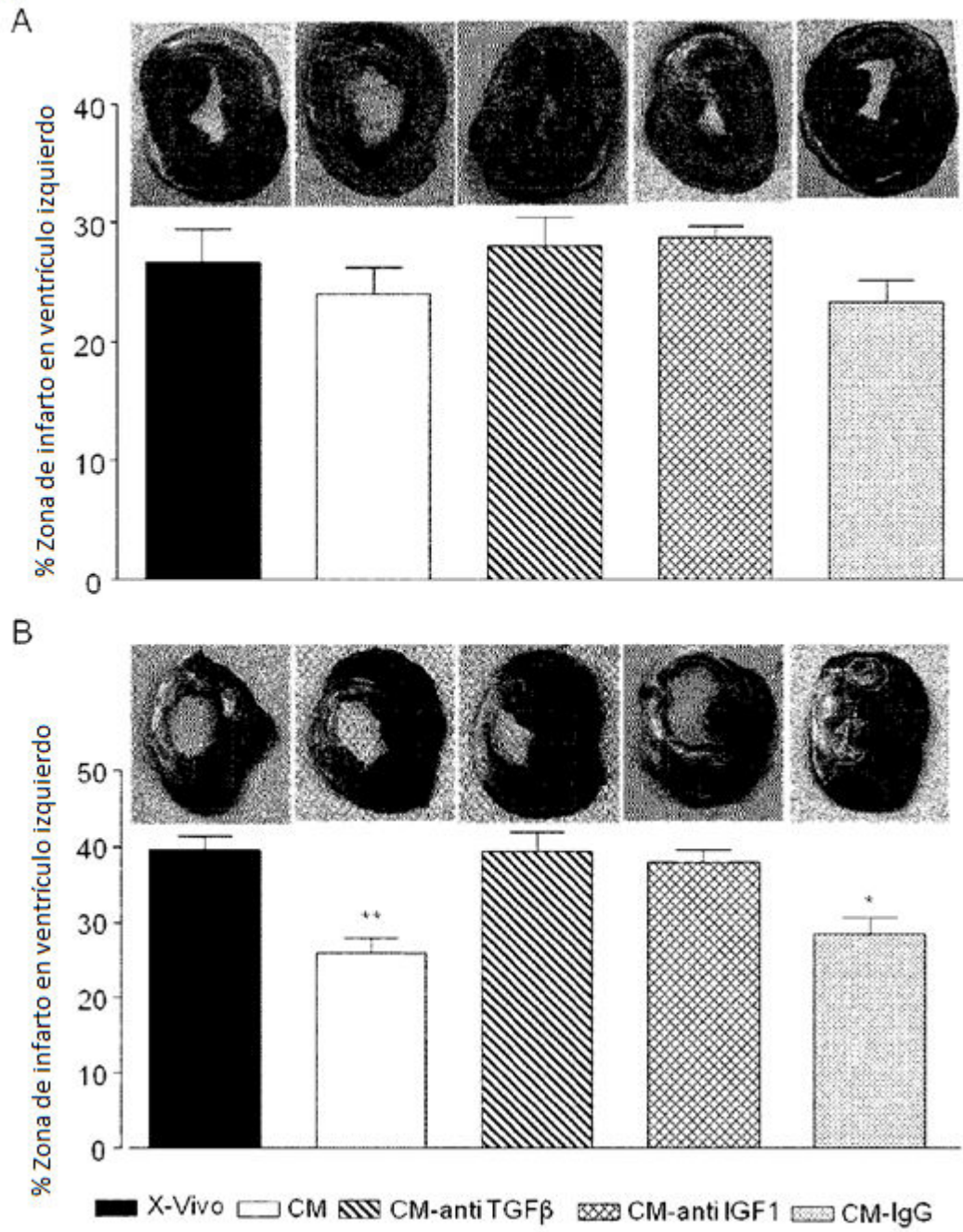
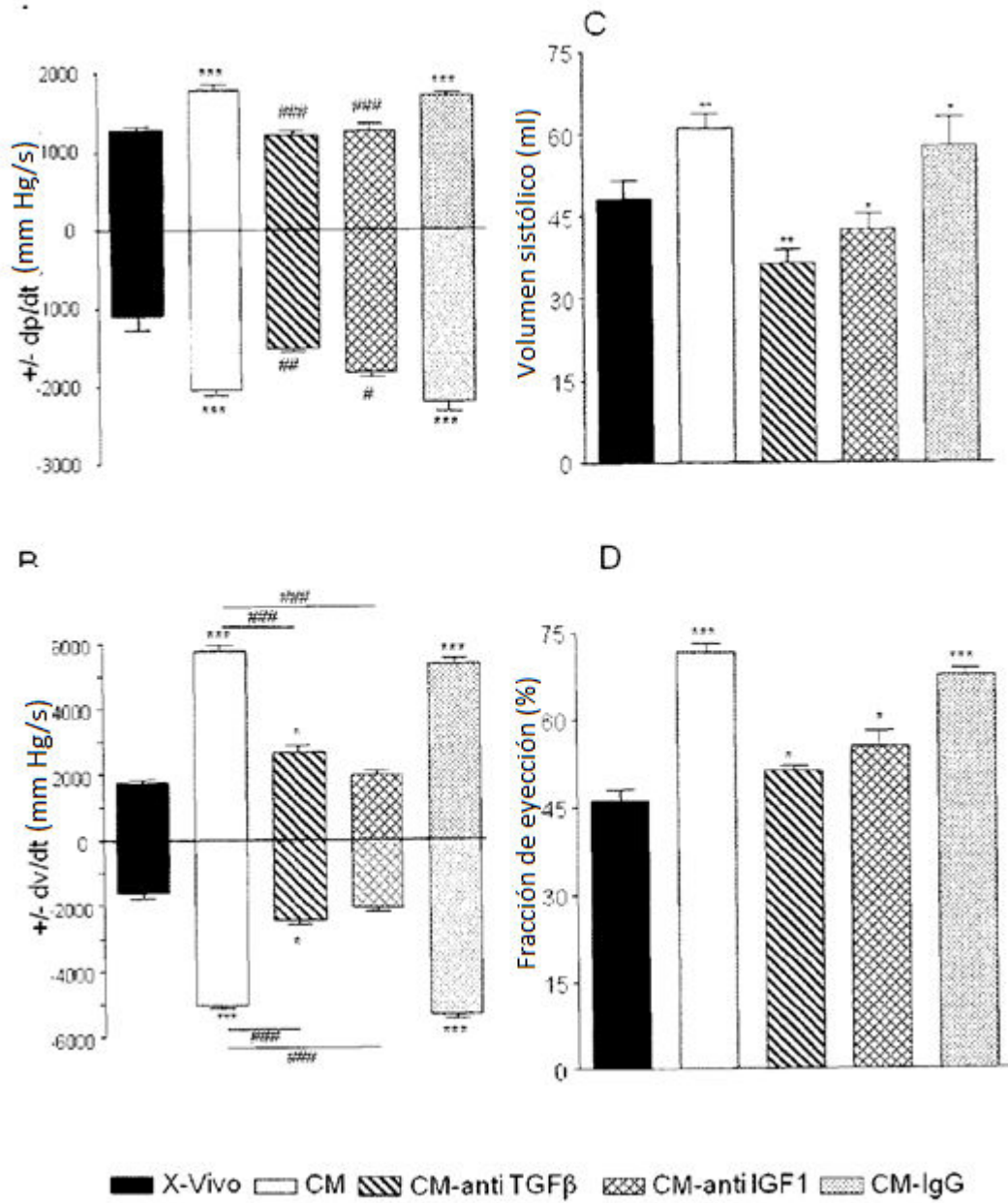
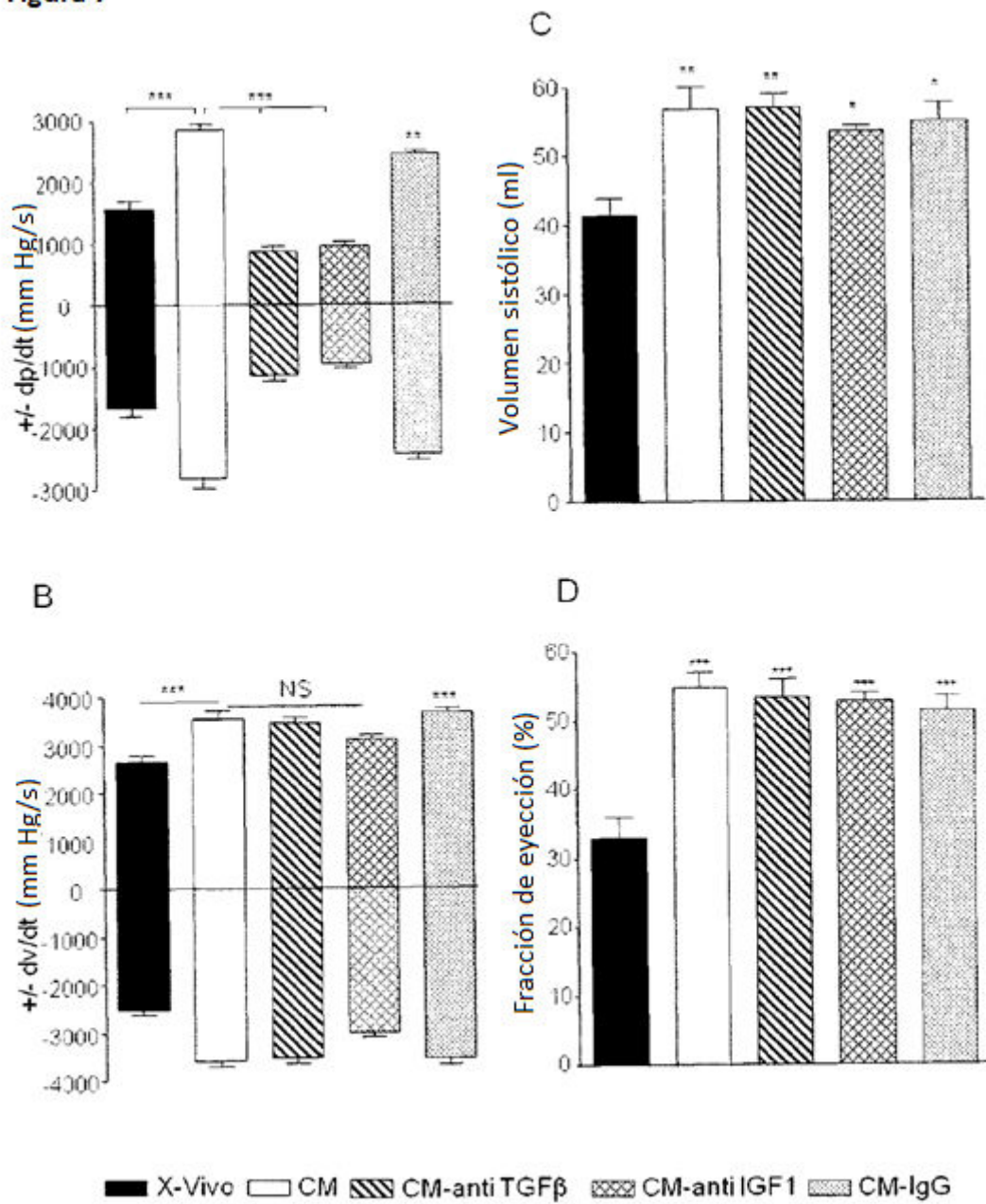


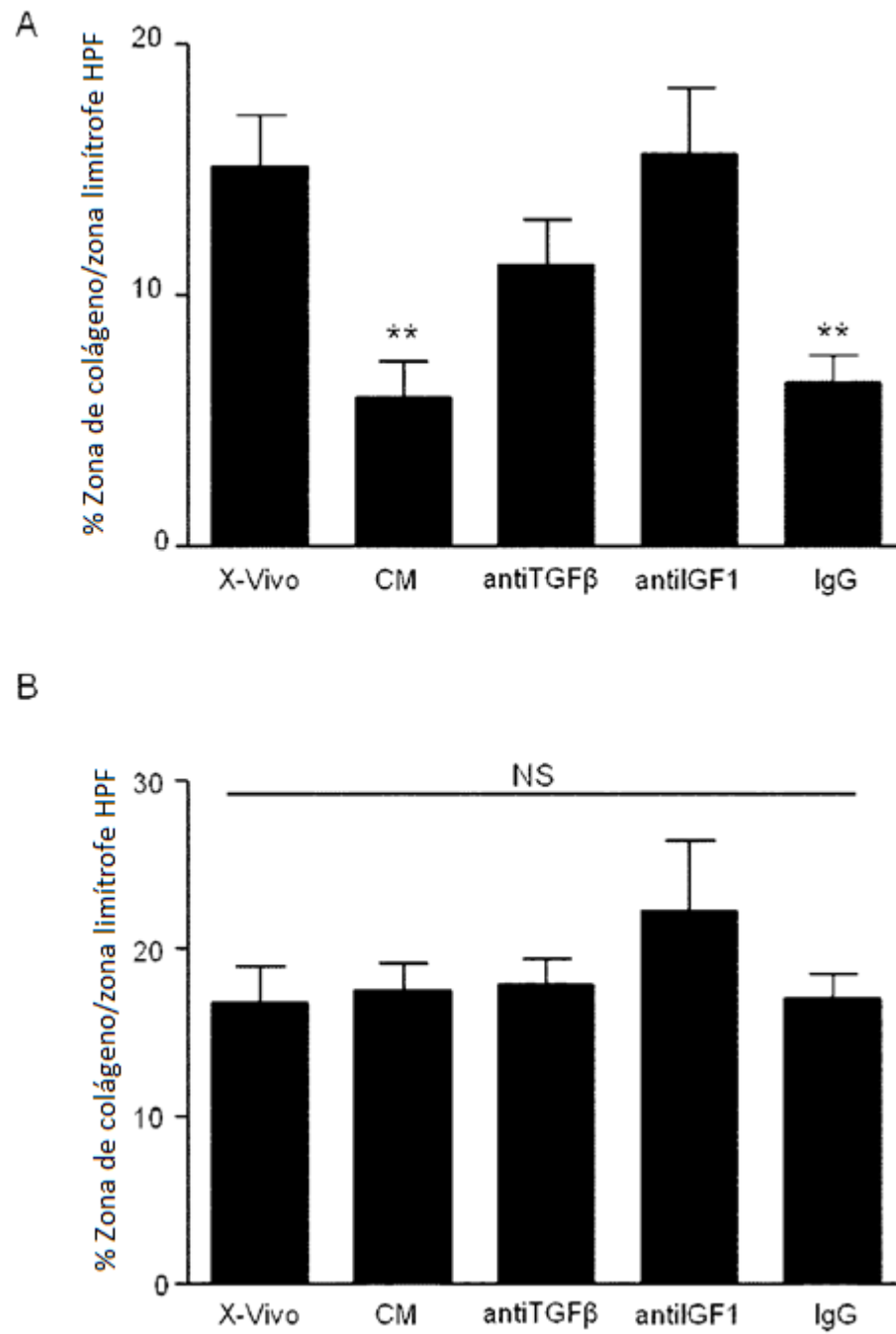
Figure 6



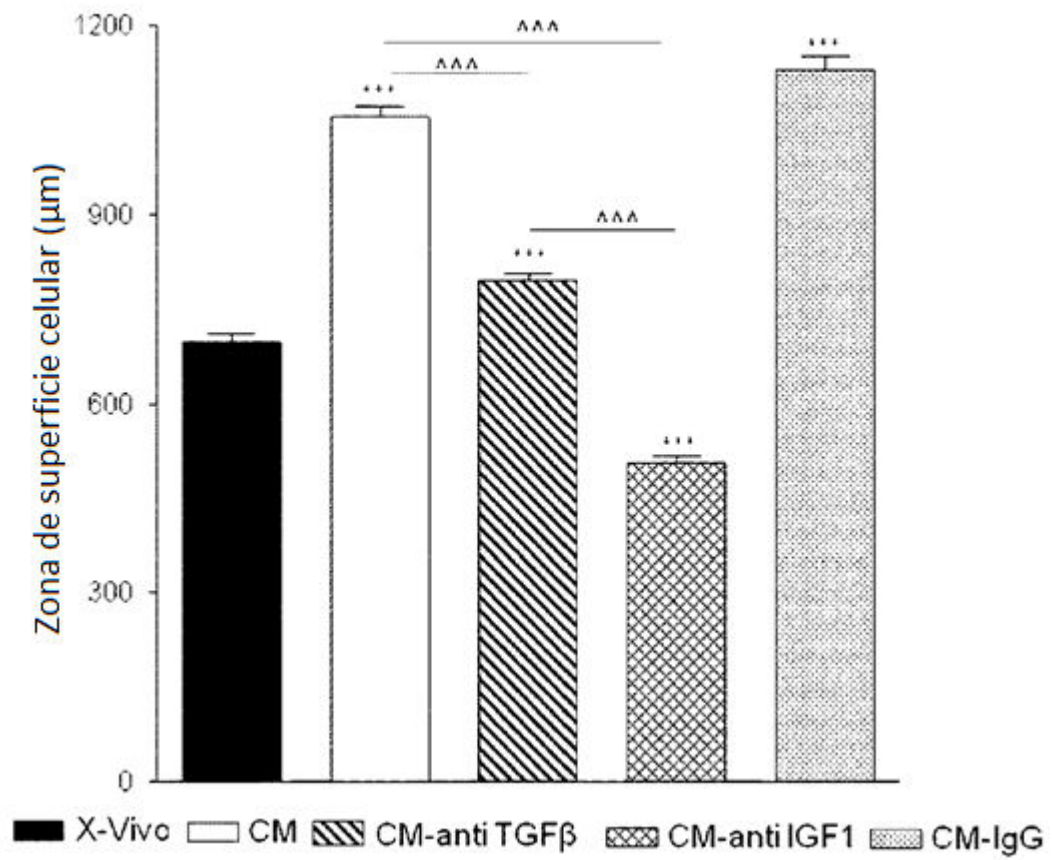
**Figura 7**



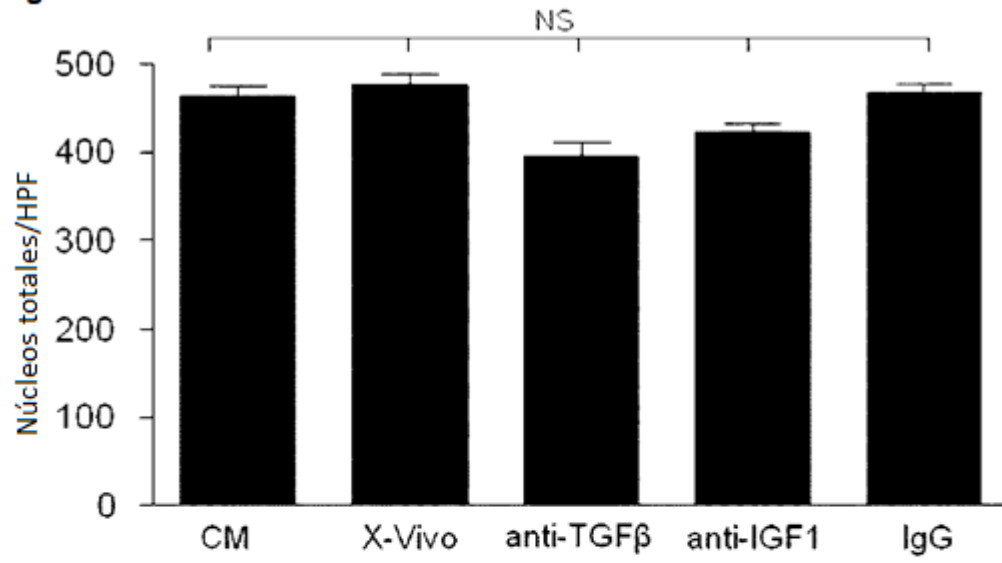
**Figura 8**



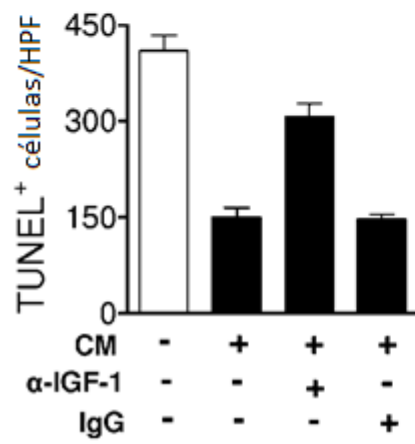
**Figura 9**



**Figura 10**

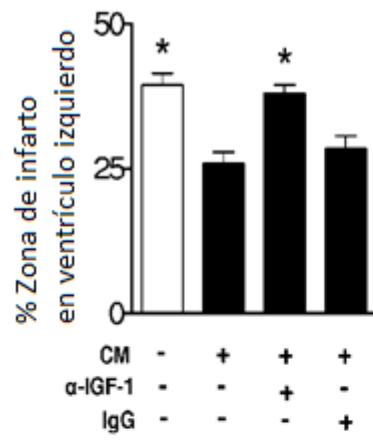


**Figura 11**

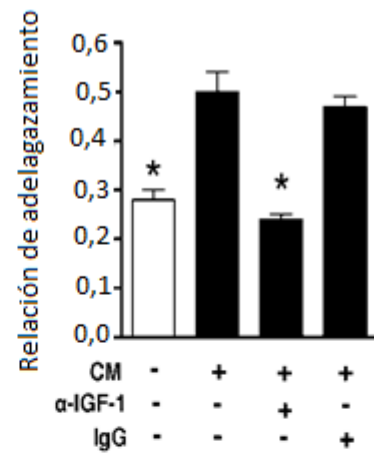


**Figura 12**

**A**



**B**



**Figura 13**

