

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 814**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2014 PCT/EP2014/050533**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14108549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2014 E 14700845 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2943212**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para la cardioprotección**

30 Prioridad:

**14.01.2013 EP 13305029**

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

**14.05.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.0%)  
101 Rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR;  
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (20.0%);  
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (20.0%);  
UNIVERSITÉ D'ANGERS (20.0%) y  
UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE (20.0%)**

72 Inventor/es:

**LACAMPAGNE, ALAIN;  
THIREAU, JÉRÔME;  
CAZORLA, OLIVIER;  
LE GUENNEC, JEAN-YVES;  
FAUCONNIER, JÉRÉMY;  
MARTINEZ, MARIA DEL CARMEN;  
ANDRIANTSITOHAINA, RAMAROSON;  
GALEH-MARZBAN, BIJAN y  
SOLETI, RAFFAELLA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 667 814 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

Composiciones farmacéuticas para la cardioprotección

### Campo de la invención

La presente invención se refiere la cardioprotección de sujetos que experimentaron un infarto de miocardio.

### 5 Antecedentes de la invención

El infarto de miocardio, comúnmente conocido como ataque cardiaco, se produce cuando se interrumpe el suministro de sangre a una parte del corazón lo que causa que algunas células cardíacas mueran. Esto es más comúnmente debido a la oclusión de una arteria coronaria después de la ruptura de una placa aterosclerótica vulnerable. La isquemia y la escasez de oxígeno resultante, si no se trata durante un periodo suficiente de tiempo, pueden causar daño y o muerte del tejido muscular cardíaco. Por consiguiente, en situaciones clínicas de infarto de miocardio, el objetivo inmediato es reestablecer el flujo sanguíneo al paciente lo más rápido posible. Si se reestablece el flujo sanguíneo dentro de un periodo de tiempo adecuado, se puede evitar el daño tisular. Sin embargo, un retraso significativo en la restauración del flujo sanguíneo da lugar a una segunda afección conocida como daño por isquemia-reperusión que puede desarrollarse gradualmente después de un evento isquémico y puede causar daño irreversible en los tejidos. Los ejemplos clínicos incluyen disfunción contráctil cardíaca, arritmias y daño irreversible de miocitos (muerte de células cardíacas) después de un infarto de miocardio. Por consiguiente, se han investigado varios métodos para la cardioprotección después del infarto de miocardio. Por ejemplo, las terapias actuales destinadas a mejorar la función contráctil implican a menudo el uso de agentes inotrópicos (p. ej., calcio, dopamina, epinefrina, efedrina, fenilefrina, dobutamina). Sin embargo, se ha informado que los fármacos inotrópicos están asociados con aumentos en la concentración de calcio intracelular y en la frecuencia cardíaca, que pueden ser potencialmente dañinos, especialmente en corazones con un equilibrio energético deteriorado. Por lo tanto, el limitado éxito de la cardioprotección está restringido a un número relativamente pequeño de dianas terapéuticas. La presente invención satisface esta necesidad proporcionando una nueva diana terapéutica para la cardioprotección después del infarto de miocardio.

### 25 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog (Shh) para usar en la cardioprotección de un sujeto que experimentó un infarto de miocardio. La invención es como se define en las reivindicaciones.

### Descripción detallada de la invención

Los inventores demostraron, en situación fisiológica, en cardiomiocitos adultos que sonic hedgehog que usa ya sea ligando o micropartículas liberadas, puede inducir una producción de óxido nítrico (NO) compartimentalizada, con la activación posterior de un canal de potasio rectificador interno sensible a glibenclamida, es decir, corriente de potasio dependiente de ATP (IKATP) que da como resultado una duración del potencial de acción, amplitud de  $Ca^{2+}$  transitorio y contracción celular reducidos. Estos efectos están mediados por la activación del complejo "Patched-Smoothened", PI3-quinasa/Akt, NO-sintasa y acumulación de cGMP. Estos efectos son imitados por sonic hedgehog transportado por micropartículas liberadas de membrana derivada de linfocitos, lo que sugiere que las micropartículas podrían actuar *in vivo* como vectores de un mensaje biológico. Los resultados obtenidos *in vivo* por los inventores muestran una reducción en el intervalo QT del ECG directamente ligado con IKATP ventricular inducido por sonic hedgehog. En un modelo animal de isquemia/reperusión, la administración de sonic hedgehog antes de la reperusión evita la ampliación del intervalo QT. La prolongación del intervalo QT se correlaciona con arritmias ventriculares y con muerte súbita cardíaca. Además, la activación de la ruta de señalización de sonic hedgehog en la reperusión previene la lesión de la reperusión a las 24 h después de la reperusión mediante un mecanismo directo en el miocardio. En conclusión, además de su efecto sobre la angiogénesis y la disfunción endotelial, los inventores demuestran aquí un nuevo efecto cardioprotector de Shh que actúa directamente sobre los cardiomiocitos. Este estudio enfatiza el efecto pleiotrópico de la ruta Shh como una diana terapéutica potencial para prevenir lesiones por reperusión después del infarto agudo de miocardio.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar en la cardioprotección de un sujeto que experimentó un infarto de miocardio.

Como se usa en esta memoria, el término "cardioprotección" significa proteger contra o reducir el daño al miocardio después de un infarto de miocardio, después, durante o antes de la reperusión isquémica. En particular, la cardioprotección incluye reducir el tamaño del infarto, reducir las lesiones de reperusión, prevenir el agrandamiento de QT (es decir, reducir el intervalo QT), reducir las arritmias (p. ej., arritmias ventriculares) y mejorar la repolarización ventricular en el contexto de una reperusión isquémica. Así, la presente invención es particularmente adecuada para reducir el riesgo de muerte súbita cardíaca después de un infarto agudo de miocardio.

55

Como se usa en esta memoria, el término “ruta de señalización sonic hedgehog” se refiere a la cadena de eventos mediada por sonic hedgehog en una célula, en particular en los cardiomiocitos. La ruta de señalización sonic hedgehog se puede activar, activando un componente corriente abajo, incluso en ausencia de proteína sonic hedgehog.

5 Por consiguiente, el término “ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog” se refiere a cualquier compuesto, natural o no, capaz de imitar el efecto de la proteína sonic hedgehog en el cardiomiocito adulto. Preferiblemente, el ligando es un compuesto capaz de activar el compuesto Patched-Smooth en el cardiomiocito adulto o capaz de activar IKATP en el cardiomiocito adulto. Típicamente, el ligando es un péptido, un polipéptido, un anticuerpo, un aptámero o una molécula orgánica pequeña.

10 De acuerdo con la presente invención, el ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog es un polipéptido sonic hedgehog.

El término “sonic hedgehog” tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína sonic hedgehog. La proteína se prepara como un precursor que se escinde de forma autocatalítica; la porción N-terminal es soluble y contiene la actividad de señalización mientras que la porción C-terminal está implicada en el procesamiento del precursor. Más importante aún, el producto C-terminal une covalentemente un resto de colesterol al producto N-terminal, lo que restringe el producto N-terminal a la superficie celular. El término “sonic hedgehog” incluye sonic hedgehog de origen natural y las variantes conservativas de función y formas modificadas de las mismas. La sonic hedgehog puede ser de cualquier fuente, pero típicamente es una sonic hedgehog de mamífero (p. ej., primate humano y no humano), y más particularmente una sonic hedgehog humana. La secuencia de la proteína sonic hedgehog y de los ácidos nucleicos para codificar tales proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, Nos. de Acc. de Genbank AAA62179 (SEQ ID NO: 1) proporciona la secuencia de aminoácidos completa de sonic hedgehog de Homo sapiens. Sin embargo, debe entenderse que, como los expertos en la técnica conocen la secuencia de estas moléculas, cualquier proteína o variante de secuencia génica de sonic hedgehog puede usarse siempre que tenga las propiedades de una sonic hedgehog.

25 Las “variantes de función conservativa” son aquellas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación global y la función del polipéptido, que incluye, pero no se limita a, la sustitución de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrofóbico, aromático, y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de proteína o de similitud de secuencia entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70% a 99%, como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento como mediante el Método Cluster, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una “variante de función conservativa” también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 60%, determinada mediante algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75%, lo más preferiblemente al menos 85%, e incluso más preferiblemente al menos 90%, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o parental con la que se compara.

De acuerdo con la invención el término “polipéptido sonic hedgehog” se refiere a cualquier polipéptido que comprende el dominio de señalización de la proteína sonic hedgehog. Por consiguiente, el término abarca la propia sonic hedgehog o fragmentos de la misma que comprenden el dominio de señalización de la proteína sonic hedgehog. Preferiblemente el polipéptido sonic hedgehog es un polipéptido soluble y no comprende el dominio C-amino terminal. El dominio de señalización de la proteína sonic hedgehog es el dominio amino terminal. Como se usa en esta memoria, “dominio amino terminal” es una secuencia de aminoácidos derivada de los aminoácidos amino terminales de la proteína sonic hedgehog y que tiene en su extremo carboxilo terminal, un sitio de escisión glicina-cisteína-fenilalanina (GlyCys-Phe) reconocido específicamente por una actividad proteolítica del fragmento carboxilo terminal del polipéptido de sonic hedgehog nativa. En algunas realizaciones, el polipéptido sonic hedgehog comprende la secuencia que va desde el residuo de aminoácido en la posición 1 al residuo de aminoácido en la posición 197 de la SEQ ID NO: 1 o una variante conservativa de la función de dicha secuencia (p. ej., una secuencia que tiene al menos 90% (es decir 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) de identidad con la secuencia de la secuencia que va desde el residuo de aminoácido en la posición 1 al residuo de aminoácido en la posición 197 de la SEQ ID NO: 1).

En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos sonic hedgehog usados en métodos terapéuticos de la presente invención se pueden modificar con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Se puede usar tal modificación de compuestos terapéuticos para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación, o modificar la bio distribución. Por ejemplo, la toxicidad de los compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante combinación con una variedad de vehículos transportadores de fármacos que modifican la bio distribución.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se han demostrado varios polímeros solubles en agua que modifican la bio distribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de aclaramiento del cuerpo. Para lograr ya sea un efecto de orientación o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles

en agua que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte del esqueleto, o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

5 El polietilenglicol (PEG) ha sido ampliamente usado como un transportador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que el acoplamiento a varios fármacos, proteínas, y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y a través de otros métodos químicos; sin embargo, el PEG en sí mismo está limitado a un máximo de dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, se estudiaron copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que retienen las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de acoplamiento por molécula (lo que proporciona una mayor carga de fármaco), y que podrían ser diseñados sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

10 Los expertos en la técnica son conscientes de las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, se han usado polímeros de liberación de fármacos que consisten en polímeros alternativos de PEG y monómeros tri-funcionales como lisina por VectraMed (Plainsboro, N. J.). Las cadenas de PEG (típicamente de 2000 daltons o menos) están unidas a grupos amino  $\alpha$ - y  $\epsilon$ - de lisina a través de enlaces uretano estables. Tales copolímeros retienen las propiedades deseables del PEG, mientras que proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Se pueden usar los grupos colgantes reactivos para derivatización, entrecruzamiento, o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles en la producción de pro-fármacos estables, de circulación prolongada variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG, y el enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta a la separación del complejo fármaco/grupo enlazador y la cantidad de fármaco por peso molecular de conjugado (segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular global del bloque de co-polímero conjugado aumentará la vida media circulatoria del conjugado. Sin embargo, el conjugado o bien debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del umbral limitante de filtración glomerular (p. ej., menos de 45 kDa).

15 Además, siendo importante el esqueleto del polímero en el mantenimiento de la vida media circulatoria, y la bio distribución, se pueden usar los enlazadores para mantener el agente terapéutico en una forma de pro-fármaco hasta que sea liberado del esqueleto de polímero por un desencadenante específico, típicamente actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de liberación de fármaco activado en tejido es particularmente útil cuando se requiere la distribución en un sitio específico de bio distribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de patología. Se conocen librerías de grupos enlazadores para usar en la distribución de fármacos activados por los expertos en la técnica y pueden estar basados en cinéticas enzimáticas, prevalencia de la enzima activa, y especificidad de escisión de las enzimas específicas de enfermedad (véase, p. ej., tecnologías de establecimiento por VectraMed, Plainsboro, N.J.). Se pueden usar tales enlazadores en la modificación de los polipéptidos sonic hedgehog descritos en esta memoria para distribución terapéutica.

20 En una realización particular, el polipéptido sonic hedgehog se fusiona a una porción Fc de un anticuerpo. Como se usa en esta memoria, "porción Fc" abarca dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, preferiblemente una inmunoglobulina humana, que incluye un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. Inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y otras clases.

25 De acuerdo con la invención, los polipéptidos sonic hedgehog se pueden producir por métodos de síntesis de péptidos automatizada convencionales o por expresión recombinante. los principios generales para el diseño y la producción de proteínas son bien conocidos por los expertos en la materia.

30 Los polipéptidos sonic hedgehog de la invención se pueden sintetizar en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Están comercialmente disponibles varios sintetizadores automáticos y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos. Los polipéptidos sonic hedgehog de la invención también se pueden sintetizar por tecnología en fase sólida que emplea un sintetizador de péptidos a modo de ejemplo como un Modelo 433A de Applied Biosystems Inc. La pureza de cualquier proteína dada; generada a través de síntesis peptídica automatizada o a través de métodos recombinantes se puede determinar usando análisis de HPLC en fase inversa. Se puede establecer la autenticidad química de cada péptido mediante cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica.

35 Como una alternativa a la síntesis de péptidos automatizada, se puede emplear tecnología de ADN recombinante en donde se inserta una secuencia nucleotídica que codifica una proteína de elección en un vector de expresión, transformado o transfectado en una célula huésped y cultivada en condiciones adecuadas para la expresión como se describe en esta memoria a continuación. Se prefieren especialmente métodos recombinantes para producir polipéptidos más largos.

40 Se pueden utilizar una variedad de sistemas de expresión vector/huésped para contener y expresar la secuencia codificadora del péptido o de la proteína. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o cósmido; levadura

transformada con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (p. ej., baculovirus), sistemas de células vegetales transfectadas con vectores de 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., plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células animales. Los expertos en la técnica son conscientes de varias técnicas para la optimización de expresión en mamíferos de proteínas. Las células de mamífero que son útiles en producciones de proteína recombinante incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), células COS (como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Se conocen protocolos ejemplares para la expresión recombinante de los sustratos peptídicos o los polipéptidos de fusión en bacterias, levaduras y otros invertebrados por los expertos en la técnica y se describen brevemente en esta memoria a continuación. También son bien conocidos los sistemas huésped de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes por los expertos en la técnica. Se pueden elegir cepas de células huésped para una habilidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones post-traduccionales que serán útiles para proporcionar actividad a la proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento post-traduccionales, que rompe una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para la correcta inserción, plegamiento y/o función. Diferentes células huésped como CHO, HeLa, MDCK, 293, W138, y similares tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades post-traduccionales y se pueden elegir para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

En la producción recombinante de los polipéptidos sonic hedgehog de la invención, sería necesario emplear vectores que comprenden moléculas de polinucleótido para codificar las proteínas derivadas de sonic hedgehog. Son bien conocidos los métodos para preparar tales vectores, así como la producción de células huésped transformadas con tales vectores por los expertos en la técnica. Las moléculas de polinucleótido usadas en tal proyecto se pueden unir a un vector, que incluye generalmente un marcador seleccionable y un origen de replicación, para la propagación en un huésped. Estos elementos de los constructos de expresión son bien conocidos por los expertos en la técnica. Generalmente, los vectores de expresión incluyen ADN que codifica la proteína dada que está unido operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales o traduccionales adecuadas, como las derivadas de unos genes de mamífero, microbianos, virales o de insecto. Ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores o potenciadores, sitios de unión a mRNA ribosomal, y secuencias apropiadas, que controlan la transcripción y la traducción. Los términos "vector de expresión", "constructo de expresión" o "casete de expresión" se usan indistintamente a lo largo de esta especificación y están destinados a incluir cualquier tipo de constructo genético que contiene un ácido nucleico que codifica un producto génico en el que parte o la totalidad del ácido nucleico que codifica la secuencia es capaz de ser transcrita. La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los péptidos o polipéptidos de la invención dependerá, por supuesto, de la célula huésped específica que se usa, y está dentro de la habilidad del experto habitual. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipuladas mediante inserción o incorporación de las secuencias polipeptídicas.

Otra estrategia para producir ligando para sonic hedgehog es el uso de micropartículas liberadas de membrana. Las células pueden comunicarse con otras células a través de la liberación de micropartículas. Las micropartículas son pequeñas vesículas liberadas de células estimuladas y/o apoptóticas. Ellas albergan proteínas de membrana que son características de la célula original parental y componentes intracelulares implicados en señalización celular. Las micropartículas se consideran ambas, biomarcadores y efectores, de la señalización celular que mantienen y/o inician la disfunción celular. Algunos tipos de micropartículas poseen potencial terapéutico a través de la modulación de procesos celulares y secretomas (las moléculas secretadas por las células), y posteriormente mediante la inducción de la reparación de tejido después de la reprogramación de células diana. Se pueden diseñar micropartículas para sobre-expresar diferentes proteínas dirigiendo la síntesis de la relevante como sonic hedgehog en células productoras de micropartículas.

Por lo tanto, en realización particular, la presente invención se refiere al uso de micropartículas que llevan sonic hedgehog para la cardioprotección de un sujeto que experimentó un infarto de miocardio. Como un transportador para distribuir fármacos, las micropartículas tienen ventajas únicas: primero, las micropartículas se forman a partir de membranas celulares, haciéndolas por lo tanto mucho más seguras y auto-amigables; segundo, las micropartículas diseñadas que llevan sonic hedgehog son simples y fácilmente manipulables; y es un proceso general y no restringido por las propiedades físico-químicas de los fármacos. El uso de micropartículas promete un transportador simple eficaz de sonic hedgehog e intervenciones terapéuticas inocuas.

En un objetivo adicional, la presente invención proporciona un método para tratar el infarto de miocardio en un paciente que lo necesita que comprende las etapas que consisten en:

- i) Restaurar el suministro de sangre en el tejido isquémico cardíaco

- ii) Inducir la cardioprotección administrando a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog de acuerdo con la invención (p. ej., un polipéptido sonic hedgehog o sonic hedgehog transportada por micropartículas).

5 Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog de acuerdo con la invención para inducir cardioprotección en una relación riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio razonable del médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la severidad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, ruta de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el ligando empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

10 En realización particular, las etapas i) e ii) como se describió anteriormente se pueden realizar secuencial o concomitantemente. Por consiguiente, el método de la invención comprende las etapas de administrar al sujeto antes de y/o en el momento del daño por reperfusión con una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog de acuerdo con la invención. Típicamente, el ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog se administra por infusión en el torrente sanguíneo. Se puede considerar una segunda administración en un corto periodo de tiempo (es decir, 24 horas) después de la reperfusión.

15 El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido, semi-sólido o líquido de relleno, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación no tóxico de cualquier tipo.

20 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, y mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la reconstitución de soluciones inyectables.

25 Las formas farmacéuticas adecuadas para 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 inyectables estériles o dispersiones. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

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

35 El polipéptido sonic hedgehog se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres pueden también derivarse de bases orgánicas como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

40 El transportador también puede ser un disolvente o 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 apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un agente de recubrimiento, como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede inducir por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico.

Se puede inducir la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril de la misma previamente filtrada.

La presente invención también se refiere al uso de un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog de acuerdo con la invención para la preparación de biomateriales o dispositivos de administración médicos seleccionados entre prótesis endovasculares, como stents, injertos de derivación (bypass), parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular, y el catéter de angioplastia.

A este respecto, la invención se refiere más en particular a biomateriales o dispositivos de administración médicos como se ha mencionado anteriormente, recubiertos con dicho polipéptido sonic hedgehog, tales biomateriales o dispositivos médicos se seleccionan entre prótesis endovasculares, como stents, injertos de derivación (bypass), parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular, y el catéter de angioplastia. Tal biomaterial local o dispositivo de administración médico se puede usar para reducir la estenosis como un adjunto para revascularizar, procedimientos de derivación o injerto realizados en cualquier localización vascular que incluye arterias coronarias, arterias carótidas, arterias renales, arterias periféricas, arterias cerebrales o cualquier otra ubicación arterial o venosa, para reducir la estenosis anastomótica como en el caso de acceso de diálisis arterio-venosa con o sin injerto de politetrafluoro-etileno y con o sin colocación de stent, o en conjunción con otros procedimientos de corazón o transplante, o intervenciones vasculares congénitas.

Para propósitos ilustrativos, se describen más particularmente tales prótesis endovasculares y métodos para el recubrimiento con polipéptidos sonic hedgehog a las mismas en WO2005094916, o son los que se usan actualmente en la técnica. Los compuestos usados para el recubrimiento de las prótesis deben permitir preferencialmente una liberación controlada de dicho inhibidor. Dichos compuestos podrían ser polímeros (como suturas, policarbonato, Hydron, y Elvax), biopolímeros/biomatrices (como alginato, fucanos, matrices a base de colágeno, heparan sulfato) o compuestos sintéticos como moléculas sintéticas del tipo de heparan sulfato o combinaciones de las mismas. Otros ejemplos de materiales poliméricos pueden incluir materiales degradables biocompatibles, p. ej., poliésteres a base de lactona orcopoliésteres, p. ej., polilactida; polilactida-glicólido; policaprolactona-glicólido; polioctoésteres; polianhidridos; poliaminoácidos; polisacáridos; polifosfatos; copolímeros de poli (éter-éster), p. ej., PEO-PLLA, o mezclas de los mismos; y materiales no degradables biocompatibles, p. ej., polidimetilsiloxano; poli (etilen-vinilacetato); polímeros o copolímeros a base de acrilato, p. ej., polibutilmetacrilato, poli (hidroxietil metil-metacrilato); polivinil pirrolidina; polímeros fluorados como politetrafluoroetileno; ésteres de celulosa. Cuando se usa una matriz polimérica, puede comprender 2 capas, p. ej. una capa base en la que se incorpora dicho inhibidor, como etilen-co-vinilacetato y polibutilmetacrilato, y una capa superior, como polibutilmetacrilato, que actúa como un control de difusión de dicho inhibidor. Alternativamente, dicho inhibidor puede estar comprendido en la capa base y el adjunto se puede incorporar en la capa exterior, o viceversa.

Dicho biomaterial o dispositivo de administración médica puede ser biodegradable o puede estar hecho de metal o aleación, p. ej., Ni y Ti, u otra sustancia estable cuando está destinado para uso permanente. El inhibidor de la invención también puede estar atrapado dentro del metal del stent o del cuerpo del injerto, que se ha modificado para contener microporos o canales. También se pueden usar para la administración local parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, o manguito vascular hecho de polímero u otros materiales biocompatibles como se describe anteriormente que contienen el inhibidor de la invención.

Dichos biomateriales o dispositivos de administración médica permiten que el inhibidor se libere de dicho biomaterial o dispositivos de administración médica con el tiempo y que entre en el tejido circundante. Dicha liberación puede ocurrir durante 1 mes a 1 año. La administración de acuerdo con la presente invención permite una alta concentración del inhibidor de la invención en el sitio de la enfermedad con baja concentración de compuesto circulante. La cantidad usada de dicho inhibidor para aplicaciones de administración local variará dependiendo de los compuestos usados, la afección a tratar y el efecto deseado. Para los propósitos de la invención, se administrará una cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración local de dicho biomaterial o dispositivo de administración médica preferiblemente tiene lugar en o cerca de los sitios de lesiones vasculares. La administración puede ser mediante una o más de las siguientes rutas: a través de catéter u otro sistema de administración intravascular, intranasal, intrabronquial, intraperitoneal o esofágica. Los stents se usan comúnmente como una estructura tubular que se deja dentro del lumen de un conducto para aliviar una obstrucción. Se deben insertar dentro del lumen del conducto en una forma no expandida y luego se expanden autónomamente (stents auto-expansibles) o con la ayuda de un segundo dispositivo in situ, p. ej., un globo de angioplastia montado en catéter que se infla dentro del vaso estenosado o conducto corporal con el fin

de cortar y romper las obstrucciones asociadas con los componentes de la pared del vaso y obtener un lumen agrandado.

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

## 5 Figuras

**Figura 1: El complejo receptor de sonic hedgehog (Shh) media la producción de NO en cardiomiocitos ventriculares.** A) Gel de PCR representativo que demuestra la expresión de mRNAs de Patched (Ptc) y Smoothed (Smo) y de Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de referencia en cardiomiocitos ventriculares de rata. B) Western blot (SDS-PAGE) representativo que demuestra la expresión de proteínas Smo y Ptc en cardiomiocitos y en testículo usado como tejido de referencia. C) Imágenes confocales representativas que demuestran el aumento de producción de NO después de la incubación de cardiomiocitos con proteína Shh recombinante (N-Shh) o micropartículas que albergan la proteína Shh (MPs<sup>Shh+</sup>) durante 4 horas (panel superior). Se cuantificaron los niveles de fluorescencia DAF (panel inferior) en el control (n=895 células), después de la incubación con N-Shh (n=365 células), y después de la co-incubación con inhibidor de fosfoinosítido-3 quinasa, LY294002 (LY, 25  $\mu$ M, n=98 células), inhibidor de NOS, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 100  $\mu$ M, n=98 células). También se cuantificó el nivel de fluorescencia DAF después de la incubación con MPs<sup>Shh+</sup>, (n=382 células) y después de la co-incubación con el inhibidor de la ruta de Shh ciclopamina (MPs<sup>Shh+</sup>-Ccl, 30  $\mu$ M, n=137 células). El inhibidor de PTC/Smo, Ciclopamina (Ccl, 30  $\mu$ M, n=68 células) sólo no tuvo efecto en los niveles de NO basales. La incubación con MPs que no lleva la Shh (MPs<sup>Shh-</sup>) no aumentó la formación de NO (n=23 células). Los datos son la media  $\pm$  SEM; \*, p<0,05 frente al control.

**Figura 2: La ruta de señalización Shh inhibe el acoplamiento de excitación-contracción de cardiomiocitos ventriculares.** A). Estudio a lo largo del tiempo representativo de la longitud del sarcómero de cardiomiocitos control, tratados con N-Shh y tratados con MPs<sup>Shh+</sup>. B) Longitud del sarcómero en reposo en cardiomiocitos control, tratados con N-Shh y tratados con MPs<sup>Shh+</sup>. C) Estudio a lo largo del tiempo representativo del Ca<sup>2+</sup> transitorio (fluorescencia indo-1 a 405/480 nm) de cardiomiocitos control y cardiomiocitos incubados con Shh recombinante (N-Shh) o MPs que llevan Shh (MPs<sup>Shh+</sup>) durante 4 h. D) Niveles de Ca<sup>2+</sup> diastólico en cardiomiocitos control, tratados con N-Shh y tratados con MPs<sup>Shh+</sup>. Se midieron el acortamiento (% de longitud de sarcómero en reposo) (E) y la amplitud de Ca<sup>2+</sup> transitorio (F) en cardiomiocitos control (n=253), tratados con N-Shh (n=82) o tratados con MPs<sup>Shh+</sup> (n=218) después de la incubación con inhibidor de fosfoinosítido-3 quinasa, LY294002 (LY, 25  $\mu$ M, n=19), inhibidor de NOS, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 100  $\mu$ M, n=19) e inhibidor de la ruta Shh, ciclopamina (Ccl, 30  $\mu$ M, n=17 con N-Shh y n=75 con MPs<sup>Shh+</sup>). La incubación con MPs que no llevan la proteína Shh (MPs<sup>Shh-</sup>, n=25) no modificó el acortamiento o el Ca<sup>2+</sup> transitorio. Los datos son la media  $\pm$  SEM; \*, p<0,05 frente al control.

**Figura 3: Ruta de señalización Shh en el acoplamiento de excitación-contracción cardiaca.** A) Seguimiento representativo de las relaciones entre [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y el acortamiento antes y después de una estimulación con un campo en cardiomiocitos ventriculares control (línea de color negro) y cardiomiocitos tratados con Shh recombinante (N-Shh) (línea de trazos), y tratados con MPs que llevan Shh (MPs<sup>Shh+</sup>) (línea gris) durante 4 h. B) Acortamiento del sarcómero (% de longitud en reposo) frente a Ca<sup>2+</sup> transitorio en cardiomiocitos control y tratados con MPs<sup>Shh+</sup> después de la modulación del Ca<sup>2+</sup> transitorio por diferentes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> externas (cuadrado: 0,3, círculo: 0,5, triángulo hacia arriba: 1, triángulo hacia abajo: 1,8 mM). C) Tensión y D) tensión relativa de cardiomiocitos de piel isométrica control y tratados con MPs<sup>Shh+</sup> (n=12 en cada condición). Densidad de corriente de Ca<sup>2+</sup> de tipo L (I<sub>CaL</sub> en pA/pF) como una función del potencial de membrana registrado con una pinza de voltaje en cardiomiocitos control (n=7), tratados con Shh recombinante (N-Shh) (N-Shh, n=8) (E) y tratados con MPs que llevan Shh (MPs<sup>Shh+</sup>) (n=8) (F) durante 4 h. Los datos son la media  $\pm$  SEM; \*, p<0,05 frente al control.

**Figura 4: Shh reduce la duración del potencial de acción y activa una corriente de potasio de rectificación interior.** A) Seguimiento representativo del potencial de acción registrado en el control y después del tratamiento con Shh (panel izquierdo, negro y rojo gris). Se repitieron los mismos experimentos en presencia del inhibidor de IKATP glibenclamida (1  $\mu$ M) (control negro, Shh gris, panel derecho). Valores promedio de la duración del potencial de acción al 95% de repolarización (APD<sub>95</sub>, B) en el control (n=7), Shh (n=8), Control + glibenclamida (n=7), Shh + glibenclamida (n=8), Shh + L-NNA (n=7), Shh + L-NNA + glibenclamida (n=7), Shh + ODQ (n=7), Shh + ODQ + glibenclamida (n=7). C) Familia de diferencia de corriente medida antes y después de la aplicación de glibenclamida de -120 mV a 0 mV en ausencia (trazas negras) o en presencia de Shh (trazas grises). Las corrientes medias en estado estacionario expresadas como densidad de corriente están representadas en (D) (n=8 y 8 en el control y Shh). Se realizaron también experimentos similares en presencia de ODQ (n=6) y L-NNA (n=6). La densidad de corriente media a -120 mV y -60mV se representa en (E) y (F), respectivamente. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM; \* y #, p<0,05 frente al control, respectivamente.

**Figura 5: Simulación numérica del potencial de acción, I<sub>CaL</sub> y Ca<sup>2+</sup> transitorio con y sin una corriente de K<sup>+</sup> de rectificación interior adicional.** Se construyó empíricamente una ecuación que empareja la corriente de rectificación interna provocada por Shh y se añadió al modelo (modelo en línea de Bondarenko *et al.* (2004) del CellML). A) Relación corriente-voltaje de la corriente simulada. Estudio a lo largo del tiempo del potencial de acción

(AP) después de una estimulación eléctrica (B) y estudio a lo largo del tiempo de  $I_{CaL}$  durante el AP (B) en presencia (línea negra) y en ausencia (línea discontinua) de esta corriente de potasio. Es de notar que el AP más corto durante el tratamiento con Shh provocó una más alta pero más corta corriente de  $Ca^{2+}$ , lo que da como resultado una afluencia neta de  $Ca^{2+}$  menor ( $4,38 E^{10}$  frente a  $3,97 E^{10}$  de iones de  $Ca^{2+}$  en ausencia y en presencia de la corriente de potasio, respectivamente) lo que generó un menor  $Ca^{2+}$  transitorio (D).

**Figura 6: Shh acorta el intervalo QTc del ECG, 6 horas después de la inyección IV.** Se registraron ECGs de telemetría en ratas antes y 6 horas después de la inyección *i.v.* de Shh, Shh y hexametonio, MPs, Shh y ciclopamina, Shh y glibenclamida. El intervalo QT se corrigió para la frecuencia cardiaca (véanse métodos) y se promedió durante un periodo de 30 minutos. \* $p < 0,05$ , 6 horas después de la inyección IV frente a antes de la inyección.

**Figura 7: Estudio a lo largo del tiempo del intervalo QTc después de la reperfusión de la isquemia.** Se registraron ECGs en ratas antes de la isquemia y durante las primeras 24 horas de la reperfusión. Se ocluyó la arteria coronaria durante 30 minutos. A las ratas se les inyectaron por vía *i.v.* Shh, Shh y ciclopamina o con el vehículo a los 15 min antes de la reperfusión. Se corrigió el intervalo QT para la frecuencia cardiaca (véanse métodos) y se promedió durante un periodo de 30 minutos. (\* $P < 0,05$  frente al control).

**Figura 8. Remodelación ventricular izquierda después de 24 h de reperfusión.** Las secciones de corazón teñidas con tricromo Masson revelaron un aumento importante en la fibrosis que se previno cuando se inyectaron por vía *i.v.* a los animales con Shh, 15 min antes de la reperfusión. Esta prevención fue abolida por ciclopamina (\* $P < 0,05$  Shh frente a vehículo, # $P < 0,05$  Shh frente a Shh + ciclopamina).

**Figura 9. La activación de la ruta Shh disminuye el tamaño del infarto en un modelo de rata de isquemia reperfusión.** A) Secciones representativas (Superior) de corazones teñidos con TTC. B) Se hizo la cuantificación normalizando el área infartada (IA) con el área de riesgo (AAR). El tratamiento con N-Shh redujo el tamaño del infarto después de 24 h de reperfusión y este efecto cardioprotector fue prevenido por ciclopamina. No se observó diferencia significativa en el AAR total entre grupos (C). Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM; (control  $n=6$ , N-Shh  $n=5$ , N-Shh + Ccl  $n=6$ ; \* $p < 0,05$  frente al control).

**Figura 10. La activación de la señalización Shh mejora la repolarización ventricular después de la isquemia-reperfusión.** Se obtuvieron ECGs durante 24 h de reperfusión después de una isquemia de 30 min, en un animal tratado (inyectado *i.p.* 15 min antes de la reperfusión) ya sea con vehículo, N-Shh recombinante, o N-Shh + Ciclopamina (Ccl). (A) Los típicos ECGs a las 6 horas después de la reperfusión mostraron una ampliación del intervalo QT corregido con la frecuencia cardiaca (QTc). El estudio a lo largo del tiempo de la variación de QTc se resume en (B) en las 3 condiciones experimentales diferentes. C) Resume el número de arritmias registradas durante un periodo de 2 horas después de la reperfusión que muestra una reducción de la arritmia ventricular cuando se activa la ruta de señalización SHH. D) Tres patrones representativos de arritmias ventriculares (indicadas por flechas) registrados después de la reperfusión en animales tratados con el vehículo solamente (control). (control  $n=6$ , N-SHH  $n=5$ , N-SHH + Ccl  $n=6$ ; \* $p < 0,05$ ).

### Ejemplo 1; La señalización de sonic hedgehog modula el acoplamiento excitación-contracción en miocitos ventriculares adultos

#### Materiales & Métodos

#### Declaración ética

Los experimentos se ajustaban a los *Institutos Nacionales de Guía para la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* (NIH Pub. N°. 85-23, Revisado 1996) y *Todos los procedimientos en conformidad con la Directiva Parlamentaria Europea 2010/63/EU y el Consejo del 22 de septiembre de 2010 sobre la protección de animales*.

#### Aislamiento de la preparación celular

Se aislaron cardiomiocitos ventriculares de ratas adultas Wistar macho de 200-250 g como se describió anteriormente<sup>1</sup>. Las ratas se anestesiaron mediante inyección *i.p.* de pentobarbital sódico (100 mg/kg) con heparina (100 U). El corazón se extirpó rápidamente, se lavó en tampón Hanks-HEPES helado (en mM: NaCl 117, KCl 5,7,  $NaHCO_3$  4,4,  $KH_2PO_4$  1,5,  $MgCl_2$  1,7, HEPES 21, glucosa 11,7, taurina 20, pH a 7,15), se montó en un sistema de perfusión Langendorff y se perfundió (3 ml/min, a 37°C) primero con tampón Hanks-HEPES durante 5 min para limpiar de sangre y después con tampón suplementado con colagenasa tipo 4 (Worthington, Lakewood, NJ, E.E.U.U.) a 1,2 mg/ml durante 13-18 min. El corazón se colocó en tampón Hanks-HEPES suplementado con 2,3-Butanodiona monoxima (BDM) a 1 mg/ml y BSA a 1 mg/ml. Se retiraron las aurículas y los ventrículos se disociaron con cuidado con tijeras y pipetas en el mismo medio. Se filtró la suspensión a través de una malla de nylon (200  $\mu$ m) y se incubó 4x para decantación de las células durante 10 min. Después de cada decantación del sobrenadante, se resuspendieron los miocitos en un tampón Hanks-HEPES que contiene  $Ca^{2+}$  a 0 mmol/l (+ BDM a 1 mg/ml y BSA a 1 mg/ml), 2 veces en tampón Hanks-HEPES que contiene  $Ca^{2+}$  a 0,3 mmol/l (+ BDM a 0,6 mg/ml y BSA a 1 mg/ml) y finalmente tampón Hanks-HEPES que contiene  $Ca^{2+}$  a 1 mmol/l (+ BSA a 1 mg/ml, solamente).

## Incubación con proteína o micropartículas Shh

Las células se contaron y se sembraron a  $150 \cdot 10^3$  cels/ml y posteriormente se incubaron con proteína Shh recombinante (C24II) (N-Shh, R&D Systems, Mineápolis, MN, E.E.U.U.) unida a un transportador humano a 0,4  $\mu\text{g/ml}$  o con micropartículas (MPs) a 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 4 horas a 22°C mientras se agitaba suavemente. Se determinó el tiempo para la incubación de acuerdo con experimentos preliminares en los que se probó la incubación durante 0 h, 2 h, 4 h y 6 h, y los efectos sobre el calcio transitorio y el acortamiento eran más pronunciados después de 4 h.

## Preparación de micropartículas

Las micropartículas (MPs) se obtuvieron de la línea celular linfoide T CEM humana (ATCC, Manassas, VA, E.E.U.U.). Las células se sembraron a  $10^6$  cels/ml, se cultivaron en medio X-VIVO 15 (Lonza, Walkersville, MD, E.E.U.U.) libre de suero y después se trataron posteriormente con fitohemaglutinina (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 72 h, con forbol-12-miristato-13 (20 ng/ml) y actinomicina D (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h (MPs<sup>Shh+</sup>) o solamente con actinomicina D (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h (MPs<sup>Shh-</sup>). Se obtuvo un sobrenadante en dos etapas de centrifugación a 750 g durante 15 min y a 1500 g durante 5 min para eliminar las células y residuos de gran tamaño. El sobrenadante restante que contiene MP se sometió a 14.000 g durante 45 min para recoger las MPs. El precipitado de MP se sometió a dos series de centrifugaciones a 14.000 g durante 45 min. Finalmente, el precipitado de MP se recuperó en 400  $\mu\text{l}$  de NaCl estéril (0,9% p/v)<sup>2</sup>. El contenido de MP se ajustó al contenido de proteína determinado frente a patrones de albúmina sérica bovina (BSA) para contener 10  $\mu\text{g}$  de proteínas por ml.

## Inhibidores y productos químicos

Se incubaron también células control y células cargadas con MPs en las mismas condiciones como se describió anteriormente con diferentes inhibidores: ciclopamina (Ccl, 30  $\mu\text{M}$ , inhibidor de la ruta Shh), LY294002 (LY, 25  $\mu\text{M}$ , inhibidor de PI3-K), N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 100  $\mu\text{M}$ , inhibidor de NOS, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, 10  $\mu\text{M}$ , inhibidor de guanilato ciclasa soluble, sGC), glibenclamida (Glib, 1  $\mu\text{M}$ , inhibidor del canal de K<sub>ATP</sub>). Salvo que se indique, todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, E.E.U.U.).

Ca<sup>2+</sup> transitorio y acortamiento celular

Se cargaron cardiomiocitos ventriculares aislados con Indo-1 AM (10  $\mu\text{M}$ , Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, E.E.U.U.) a temperatura ambiente durante 30 min y después se lavaron con solución tamponada de HEPES libre (NaCl a 117 mmol/l, KCl a 5,7 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> a 4,4 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1,5 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> a 1,7 mmol/l, HEPES a 21 mmol/l, glucosa a 11 mmol/l, taurina a 20 mmol/l, pH 7,2) que contiene Ca<sup>2+</sup> a 1,8 mmol/l. Se estudiaron el acortamiento celular y la concentración de calcio [Ca<sup>2+</sup>] (colorante Indo-1) sin cargar usando estimulación de campo (1 Hz, 22°C, Ca<sup>2+</sup> externo a 1,8 mmol/l). Se registraron simultáneamente la longitud de sarcómero (SL) y la fluorescencia (405 y 480 nm) (IonOptix Myocyte Calcium and Contractility Recording System, Dublin, Irlanda)<sup>3</sup>. Para evaluar el calcio transitorio y el acortamiento a diferentes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ext</sub> (en mmol/l: 0,3, 0,5, 1, 1,8, 2,5, 3,5, 5), se colocaron cardiomiocitos en cubreobjetos recubiertos previamente con laminina y perfundidos a flujo constante de 500  $\mu\text{l/min}$ . La perfusión se logró colocando una punta de pipeta cónica en la proximidad de la célula que estaba acoplada a microcapilares conectados a jeringas de 5 ml.

## Registro mecánico y medida de SL

Se midió la fuerza de Ca<sup>2+</sup>-activado de miocitos individuales permeabilizados como se describe anteriormente<sup>3</sup>. Se permeabilizaron miocitos ventriculares aislados intactos en una solución relajante (pCa 9; pCa =  $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ , véase más abajo) que contiene Tritón X-100 al 0,3% vol/vol e inhibidores de proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, y trans-epoxisuccinil-1-leucina-guanidobutilamida (E-64)) a temperatura ambiente durante 6 min. Las células se lavaron entonces dos veces con la misma solución sin Tritón X-100 y se mantuvieron a 4°C.

Se unieron monocitos permeabilizados a un extensómetro piezorresistivo (sensor AE801, Memscap; 500 Hz de frecuencia de resonancia descargada, elasticidad del extensómetro: 0,03  $\mu\text{m}/\mu\text{N}$ ) y a un micromanipulador impulsado por un motor paso a paso (MP-285, Sutter Instrument Company) con agujas delgadas de acero inoxidable y pegamento óptico (NOA 63, Norland Products) que se polimeriza mediante 2 min de iluminación UV. Se determinó SL en línea durante el experimento aplicando un algoritmo rápido de transformada de Fourier sobre las imágenes de video de la célula, usando software de adquisición IonOptix. Se normalizó la fuerza con el área de sección transversal medida a partir de la sección transversal de la imagen tomada. Se midió SL relajado antes de la unión para servir como el origen. Se establecieron las relaciones pCa-fuerza a 2,3  $\mu\text{m}$  SL a 22°C. La tensión activa a cada pCa se representó por la diferencia entre la tensión total y la tensión relajada. Se descartaron las células que no mantienen el 80% de la primera tensión máxima o un patrón de estriación visible. Aunque se mantuvieron las células isométricas durante la contracción, los sarcómeros cambiaron típicamente de longitud, especialmente cuando la activación era máxima. Se mantuvieron solamente las células que estaban bien unidas y con un cambio mínimo de SL (<0,1  $\mu\text{m}$ ). Se normalizaron las tensiones activas a activaciones submáximas con la tensión isométrica máxima (obtenida a pCa 5). Las medidas de fuerza se filtraron con paso bajo a 100 Hz y se registraron en un registro de

papel térmico (Dash IV, Astro-Med). Se colocó una célula individual en la punta de un micropilar cónico que recibe la salida de 10 microcapilares conectados a jeringas de 5 ml que contienen soluciones experimentales con un intervalo de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de pCa 9 a pCa 4,5 (velocidad de flujo  $200 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Para cada célula, se ajustó la relación entre la fuerza y pCa a la ecuación fuerza =  $[\text{Ca}^{2+}]^{nH}/(K + [\text{Ca}^{2+}]^{nH})$  donde  $nH$  es el coeficiente de Hill y pCa50 es el pCa para la activación semi-máxima, que corresponde a  $-(\log K)/nH$ .

Se prepararon soluciones de activación de  $\text{Ca}^{2+}$  diariamente mezclando soluciones madre relajante (pCa 9,0) y de activación máxima (pCa 4,5). Las soluciones relajantes y de activación contenían fosfocreatina a 12 mmol/l, imidazol a 30 mmol/l,  $\text{Mg}^{2+}$  libre a 1 mmol/l, EGTA a 10 mmol/l,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  a 3,3 mmol/l, y DTT a 0,3 mmol/l, ya sea con pCa 9,0 (solución relajante) o con pCa 4,5 (solución de activación máxima), pH 7,1 ajustado con KOH. Se ajustó la fuerza iónica a 180 mmol/l con K-acetato.

#### Medida de óxido nítrico (NO)

Se cargaron los cardiomiocitos con el colorante fluorescente sensible a NO: DAF-AM (4-amino-5-metilamino-2,7-difluorofluorescein diacetato a  $20 \mu\text{M}$ , durante 30 min, Invitrogen). Las células se resuspendieron luego en solución de Tyrode ( $\text{Ca}^{2+}$  a  $1,8 \text{ mmol/l}$ ) a  $22^\circ\text{C}$ . Se adquirieron las imágenes confocales de fluorescencia DAF en el modo x-y (Zeiss LSM 510, 25x, NA=0,8 de agua de inmersión, Le Pecq, Francia), con excitación a 488 nm con láser de iones de argón y filtro de emisión de 510-530 nm. Los valores de fluorescencia se corrigieron para la fluorescencia de fondo a partir de una imagen sin células ( $F-F_0$ ) y se calculó la relación fluorescencia/fondo ( $F-F_0$ ) /  $F_0$ ). Todas las imágenes se procesaron y analizaron usando un software Image J v 1.36b (National Institute of Health, E.E.U.U.).

#### Western blot

Se extrajeron proteínas de precipitados de cardiomiocitos homogeneizados en tampón de lisis Tris-malato a 10 mmol/l,  $\beta$ -glicerolfosfato a 20 mmol/l, NaF a 50 mmol/l, benzamidina a 10 mmol/l,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  a 0,2 mmol/l, leupeptina a  $40 \mu\text{M}$ , PMSF a  $500 \mu\text{M}$ , E64 a  $10 \mu\text{M}$ , EDTA a 2 mmol/l, DTT a 5 mmol/l, Tritón X100 al 1%, pH 6,8, a  $4^\circ\text{C}$ ). Se centrifugaron los homogeneizados a  $10.000 g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se determina la concentración de proteína total mediante el kit RC DC (Bio-Rad, Hercules, CA, E.E.U.U.). Los extractos de proteína se solubilizaron en tampón de Laemmli-urea (Tris-malato 10 mmol/l,  $\beta$ -glicerolfosfato 20 mmol/l, NaF 50 mmol/l, benzamidina 10 mmol/l,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  0,2 mmol/l, leupeptina  $40 \mu\text{M}$ , PMSF  $500 \mu\text{M}$ , E64  $10 \mu\text{M}$ , EDTA 1 mmol/l, EGTA 1 mmol/l, urea 8M, tio-urea 2M, SDS al 3%, DTT 5 mmol/l, Tritón X100 al 1%, pH 6,8, a  $4^\circ\text{C}$ ) y se hierven durante 5 min a  $95^\circ\text{C}$ . Se separaron muestras de proteína (50  $\mu\text{g}$ ) usando electroforesis en SDS-PAGE (al 10%) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno mediante protocolo de western blot semi-seco y se bloqueó con BSA al 3% durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se tiñeron con anticuerpo de cabra frente a Smo (ab58591) (1:400, Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, UK) y a Ptc (sc-6147) (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, E.E.U.U.) durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  y anticuerpos secundarios IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa 1:3.000 / anti-cabra (1:10.000) (Pierce, Rockford, IL, E.E.U.U.). Se identificaron las bandas usando quimioluminiscencia (Super Signal West Pico, Pierce), se evaluaron densitométricamente y se expresaron en unidades arbitrarias (A.U.).

#### Extracción de RNA y RT-PCR a tiempo real

Se extrajo ARN a partir de precipitados de cardiomiocitos usando el reactivo TRIzol de acuerdo con el protocolo del fabricante (Euromedex, Souffelweyheim, Francia), se trató con DNasa I (Invitrogen) a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min. Se sintetizó cDNA usando transcriptasa inversa superscript II (Invitrogen) a  $42^\circ\text{C}$  durante 50 min. Se realizó la PCR cuantitativa usando un termociclador rápido LightCycler (Roche, Meylan, Francia). Veinte  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción contenían 10  $\mu\text{l}$  de mezcla Absolute QPCR SYBR Green Capillary (DNA polimerasa termo strat, tampón de reacción, mezcla de deoxiribonucleósidos trifosfato,  $\text{MgCl}_2$  3 mmol/l, colorante SYBR verde I; Thermo Fischer Scientific, Ilkirch, Francia) suplementado con mezcla de cebador a  $0,5 \mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{l}$  de cDNA. Los datos se normalizaron frente a GAPDH. El programa de amplificación incluía la etapa inicial de desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  durante 15 min, 40 ciclos de desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  durante 1 seg, hibridación a  $60^\circ\text{C}$  durante 10 seg y extensión a  $72^\circ\text{C}$  durante 20 seg. Se usaron curvas de fusión para determinar la especificidad de los productos de PCR.

#### Electrofisiología celular

Se realizaron experimentos de patch-clamp (fijación de membranas) de célula completa a temperatura ambiente ( $22-24^\circ\text{C}$ ) con un Axopatch 200B (Axon instrument, Burlingham, CA, E.E.U.U.). Las pipetas patch tienen resistencia de 2 M $\Omega$ . Las corrientes se normalizaron con la capacitancia de la membrana celular (pA/pF). Las resistencias en serie se compensaron antes de los registros.

Para registrar APs, la solución de las pipetas contenía (en mM): KCl (130), HEPES (25), ATP(Mg) (3), GTP(Na) (0,4), EGTA (0,5); pH 7,2 (KOH). La solución de baño contenía (en mmol/l): NaCl (135),  $\text{MgCl}_2$  (1), KCl (4), Glucosa (11), HEPES (2),  $\text{CaCl}_2$  (1,8); pH 7,4 (NaOH). Se provocaron las APs mediante inyección de corriente de 0,2 ms de intensidad supra-umbral. Durante los experimentos, las células se estimularon mediante series de 30 estímulos a 0,5 Hz.

Para registrar  $I_{CaL}$ , la solución de baño contenía (en mM):  $CaCl_2$  (1,8), TEACl (140),  $MgCl_2$  (2), glucosa (10), HEPES (10), pH 7,4 (TEAOH). La solución de pipeta contenía (en mmol/l): CsCl (140), HEPES (10), EGTA (10), NaGTP (0,4), MgATP (3), pH 7,2 (CsOH). La  $I_{CaL}$  se provocó mediante ensayo de despolarización (150 ms) de -80 a -10 mV a 0,1 Hz. La relación corriente-voltaje se determinó usando una etapa de voltaje de 10 mV desde -80 a +50 mV. Se estimó su amplitud como la diferencia entre el pico de  $I_{CaL}$  y el nivel de corriente al final del pulso.

Se registraron las corrientes de  $K^+$  con la solución usada para APs, pero con tetrodoxina (TTX) 10  $\mu\text{mol/l}$  y cobalto ( $Co^{2+}$ ) 2 mM añadidos en el medio externo para bloquear  $I_{Na}$  e  $I_{CaL}$ , respectivamente. Se provocaron a partir de un potencial de mantenimiento (HP) de -80 mV mediante ensayo de despolarización (1 s) que varía de -120 mV a 0 mV a 0,1 Hz. Se realizaron etapas de voltajes 2 veces en cada célula antes y después de la aplicación de glibenclamida y se usaron para determinar los componentes sensibles a glibenclamida de la corriente.

#### Simulación numérica

Se realizó la simulación numérica usando el modelo de célula ventricular endocardial de ratón descrito por <sup>4</sup>. Este modelo está disponible en línea desde el depósito CellML (<http://www.cellML.org>) y se desarrolló con Fuente Celular Abierta <sup>5</sup>. La corriente activada por Shh se simuló mediante la siguiente ecuación derivada de una ecuación de corriente rectificadora instantánea interna que tiene una pendiente negativa:

$$i_{shh} = \frac{g_{shh} \cdot (V - E_K)}{1 + e^{\frac{F(V - E_K)}{RT}}} + \left( 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{F(V - E_K)}{RT}}} \right) \cdot 0.1$$

Donde  $E_K$  es el potencial de equilibrio para  $K^+$ ,  $G_{Shh}$  es la conductancia  $I_{Shh}$ , R es la constante gaseosa, T es la temperatura y F es la constante de Faraday.

#### Histología

Se prepararon secciones finas (5  $\mu\text{m}$ ) de ventrículos izquierdos de rata y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) y tricromo Masson (MT) para microscopía óptica (10x). Se estimó el engrosamiento del miocardio en las secciones de corazón teñidas con HE, y se analizó la presencia de colágeno en las secciones ventriculares teñidas con MT. Los resultados indican el porcentaje de área de fibrosis expresado como un porcentaje de área de contenido de colágeno del tejido miocárdico analizado.

#### Registro y análisis de ECG

Se implantó a las ratas un Transmisor DSI PhysioTel™ (CTA-F40, Data Sciences International, Saint-Paul, Mn, E.E.U.U.), quince días antes de comenzar los experimentos. Después de la recuperación, se registraron los ECGs usando un transmisor-receptor de señal (RCP-1; DSI) conectado a un sistema de adquisición de datos (IOX2; EMKA Technologies). Los datos se recogieron de forma continua a una velocidad de muestreo de 1000 Hz. Por lo tanto, se recogieron los datos en las ratas antes y 6 horas después de la inyección *i.v.* de Shh, Shh y hexametonio, MPs, Shh y ciclopamina, Shh y glibenclamida. Los ECGs se monitorizaron también 24 h antes de la isquemia, durante la isquemia y 24 h después de la reperusión. Se analizaron los registros digitales continuos en desconexión usando el software ECG-auto (véase 1.5.12.22, EMKA Technologies). Las señales ECG se filtraron digitalmente entre 0,1 y 1.000 Hz. Se midieron la frecuencia cardiaca y el intervalo QT. El intervalo QT se definió como el tiempo entre la primera desviación de un intervalo isoelectrico PR hasta el regreso de la repolarización ventricular a la línea de base isoelectrica TP a partir de los ECGs II principales. El intervalo QT es dependiente de la frecuencia cardiaca, por lo tanto, el intervalo QT se debería corregir para tener en cuenta los cambios de potencial en el intervalo RR. La corrección QT se realizó de acuerdo con la *fórmula de Bazett*:

$$QT_B = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

donde  $QT_B$  es el intervalo QT corregido para la frecuencia cardiaca, y RR es el intervalo desde el inicio de un complejo QRS hasta el comienzo del siguiente complejo QRS.

#### Estadística

Los datos numéricos presentados son la Media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los resultados se consideraron significativos si  $p < 0,05$ , con Análisis de Varianza (ANOVA) de dos colas, simple con prueba posterior de Bonferroni.

#### Resultados

La ruta Shh es funcional en cardiomiocitos adultos

Se han identificado dos proteínas transmembrana Patched (Ptc) y Smoothened (Smo) como el complejo receptor de hedgehog<sup>24, 25</sup>. Ptc funciona como una proteína de unión de hedgehog mientras Smo se requiere para transducir la señal. En ausencia de señal hedgehog, Ptc inhibe la actividad de Smo, cuando hedgehog interacciona con Ptc, Ptc se internaliza y se elimina la inhibición de Smo<sup>25</sup>. El análisis de PCR lleva a la identificación de la presencia de mRNA que codifica Ptc y Smo en miocitos ventriculares de rata adulta aislados (Figura 1A). Esto además se confirmó por Western blot que revela la presencia de Ptc y Smo (Figura 1B). Se cargaron después los cardiomiocitos con la sonda fluorescente de NO, DAF (Figura 1C). En una primera serie de experimentos, las células se incubaron con la proteína recombinante del ligando homólogo Shh (N-Shh) durante 4 horas a 20  $\mu\text{mol/l}$ . Cuando se compara con las células control, la fluorescencia DAF aumentó significativamente después de la incubación con N-Shh sugiriendo una producción de NO. Este efecto se previno en presencia del inhibidor de NOS L-NNA. PI3K es conocido como un modulador potencial corriente arriba de NOS<sup>16</sup>. La producción de NO inducida por Shh se inhibió también en presencia de inhibidor de PI3K LY29402. También se incrementó significativamente la producción de NO cuando los cardiomiocitos se incubaron durante 4 horas con MPs de membrana liberadas que llevan el ligando Shh (MPs<sup>Shh+</sup>,<sup>18</sup>). Este efecto se previno cuando los cardiomiocitos se pre-incubaron con el inhibidor específico de la ruta Shh, ciclopamina. Cuando las células se incubaron con diferentes MPs que carecían del ligando Shh (MPs<sup>Shh-</sup>,<sup>18</sup>), la fluorescencia DAF fue comparable al control. En conjunto, estos experimentos demuestran que la ruta Shh está presente y funcional en cardiomiocitos adultos de rata, y ligada a la activación de NOS y a la producción de NO más probablemente a través de la ruta corriente arriba PI3K/Akt.

La ruta Shh modula el acoplamiento de excitación-contracción

Se cargaron cardiomiocitos aislados con indo-1 (5  $\mu\text{M}$  durante 20 min) y se impulsaron a 0,5 Hz. Se registraron simultáneamente las variaciones de longitud del sarcómero y del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. El acortamiento celular provocado por la estimulación eléctrica se redujo tanto con tratamiento de N-Shh como con MPs<sup>Shh+</sup> (Figura 2A, E) sin afectar a la longitud del sarcómero en reposo (Figura 2B). N-Shh o MPs<sup>Shh+</sup> también redujeron significativamente la amplitud del  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio (Figura 2C, F), mientras el  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico permaneció estadísticamente inalterado aunque ligeramente disminuido (Figura 2D).

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar el impacto de la producción de NO inducida por Shh sobre el acortamiento celular (Figura 2E) y el  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2F) en cardiomiocitos. La reducción del acortamiento celular y de la amplitud del  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio inducido por N-Shh fue completamente suprimida en presencia del inhibidor de la ruta Shh ciclopamina, del inhibidor PI3K LY249002 y del inhibidor no selectivo de NOS, L-NNA. El efecto de Shh imitado por la MPs<sup>Shh+</sup> liberadas de membrana también se bloqueó por ciclopamina mientras MPs<sup>Shh-</sup> no tuvo ningún efecto.

Esta reducción en el acortamiento celular podría ser en parte la consecuencia tanto de la reducción de la amplitud de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio y/o finalmente de la acción directa a nivel de la maquinaria contráctil. Las relaciones entre la amplitud del  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio y el acortamiento celular de la longitud del sarcómero se representaron primero como bucles de fase plana (Figura 3A,<sup>26</sup>). Este tipo de representación refleja la respuesta cinética de la maquinaria contráctil a cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta muestra una primera fase de rápida elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  con pequeña respuesta contráctil seguido de un acortamiento celular que empieza en el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio. La respuesta contráctil continua incluso aunque el  $\text{Ca}^{2+}$  cae y finalmente, tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como la contracción decaen juntos. Por lo tanto, la reducción en el acortamiento celular se correlaciona con el  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio disminuido después de la estimulación por Shh. Para modular la amplitud del  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio y la respuesta del miofilamento, las células se bañan en varias  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  que van de 0,3 a 5 mmol/l (Figura 3B). Para cada  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$  se representó el acortamiento del sarcómero frente al pico de amplitud de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio. Las curvas obtenidas de cardiomiocitos control y tratados con MPs<sup>Shh+</sup> se superpusieron, aunque con un desvío hacia  $\text{Ca}^{2+}$  transitorios más bajos y acortamiento en MPs<sup>Shh+</sup>. Finalmente, se evaluó la sensibilización del miofilamento por  $\text{Ca}^{2+}$  en cardiomiocitos de piel en Tritón-X100<sup>21</sup>. Como se muestra en la Figura 3C-D, las relaciones tensión-pCa demostraron una sensibilización similar por  $\text{Ca}^{2+}$  del miofilamento ( $p\text{Ca}_{50} = 5,91 \pm 0,03$  y  $5,87 \pm 0,03$  en el control y en condiciones de MPs<sup>Shh+</sup>, respectivamente,  $n=12$  por condición). Se observó un ligero aumento en la tensión activa máxima bajo tratamiento con MPs<sup>Shh+</sup> para pCa por encima de 5,5. En conjunto, esto apoya la hipótesis de que la reducción en el acortamiento celular por N-Shh y MPs<sup>Shh+</sup> es la consecuencia de una señalización reducida de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Luego se evaluó el efecto de N-Shh y MPs<sup>Shh+</sup> sobre el principal activador de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  cardiaco, es decir, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $I_{\text{CaL}}$ , Figura 3E, F) que se sabe está modulada por NO<sup>27</sup>. La cativación de la ruta Shh no afectó a  $I_{\text{CaL}}$  medida en condiciones de bloqueo de voltaje. Finalmente, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SR) medida como el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio medido después de una aplicación rápida de cafeína 10 mmol/l fue similar en células control y en células incubadas con o bien N-Shh o MPs<sup>Shh+</sup>, (relación F405/F480 = 0,38  $\pm$  0,02 ( $n=63$ ), 0,37  $\pm$  0,02 ( $n=24$ ) y 0,36  $\pm$  0,02 ( $n=36$ ) respectivamente) lo que sugiere que la ruta Shh podría no interferir directamente con el compartimento SR.

Efecto de la ruta Shh en el potencial de acción

La amplitud de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio y contracción celular están directamente moduladas por la forma de la onda del potencial de acción como resultado de los cambios en  $I_{\text{CaL}}$ <sup>28</sup>. Los cardiomiocitos pre-incubados con N-Shh exhibieron una duración de potencial de acción (APD) más corta comparada con cardiomiocitos control (Figura 4AB).

Se ha descrito recientemente que la ruta NO/cGMP activa el canal de potasio dependiente de ATP (K-ATP) en ausencia de reducción de ATP<sup>29-31</sup>. Curiosamente, la aplicación aguda de glibenclamida, el bloqueante selectivo y específico de los canales de K-ATP<sup>32</sup>, previno la reducción de APD inducida por N-Shh, aunque no tenía efecto en ausencia de tratamiento con N-Shh (Figura 4B). Además, el bloqueo de la ruta NO/cGMP por L-NNA y ODQ, mitigaron respectivamente el efecto de N-Shh. Se realizaron experimentos electrofisiológicos adicionales para caracterizar la corriente de K<sup>+</sup> sensible a glibenclamida en condición de bloqueo de voltaje. Se registraron las corrientes de K<sup>+</sup> antes y después de la incubación con glibenclamida<sup>32</sup> y se midió la diferencia de corriente que refleja la corriente K-ATP (I<sub>KATP</sub>, Figura 4C) al final del pulso para generar la relación de corriente voltaje (Figura 4D). Esta corriente estaba ausente en la condición control (Figura 4C-E), pero se desencadenaba en presencia de N-Shh y se bloqueaba tanto por L-NNA como por ODQ. Para corroborar estos experimentos, se realizó una simulación numérica en ausencia y presencia de una corriente rectificadora interna adicional de potasio (véase la sección de Métodos) ajustada empíricamente a los resultados experimentales que mejor imitan la corriente inducida por Shh registrada mediante sustracción antes y después de la aplicación de glibenclamida (Figura 5A). La adición de conductancia de K<sup>+</sup> rectificadora interna redujo la duración del potencial de acción (Figura 5B) así como el Ca<sup>2+</sup> transitorio (Figura 5D) en la misma medida que se observa experimentalmente. Esto estaba acompañado por un aumento en la amplitud I<sub>CaL</sub> (Figura 5C) pero una reducción en la cantidad neta de Ca<sup>2+</sup> que entra en la célula (4,38 E<sup>10</sup> frente a 3,97 E<sup>10</sup> iones de Ca<sup>2+</sup> en el control y en Shh respectivamente) debido a una corriente de Ca<sup>2+</sup> más corta y que da como resultado una reducida liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup> como se informó previamente<sup>28</sup>. Esto demuestra que la reducción en el Ca<sup>2+</sup> transitorio provocada por la ruta Shh en ausencia de un efecto directo sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L, da como resultado la activación de I<sub>KATP</sub> y una reducción posterior en APD.

Dicha reducción en la APD debería afectar al ECG registrado *in vivo* y más precisamente al intervalo QT. De hecho, los ECGs se registraron durante 6 horas después de la inyección de N-Shh y MP<sup>s<sup>Shh</sup></sup> ECGs en animales libres en vigilia. Se observó una reducción significativa en el intervalo QTc 6 horas después de la inyección (Figura 6). Este efecto era idéntico cuando los animales se pre-trataron con hexametonio, un antagonista del receptor nicotínico nACh que actúa sobre los receptores en los sitios pre-ganglionares tanto en el sistema nervioso simpático como en el parasimpático y por lo tanto inhibe la regulación cardíaca por el sistema nervioso autónomo. Sin embargo, esta reducción en el intervalo QT se previno tanto bloqueando *in vivo* la corriente I<sub>KATP</sub> con glibenclamida como inhibiendo la ruta de señalización Shh con ciclopamina (Figura 6). El agrandamiento de QT se correlaciona *in vivo* con la aparición de arritmias ventriculares. Esto ocurre en situaciones patofisiológicas como la isquemia-reperusión, que exhibe rápidamente después de la reperusión miocárdica una mayor frecuencia de arritmias ventriculares que pueden desencadenar taquicardia ventricular sostenida y muerte súbita. Para validar esta hipótesis, se sometieron ratas a 30 min de isquemia seguida de reperusión. Se registraron los ECGs continuamente antes de la isquemia y durante 24 h después de la reperusión (Figura 7). Como se informó anteriormente, se registró un agrandamiento del intervalo QT<sub>c</sub> después de la reperusión. Curiosamente, esto se abolió completamente cuando se trataron los animales con N-Shh antes de la reperusión. Es de señalar que se observó el efecto máximo del tratamiento con N-Shh después de 12 horas de reperusión. Sabiendo que se hace una sola inyección de N-Shh antes de la reperusión, se puede esperar que la pérdida progresiva del efecto observado después de 24 h podría ser debido a la pérdida de estimulación de la ruta de señalización Shh. No se pudo ver un efecto beneficioso de N-Shh en el intervalo QTc cuando se inyectó ciclopamina además de N-Shh (Figura 7). Además, las lesiones de la reperusión se evaluaron histológicamente a las 24 h después de la reperusión midiendo el área infartada en relación con el área de riesgo (Figura 8). Estos experimentos demostraron una clara reducción en el área infartada con N-Shh. Este efecto cardioprotector se abolió completamente por ciclopamina. Estos datos *in vivo* demuestran claramente el potente papel de la ruta de señalización Shh para proteger el miocardio frente a lesiones de reperusión después de un infarto agudo de miocardio.

#### 45 Ejemplo 2: Efecto cardioprotector de la ruta de señalización Shh

Las ratas se sometieron a 30 min de isquemia seguida de reperusión. Las lesiones por reperusión se evaluaron histológicamente a las 24 h después de la reperusión midiendo el área infartada en relación con el área de riesgo (Figura 9). Quince minutos antes de la reperusión, un grupo de ratas recibió inyección intravenosa (iv) del ligando homólogo de Shh recombinante (N-ShhH, 25 µg.kg<sup>-1</sup>), el segundo grupo recibió N-Shh y el antagonista del receptor de Shh (patch/smoothened) ciclopamina (N-Shh + Ccl, 30 µmol/l) y el tercero el vehículo (control). Estos experimentos demostraron una reducción significativa del área infartada con tratamiento N-Shh. El efecto cardioprotector de N-Shh se previno completamente por ciclopamina. Estos datos *in vivo* demuestran el potente papel de la ruta de señalización Shh para proteger el miocardio contra lesiones de reperusión después de un infarto agudo de miocardio (AMI). Teniendo en cuenta que se observan los efectos cardioprotectores dentro de un corto periodo de tiempo después de la reperusión (es decir, <24 h), es poco probable que estén mediados por una neoangiogénesis y/o movilización de células progenitoras (Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Li M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R y Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. Nat Med. 2005; 11: 1197-204. Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T e Isner JM. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. Nat Med. 2001; 7: 706-11). Por lo tanto, se hipotetiza otro efecto pleiotrópico de Shh directamente sobre el tejido miocárdico.

Se evaluó el ECG registrado continuamente antes de la isquemia y durante 24 h después de la reperfusión en un animal en vigilia por telemetría (Figura 10). Después de la reperfusión, se observó un agrandamiento del intervalo QTc. Esto se previene en un animal tratado por una inyección única de N-Shh antes de la reperfusión, sin mayor efecto indeseable cardiodepresivo principal en la frecuencia sinusal. Es de notar que la significación de este efecto tiende a desaparecer después de 12 h probablemente debido a la eliminación del péptido y a la reversión de su efecto (Figura 10A, 10B). Cuando los animales se trataron simultáneamente con ambos, N-Shh y ciclopamina, la prevención del agrandamiento N-Shh se abolió (Figura 10A, 10B). El agrandamiento del intervalo QT se correlaciona *in vivo* con la aparición de arritmias ventriculares y se usa comúnmente como indicador de taquiarritmias ventriculares y un factor de riesgo de muerte cardíaca súbita (Antzelevitch C, Shimizu W, Yang GX y Sicouri S. Cellular basis for QT dispersion. *Journal of electrocardiology*, 1998; 30 Suppl: 168-75; Hlaing T, DiMino T, Kowey PR y Yang GX. ECG repolarization waves: their génesis and clinical implications. *Annals of noninvasive electrocardiology: the official journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc.* 2005; 10: 211-23.). De hecho, el tratamiento con N-Shh redujo significativamente el número de eventos arrítmicos ventriculares medidos en la reperfusión (Figura 10C-D). Este efecto beneficioso de Shh es abolido de nuevo por ciclopamina. En conjunto, estos experimentos demuestran un efecto cardioprotector directo de la ruta Shh en el miocardio a través de una regulación electrofisiológica.

Los presentes ejemplos demuestran primero un nuevo efecto cardioprotector de la ruta morfogenética Shh en un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión en ratas. En segundo lugar, se investigaron los niveles celular y molecular y se propuso un mecanismo explicativo. Se informó previamente que la señalización Shh juega un papel importante en la cardiomiogénesis durante el desarrollo embrionario. La restauración de esta señalización en ratas adultas después de un infarto de miocardio mejora la reparación cardíaca aumentando la neovascularización, reduciendo la fibrosis y la apoptosis cardíaca (Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Li M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, van Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R y Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissues repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med.* 2005; 11: 1197-204.). Recientemente se ha demostrado que la estimulación de Shh en la superficie de la membrana de los cardiomiocitos era capaz de aumentar la expresión de citoquinas angiogénicas que median la angiogénesis después del infarto de miocardio. Los presentes Ejemplos demuestran que la activación de la ruta Shh previa a la reperfusión mediante una inyección única de cualquiera de N-Shh o MPs<sup>Shh+</sup>, reduce el tamaño del infarto y las arritmias de reperfusión a través de una prevención del agrandamiento de QT. En varios estudios, la prolongación del intervalo QT se ha asociado con un riesgo aumentado de muerte cardíaca súbita después de un infarto agudo de miocardio en pacientes tanto a corto como a largo plazo. Ahora está bien admitido que la reducción del intervalo QT y la variabilidad del intervalo QT después de la reperfusión, es beneficiosa e indicativa de una reperfusión satisfactoria en pacientes sometidos a angioplastia coronaria percutánea primaria. En conclusión, los presentes Ejemplos muestran por primera vez un efecto protector directo de la ruta Shh contra AMI en el tejido cardíaco. En conjunto, estos efectos pleiotrópicos de Shh contribuyen a la cardioprotección actuando simultáneamente sobre diferentes dianas.

**Referencias:**

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan por la presente por referencia en la presente descripción.

- 5 1. Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H, Jessel TM. Two critical periods of sonic hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*. 1996; 87: 661-673.
2. Marigo V, Tabin CJ. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 9346-9351.
3. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*. 1995; 82: 803-814.
- 10 4. Wilson GN. Correlated heart/limb anomalies in mendelian syndromes provide evidence for a cardiomeic developmental field. *Am J Med Genet*. 1998; 76: 297-305.
5. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor gli1 and the sonic hedgehog signaling pathway in skin tumours. *Nature*. 1997; 389: 876-881.
- 15 6. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003; 425: 851-856.
7. Gianakopoulos PJ, Skerjanc IS. Hedgehog signaling induces cardiomyogenesis in p19 cells. *J Biol Chem*. 2005; 280: 21022-21028.
- 20 8. Lin L, Bu L, Cai CL, Zhang X, Evans S. Is11 is upstream of sonic hedgehog in a pathway required for cardiac morphogenesis. *Dev Biol*. 2006; 295: 756-763.
9. Lavine KJ, Long F, Choi K, Smith C, Ornitz DM. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development*. 2008; 135: 3161-3171.
10. Goddeeris MM, Pho S, Petiet A, Davenport CL, Johnson GA, Meyers EN, Klingensmith J. Intracardiac septation requires hedgehog-dependent cellular contributions from outside the heart. *Development*. 2008; 135: 1887-1895.
- 25 11. Thomas NA, Koudijs M, van Eeden FJ, Joyner AL, Yelon D. Hedgehog signaling plays a cell-autonomous role in maximizing cardiac developmental potential. *Development*. 2008; 135: 3789-3799.
12. Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: Tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med*. 2005; 11: 1197-1204.
- 30 13. Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM. The morphogen sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*. 2001; 7: 706-711.
14. Lavine KJ, Kovacs A, Ornitz DM. Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118: 2404-2414.
- 35 15. Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, Oka T, Miyazaki M, Nakaya H, Komuro I. Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120: 2016-2029.
16. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J*. 2007; 21: 2735-2741.
- 40 17. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microparticles carrying sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One*. 2010; 5: e12688.
18. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, Freyssinet JM. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*. 2006; 108: 3012-3020.
- 45 19. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: Targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32: 659-665.

- Soleti R., Benameur T., Porro C., Panaro M.A., Andriantsitohaina R., Martinez M.C. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the up-regulation of adhesion proteins and pro-angiogenic factors. *Carcinogenesis* 2009; 30: 580-588.
- 5 Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contributes to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 2012; 53: 2159-2170.
19. Riobo NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP, Jr. Phosphoinositide 3-kinase and akt are essential for sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 4505-4510.
- 10 20. Mutoh A, Isshiki M, Fujita T. Aldosterone enhances ligand-stimulated nitric oxide production in endothelial cells. *Hypertens Res.* 2008; 31: 1811-1820.
21. Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *Faseb J.* 2005; 19: 88-90.
22. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The camp binding protein epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 14144-14149.
- 15 23. Pandit SV, Clark RB, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of action potential heterogeneity in adult rat left ventricular myocytes. *Biophys J.* 2001; 81: 3029-3051.
24. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the hedgehog receptor. *Nature.* 1996; 384: 176-179.
- 20 25. Deneff N, Neubuser D, Perez L, Cohen SM. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell.* 2000; 102: 521-531.
26. Esposito G, Santana LF, Dilly K, Cruz JD, Mao L, Lederer WJ, Rockman HA. Cellular and functional defects in a mouse model for heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H3101-3112.
27. Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J. Mol Cell Cardiol.* 2003; 35: 719-729.
28. Bouchard RA, Clark RB, Giles WR. Effects of action potential duration on excitation-contraction in rat ventricular myocytes. Action potential voltage-clamp measurements. *Circ Res.* 1995; 76: 790-801.
- 25 29. Chai Y, Lin YF. Dual regulation of the atp-sensitive potassium channel by activation of cgmp-dependent protein kinase. *Pflugers Arch.* 2008; 456: 897-915.
30. Chai Y, Lin YF. Stimulation of neuronal katp channels by cgmp-dependent protein kinase: Involvement of ros and 5-hydroxydecanoate-sensitive factors in signal transduction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298: C875-892.
- 30 31. Galdino GS, Cortes SF, Duarte ID, Perez AC. Involvement of the nitric oxide/(c)gmp/k(atp) pathway in antinociception induced by exercise in rats. *Life Sci.* 2010; 86: 505-509.
32. Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 9-33.
- 35 33. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA. Effects of oncogenic mutations in smoothened and patched can be reversed by cyclopamine. *Nature.* 2000; 406: 1005-1009.
34. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothened. *Genes Dev.* 2002; 16: 2743-2748.
35. Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E. Low increase in cgmp induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Cir Res.* 1996; 78: 91-101.
- 40 36. Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol.* 1993; 265: H176-182.
37. Ziolo MT, Katoh H, Bers DM. Positive and negative effects of nitric oxide on ca(2+) sparks: Influence of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H2295-2303.
- 45 38. Layland J, Li JM, Shah AM. Role of cyclic gmp-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 2002; 540: 457-467.
39. Paulus WJ, Vantrimpont PJ, Shah AM. Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion. *Circulation.* 1994; 89: 2070-2078.

40. Gonzalez DR, Fernandez IC, Ordenes PP, Treuer AV, Eller G, Boric MP. Differential role of s-nitrosylation and the no-cgmp-pkg pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide*. 2008; 18: 157-167.

41. Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. Muscle katp channels: Recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev*. 2010; 90: 799-829.

5 42. Zhang H, Flagg TP, Nichols CG. Cardiac sarcolemmal k(atp) channels: Latest twists in a questing tale! *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48: 71-75.

Referencias suplementarias:

1. Cazorla O, Szilagyí S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *Faseb J*. 2005; 19: 88-90.

10 2. Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, Freyssinet JM. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*. 2006; 108: 3012-3020.

3. Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The camp binding protein epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 14144-14149.

15 4. Bondarenko VE, Szigetí GP, Bett GC, Kim SJ, Rasmusson RL. Computer model of action potential of mouse ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 2004; 287(3): H1378-H1403.

5. Garry A, Kohl P, Hunter PJ, Boyett MR, Noble D. One-dimensional rabbit sinoatrial node models: Benefits and limitations. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003; 14: S121-132.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS PARA LA CARDIOPROTECCIÓN

5 <130> BIO11321 LACAMPAGNE / MC

<160> 1

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 462

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Leu Leu Ala Arg Cys Leu Leu Leu Val Leu Val Ser Ser Leu  
 1 5 10 15

Leu Val Cys Ser Gly Leu Ala Cys Gly Pro Gly Arg Gly Phe Gly Lys  
 20 25 30

Arg Arg His Pro Lys Lys Leu Thr Pro Leu Ala Tyr Lys Gln Phe Ile  
 35 40 45

Pro Asn Val Ala Glu Lys Thr Leu Gly Ala Ser Gly Arg Tyr Glu Gly  
 50 55 60

Lys Ile Ser Arg Asn Ser Glu Arg Phe Lys Glu Leu Thr Pro Asn Tyr  
 65 70 75 80

Asn Pro Asp Ile Ile Phe Lys Asp Glu Glu Asn Thr Gly Ala Asp Arg  
 85 90 95

Leu Met Thr Gln Arg Cys Lys Asp Lys Leu Asn Ala Leu Ala Ile Ser  
 100 105 110

Val Met Asn Gln Trp Pro Gly Val Lys Leu Arg Val Thr Glu Gly Trp  
 115 120 125

Asp Glu Asp Gly His His Ser Glu Glu Ser Leu His Tyr Glu Gly Arg  
 130 135 140

Ala Val Asp Ile Thr Thr Ser Asp Arg Asp Arg Ser Lys Tyr Gly Met  
 145 150 155 160

Leu Ala Arg Leu Ala Val Glu Ala Gly Phe Asp Trp Val Tyr Tyr Glu  
 165 170 175

ES 2 667 814 T3

Ser Lys Ala His Ile His Cys Ser Val Lys Ala Glu Asn Ser Val Ala  
 180 185 190

Ala Lys Ser Gly Gly Cys Phe Pro Gly Ser Ala Thr Val His Leu Glu  
 195 200 205

Gln Gly Gly Thr Lys Leu Val Lys Asp Leu Ser Pro Gly Asp Arg Val  
 210 215 220

Leu Ala Ala Asp Asp Gln Gly Arg Leu Leu Tyr Ser Asp Phe Leu Thr  
 225 230 235 240

Phe Leu Asp Arg Asp Asp Gly Ala Lys Lys Val Phe Tyr Val Ile Glu  
 245 250 255

Thr Arg Glu Pro Arg Glu Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ala His Leu Leu  
 260 265 270

Phe Val Ala Pro His Asn Asp Ser Ala Thr Gly Glu Pro Glu Ala Ser  
 275 280 285

Ser Gly Ser Gly Pro Pro Ser Gly Gly Ala Leu Gly Pro Arg Ala Leu  
 290 295 300

Phe Ala Ser Arg Val Arg Pro Gly Gln Arg Val Tyr Val Val Ala Glu  
 305 310 315 320

Arg Asp Gly Asp Arg Arg Leu Leu Pro Ala Ala Val His Ser Val Thr  
 325 330 335

Leu Ser Glu Glu Ala Ala Gly Ala Tyr Ala Pro Leu Thr Ala Gln Gly  
 340 345 350

Thr Ile Leu Ile Asn Arg Val Leu Ala Ser Cys Tyr Ala Val Ile Glu  
 355 360 365

Glu His Ser Trp Ala His Arg Ala Phe Ala Pro Phe Arg Leu Ala His  
 370 375 380

Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ala Pro Ala Arg Thr Asp Arg Gly Gly Asp  
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg Val Ala Leu Thr  
 405 410 415

Ala Pro Gly Ala Ala Asp Ala Pro Gly Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ile  
 420 425 430

His Trp Tyr Ser Gln Leu Leu Tyr Gln Ile Gly Thr Trp Leu Leu Asp  
 435 440 445

Ser Glu Ala Leu His Pro Leu Gly Met Ala Val Lys Ser Ser  
 450 455 460

**REIVINDICACIONES**

1. Un ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar en un método para reducir arritmias y el intervalo QT en un sujeto que experimentó un infarto de miocardio en donde el ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog es un polipéptido sonic hedgehog.
- 5 2. El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende el dominio de señalización de la proteína sonic hedgehog.
3. El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar de acuerdo con la reivindicación 1 que es un polipéptido soluble.
- 10 4. El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polipéptido sonic hedgehog comprende la secuencia que va desde el residuo de aminoácido en la posición 1 al residuo de aminoácido en la posición 197 en SEQ ID NO: 1 o una variante de función conservativa de la misma que tiene al menos un 90% de identidad con dicha secuencia.
5. El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polipéptido sonic hedgehog se fusiona a una porción Fc de un anticuerpo.
- 15 6. El ligando de la ruta de señalización sonic hedgehog para usar de acuerdo con la reivindicación 1 que es llevado por una micropartícula.

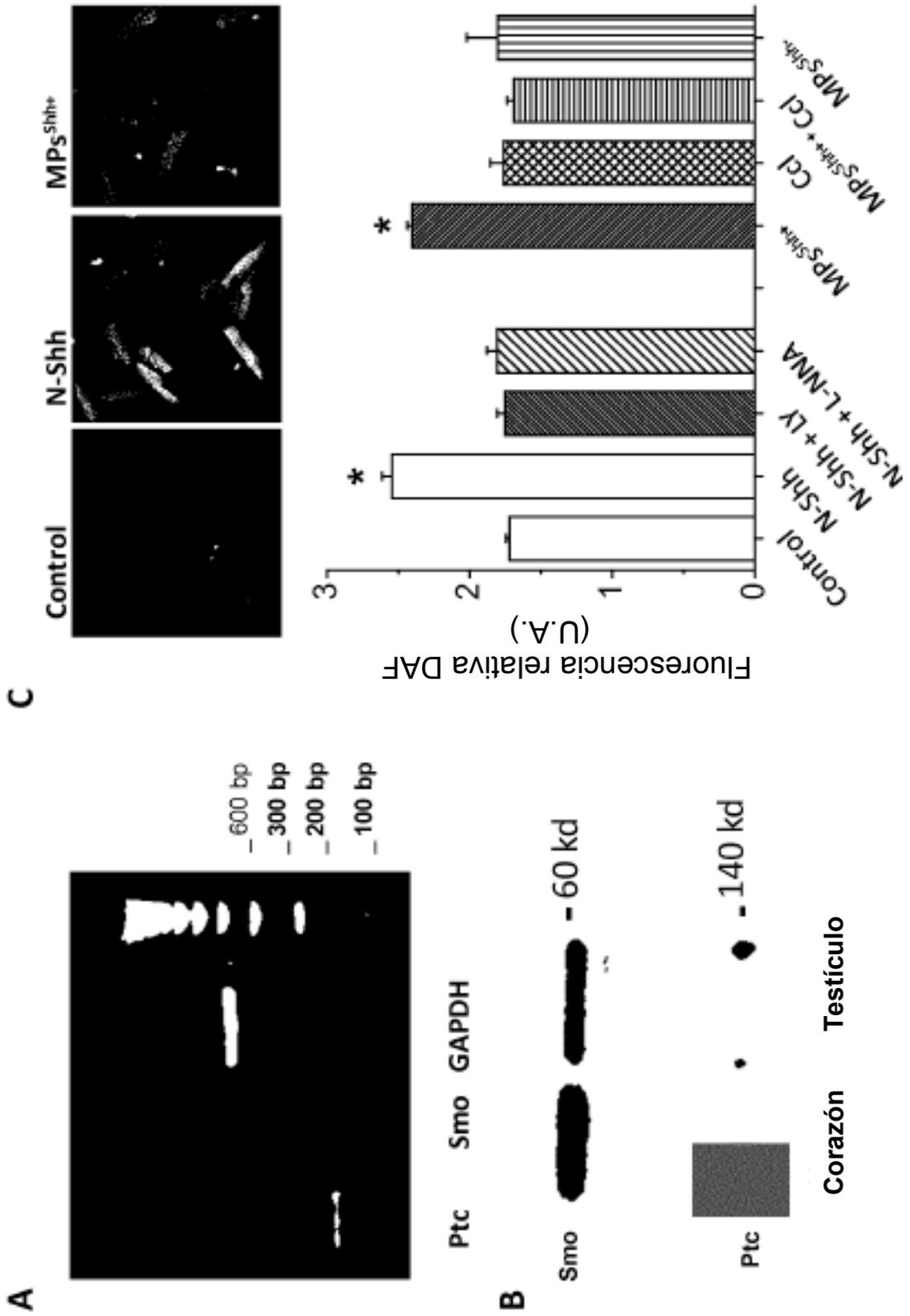


Figura 1

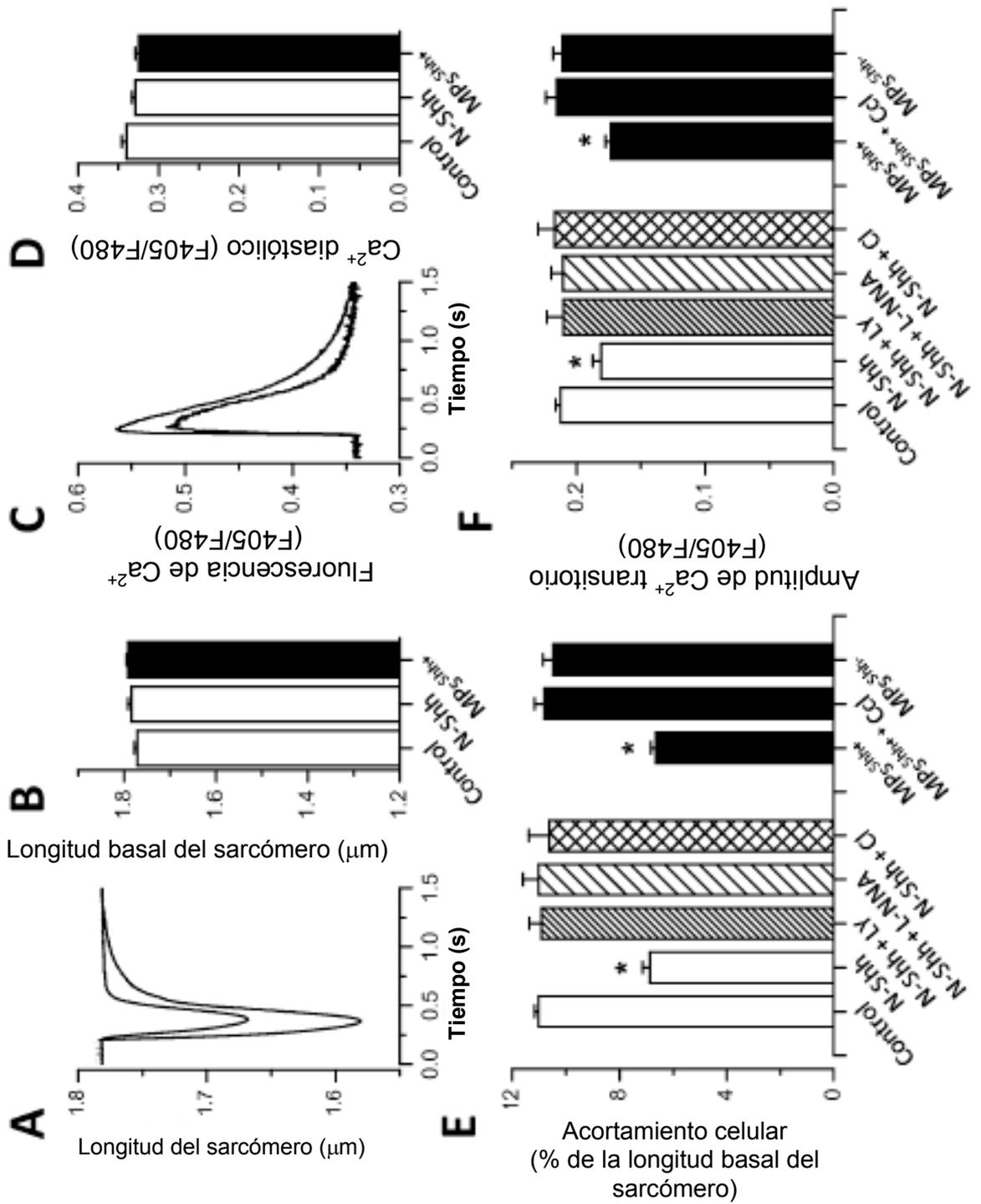


Figura 2

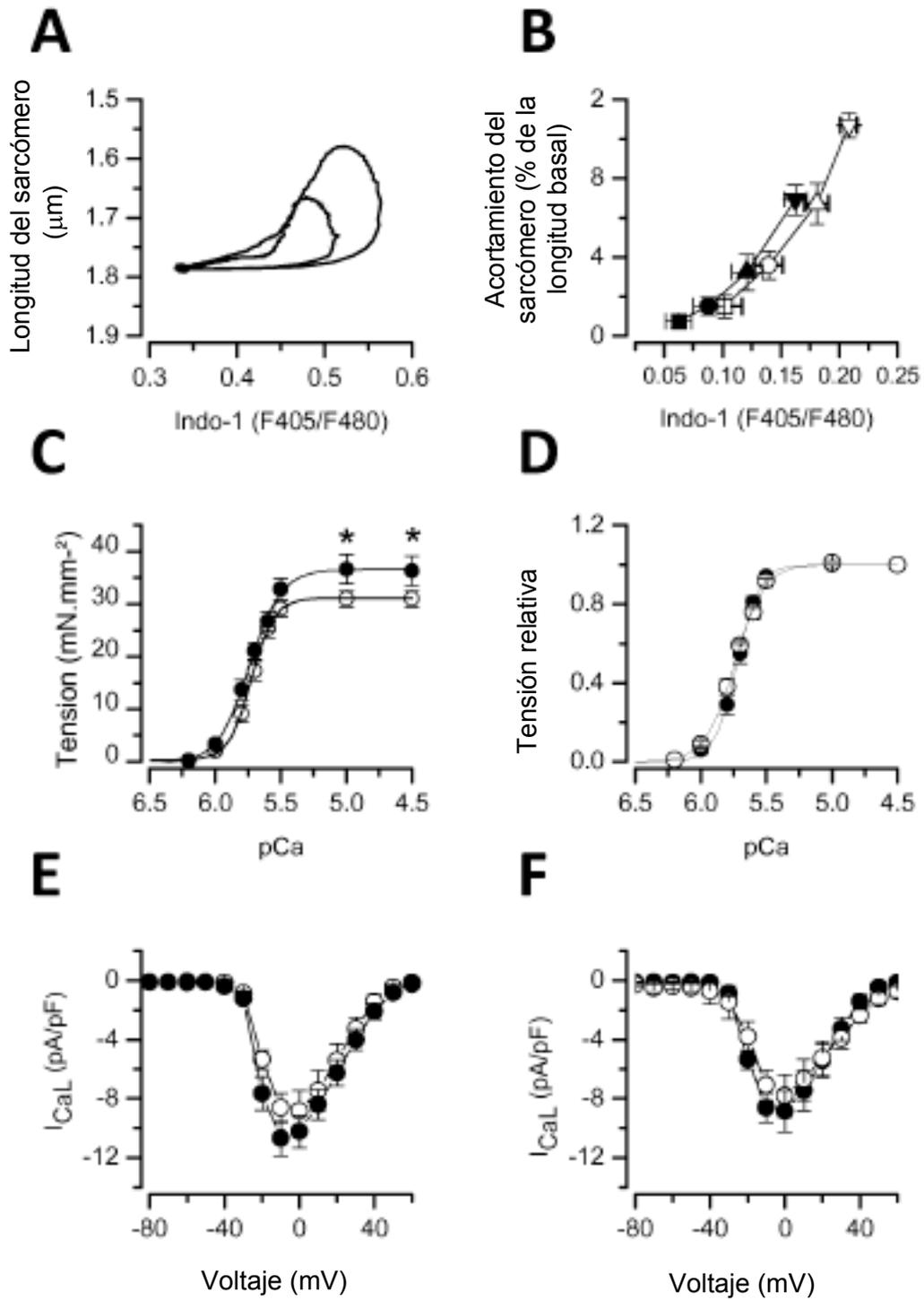


Figura 3

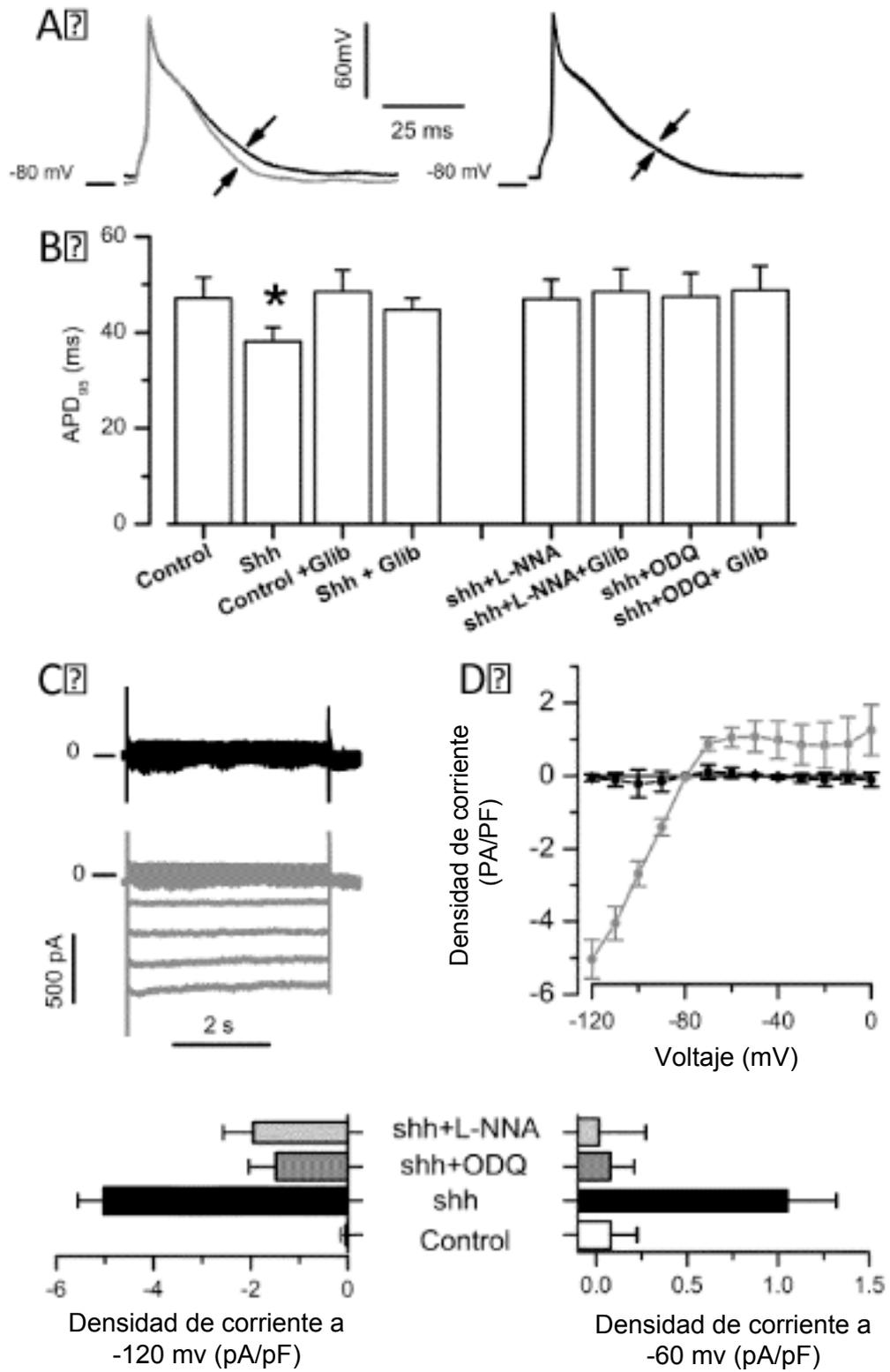


Figura 4

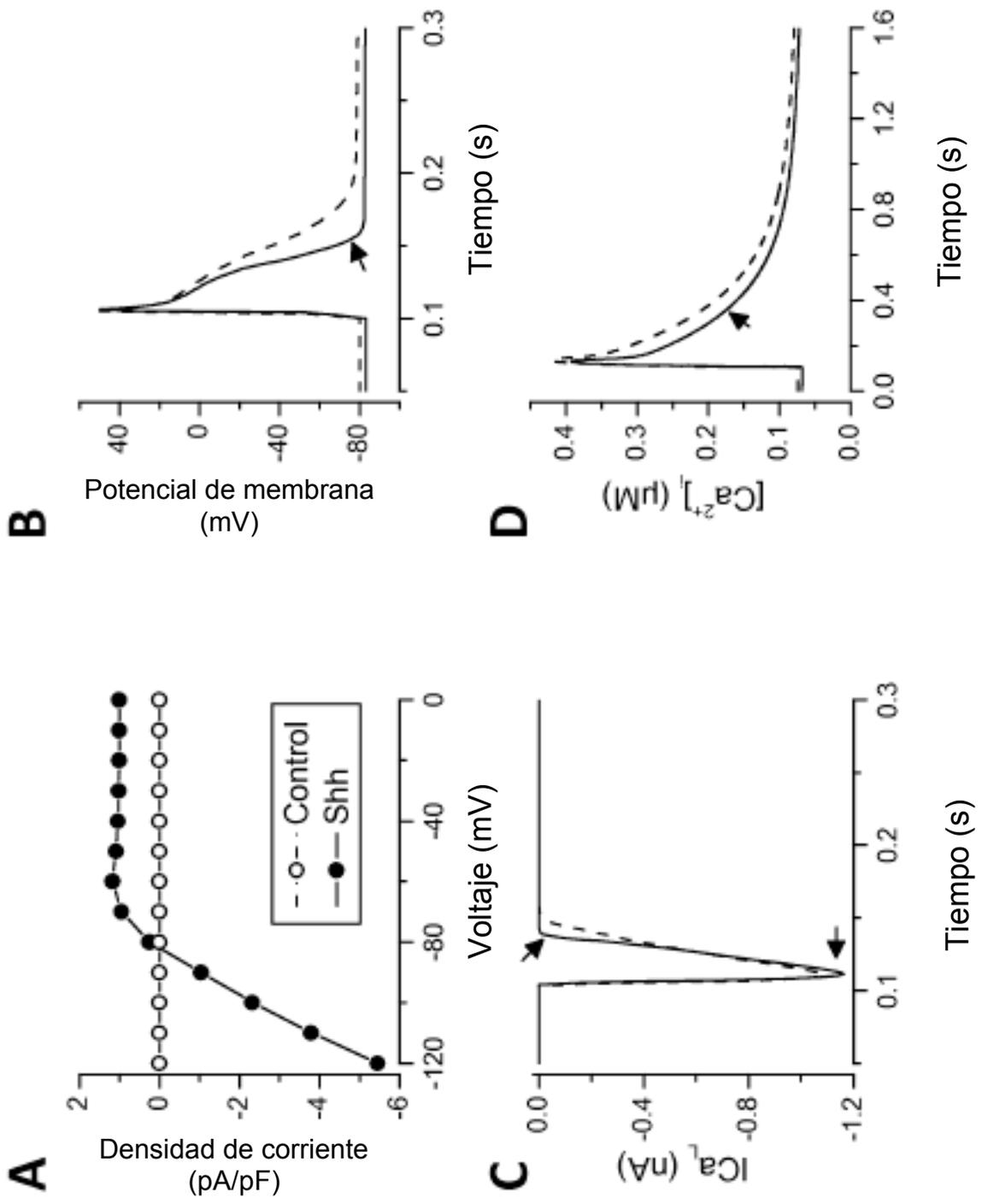


Figura 5

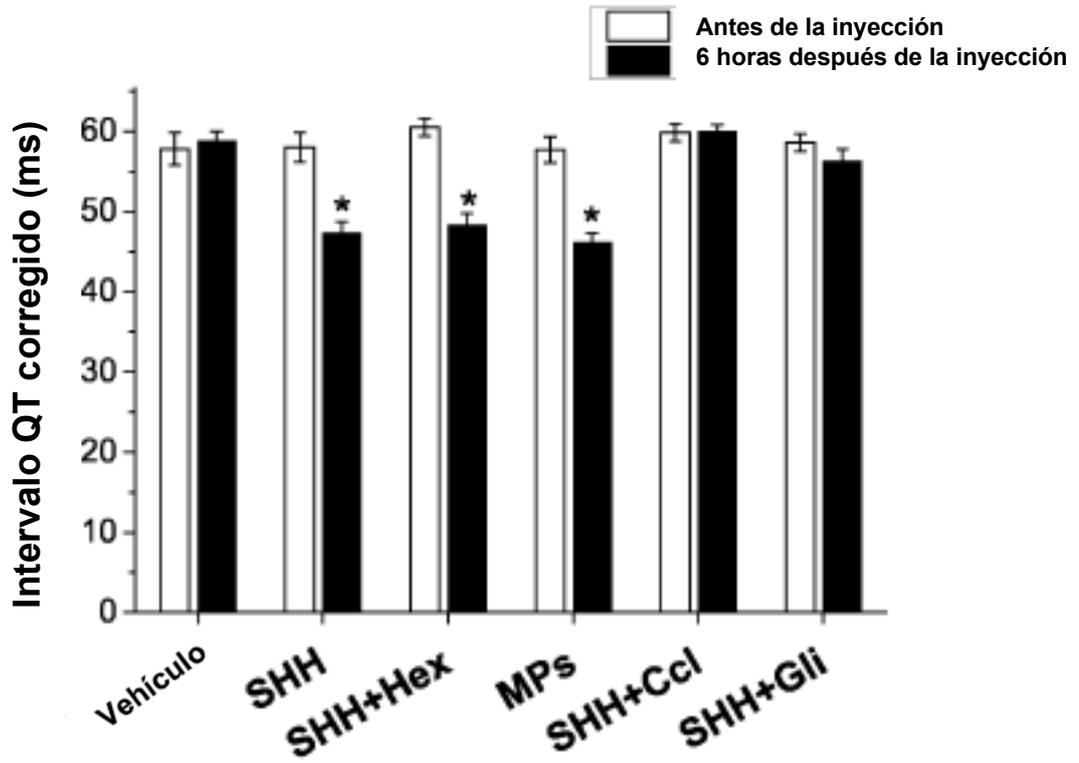


Figura 6

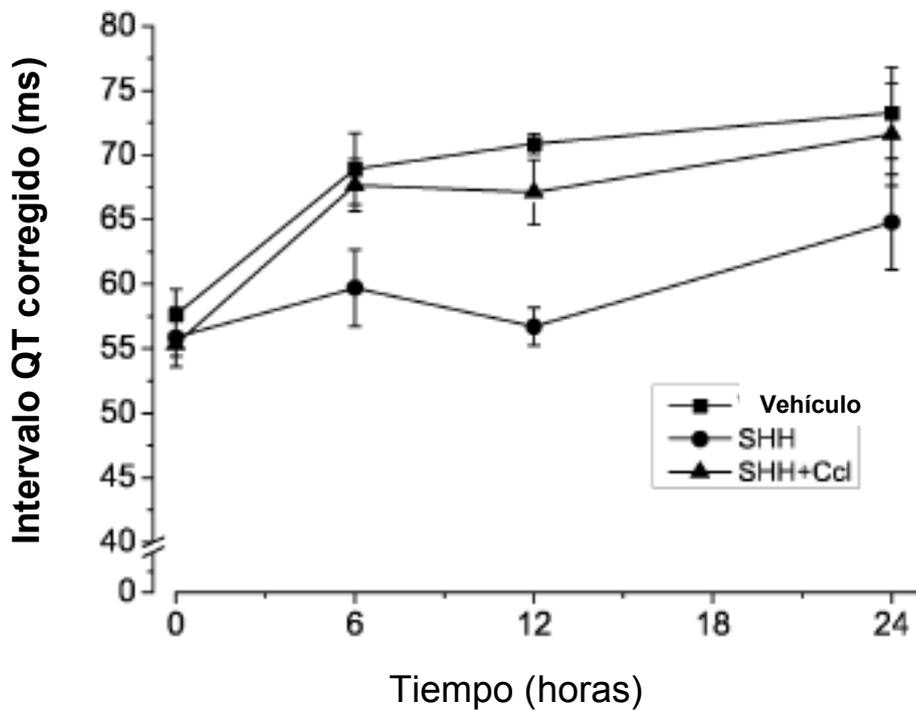


Figura 7

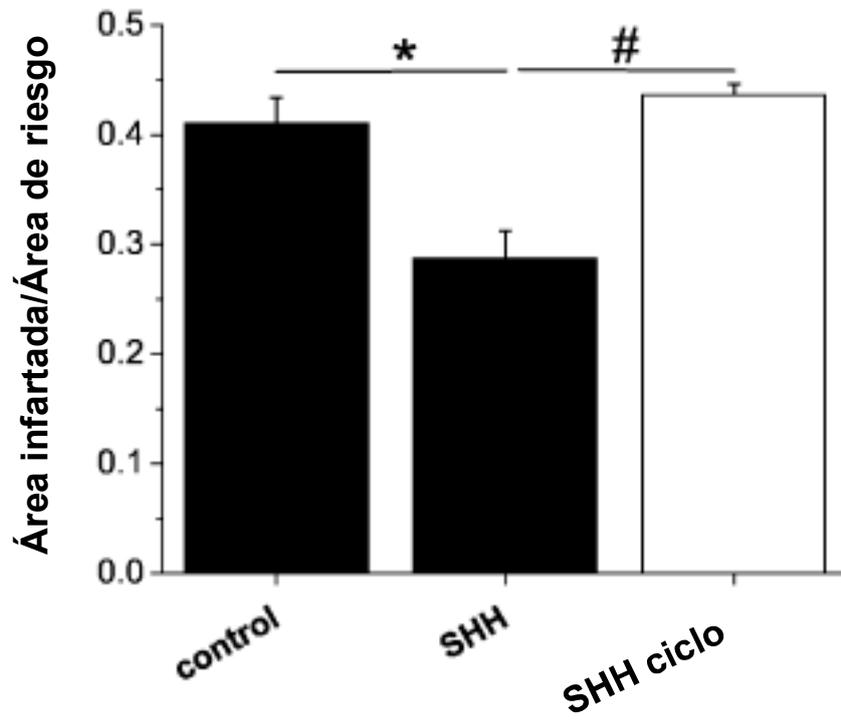


Figura 8

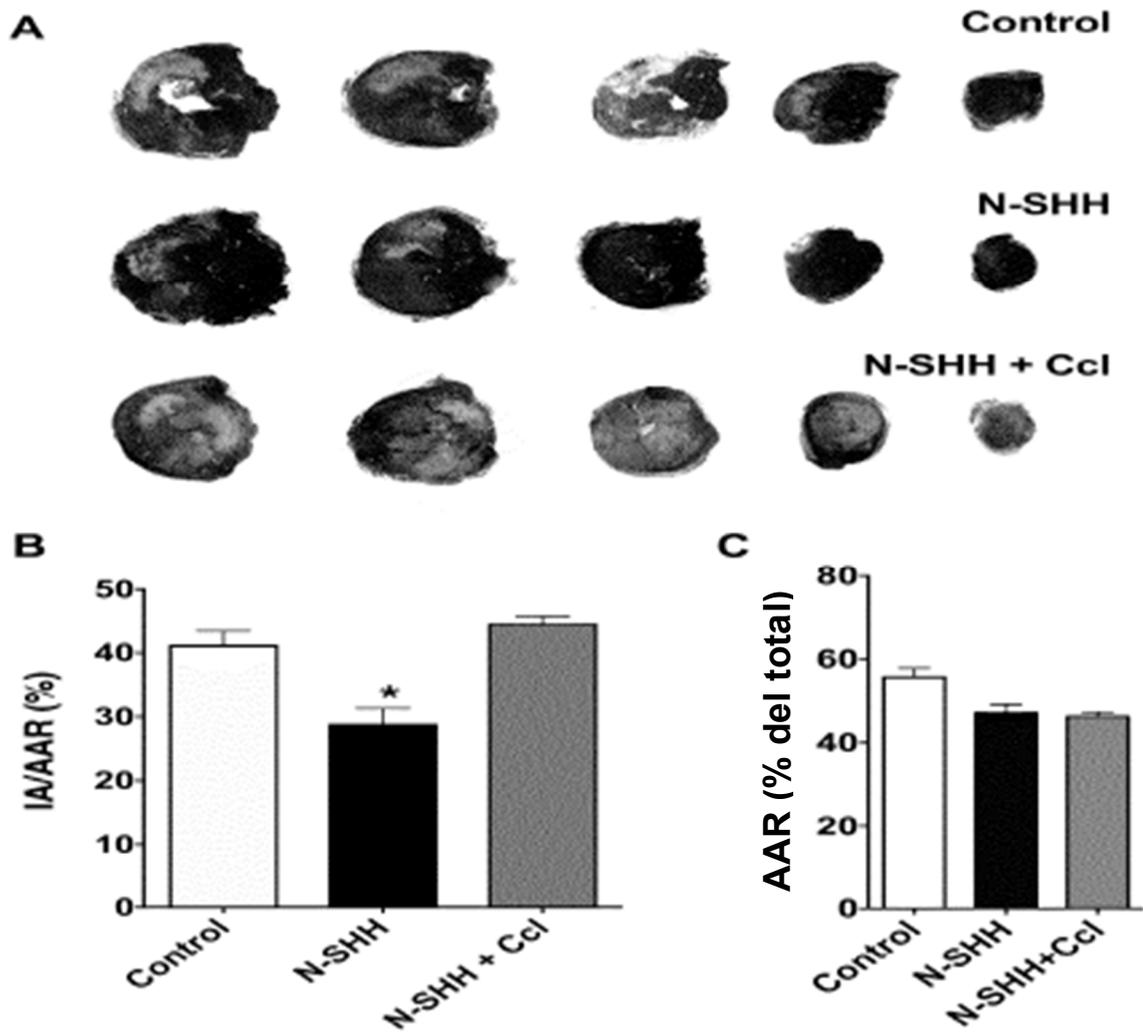


Figura 9

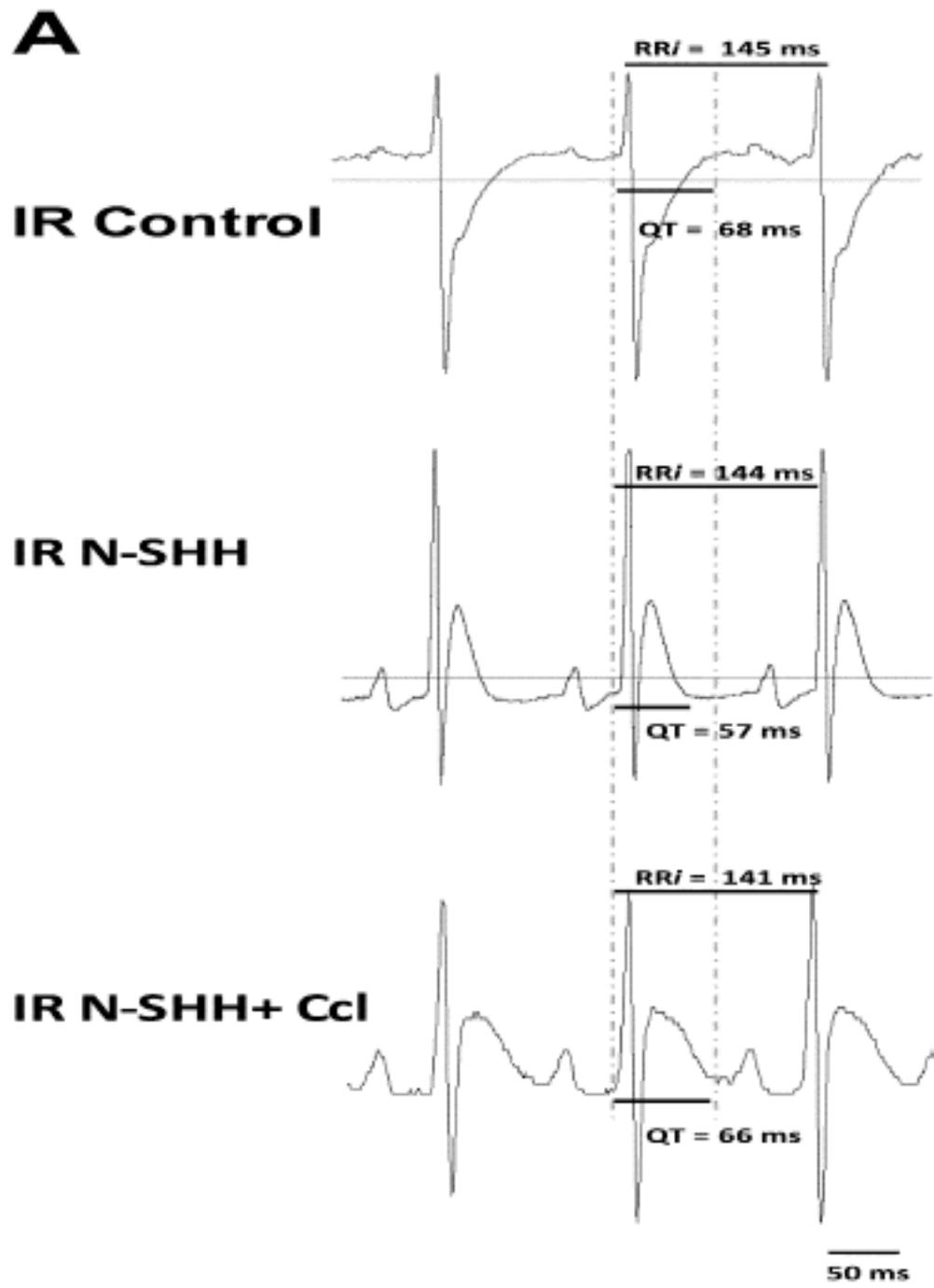


Figura 10A

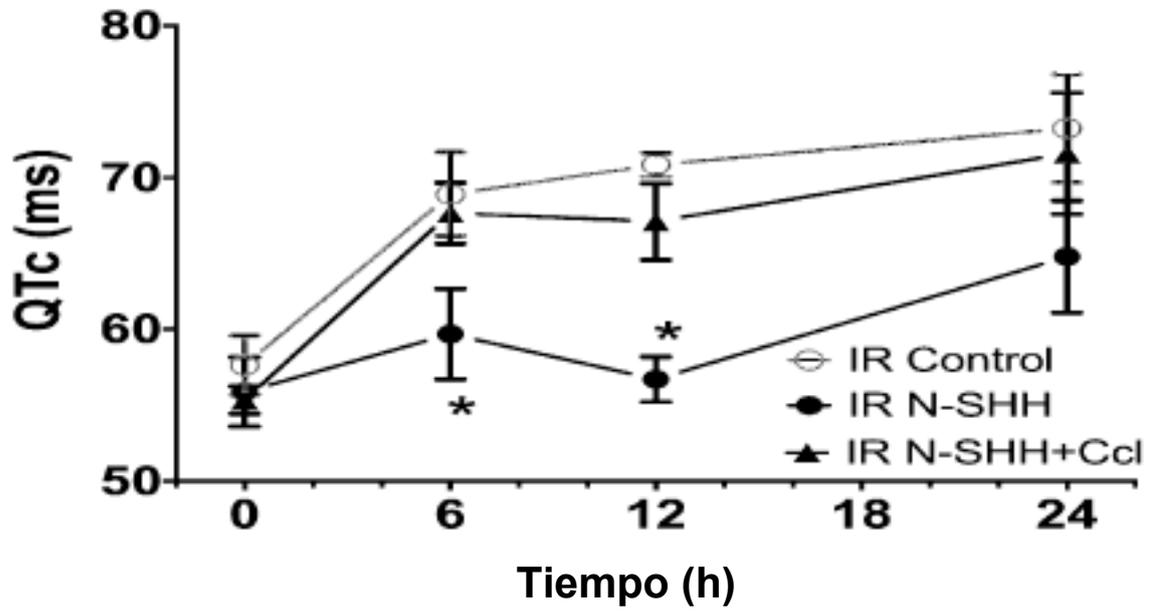


Figura 10B

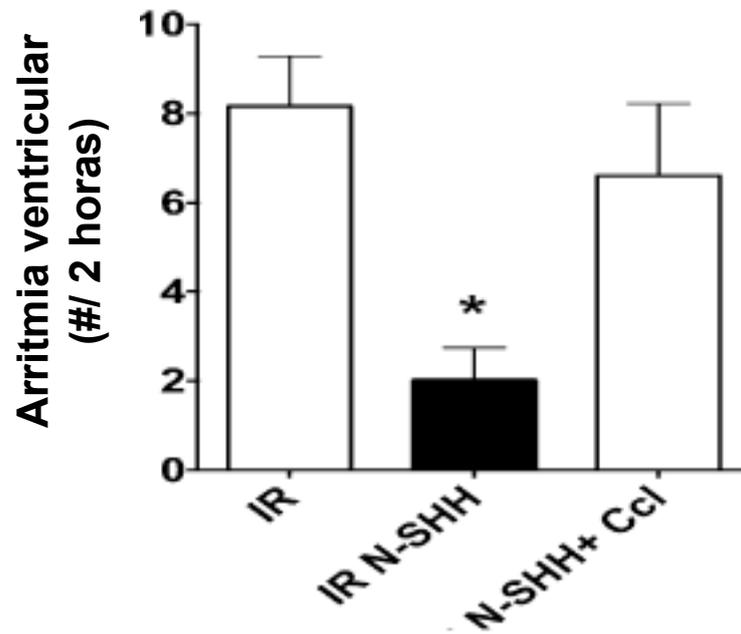
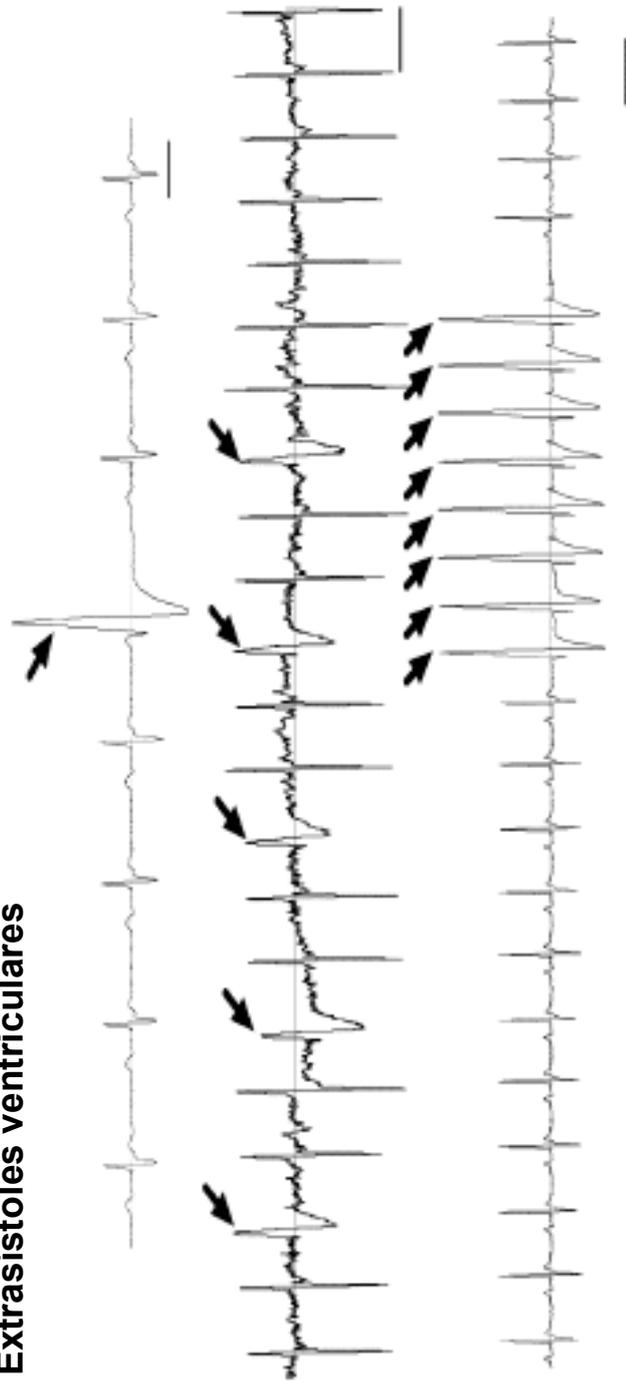


Figura 10C

**Extrasístoles ventriculares**



**Figura 10D**