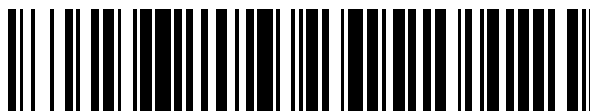


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 450**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2011 PCT/NL2011/050311**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12057613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2011 E 11720206 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2632950**

54 Título: **Unión de anticuerpos a fibronectina-EDA para prevenir las complicaciones relacionadas con el infarto de miocardio**

30 Prioridad:

**26.10.2010 US 406591 P**

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

**04.02.2019**

73 Titular/es:

**UMC UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)  
Yalelaan 40  
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**ARSLAN, FATIH;  
PASTERKAMP, GERARD y  
DE KLEIJN, DOMINICUS PASCHALIS VICTOR**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 698 450 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

Unión de anticuerpos a fibronectina-EDA para prevenir las complicaciones relacionadas con el infarto de miocardio

## 5 Campo de la invención

La presente invención está en el campo de la medicina, en particular en el campo de la cardiología. La invención proporciona un método para tratar, prevenir o prevenir la progresión de complicaciones relacionadas con infarto de miocardio o afecciones mediadas por remodelación ventricular adversa.

10

## Antecedentes de la invención

La cardiopatía isquémica es la mayor carga socioeconómica para las sociedades occidentales. Se convierte en un problema aún mayor en esta era de rápida modernización de países en desarrollo como China e India. La complicación más grave y aguda de la cardiopatía isquémica es un ataque al corazón, también conocido como infarto de miocardio. Solo en EE. UU., La UE y Japón, 2.4 millones de pacientes sufren un infarto de miocardio cada año <sup>1-3</sup>. La cantidad de dinero gastada en los EE. UU. y la UE solo para el tratamiento de la cardiopatía isquémica supera los 150.000 millones de euros cada año <sup>1,2</sup>. Desafortunadamente, las complicaciones relacionadas con el infarto están aumentando debido a que más pacientes sobreviven al infarto que amenaza la vida inicial, pero en el futuro tienen una función cardíaca cada vez peor. Las complicaciones después de un infarto de miocardio (IM), como insuficiencia cardíaca, fibrosis y arritmia, dan como resultado tasas de mortalidad y morbilidad elevadas. El determinante más importante de estas complicaciones es una respuesta inadecuada de reparación cardíaca, denominada remodelación adversa o remodelación ventricular adversa.

15

20

25

30

35

La insuficiencia cardíaca (IC) ha ganado mucha atención, ya que es la consecuencia más grave y más frecuente de la remodelación adversa después del infarto de miocardio. No es sin razón que la sociedad de cardiología más grande del mundo, la Sociedad Europea de Cardiología (ESC), declaró que "la insuficiencia cardíaca es la epidemia del siglo XXI en las sociedades occidentales" <sup>4</sup>. Solo en los EE. UU., La UE y Japón, al menos 1,8 millones de pacientes son hospitalizados con insuficiencia cardíaca relacionada con el infarto diagnosticada cada año <sup>1,2,5</sup>. La tasa de mortalidad es del 20% dentro de un año desde el diagnóstico, mientras que el 50% muere dentro de los 5 años <sup>6</sup>. La calidad de vida de quienes sobreviven se ve gravemente afectada, ya que sufren una disminución progresiva de la tolerancia al ejercicio y una menor capacidad para realizar las actividades diarias normales <sup>7</sup>. La carga socioeconómica es de casi € 60 mil millones anuales para los EE. UU. Y la UE solo <sup>1,2</sup>, como consecuencia de 1) la reducción de la tolerancia al ejercicio y la subsiguiente reducción de la productividad, 2) un tratamiento médico costoso que no es preventivo pero disminuye los síntomas y 3) estancias hospitalarias.

40

La terapia actual para el infarto de miocardio tiene como objetivo restaurar el flujo sanguíneo a través de la arteria coronaria ocluida. Los antitrombóticos (es decir, la prevención de la formación de coágulos de sangre) junto con los stents son las clases de medicamentos y dispositivos más importantes para optimizar la restauración del flujo sanguíneo después de un infarto de miocardio. A pesar de estos avances en la optimización del flujo sanguíneo, las complicaciones relacionadas con el infarto todavía ocurren y están aumentando. La razón principal es el hecho de que la remodelación adversa es un proceso fisiopatológico completamente diferente a la restauración del flujo sanguíneo.

45

50

55

60

La curación del corazón infartado es un proceso muy complejo que involucra muchos tipos de células <sup>8</sup>. El infarto de miocardio es un evento agudo en el que parte del músculo cardíaco muere y se pierde la función de la bomba. Inmediatamente después de este evento agudo, se inducen procesos de reparación en la sangre y el músculo cardíaco caracterizado por una inflamación aumentada. Sin embargo, el tipo de inflamación determina si el corazón infartado se repara y remodela adecuadamente. El factor clave que impulsa una curación inadecuada y una inflamación perjudicial es la activación de la inmunidad innata por moléculas relacionadas con la muerte cardíaca y la degradación de la matriz. En muchos pacientes, el sistema inmunitario se activa de forma perjudicial, lo que resulta en una curación inadecuada del corazón después de un infarto de miocardio. En esos casos, el corazón entrará en un proceso llamado remodelación adversa del ventrículo afectado. La remodelación adversa tiene varias consecuencias perjudiciales: la insuficiencia cardíaca, la dilatación y la fibrosis del corazón, la contractilidad y relajación perturbadas y la activación eléctrica alterada son complicaciones conocidas. El aumento de la incidencia de morbilidad relacionada con el infarto, como la insuficiencia cardíaca, enfatiza la necesidad de nuevas terapias para mejorar la reparación cardíaca después del infarto. El principal determinante para que los leucocitos causen una reacción inflamatoria perjudicial es la deposición de fibronectina-EDA. Después del infarto de miocardio, la fibronectina-EDA se sintetiza nuevamente y se regula de forma transitoria en el miocardio infartado. La fibronectina-EDA puede activar el sistema inmunitario, lo que induce la migración de leucocitos al corazón infartado. Posteriormente, los leucocitos activados por la fibronectina-EDA inducen reacciones inflamatorias perjudiciales en el corazón en curación (Arslan. F. et al. Circ. Res., Mar 2011; 108: 582 - 592).

65

La fibronectina celular es una glicoproteína adhesiva multifuncional presente en la ECM y es producida por las células en respuesta a una lesión tisular como ocurre con el IM. Contiene un exón empalmado alternativamente que codifica el dominio extra A de repetición de tipo III (EIIIA; EDA), que actúa como un ligando endógeno para TLR2 y TLR4. Shimamoto et al. ha informado que la inhibición de TLR4 con eritoran reduce significativamente la lesión de isquemia-

5 reperfusión miocárdica (Shimamoto et al., Circulation, 2008; 114: 270-274). In vitro, la fibronectina-EDA induce la expresión de genes proinflamatorios y activa los monocitos. La inyección in vivo de fibronectina-EDA en las articulaciones murinas produce una inflamación aumentada. Por lo tanto, la fibronectina-EDA es capaz de activar los leucocitos y causar una regulación al alza de citoquinas y quimioquinas. Recientemente se demostró que los ratones modificado para la EDA de fibronectina mostraron una fibrosis reducida, una función cardíaca preservada y una dilatación ventricular reducida en comparación con los ratones de tipo silvestre después de un infarto (Arslan F. et al. Circ. Res., Mar 2011; 108: 582 - 592). También se demostró recientemente que se evitó la remodelación cardíaca adversa en ratones modificado EDA de fibronectina en comparación con ratones de tipo silvestre después de un infarto de miocardio (Arslan R. et al. Circulation, noviembre de 2009; 120: S818-S819).

10 En el campo, se buscan intervenciones mejoradas para prevenir las complicaciones relacionadas con el IM, como la insuficiencia cardíaca.

15 Resúmen de la invención

Los presentes inventores han demostrado ahora que el tratamiento de ratones con anticuerpos dirigidos al dominio EDA de fibronectina-EDA previene la dilatación del ventrículo izquierdo en dichos ratones y mejora la supervivencia después de la IM.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG (SEQ ID NO: 2) del dominio EDA de fibronectina-EDA para tratar, prevenir o prevenir la progresión de una afección relacionada o resultante de un infarto de miocardio y/o remodelación cardíaca adversa. Dicha condición se selecciona del grupo que consiste en dilatación cardíaca, remodelación ventricular adversa, insuficiencia cardíaca; fibrosis miocárdica remota; aneurisma o rotura del ventrículo; regurgitación mitral, particularmente si el infarto es grande y es probable que cause dilatación ventricular grave; y arritmias, como la fibrilación ventricular y la taquicardia ventricular debidas al agrandamiento ventricular y la fibrosis. Preferiblemente, la afección se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca y fibrosis miocárdica remota. Dicha insuficiencia cardíaca puede ocurrir después de un infarto de miocardio.

30 El anticuerpo puede usarse adicionalmente para prevenir la fibrosis y/o para mejorar la función cardíaca.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo neutralizante, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado.

35 Descripción detallada de la invención

40 Los presentes inventores han demostrado que el tratamiento de ratones con anticuerpos monoclonales de ratón de las subclases IgG1 e IgG2a que reconocen el antígeno TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG (SEC ID NO: 2) ubicado en el dominio EDA de fibronectina-EDA impide la dilatación ventricular izquierda en ratones mencionados y mejora supervivencia después de IM. También se encontró que la remodelación cardíaca adversa en sujetos con infarto de miocardio agudo podría tratarse o prevenirse. Como se usa en este documento, el término "remodelación cardíaca adversa", "remodelación adversa" y "remodelación ventricular adversa" se usan de manera intercambiable.

45 Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG (SEC ID NO: 2) del dominio EDA de fibronectina-EDA para tratar, prevenir o prevenir la progresión de una afección relacionada o resultante por infarto de miocardio (IM) y/o remodelación ventricular adversa. Dicha afección se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca; fibrosis miocárdica remota; aneurisma o rotura del ventrículo; regurgitación mitral, particularmente si el infarto es grande y es probable que cause dilatación ventricular grave; y arritmias, como la fibrilación ventricular y la taquicardia ventricular debidas al agrandamiento ventricular y la fibrosis. Preferiblemente, la afección se selecciona del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca y fibrosis miocárdica remota.

55 El término "tratar, prevenir o prevenir la progresión de" como se usa en el presente documento no solo abarca el inicio de remodelación cardíaca adversa, sino que también abarca la situación en la que ha comenzado la remodelación cardíaca adversa, sino que se detiene para continuar. Por lo tanto, abarca la situación en la que se evita el desarrollo completo de las complicaciones relacionadas con el IM, incluso si dichas complicaciones relacionadas con el IM ya han comenzado a desarrollarse. Por ejemplo, la dilatación cardíaca que ya ha comenzado se puede detener con la intervención terapéutica utilizando el anticuerpo de la presente invención. Dicho método está abarcado por la presente invención. Como la remodelación adversa es reversible, las complicaciones relacionadas con la remodelación adversas, también referidas en este documento como "complicaciones relacionadas con el IM", también pueden tratarse utilizando el método de la presente invención.

65 Como se usa en el presente documento, los términos "insuficiencia cardíaca" se refieren a cualquier afección caracterizada por disminución del gasto cardíaco y/o presiones de llenado anormales en los ventrículos. En estas situaciones, el corazón no puede bombear sangre a una velocidad adecuada o en un volumen adecuado y/o con una

fuerza adecuada (es decir, insuficiencia cardíaca sistólica) o muestra una rigidez ventricular aumentada (es decir, insuficiencia cardíaca diastólica), respectivamente. En la insuficiencia cardíaca, la perfusión sanguínea de los órganos se ve obstaculizada, lo que deteriora la función de los órganos (por ejemplo, insuficiencia renal o hepática). Además, la sangre puede volver a los pulmones, lo que hace que los pulmones se congestionen con líquido. Los síntomas típicos de la insuficiencia cardíaca incluyen dificultad para respirar (disnea), fatiga, debilidad, dificultad para respirar cuando está acostado, e hinchazón de las piernas, tobillos o abdomen (edema).

El término "anticuerpo" usado aquí se refiere a cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno con al menos una región determinante de complementariedad (CDR). El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, quiméricos, humanos, monocatenarios, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados e in vitro generados. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, dAb y otros fragmentos de anticuerpos u otras construcciones que comprenden CDR que retienen la función de unión al antígeno. Típicamente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Los detalles de la preparación de dichos anticuerpos y su idoneidad para su uso como miembros de unión, particularmente un miembro de unión específico, son bien conocidos por los expertos en la técnica. El término "neutralizar" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para inhibir (es decir, eliminar o reducir) al menos una actividad de otro compuesto o molécula. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser cualquiera de los isotipos de anticuerpos conocidos y sus conformaciones, por ejemplo, IgA, tales como IgA1 o IgA2, IgD, IgE, IgG, tales como la clase IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, o IgM, o puede constituir mezclas de los mismos en cualquier combinación, como una mezcla de anticuerpos de la clase IgG1 e IgG2a.

La "unión específica" del anticuerpo a la fibronectina-EDA significa que la fibronectina-EDA y el anticuerpo forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada, a diferencia de la unión no específica que generalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad  $K_a$  es superior a  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Si es necesario, la unión no específica puede reducirse sin afectar sustancialmente la unión específica variando las condiciones de unión en una prueba in vitro. En la presente invención, un "anticuerpo para la fibronectina-EDA" o "un anticuerpo que se une específicamente a la fibronectina-EDA" es un anticuerpo que es la única diana que está unida con alta afinidad, es decir, otros polipéptidos como la fibronectina-EDB o la fibronectina plasmática, no se une a dicho anticuerpo específico o se une solo con baja afinidad (unión no específica).

El anticuerpo puede usarse para prevenir la remodelación cardíaca adversa, la dilatación cardíaca y/o para mejorar la función cardíaca. Dicha insuficiencia cardíaca puede ocurrir después de un infarto de miocardio.

Dicho anticuerpo se une a una secuencia de aminoácidos como se describe en la SEC ID NO: 2. Las SEQ ID NO: 1 representan una secuencia de aminoácidos de consenso de los aminoácidos 36 a 60 del dominio EDA de fibronectina-EDA derivada de la alineación del dominio EDA de fibronectina-EDA de varios animales. La SEC ID NO: 2 corresponde a los aminoácidos 36 a 60 del dominio EDA de la fibronectina-EDA humana.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo neutralizante, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado.

El anticuerpo puede administrarse a un sujeto que lo necesite para tratar, prevenir y/o prevenir la progresión de remodelado cardíaco adverso y complicaciones relacionadas (es decir, afecciones relacionadas con, o resultantes de IM) como se indica anteriormente. El sujeto puede ser un animal, tal como un animal no humano. Los sujetos adecuados incluyen, sin limitación, mamíferos, tales como seres humanos.

El anticuerpo se puede administrar en una cantidad eficaz. Como se usa en este documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que resulta en el tratamiento, la prevención o la prevención de la progresión de una afección relacionada con o resultante de infarto de miocardio (IM) y/o remodelación cardíaca adversa, como insuficiencia cardíaca o uno o más síntomas asociados con insuficiencia cardíaca. En el contexto de las aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad de anticuerpo administrado al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad o afección y de las características del sujeto, como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, la gravedad y el tipo de afección. El experto en la materia podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. El anticuerpo también se puede administrar en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. En los métodos de la presente invención, el anticuerpo puede administrarse a un sujeto que tenga uno o más signos o síntomas de IM y/o insuficiencia cardíaca, como dolor de pecho, disnea, edema y cardiomegalia. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo se refiere a los niveles en los cuales los efectos fisiológicos de una afección relacionada o resultante de un IM y/o remodelación cardíaca adversa, como la insuficiencia cardíaca, como mínimo, mejoran. El experto en la materia será capaz de determinar cuándo se ha tratado, prevenido o cuándo se ha prevenido su progresión.

Una cantidad eficaz del anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo monoclonal, puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 10 g/kg, tal como aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg, aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg.

En una realización adecuada, el anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa, por ejemplo, por medio de una inyección en bolo. El anticuerpo puede administrarse una vez en una dosis única, o puede administrarse varias veces después del IM. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse por vía intravenosa, una vez inmediatamente después del IM (es decir, dentro de las 48 horas del IM), seguido de una o más administraciones intravenosas en los días posteriores a la primera administración del anticuerpo de la invención. El anticuerpo puede administrarse con un intervalo que oscila entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 14 días, tal como aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 días, aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 días, aproximadamente 8 horas a aproximadamente 6 días, aproximadamente 12 horas a aproximadamente 4 días, o aproximadamente de 24 horas a aproximadamente 2 días para lograr un efecto terapéutico o preventivo óptimo.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo “comprender” y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, el verbo “consistir” puede ser reemplazado por “consistir esencialmente en” lo que significa que una composición de la invención puede comprender componentes adicionales a los identificados específicamente, dichos componentes adicionales no alteran las características únicas de la invención.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido “un” o “uno” no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “uno” por lo general significa “al menos uno”.

El término “aproximadamente” puede, en su caso, indicar una desviación de 10% o menos, o 5% o menos, o 1% o menos, o 0.5% o menos, o incluso 0.1% o menos, y también en una realización no hay desviación (medible). Como quedará claro para el experto en la materia, en general pueden permitirse pequeñas desviaciones de los valores numéricos, cuando sea aplicable. Por lo tanto, a excepción de los valores en la definición de más arriba, los valores numéricos pueden, en su caso, desviarse de un 10% o menos, o un 5% o menos, o un 1% o menos, o un 0,5% o menos, o incluso un 0,1% o menos a partir del valor dado. Para enfatizar esto, aquí a veces la palabra “aproximadamente” se usa antes de los valores numéricos.

Quedará claro que la descripción anterior y las figuras se incluyen para ilustrar algunas realizaciones de la invención, y no para limitar el alcance de la protección. En lo sucesivo, la invención se ilustrará adicionalmente por medio de ejemplos no limitantes.

#### Figuras

La Figura 1A-D muestra el volumen diastólico final (A; EDV), el volumen sistólico final (B; ESV), el engrosamiento de la pared sistólica (C; SWT) y la curva de supervivencia acumulada de Kaplan-Meier (D) después de IM, en ratones modificados tratados con solución salina EDA (EDA<sup>-/-</sup>), anticuerpos IgG1 anti-fibronectina-EDA y anticuerpos IgG2a anti-fibronectina-EDA tratados y animales de operación simulada. Los ratones se inyectaron con solución salina o anticuerpos (IgG1 o IgG2a) contra la fibronectina-EDA 1 día después de la IM. Los animales operados de forma simulada no recibieron ningún tratamiento que no fuera una operación simulada. Los ratones EDA<sup>-/-</sup> se sometieron a IM pero no recibieron ninguna intervención terapéutica.

#### Secuencias

SEQ ID NO.: 1:

TYSSPE (D/E) G (I/V) (H/R/K) EL (F/L/S) PAP (D/E) G (E/D) (E/D) (E/D) ( D/E) T AEL (Q/H) G

SEC ID NO: 2:

TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG

#### EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos

Ratones

Los ratones modificados para Fibronectina-EDA se generaron como se describe previamente por Tan et al. (Blood. 2004; 104: 11-18). Los ratones EDA -/- se retrocruzaron en un fondo Balb/C durante 8 generaciones.

#### Aislamiento de proteínas y ARN

5 Se aisló ARN total y proteína de secciones de corazón infartadas congeladas instantáneamente (se separaron el infarto y el área remota) usando 1 ml de Reactivo de aislamiento Tripure™ (Roche, Woerden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se usó una solución Tris 40 mM (pH 7,5) para el aislamiento de proteínas de muestras recogidas 7 días después del infarto para la zimografía.

10 Citometría de flujo

Los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , RANTES, IL10, MCP-1 y factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) en muestras de proteína de tejido aislado se midieron mediante citometría de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter) usando el kit multiplex personalizado Th1/Th2 (Bender MedSystems, Viena, Austria). Las muestras de proteína se diluyeron 1: 1 en tampón de ensayo, y el protocolo se siguió de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de TLR2, TLR4, CD49d se evaluó en monocitos circulantes de sangre anticoagulada con EDTA mediante citometría de flujo. La sangre completa se tiñó para TLR2 (FITC, eBioscience, San Diego, California), TLR4 (PE, eBioscience, San Diego, California), CD49d (Alexa Fluor 488, Serotec, Oxford, Reino Unido) y F4/80 para monocitos (Alexa Fluor 647, Serotec, Oxford, Reino Unido).

#### Generación de ratones quiméricos.

25 Se generaron ratones quiméricos para estudiar la contribución relativa de la expresión de EDA en células sanguíneas y parenquimatosas a la remodelación de LV. Se recogieron células de médula ósea (BM) de donantes de ratones WT y EDA -/- mediante lavado de húmero, fémures y tibias con medio RPMI-1640. Los ratones receptores recibieron 5x10<sup>6</sup> células BM después de recibir una dosis única de 10 Gy para irradiar la médula ósea del huésped. Los ratones se recuperaron durante 6 semanas para asegurar un injerto estable de las células de la médula ósea del donante. En lo sucesivo, el ADN se extrajo de muestras de sangre periférica y se utilizó para el genotipado con reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR). La quimerización exitosa (> 95% de células donadoras circulantes) se logró en todos los ratones (datos no mostrados). Ratones WT irradiados con EDA -/- médula ósea se denominan WT/EDA KO BM, y ratones EDA -/- con médula ósea WT como EDA KO/WT BM. Los ratones WT/WT BM y EDA KO/EDA KO BM sirvieron como controles apropiados para la comparación funcional y estadística.

#### 35 Infarto de miocardio in vivo

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de fentanilo (Jansen-Cilag) 0.05 mg/kg, Dormicum (Roche) 5 mg/kg y medetomidina 0.5 mg/kg mediante una inyección intraperitoneal. La temperatura corporal central se mantuvo alrededor de 37 °C durante la cirugía mediante un monitoreo continuo con un termómetro rectal y una manta de calentamiento automática. Los ratones fueron intubados y ventilados (Harvard Apparatus Inc.) con oxígeno al 100%. La arteria coronaria izquierda (LCA) se ligó de forma permanente con una sutura de vicryl 8-0. La isquemia se confirmó mediante la decoloración del miocardio y la taquiarritmia ventricular. En animales de operación simulada, la sutura se colocó debajo del LCA sin ligadura. La pared torácica se cerró y los animales recibieron por vía subcutánea Antisedan (Pfizer) 2.5 mg/kg, Anexate (Roche) 0.5 mg/kg y Temgesic (Schering-Plough) 0.1 mg/kg.

#### 45 Tamaño del infarto

El tamaño del infarto (IS) como porcentaje del ventrículo izquierdo (LV) se determinó utilizando la inyección de tinte azul de Evans y la tinción con TTC, 2 días después del infarto (n = 6/grupo). Al evaluar el tamaño del infarto en la fase aguda (a los 2 días), se puede determinar si existen diferencias entre los ratones WT y EDA -/- en la perfusión miocárdica. Por lo tanto, se inyectó colorante azul de Evans al 4% a través de la aorta torácica de forma retrógrada. Al hacerlo, se puede demarcar el área en riesgo (AAR), la extensión del tejido miocárdico que sufrió isquemia (es decir, miocardio en peligro de extinción). Los corazones se explantaron rápidamente, se enjuagaron en solución salina al 0,9% y se pusieron en un congelador a -20 °C durante 1 hora. En lo sucesivo, los corazones se cortaron mecánicamente en cuatro secciones transversales de 1 mm. Las secciones del corazón se incubaron en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 15 minutos antes de colocarlas en formaldehído durante otros 15 minutos. Manchas de tejido viables rojas y el tejido infartado aparece blanco. Las secciones del corazón se fotografiaron digitalmente (Canon EOS 400D) bajo un microscopio (Carl Zeiss®). IS, AAR y el área de LV total se midieron utilizando el software ImageJ (versión 1.34). El tamaño del infarto se corrigió por el peso del corte de corazón correspondiente. Después de 28 días, se determinó la IS/LV utilizando secciones transversales teñidas con hematoxilina-eosina.

#### Imagen de resonancia magnética

65 Cincuenta y dos ratones sin trasplante de médula ósea (n = 15/grupo en isquémicos y n = 6/grupo en ratones de operación simulada) y 44 ratones (n = 11/grupo) en los experimentos con ratones quiméricos se sometieron a una

5 evaluación en serie de dimensiones y función cardíaca mediante imágenes de resonancia magnética de alta resolución (MRI, 9.4 T, Bruker, Rheinstetten, Alemania) bajo anestesia con isoflurano antes, 7 y 28 días después de la IM. Se obtuvieron imágenes de eje largo y eje corto con un intervalo de 1.0 mm entre los cortes y se utilizaron para calcular el volumen diastólico final (EDV, el mayor volumen) y el volumen sistólico final (ESV, el volumen más pequeño). La fracción de eyección (EF) se calculó como  $100 * (EDV-ESV)/EDV$ . El grosor de la pared (WT) y el engrosamiento de la pared sistólica (SWT) se evaluaron tanto en el tabique (miocardio remoto) como en la pared libre (área de infarto). Todos los datos de MRI se analizan utilizando el software de imágenes digitales Qmass (Medis, Leiden, Países Bajos).

#### 10 Mediciones de presión LV

15 En un subconjunto de ratones, la evaluación invasiva del rendimiento cardíaco y el desarrollo de la presión del LV se realizó 28 días después del infarto. Un catéter de presión 1.4F Millar (modelo SPR-839) se insertó de forma retrógrada a través de la arteria carótida común derecha. La función sistólica se evaluó mediante  $dP/dt_{max}$ , mientras que la función diastólica se realizó mediante la presión diastólica final del ventrículo izquierdo y tau (constante de tiempo de relajación del ventrículo izquierdo). Tau se determinó a partir de la regresión de  $dP/dt$  frente a la presión del ventrículo izquierdo.

#### 20 Inmunohistoquímica

25 Tras la terminación, los corazones se escindieron y se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. Las secciones de parafina se tiñeron para Ly-6G (para neutrófilos; Ly-6G anti-ratón de rata 1: 100, Abcam, Cambridge, Reino Unido), MAC-3 (para macrófagos; MAC-3 anti-ratón de rata 1:30, BD Pharmingen, Breda, Países Bajos),  $\alpha$ -SMA (para miofibroblastos;  $\alpha$ -SMA anti-humano de conejo 1:50, Acris antibodies, Herford, Alemania), periostina (factor de maduración; periostina anti humana de conejo 1:50, Sigma, Zwijndrecht, Países Bajos) y fibronectina-EDA (antihumano de ratón 1: 150, Abcam, Cambridge, Reino Unido). La cuantificación de la densidad del colágeno se realizó con la tinción con rojo de Picrosirius al 4% fijada con formalina y secciones de corazón incluidas en parafina. Las secciones se tiñeron mediante incubación durante la noche con el primer anticuerpo a 4 °C para MAC-3 y periostina o mediante incubación de 1 hora a temperatura ambiente para Ly-6G e incubación de 1/2 horas a temperatura ambiente para  $\alpha$ -SMA. Antes de la tinción, las secciones se desparafinaron y la peroxidasa endógena se bloqueó mediante 30 minutos de incubación en metanol que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1.5%. La recuperación del antígeno se realizó mediante 20 minutos de ebullición en tampón de citrato (MAC-3, Ly-6G y periostina), 10 minutos de ebullición en tampón de citrato para fibronectina-EDA o 15 minutos a 37 °C en tampón de pepsina (-SMA). Para MAC-3, tinción de  $\alpha$ -SMA y periostina, las secciones se incubaron previamente con suero normal de cabra y se incubaron con el anticuerpo primario (MAC-3, 1:30 durante la noche a 4 °C;  $\alpha$ -SMA, 1:50 para 30 minutos a temperatura ambiente; periostina, 1:50 durante la noche a 4 °C). Las secciones se incubaron luego durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario marcado con biotina, seguido de 1 hora de incubación con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante a temperatura ambiente y se desarrollaron con AEC. Para Ly-6G, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente). Las secciones se incubaron luego durante 30 minutos con un anticuerpo secundario seguido de 30 minutos de incubación con IgG anti-conejo de poly-HRP de Powervision (ImmunoVision Technologies, Daily City, EE. UU.). La tinción se visualizó inmediatamente con el kit de sustrato Vector NovaRED™ siguiendo las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.). Para Fibronectin-EDA, las secciones se incubaron previamente con albúmina de suero bovino y se incubaron con el anticuerpo primario (1:150 durante la noche a 4 °C). Al día siguiente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario (conejo anti-ratón, Dako, Glostrup, Dinamarca) seguido de incubación durante 1 h con el complejo AB (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.). La tinción se visualizó inmediatamente con DAB (Dako, Glostrup, Dinamarca). Todas las secciones se contrastaron con la tinción de hematoxilina de Mayer.

50 El análisis de densidad de colágeno se realizó con luz polarizada circularmente después de la conversión en valores de gris y microscopía de imagen digital. Se generaron histogramas de toda la imagen, en la que se representó el número de píxeles con un cierto valor de gris. Los valores de gris inferiores a 30 se consideraron como señal de fondo de la imagen. La afluencia de miofibroblastos y la expresión de periostina se calcularon como la  $\alpha$ -SMA positiva y la fracción del área de periostina. Los recipientes fueron excluidos del análisis.

#### 55 Reacción en cadena de la polimerasa

60 El ARN se aisló utilizando reactivo de Tripura según el protocolo del fabricante (Roche). Después del tratamiento con DNasa, se utilizaron 500 g de ARN total para la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (Bio-Rad). La amplificación se realizó utilizando 10  $\mu$ l de iQTM SYBR Green supermix y 10  $\mu$ l de ADNc. Las cantidades se determinan por comparación con cantidades conocidas de productos de PCR clonados. Todos los niveles de expresión de ARNm se corrigieron por la cantidad de p0. Los cebadores se diseñaron utilizando Beacon Designer 4.0 (Premier Biosoft): colágeno-1 ((directo: 5'- tcaaggtctactgcaacatgg-3'; inverso: 5'-aatccatcggtcatgctct-3'), colágeno-3 (directo: 5'-cgtaagcactggtggacagattc-3'; inverso: 5'-gcacatcaacgacatctcagg -3'), EDA (directo: 5'-acgtggttagtgtttatgctc-3'; inverso: 5'-tggaatcgacatccacatcag-3') y p0 (directo: 5'-ggaccgagaagacctcct-3'; inverso 5'-gcacatcactcagaatttcaatgg-3'), lisil-oxidasa (directo: 5'-cgcaaagagtgaagaaccaag-3; inverso: 5'-ggcatcaagcaggtcatag-3'), MCP-1 (directo: 5'-gatcgaaccaaatgagatcag-3'; inverso: 5'-gtggaagagtagtgatgc-3'), TIMP-2 (directo: 5'-caccgcaacagcgctttt-3'; inverso: 5'-tttctccaacgtccagcga-3').

## Zimografía

5 Se separaron muestras de proteína aislada de Tris (5 µg) en un gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida que contenía 1 mg/ml de gelatina (Sigma) en el gel corriente al 8%. Después de correr, el gel se lavó 2x15 min en Triton X-100 al 2.5% y se incubó durante la noche a 37 °C en solución de Brij (Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, CaCl<sub>2</sub> 0.01 M, Brij 35 al 0.05% (Sigma)). A continuación, el gel se tiñó con azul de Coomassie (metanol al 25%, ácido acético al 15%, azul de Coomassie al 0.1%) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), y luego se decoloró en metanol al 25%/ácido acético al 15% durante aproximadamente 30 min. Las MMP-2 y -9 activas se identificaron por tamaño y en migración conjunta con su proteína recombinante.

## Actividad elastasa

15 La actividad de la elastasa se midió en 100 µg de extractos de proteína Tris usando el kit de ensayo de elastasa EnzCheck (E12056, Invitrogen, Breda, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron partes alícuotas del sustrato de elastina DQ (con una concentración final de 25 µg/ml) a las muestras y se incubaron durante 1-3 horas a 37 °C. La fluorescencia de fondo de una reacción de control sin enzima se había sustraído de cada valor.

## Cultivo de miofibroblastos

20 Los corazones de ratones WT y EDA -/- se enjuagaron con solución salina y se explantaron 5 días después del infarto. Se retiraron el ventrículo derecho, las aurículas y las válvulas. Los corazones se cortaron en piezas submilimétricas y se trataron durante 1 hora con colagenasa (2 mg/ml, Roche) a 37°C. Se obtuvieron suspensiones de células individuales a través de filtros de células. Los miofibroblastos se seleccionaron en función de su capacidad para proliferar in vitro. Los miofibroblastos se expandieron utilizando medio de cultivo DMEM (Gibco), suplementado con 10% de FCS (HyClone, Logan, Utah, VS) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma). Para el perfil de expresión de MMP, los miofibroblastos se cultivaron durante la noche en FCS al 0.1% para minimizar la actividad de MMP2 y -9 de fondo en zimografía. La inmunocitoquímica se realizó en células en el pase 3, se sembró en cubreobjetos y se cultivó durante 3 días, fijada en 4%. Para la tinción, los cubreobjetos se lavaron, se permeabilizaron con Triton-X100 al 0.1% y se bloquearon en BSA al 2% (Roche), solución de saponina al 0.1% en PBS y se incubaron durante 1 hora con anticuerpos primarios en PBS. Anticuerpos utilizados: αSMA (1: 400, Sigma, A2547, concentración madre (sc): 4.5 mg/ml), vimentina (1: 400, ab20346, VI-10, Abcam, sc: 1.0 mg/ml), desmina (1: 50, MA1-46394, ThermoScientific) y procolágeno tipo III (1:50, BP8034, Acris, sc: 1.0 mg/ml). Las tinciones de control se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-conejo de cabra marcado con AlexaFluor-555 (1: 400, invitrogen, A21429, sc: 2 mg/ml) y anti-ratón de cabra marcado con AlexaFluor-488 (1: 400, invitrogen, A11001), 2 mg/ml). Los núcleos celulares se tiñeron en 1 ng/ml de colorante Hoechst durante 5 minutos. Los cubreobjetos se montaron con una solución de mowiol al 10% (p/v) (glicerol al 25%, Tris-HCl al 50%, pH 8,5). Los cardiomiocitos adultos humanos se agregaron más tarde como control positivo para confirmar la eliminación de manchas negativas. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Olympus, BX60).

## Resultados

45 La falta de EDA promueve la supervivencia y previene el deterioro de la función cardíaca, así como la remodelación inadaptada después del infarto de miocardio

50 La síntesis de EDA se estimula después del infarto tanto en el infarto como en el miocardio remoto, alcanzando un pico a los 7 y 3 días, respectivamente. La evaluación de RMN de valor inicial de la función cardíaca y las dimensiones no reveló diferencias entre los ratones EDA-/- y WT. Los análisis microscópicos no mostraron alteraciones en la celularidad y composición de la matriz en ratones EDA-/-. La extensión del miocardio en peligro (AAR/LV) determinada 2 días después del IM fue similar entre los grupos. El tamaño del infarto (IS) como porcentaje de LV también fue similar entre los grupos (IS/LV 38.2±1.2%, p = 0.985. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró un beneficio significativo de supervivencia en ratones EDA-/- sobre ratones WT. La mayoría de las muertes se produjeron después del día 6 y no fueron provocados por rupturas cardíacas (solo se observaron 2 rupturas en la WT y 1 ruptura en los ratones EDA-/- durante los 28 días de seguimiento). En línea con el aumento de la mortalidad, los ratones WT tenían mayores dimensiones de LV y un rendimiento sistólico reducido en comparación a los ratones EDA-/-. Estas diferencias significativas ya estaban presentes 7 días después del infarto y continuaron deteriorándose hasta 28 días después del IM. Los ratones EDA-/- estaban relativamente protegidos contra la remodelación y mostraron una mejor función sistólica después del IM. El efecto protector visto en EDA-/- no fue atribuible a cambios en la extensión del tejido viable, porque el tamaño del infarto no difirió entre los ratones WT y EDA-/- 28 días después del IM (33.7±2.3% frente a 34.3±3.5%, respectivamente; p = 0.818). Sin embargo, el grosor de la pared del área del infarto no disminuyó en ratones EDA-/- tanto como en ratones WT. En el día 28 después del infarto, toda el área del infarto se reemplazó por una densa red de colágeno en ambos grupos. En el día 7, sin embargo, hubo una granulación reducida del infarto como se muestra por la degradación retardada de la matriz acelular en ratones EDA-/-.

65 La falta de EDA reduce las actividades endógenas de MMP-2, -9 y elastasa



Las actividades de MMP2 y -9 mejoradas son perjudiciales para el rendimiento cardíaco y la geometría durante el proceso de curación posterior al infarto. Realizamos zimografía para estudiar si la protección contra la remodelación adversa observada en ratones EDA<sup>-/-</sup> también es atribuible a cambios en la actividad de la proteinasa. En línea con la reducción de la degradación de la matriz en los animales modificados observados en la histología en el día 7, tanto las formas activas de MMP-2 como las de -9 en las áreas de infarto se redujeron en los ratones EDA<sup>-/-</sup>, 7 días después del infarto. El análisis del área remota después de 7 días de infarto no fue posible debido a una intensidad de señal muy baja. Finalmente, estudiamos si la actividad de la elastasa también se vio afectada por la ausencia de EDA. En línea con la actividad reducida de MMP2 y -9, la actividad de la elastasa también se redujo en los ratones EDA<sup>-/-</sup> 7 días después del infarto.

Los ratones EDA<sup>-/-</sup> exhiben menos fibrosis después del infarto

El depósito de colágeno se produce en el área del infarto tras la degradación de la matriz y en el miocardio remoto luego de los cambios en la tensión de la pared. Los miofibroblastos son la principal fuente de síntesis de colágeno de novo. En nuestro estudio, el depósito de colágeno tanto en el área de infarto como en el área remota fue similar entre los grupos en el día 7 después del IM. Después de 28 días, el contenido de colágeno fue nuevamente similar en el área del infarto, lo que sugiere que la formación de cicatrices no se ve afectada negativamente en los ratones EDA<sup>-/-</sup>. Sin embargo, el miocardio remoto ahora contenía menos fibras de colágeno en ratones EDA<sup>-/-</sup> en comparación con los animales WT. Estos resultados fueron apoyados a nivel de ARNm. Tanto el procolágeno-1 como el -3 se reducen en el miocardio remoto de los ratones EDA<sup>-/-</sup>. Dentro del infarto, la síntesis de colágeno en ratones EDA<sup>-/-</sup> fue de nuevo comparable a los animales WT. No hubo diferencias en la producción de lisil-oxidasa y TIMP-2 entre los grupos, lo que sugiere que no hay diferencias en el entrecruzamiento del colágeno y la inhibición de la proteasa, respectivamente. La fibrosis reducida en el miocardio remoto a los 28 días después del IM está precedida por una disminución significativa de la transdiferenciación de miofibroblastos en ratones EDA<sup>-/-</sup>, tanto en áreas remotas como en áreas de infarto 7 días después del infarto. La periostina se describe como un factor de maduración de los fibroblastos cardíacos. En nuestro estudio, el área con periostina positiva también se redujo en ratones EDA<sup>-/-</sup> en comparación con los animales WT. Para estudiar si los miofibroblastos WT y EDA<sup>-/-</sup> difirieron en su actividad de síntesis de matriz y en el perfil de expresión de MMP, cultivamos miofibroblastos después del infarto y teñimos para marcadores de miofibroblastos y pro-colágeno-III. In vitro, no hubo diferencias entre los dos genotipos. Adicionalmente, la zimografía se realizó utilizando los sobrenadantes de las células y tampoco mostró diferencias en la actividad de MMP2 y -9.

La falta de EDA resulta en inotropía y lusitropía mejoradas.

Los procesos fibróticos alterados en ratones EDA<sup>-/-</sup> indican que la función diastólica también podría verse afectada. La contractilidad, según lo indicado por dP/dT<sub>max</sub>, fue mucho mayor en ratones EDA<sup>-/-</sup> después de 28 días de infarto. Esto confirmó nuestros hallazgos previos de MRI, que los ratones EDA<sup>-/-</sup> exhiben un rendimiento sistólico mejorado. El aumento de LVEDP y tau es perjudicial para la función cardíaca y es provocado por el aumento de EDV y/o fibrosis; una de las señas de identidad de la insuficiencia cardíaca. En comparación con los animales WT, el rendimiento diastólico también mejoró significativamente en ratones EDA<sup>-/-</sup> después de 28 días de infarto. Ambos parámetros fueron significativamente más bajos en los ratones EDA<sup>-/-</sup> en comparación con los animales WT, proporcionando evidencia de que la supervivencia mejorada en los ratones EDA<sup>-/-</sup> es una consecuencia de las mejoras funcionales tanto sistólica como diastólica.

EDA regula la inflamación después del IM

Considerado como un ligando para TLR2 y 4, la falta de EDA debería dar como resultado un estado inflamatorio disminuido. Los neutrófilos son el primer subconjunto de leucocitos que migran en la lesión de tejidos y se sabe que están asociados con la extensión del daño. El recuento de neutrófilos en el área del infarto no fue diferente entre los grupos. En lo sucesivo, los macrófagos limpian los restos celulares (por ejemplo, neutrófilos necróticos y cardiomiocitos) y, lo que es más importante, inician el proceso de remodelación después del infarto. En nuestro estudio, el número de macrófagos se redujo en gran medida en ratones EDA<sup>-/-</sup> 7 días después del infarto. No hubo células detectables después de 28 días de infarto en ambos grupos. En concordancia con la afluencia reducida de macrófagos, los niveles de TNF $\alpha$ , RANTES, GM-CSF (responsables del reclutamiento, diferenciación y maduración de los macrófagos) e IL-10 fueron muy reducidos en los ratones EDA<sup>-/-</sup>, 7 días después del infarto. En contraste, los niveles de MCP-1 aumentaron en ratones EDA<sup>-/-</sup> en comparación con los animales WT a nivel de proteína y ARNm.

EDA parenquimatosa media la supervivencia después del infarto y la remodelación inadapta

Generamos ratones quiméricos para diferenciar entre la contribución de la sangre y los compartimentos parenquimatosos a los efectos observados después del IM. Curiosamente, WT/EDA KO BM tuvo tasas de supervivencia y rendimiento cardíaco similares en comparación con los animales WT/WT BM. En contraste, los EDA KO/WT BM fueron similares a los animales EDA KO/EDA KO BM y mostraron mayores tasas de supervivencia y mostraron menos remodelaciones adversas después del IM, en comparación con WT/EDA KO BM. Estos datos indican que la expresión de EDA parenquimatosa después del infarto conduce a una remodelación inadapta. Desde la

perspectiva de un modelo de peligro, podemos postular que la expresión de EDA como una señal de peligro puede tener efectos profundos sobre células circulantes que son responsables de las respuestas de reparación después del infarto.

5 EDA media tanto la integrina- $\alpha 4$  como la señalización del receptor tipo Toll en los monocitos circulantes

La EDA es un ligando conocido para la integrina- $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) y TLR2 y 4. Dado que la EDA parenquimática media en la remodelación adversa, hipotetizamos que la EDA del corazón puede servir como un activador endógeno de las células circulantes después del infarto. Los ratones EDA-/- mostraron una reducción significativa en los monocitos periféricos 3 días después del infarto, mientras que después de 7 días los números fueron similares entre los grupos. La expresión de TLR2 sobre monocitos se alteró significativamente en ausencia de EDA, mientras que TLR4 no mostró ninguna diferencia en los niveles de expresión después de la IM entre los grupos. La expresión de integrina  $\alpha 4$  (CD49d) también se redujo significativamente sobre los monocitos de ratones EDA-/- después del infarto. Adicionalmente, hubo un subgrupo de monocitos que mostró un nivel de expresión significativamente mayor de CD49d. Los ratones EDA-/- mostraron nuevamente una expresión de CD49d reducida en este subgrupo, 7 días después del infarto.

Ejemplo 2

20 Métodos

Animales y diseño experimental

Los ratones macho de tipo silvestre Balb/C (10-12 semanas, 25-30 g) recibieron una dieta estándar y agua ad libitum. El infarto de miocardio se indujo por ligadura de la arteria coronaria izquierda, justo debajo del apéndice auricular izquierdo. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales sobre cuidado de animales y con la aprobación previa del Comité de Experimentación con Animales de la Universidad de Utrecht.

Se probaron los anticuerpos monoclonales de ratón de las subclases IgG1 e IgG2a (Peters JH et al. Blood. 1990. Vol. 75: 1801-1808), reconociendo el siguiente péptido (antígeno): TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG, que corresponde a los aminoácidos 36 a 60 del dominio EDA de la fibronectina-EDA humana.

Los ratones Balb/C se sometieron a una operación de ligadura o simulación de la arteria coronaria izquierda y a la función cardíaca y evaluación de la geometría en el valor de referencia, 7 y 28 días después de la IM utilizando imágenes de resonancia magnética cardíaca de ratón 9.4T de alta resolución. Los ratones recibieron por vía intravenosa 250 microlitros ( $\mu$ l) de solución salina (control) o solución de anticuerpo a través de la vena de la cola. Los animales se aleatorizaron para recibir solución salina, IgG1 (20 mg/kg) o IgG2a (20 mg/kg) de anticuerpo monoclonal 1 día después del infarto. Las inyecciones de bolos se repitieron el día 3 y el día 5 después del infarto. Las 3<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> inyecciones de anticuerpos segundo y tercero se administraron en una dosis de 10 mg/kg.

40 Infarto de miocardio in vivo

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de fentanilo (Jansen-Cilag) 0.05 mg/kg, Dormicum (Roche) 5 mg/kg y medetomidina 0.5 mg/kg mediante una inyección intraperitoneal. La temperatura corporal central se mantuvo alrededor de 37°C durante la cirugía mediante una monitorización continua con un termómetro rectal y una manta de calentamiento automática. Los ratones se intubaron y ventilaron (Harvard Apparatus Inc.) con oxígeno al 100%. La arteria coronaria izquierda (LCA) se ligó de forma permanente con una sutura de vicrilo 8-0. La isquemia se confirmó mediante la decoloración del miocardio y la taquiarritmia ventricular. En animales de operación simulada, la sutura se colocó debajo de la LCA sin ligadura. La pared torácica se cerró y los animales recibieron por vía subcutánea Antisedan (Pfizer) 2.5 mg/kg, Anexate (Roche) 0.5 mg/kg y Temgesic (Schering-Plough) 0.1 mg/kg.

Formación de imágenes de resonancia magnética

La evaluación de la función y la geometría del corazón se realizaron por un técnico cegado al grupo de tratamiento. Los ratones se sometieron a una evaluación en serie de las dimensiones y la función cardíacas mediante formación de imágenes de resonancia magnética de alta resolución (MRI, 9.4 T, Bruker, Rheinstetten, Alemania) bajo anestesia con isoflurano antes, 7 y 28 días después del IM. Se obtuvieron imágenes de eje largo y eje corto con un intervalo de 1.0 mm entre los cortes y se utilizaron para calcular el volumen diastólico final (EDV, el mayor volumen) y el volumen sistólico final (ESV, el volumen más pequeño). El engrosamiento de la pared sistólica (SWT) se evaluó tanto en el tabique (miocardio remoto) como en la pared libre (área de infarto). Todos los datos de IRM se analizaron utilizando el software de formación de imágenes digitales Qmass (Medis, Leiden, Países Bajos).

Resultados

65 No hubo diferencias entre los diferentes grupos de ratones en el valor de referencia ( $t = 0$ ). Los ratones tratados con IgG1 o IgG2a desarrollaron una dilatación ventricular reducida en comparación con los animales tratados con solución

salina. En comparación con el tratamiento con solución salina, el volumen diastólico final y sistólico final (EDV, ESV) fue menor en los animales tratados con IgG1 e IgG2a, lo que indica una disminución de la dilatación ventricular tras el tratamiento con anticuerpos anti-fibronectina-EDA (Figura 1A y B). Adicionalmente, los animales tratados con antifibronectina-EDA mostraron una reducción del abultamiento ventricular, como lo muestra el índice SWT más alto (Figura 1C). Más importante aún, la función cardíaca y la geometría preservadas se tradujeron en una supervivencia mejorada en ratones tratados con anti-fibronectina-EDA. En comparación con los animales tratados con solución salina, los animales tratados con IgG1 e IgG2a mostraron una reducción del 50% en la mortalidad durante 28 días de seguimiento después de IM (Figura 1D). Curiosamente, el efecto terapéutico de ambos anticuerpos anti-fibronectina-EDA es comparable al fenotipo de los ratones EDA -/- después de IM (Figura 1A-D).

En conclusión, los anticuerpos IgG1 e IgG2a contra el segmento fibronectina-EDA humana conservan la función y la geometría del ventrículo izquierdo y mejoran la supervivencia después del IM. El efecto terapéutico observado en ratones tratados con IgG1 e IgG2a es comparable al efecto protector de la deficiencia de fibronectina-EDA en ratones, lo que sugiere una alta especificidad y seguridad de los anticuerpos IgG1 e IgG2a contra la fibronectina-EDA humana.

#### Referencias

- 1) AHA Heart Disease & Stroke Statistics 2009, Dallas, Texas
- 2) European Cardiovascular Disease Statistics 2008, Oxford
- 3) Takii T et al. Increasing Trend of the Incidence of Acute Myocardial Infarction Over 30 Years in Japan: Lessons From the MIYAGI-AMI Registry Study. *Circulation*. 2009;120:S430
- 4) ESC World Congress of Cardiology 2006, Barcelona
- 5) Stakeholders Opinions: Heart Failure 2008, Datamonitor Healthcare
- 6) Roger VL et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*. 2004;292:344-350
- 7) Juenger Jet al. Health related quality of life in patients with congestive heart failure: comparison with other chronic diseases
- 8) Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008;58:88-111

#### Listado de secuencias

- <110> UMC Utrecht Holding B.V.
- <120> Método para prevenir las complicaciones relacionadas con el infarto de miocardio.
- <130> P30707PC00
- <150> US61/406,591
- <151> 2010-10-26
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 28
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de aminoácidos de consenso que corresponde a los aminoácido 36-60 del dominio fibronectina-EDA-EDA
- <220>
- <221> características\_misc
- <222> (7)..(7)
- <223> Xaa puede ser Asp o Glu
- <220>

<221> características\_misc  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa puede ser Ile o Val

5 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa puede ser His o Arg o Lys

10 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (13)..(13)  
 <223> Xaa puede ser Phe o Leu o Ser

15 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (17)..(17)  
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

20 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (19)..(22)  
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

25 <220>  
 <221> características\_misc  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa puede ser Asn o His

30 <400> 1  
**Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Xaa Gly Xaa Xaa Glu Leu Xaa Pro Ala Pro**  
  
**1 5 10 15**  
  
**Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Ala Glu Leu Xaa Gly**  
**20 25**

35 <210> 2  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
**Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala Pro**  
**1 5 10 15**  
  
**Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly**  
**20 25**

40

45 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador de colágeno-1 directo

50 <400> 3  
 tcaaggtcta ctgcaacatg g 21

55 <210> 4  
 <211> 21

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador de colágeno-1 inverso  
  
 <400> 4  
 aatccatcgg tcatgctctc t 21  
  
 10 <210> 5  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador de colágeno-3 directo  
  
 <400> 5  
 20 cgtaagcact ggtggacaga ttc 23  
  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador de colágeno-3 inverso  
  
 <400> 6  
 30 gcacatcaac gacatcttca gg 22  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de fibronectina-EDA directo  
  
 <400> 7  
 40 acgtggtag tgttatgct c 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador de fibronectina-EDA inverso  
 50  
 <400> 8  
 tggaatcgac atccacatca g 21  
  
 <210> 9  
 55 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador p0 directo  
  
 <400> 9  
 ggacccgaga agacctcct 20  
  
 65 <210> 10  
 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador p0 inverso  
  
 <400> 10  
 gcacatcact cagaatttca atgg 24  
  
 10 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador lisil-oxidasa directo  
  
 <400> 11  
 20 cgcaaagagt gaagaaccaa g 21  
  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador lisil-oxidasa inverso  
  
 <400> 12  
 30 ggcatcaagc aggtcatag 19  
  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador MCP-1 directo  
  
 <400> 13  
 40 gatcggaacc aaatgagatc ag 22  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador MCP-1 inverso  
 50  
 <400> 14  
 gtggaaaagg tagtggatgc 20  
  
 <210> 15  
 55 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> cebador TIMP-2 directo  
  
 <400> 15  
 caccgcgaac aggcgtttt 19  
  
 65 <210> 16  
 <211> 20

ES 2 698 450 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> cebador TIMP-2 inverso

<400> 16  
ttcctccaa cgtccagcga 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente al dominio EDA de fibronectina-EDA para uso en el tratamiento, la prevención o prevención de la progresión de una afección relacionada con o que resulta de un infarto de miocardio y/o una remodelación adversa, en la que dicha afección se selecciona del grupo que consiste de dilatación cardíaca, remodelación ventricular adversa, insuficiencia cardíaca, fibrosis miocárdica remota, aneurisma o rotura del ventrículo, regurgitación mitral y arritmias y en el que dicho anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQG (SEQ ID NO: 2).
- 10 2. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, para mejorar la función cardíaca.
3. Un anticuerpo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo monoclonal.
- 15 4. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo humano.
5. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, que es un anticuerpo humanizado.
- 20 6. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 5, que es un anticuerpo de ratón humanizado.



Figura 1

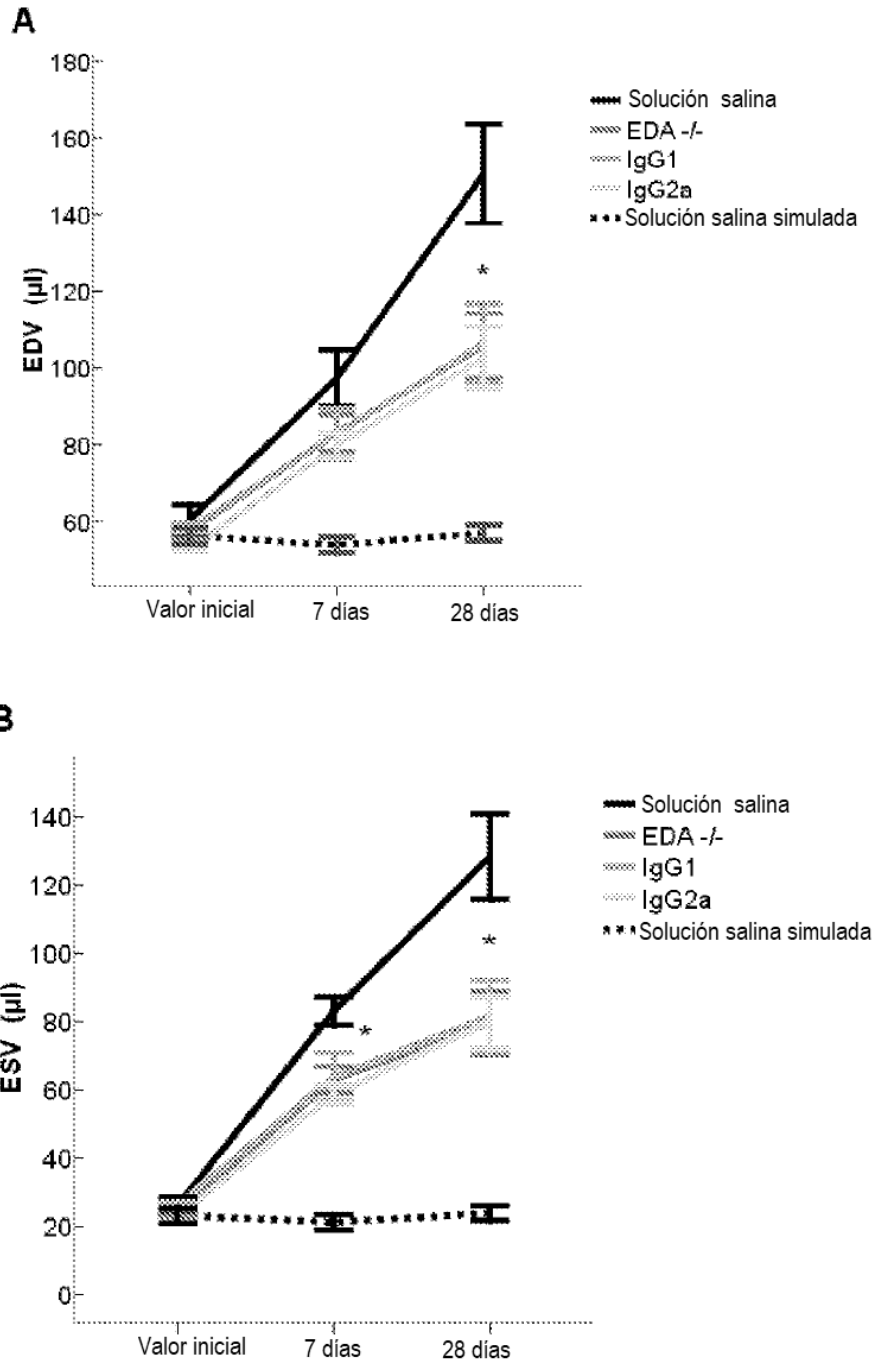


Figura 1

