(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 722 402**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014** **PCT/EP2014/061259**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14191553**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014** **E 14731922 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 3003354**

(54) Título: **PLGF-2 humana para la prevención y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aterosclerótica**

(30) Prioridad:

31.05.2013 US 201361829393 P
16.07.2013 EP 13176638

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2019

(73) Titular/es:

COBIORES NV (100.0%)
Herestraat 49 (bus 913)
3000 Leuven, BE

(72) Inventor/es:

JANSSENS, STEFAN y
WU, MING

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 722 402 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

PLGF-2 humana para la prevención y tratamiento de la insuficiencia cardíaca aterosclerótica

Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento y/o la prevención de la insuficiencia cardíaca o de uno o más fenotipos individuales de la insuficiencia cardíaca en mamíferos, usado factor de crecimiento placentario 2 (denominado a partir de ahora PlGF-2).

Antecedentes de la invención

A pesar del progreso significativo en la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, las estadísticas mundiales indica que la incidencia y la prevalencia de la insuficiencia cardíaca (HF, del inglés “heart failure”) continúan aumentando. En las sociedades envejecidas de los países industrializados la prevalencia de la HF es del 1% a la edad entre los 50 y los 59 años, pero del 10% por encima de la edad de 75 años. Además, el aumento de la supervivencia tras un infarto de miocardio y los avances en las terapias farmacológicas y dispositivos para la prevención de la muerte cardíaca súbita han incrementado notablemente la población de pacientes con riesgo de desarrollar HF crónica.

Estudios previos han demostrado que la administración de isoforma 2 del factor de crecimiento placentario (PlGF-2) puede inducir la angiogénesis y mejorar la función del miocardio regional y global en un modelo de roedor de infarto de miocardio agudo (AMI) (Binsalamah et al. 2011 Int J Nanomed 6, 2667; Roncal et al. 2008 J Pathol 216, 236; Takeda et al. 2009 Circ J 73, 1674). Sigue sin estar claro si una dosis individual de isoforma 1 de factor de crecimiento placentario (PlGF-1) o un periodo definido de administración sostenida pueden potenciar la función global cardíaca en un modelo de animal grande representativo de la enfermedad en humanos (Kolakowski et al. 2006 J Card Surg 21, 559; Iwasaki et al. 2011 PLos One 6, e24872). Se ha demostrado recientemente que la infusión sistémica de rhPlGF-1 aumenta significativamente el flujo sanguíneo regional y la función contráctil del miocardio isquémico crónico sin efectos adversos. Sin embargo, la mejora parcial de la función contráctil regional no se tradujo en una recuperación adicional de la función LV global (Liu et al. 2013 Am J Physiol Heart Circ Physiol 304, H885). Actualmente faltan conocimientos similares sobre el efecto de PlGF-2.

Aunque existen algunas publicaciones que describen los efectos particulares de PlGF-1 y PlGF2 sobre los parámetros de la HF en modelos específicos, éstas no consiguen proporciona una indicación directa del potencial terapéutico de dichas proteínas, y además no permiten la comparación entre datos obtenidos para PlGF1 y PlGF2. De hecho, mientras que Binsalamah et al. 2011 (Int J Nanomed 6, 2667), Kolakowski et al. 2006 (J Card Surg 21, 559) y Iwasaki et al. 2011 (PLos One 6, e24872) usaron un modelo de rata, solo Binsalamah et al. (2011) y Kolakowski et al. (2006) administraron intramiocardialmente proteína PlGF2 y PlGF1 en salino, respectivamente. Binsalamah et al. (2011) también administraron proteína PlGF2 intramiocardialmente atrapada en nanopartículas. Iwasaki et al. (2011) usaron administración intramiocardial terapéutica génica de PlGF1 (a través de un plásmido que codifica PlGF-1). Binsalamah et al. (2011) aplicaron ecocardiografía para determinar la fracción de eyección ventricular (LVEF%), mientras que Kolakowski et al. (2006) usaron un catéter de conductancia insertado en el ventrículo izquierdo usando una técnica de pecho abierto. Por lo tanto, los resultados obtenidos no permiten la determinación de diferencias eventuales en el efecto terapéutico entre PlGF1 y PlGF2. Roncal et al. 2008 (J Pathol 216, 236) y Takeda et al. 2009 (Circ J 73, 1674) se basaron ambos en un modelo de ratón de HF. Mientras que Roncal et al. (2008) aplicó terapia génica (vector de adenovirus) para administrar PlGF2, Takeda et al. (2009) administraron proteína PlGF1 recombinante. Nuevamente, esta diferencia dificulta una comparación fiable de los resultados obtenidos y no permite discernir los efectos terapéuticos eventuales mejores de una isoforma de PlGF respecto a la otra isoforma de PlGF. Wu et al. 2013 (Eur Heart J 34 S1, 415) en un modelo porcino de isquemia de miocardio crónica con fracción de eyección reducida demostró una fracción de eyección ventricular izquierda mejorada y un volumen final sistólico ventricular izquierdo reducido tras una infusión sistémica de PlGF2. El modelo usado por Wu et al. fue un modelo no aterosclerótico en el que se indujo una isquemia de miocardio crónica con una fracción de eyección reducida mediante implante de un stent limitador de flujo.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una composición que comprende proteína de factor de crecimiento placentario 2 (PlGF-2) para uso en el tratamiento o la prevención de un fenotipo de insuficiencia cardíaca en un mamífero aterosclerótico.

El fenotipo de insuficiencia cardíaca puede definirse como uno cualquiera de, o una combinación de: una disfunción ventricular, un volumen final sistólico incrementado, una fracción de eyección reducida, una remodelación ventricular o un volumen final diastólico incrementado. En particular, la disfunción ventricular puede estar definida por un volumen final sistólico incrementado y/o una fracción de eyección reducida. Alternativamente, la disfunción ventricular puede estar definida por una relajación afectada, una presión de llenado ventricular incrementada y una fracción de eyección preservada. En particular, la remodelación ventricular puede estar definida por un volumen final diastólico incrementado.

El fenotipo de insuficiencia cardíaca a tratar o prevenir puede presentarse en el ventrículo izquierdo y/o el derecho. En una realización particular, se presenta en el ventrículo izquierdo.

La proteína PlGF-2 de las composiciones descritas anteriormente puede ser cualquier proteína PlGF-2 recombinante, tal como una obtenida de un cultivo celular de mamífero. Un ejemplo de dicho cultivo celular de mamífero es un cultivo de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o un cultivo de células equipotentes. Dicho cultivo celular puede ser capaz de expresar una proteína PlGF-2 de un modo transitorio o constitutivo. La proteína PlGF-2 de las composiciones descritas anteriormente en una realización es una proteína PlGF-2 humana, tal como la definida por la SEQ ID NO: 1, o variantes polimórficas (polimorfos) de la misma.

Cualquiera de las composiciones que comprenden proteína PlGF-2 descritas anteriormente es en particular para uso mediante administración sistémica. Dicha administración sistémica puede ser administración endovascular (p.ej., intravenosa) o subcutánea.

Leyendas de las figuras

Figura 1. El tratamiento con RhPLGF2 mejora la función de miocardio regional. Engrosamiento de pared regional derivada de imagen de resonancia magnética, como indicador de que la función de miocardio regional se preservó mejor en la región isquémica en reposo y durante estrés inducido por dobutamina en cerdos tratados con rhPLGF2 en comparación con los controles. Marcadores del gráfico: cuadrado relleno (■) = isquémico, control (salino tamponado con fosfato), n=12; triángulo relleno (▲) = isquémico, tratado con rhPlGF2, n=12; diamante relleno (♦): pared anterior de simulacro, n=3. Marcadores estadísticos: * p<0,05 frente a remoto y simulacro; † p<0,05 frente a reposo; ‡ p<0,05 frente a estrés de dosis baja; # p<0,05 frente a control.

Figura 2. El flujo sanguíneo de miocardio (MBF, del inglés “myocardial blood flow”) en reposo y durante estrés inducido por adenosina en el área isquémica de corazones tratados con rhPLGF2 fue mayor que en los controles o en los simulacros (panel izquierdo). El MBF fue mayor en condiciones de estrés que en reposo, lo que indica una reserva perfusional. No hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la región remota (panel derecho). Marcadores del gráfico para región isquémica: cuadrado relleno (■) = control (salino tamponado con fosfato), n=11; triángulo relleno (▲) = tratamiento con PlGF-22, n=11; diamante relleno (♦): simulacro, n=2. Marcadores de gráfico para región remota (panel derecho): cuadrado (□) = control (salino tamponado con fosfato), n=11; triángulo hueco (Δ) = tratamiento con PlGF-2, n=11; diamante hueco (◊) = simulacro, n=2. Marcadores estadísticos: * p<0,05 frente a remoto y simulacro; † p<0,05 frente a reposo; ‡ p<0,05 frente a control.

Figura 3. Diagrama de flujo que muestra el diseño experimental aplicado a un modelo de ratón de infarto de miocardio con reperfusión en fondo aterosclerótico. LAD = arteria coronaria descendente anterior izquierda; PBS = salino tamponado con fosfato); PlGF = PlGF-2 recombinante humano.

Figura 4. Diagrama de flujo del protocolo de estudio en un modelo de ratón de infarto de miocardio con reperfusión en fondo aterosclerótico. LAD = arteria coronaria descendente anterior izquierda; PBS = salino tamponado con fosfato); PlGF = PlGF-2 recombinante humano; xW = x semanas; ECHO = ecocardiografía; IHC = inmunohistoquímica.

Figura 5. Volumen final sistólico y final diastólico de ventrículo izquierdo (LV) en grupos de control (tratado con PBS) y tratado con rhPLGF2 a tiempo 0W = línea base (BL), a 8 semanas (correspondiente a 4 semanas después de la inducción del infarto de miocardio e inicio de los tratamientos), y a las 12 y 20 semanas. El volumen final diastólico LV indexado al área superficial del cuerpo (Panel A) y el volumen final sistólico LV indexado al área superficial del cuerpo (Panel B) aumentaron significativamente después de MI en el grupo de control, pero no después del tratamiento con rhPLGF2. * p<0,05 frente a línea base; ** p<0,05 frente a MI a las 8 semanas.

Figura 6. Función global de ventrículo izquierdo (LV) en grupos de control (tratado con PBS) y tratado con rhPLGF2 a tiempo 0 = línea base (BL) a 8 semanas (4 semanas después de la inducción del infarto de miocardio y correspondiente al inicio de los tratamientos), y a las 12 y 20 semanas. Después de 12 y 20 semanas, la fracción de eyección (EF) fue significativamente superior después del tratamiento con rhPLGF2. * p<0,05 frente a línea base; ** p<0.05 frente a MI a 8 semanas.

Figura 7. Se evaluó la inflamación cardíaca en ratones de control (PBS) y tratados con rhPLGF2 midiendo el número de células positivas para MAC3 en la región remota del corazón (Panel A) y en las áreas isquémicas (Panel B). El número de células positivas para MAC3 fue mayor después de 20 semanas, en comparación con 12 semanas, en ambos grupos de tratamiento. * p<0,05 frente a 12 semanas.

Figura 8. Velocidad sanguínea aórtica máxima, medida usando ultrasonidos de onda de pulso Doppler. Panel A: una imagen de escáner de la aorta con las 5 posiciones de medida: 1 = raíz aórtica; 2 = aorta ascendente; 3 = arco aórtico próximo a la arteria innominada; 4 = arco aórtico próximo a la arteria carótida; 5 = arco aórtico próximo a la arteria subclavia. Panel B: Velocidad sanguínea máxima en el arco aórtico (midiendo en el punto 3) en la línea base (BL; 0 semanas = 0W), 4 semanas después del infarto de miocardio, correspondiente al inicio de la administración de PBS o rhPlGF-2 (MI 8W) y a las 12 y 20 semanas. Se observó una elevación transitoria y similar de la velocidad sanguínea máxima a las 12 semanas en ambos grupos. * p<0,05 frente a línea base.

Figura 9. Se midió la vascularización en placas aórticas en animales tratados con control (PBS) y rhPLGF2 y se expresó como área capilar relacionada con el área de placa (Panel A) y como área arteriolar relativa a área de placa (Panel B). La densidad capilar y arteriolar en las placas fue similar entre los grupos de tratamiento a diferentes tiempos.

Figura 10: La respuesta de inflamación en las lesiones ateroscleróticas, evaluada como área de células positivas para MAC3 relativa al área de placa, fue comparable entre los grupos tratados con rhPLGF-2 y control (PBS).

Descripción detallada de la invención

Los modelos de roedor previos de infarto de miocardio agudo provocados por ligación permanente de la arteria coronaria descendente anterior izquierda inducían isquemia cardíaca y tamaños de infarto extensivos (Binsalamah et al. 2011 Int J Nanomed 6, 2667; Roncal et al. 2008 J Pathol 216, 236; Takeda et al. 2009 Circ J 73, 1674). El modelo porcino aplicado en los experimentos subyacentes a la presente invención usa tecnología de stent de reducción de flujo para imitar el modelo de arteria coronaria estrechada en pacientes con enfermedad arterial coronaria avanzada, y está asociada a un infarto de miocardio modesto, pero induce cambios significativos en la función ventricular izquierda (disfunción contráctil inducida por isquemia) que incluyen una función global ventricular izquierda dificultada indicada por un volumen final sistólico (EDV) incrementado y una fracción de eyección (EF) reducida (Liu et al. 2013 Am J Physiol Heart Circ Physiol 304, H885). El volumen final diastólico (EDV) no aumenta, o solo marginalmente, por tanto, este modelo representa solo una modesta dilatación ventricular. El modelo de reducción de flujo de arteria coronaria porcino (es decir, de *Sus scrofa*, cerdo) representa la patología de enfermedad cardíaca isquémica clínicamente relevante con insuficiencia cardíaca (HF) moderada. El modelo de ratón usado en la presente memoria de isquemia-reperfusión en fondo aterosclerótico (infarto de miocardio reperfusionado con deposición avanzada de placa aterosclerótica) permite estudiar el efecto clínico de un compuesto sobre la remodelación cardíaca y vascular, que incluye la disfunción contráctil (inducida por isquemia; fenotipos de HF: volumen final sistólico incrementado y fracción de eyección disminuida), remodelación ventricular (inducida por infarto; fenotipo de HF: volumen final diastólico incrementado) y modelo de flujo vascular patológico (deposición de placa aterosclerótica en las arterias principales).

La disfunción ventricular, la remodelación ventricular, el ESV incrementado, el EDV incrementado y la EF reducida son referidos en la presente memoria adicionalmente como (algunos de) los fenotipos de insuficiencia cardíaca (HF). El ESV incrementado y el EDV incrementado se determinan como volúmenes incrementados en comparación con los correspondientes volúmenes normales medidos y derivados de una población de sujetos sanos. Como estos volúmenes son dependientes del peso corporal, la normalización al área superficial de cuerpo (BSA) es útil y frecuentemente se usan valores indexados (EDVi, ESVi). La EF reducida se determina por comparación con la EF normal correspondiente medida y derivada de una población de sujetos sanos. La EF es el volumen de latido (volumen determinado como EDV – ESV) dividido por EDV.

Por ejemplo, en el grupo de control de humanos evaluados por Jörgensen et al. 2007 (Chest 131: 1050; ver la Tabla 2 incluida en el documento), el EDVi de ventrículo izquierdo es de 84 ± 15 mL/m^2, el ESVi de ventrículo izquierdo es de 34 ± 11 mL/m^2, el EDVi de ventrículo derecho es de 91 ± 15 mL/m^2, y el ESVi de ventrículo derecho es de 42 ± 11 mL/m^2. La EF normal en humanos se considera que es >50% ("ESC Guidelines for diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure" 2012, Eur Heart J 33: 1787), como corroboraron Jörgensen et al. 2007 (ver anterior), destacando una EF de ventrículo izquierdo de 60 ± 8% y una EF de ventrículo derecho de 54 ± 7%. En ratones ApoE-/- como los usados en la presente memoria, el EDV de línea base normal está alrededor de 25-35 µL, y el ESV de línea base normal está alrededor de 12-17 µL. Como estos volúmenes dependen del peso corporal, es útil la indexación referida al área superficial de cuerpo (BSA). Para ratones, se puede usar la siguiente fórmula para calcular la BSA (siendo BW el peso corporal en gramos): BSA (m^2) = (9 x BW^(2/3))/10000. Con un BW de línea base medio = 17,4 ± 1,8 g, los valores de EDV y ESV de línea base indexados son EDVi = 6,4 ± 1,5 (mL/m^2) y ESVi = 2,8 ± 0,8 (mL/m^2). Para ratones, una fracción de eyección normal es de 55-65%.

Estudios previos con PlGF-1 en el modelo porcino fueron desalentadores debido a que no se observaron mejoras en el volumen final sistólico (ESV) del ventrículo izquierdo (LV) ni en la fracción de eyección (EF) LV a las 8 semanas (Liu et al. 2013 Am J Physiol Heart Circ Physiol 304, H885). En el trabajo que conduce a la presente invención (Ejemplo 1), se observó una mejora significativa tanto en el LVESV como en la LVEF a las 8 semanas cuando se administró PlGF-2 en las mismas condiciones usadas previamente con PlGF-1. En vista de la alta similitud de secuencia entre PlGF-1 y PlGF-2, esta observación es muy sorprendente e inesperada, y añade la insuficiencia cardíaca como nueva indicación tratable mediante la administración de PlGF-2. El modelo de ratón aterosclerótico de HF usado en la presente memoria (Ejemplo 2) confirma los efectos beneficiosos del PlGF-2 en la función ventricular (como en el modelo porcino). Adicionalmente, se observó un efecto beneficioso de PlGF-2 en la remodelación ventricular. Además, el PlGF-2 demostró ser seguro, ya que no indujo daño cardíaco ni inflamación de miocardio y no aumentó la inestabilidad de placa debido a neovascularización o infiltración de células inflamatorias. Estas observaciones son sorprendentes e inesperadas, ya que el PlGF es conocido por ser pro-inflamatorio y debido a que la pérdida de PlGF retrasa el desarrollo de lesión aterosclerótica (Roncal et al. 2010, Cardiovasc Res 86: 29).

En un aspecto, por tanto, la invención se refiere a proteína de factor de crecimiento placentario 2 (PlGF-2) para uso en el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca o más particularmente de uno o más de los fenotipos específicos de insuficiencia cardíaca en un mamífero descritos en la presente memoria. La invención proporciona una

composición que comprende proteína de factor de crecimiento placentario 2 (PlGF-2) para uso en el tratamiento o la prevención de un fenotipo de insuficiencia cardíaca en un mamífero. El fenotipo de insuficiencia cardíaca puede definirse como uno cualquiera de los siguientes, o una combinación de los mismos: una disfunción ventricular, un volumen final sistólico incrementado, una fracción de eyección reducida, remodelación ventricular, o un volumen final diastólico incrementado. En particular, la disfunción ventricular puede estar definida por un volumen final sistólico y/o una fracción de eyección reducida. Alternativamente, la disfunción ventricular puede estar definida por una relajación alterada, una presión de llenado ventricular incrementada y una fracción de eyección preservada. En particular, la remodelación ventricular puede estar definida por un volumen final diastólico incrementado.

Alternativamente, la invención se refiere a PlGF-2 para uso en el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca en un mamífero aterosclerótico. Dicha insuficiencia cardíaca puede venir acompañada de una disfunción ventricular. Alternativa o adicionalmente a la disfunción ventricular, puede venir acompañada de una fracción de eyección ventricular reducida o de una fracción de eyección ventricular preservada.

Alternativamente, la invención se refiere a PlGF-2 para uso en la mejora de la fracción de eyección ventricular de un corazón de mamífero en un mamífero aterosclerótico. Dicha fracción de eyección ventricular reducida puede venir acompañada de insuficiencia cardíaca.

Alternativamente, la invención se refiere a PlGF-2 para uso en el tratamiento, prevención o mejora de disfunción ventricular en un mamífero aterosclerótico. Dicha disfunción ventricular puede venir acompañada de insuficiencia cardíaca.

Alternativamente, la invención se refiere a PlGF-2 para uso en el tratamiento o la prevención de remodelación ventricular (hipertrófica) de un corazón de mamífero en un mamífero aterosclerótico. Dicha remodelación ventricular hipertrófica puede venir acompañada de insuficiencia cardíaca.

En la insuficiencia cardíaca, se puede ver afectado el ventrículo izquierdo y/o el ventrículo derecho. Por lo tanto, en cualquiera de los casos, la insuficiencia cardíaca o el fenotipo de insuficiencia cardíaca a tratar o prevenir puede expresarse o presentarse en el ventrículo izquierdo y/o derecho. En una realización particular, se expresa o se presenta en el ventrículo izquierdo.

Una de las indicaciones que pueden conducir al infarto de miocardio es la aterosclerosis, que se caracteriza por la deposición de placas que limitan el flujo sanguíneo en los vasos sanguíneos. Como se demuestra en la presente memoria (ver el Ejemplo 2), las composiciones descritas anteriormente son seguras y efectivas para su uso en el tratamiento o la prevención de un fenotipo de insuficiencia cardíaca en un mamífero que padece aterosclerosis (un mamífero aterosclerótico).

La proteína PlGF-2 de las composiciones descritas anteriormente puede ser una proteína PlGF-2 recombinante, tal como una obtenida de un cultivo celular de mamífero. Un ejemplo de dicho cultivo celular de mamífero es un cultivo de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o un cultivo de células equipotentes. Dicho cultivo celular puede ser capaz de expresar una proteína PlGF-2 de un modo transitorio o constitutivo. La proteína PlGF-2 de las composiciones descritas anteriormente en una realización es proteína PlGF-2 humana, tal como se define en la SEQ ID NO: 1, o variantes polimórficas de la misma (polimorfos).

En realizaciones particulares, las composiciones de proteína PlGF-2 son composiciones que consisten esencialmente en la proteína PlGF-2, en donde la proteína PlGF-2 es el único ingrediente activo. En otras realizaciones particulares, la proteína PlGF-2 es el único factor angiogénico de la composición.

Cualquiera de las composiciones que comprenden proteína PlGF-2 descritas anteriormente en la presente memoria son en particular para uso mediante administración sistémica. Dicha administración sistémica puede ser administración endovascular (p.ej., intravenosa) o subcutánea.

“Insuficiencia cardíaca (HF)” se puede definir como una anormalidad de la estructura cardíaca y/o de la función cardíaca que conduce a una insuficiencia del corazón para suministrar oxígeno a un ritmo proporcional a lo requerido por los tejidos en metabolización (“ESC Guidelines for diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure” 2012, Eur Heart J 33: 1787). Se muestra como un conjunto de signos clínicos (p.ej., tensión elevada de la vena yugular, chasquidos pulmonares y ápice latido desplazado) y síntomas clínicos (p.ej., falta de aliento, hinchamiento de tobillos y fatiga) que son resultado de una anomalía en la función cardíaca y de un resultado clínico limitante (es decir, muerte cardiovascular o total, hospitalización por HF) y una calidad de vida limitada. La insuficiencia cardíaca debida a disfunción ventricular engloba a los pacientes con una fracción de eyección reducida y a aquellos con una fracción de eyección preservada. Los eventos isquémicos, que incluyen el infarto de miocardio, pueden ser la causa subyacente de la insuficiencia cardíaca, pero otras causas incluyen hipertensión, enfermedad cardíaca valvular, cardiomiopatía, fumar cigarrillos, obesidad, diabetes, etc. En vista de las observaciones presentadas en la presente memoria, el fallo cardíaco con causa(s) no isquémica(s) se incluye específicamente como un subgrupo de estados fisiológicos de fallo cardíaco en los que el resultado cardíaco es insuficiente para alcanzar las necesidades del cuerpo y/o los pulmones. Se puede cuantificar una serie de fenotipos de HF (ver más arriba) y servir como parámetros medibles, como se ha determinado en los modelos de cerdo y ratón usados en la presente memoria (ver Ejemplo 1 y 2).

La HF con EF preservada, observada en pacientes con remodelación ventricular hipertrófica con o sin co-morbilidades importantes que incluyen diabetes mellitus, hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal, obesidad, tiene un resultado igual de malo que la HF con EF reducida. La discrepancia entre perfusión e hipertrofia se debe al fenotipo de HF y a la disfunción ventricular. En base a esta analogía, el alcance de esta invención incluye pacientes diagnosticados con HF con EF preservada. Actualmente no existe una terapia específica para mejorar el resultado clínico en HF con EF preservada.

Otros fenotipos de HF se refieren a la disfunción ventricular definida por una relajación afectada, una presión de llenado ventricular incrementada y una EF preservada. En este fenotipo de HF, la EF está por tanto preservada, pero los ventrículos no se relajan apropiadamente durante la diástole. Si la relajación del ventrículo se ve afectada de este modo, la presión en el interior aumentará según trata de entrar la sangre del siguiente latido (presión de llenado incrementada).

El factor de crecimiento placentario humano, hPlGF, fue descrito por primera vez por Maglione et al. 1991 (Proc Natl Acad Sci USA 88, 9267) y se refiere a 3 variantes isofórmicas de un polipéptido de 221 aminoácidos accesible bajo el nº de acceso del GenBank P49763. El sujeto de la presente invención es la isoforma 2 del PlGF, PlGF-2 (también denominado PlGF2), que es la isoforma que comprende un sitio de unión de heparina. La secuencia de referencia de longitud completa de hPlGF-2 (es decir, la proteína madura que carece de la secuencia señal de 18 aminoácidos) se incluye a continuación:

LPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHM
FSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRC
ECRPLREKMKPERRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDA VPRR (SEQ ID NO: 1).

Se pueden encontrar secuencias de proteínas PlGF-2 de otras especies, en particular de especies de mamíferos, buscando, p.ej., en GenBank, p.ej., ejecutando el programa BLAST con la SEQ ID NO: 1. El término “un PlGF-2” en general se refiere a una molécula de PlGF de cualquier origen que contiene un dominio de unión a heparina (HBD, del inglés “heparin binding domain”) de tipo hPlGF2. Dicho HBD de tipo hPlGF2 puede ser altamente homólogo (p.ej. idéntico al 95% o más) con respecto al HBD de hPlGF2, o puede ser menos homólogo (p.ej., idéntico al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o menos de 95%) con respecto al HBD de hPlGF2. El HBD de hPlGF2 está subrayado en la SEQ ID NO: 1 anterior, y más particularmente se refiere a la inserción de una secuencia de 21 aminoácidos RRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO: 2) relativa a hPlGF1. La unión de una proteína o compuesto a heparina se puede determinar fácilmente por medio de un ensayo de unión a heparina, p.ej., mediante la unión competitiva ligada a enzima de moléculas biológicas de unión de heparina (p.ej., en placas de unión de heparina de 96 pocillos, BD Biosciences). El término “un PlGF-2” incluye además variantes polimórficas de una secuencia de PlGF2 de referencia para un género dado que puede existir en dicho género.

También se pretende el uso de derivados de proteínas PlGF-2 en cualquiera de los aspectos anteriormente descritos de la invención, y el término ser refiere a moléculas híbridas que contienen al menos una porción de proteína PlGF-2 y una porción adicional que difiere de la presente en el PlGF-2 natural. Los ejemplos de derivados de PlGF-2 incluyen, p.ej., proteínas de fusión que comprenden PlGF-2 y una proteína no relacionada con PlGF (p.ej., una albúmina o un dominio de unión a heparina adicional de una proteína diferente a PlGF-2) y proteínas de fusión que comprenden PlGF-2 y uno o más dominios de unión a heparina de PlGF-2. Los derivados de PlGF-2 incluyen además, p.ej., la adición de un compuesto no proteínico a PlGF-2, p.ej., pegilación de PlGF-2. El término derivado de PlGF-2 incluye además muteínas de PlGF-2 activas. Dichas muteínas pueden incluir por ejemplo la mutación de la cisteína C-terminal a otro aminoácido como se describe en el documento WO 03/097688. Sea cual sea la naturaleza de la derivación, el derivado de proteína PlGF-2 resultante debería retener su actividad biológica; sin embargo, se contempla que la dosis de un derivado de PlGF-2 activo pueda ser igual, o pueda necesitar ser superior o inferior, a la dosis de PlGF-2 natural a fin de obtener el mismo efecto terapéutico. Mientras que el PlGF-2 se une solo al receptor FLT-1 (y a su variante soluble sFLT-1), el PlGF-2 se une adicionalmente a neuropilina-1 y -2. PlGF-1 y PlGF-2 activan diferentes cascadas de señalización (Kendall et al. 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90: 10705; Migdal et al. 1998, J Biol Chem 273: 22272; Persico et al. 1999, Curr Top Microbiol Immunol 237: 31). En vista de la estructura, modelo de unión a receptor y señalización diferentes, PlGF-1 en este contexto no se considera como un derivado de PlGF-2.

En todos los diversos aspectos de la presente invención, el término “mamífero” se considera en su significado común e incluye, a saber, humanos, equinos, felinos, caninos, porcinos, bovinos, ovinos y similares.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” tal como se usa en la presente memoria preferiblemente significa una cantidad capaz de llevar a cabo el efecto o efectos terapéuticos contemplados. Se refiere a la cantidad requerida de ingrediente activo (una proteína PlGF-2 o un derivado de PlGF-2), en un método de administración dado y/o en un régimen de administración dado, para producir un efecto terapéutico beneficioso. Un efecto terapéutico beneficioso incluye al menos detener o inhibir la progresión adicional de una afección, estado fisiológico o enfermedad. Puede incluir además, aunque no debe, cualquier nivel de mejora, alivio, regresión o reducción, incluyendo aunque no necesariamente la recuperación completa, de una afección, estado fisiológico o enfermedad. Aunque la cantidad terapéuticamente activa dependerá del método de administración y/o del régimen de administración, puede corresponder a una cantidad de aproximadamente 2 a 2000 microgramos por kg de peso corporal del mamífero a tratar.

El ingrediente activo (una proteína PlGF-2 o un derivado de PlGF-2) se administra al mamífero o al paciente humano sistémicamente como proteína, p.ej. proteína recombinante. La expresión recombinante de una proteína PlGF-2 o de un derivado de PlGF-2 puede ser en un hospedante procariótico (p.ej., *Escherichia coli*) aunque puede existir una ventaja en producir la proteína glicosilada tal como mediante la expresión en células eucarióticas (p.ej., una línea de células de mamífero como CHO, o células de insecto). Dichas líneas celulares pueden ser capaces de expresar PlGF-2 o un derivado de PlGF-2 de un modo tanto transitorio como constitutivo.

La administración sistémica (p.ej., subcutánea o endovascular, p.ej., intravenosa o intracoronaria) tiene ventajas prácticas sobre la inyección intramiocardial. La última se lleva a cabo intraoperativamente o mediante catéteres sofisticados. La administración intramiocardial tiene las siguientes limitaciones adicionales: el tiempo de administración es único, la repetición requiere una intervención adicional y el volumen inyectado debe mantenerse al mínimo para evitar un edema local. Por otro lado, alcanzar una dosis suficiente de un agente terapéutico por administración sistémica puede venir dificultado por efectos secundarios (no específicos de órgano). Éste es, por ejemplo, el caso de los factores de crecimiento VEGF-A y FGF, estando sus máximas dosis intravenosas o intracoronarias limitadas por su propensión a causar hipotensión y edema. Tales efectos secundarios, sin embargo, no son ejercidos por PlGF (Luttun et al. 2002, Ann NY Acad Sci 979: 80). Adicionalmente, la eficacia y la seguridad de la administración sistémica de PlGF, tal como se demuestra en la presente memoria, alivia los problemas afrontados por los agentes terapéuticos angiogénicos evaluados previamente, p.ej., VEGF-A y FGF (ver Kornowski et al. 2000, Circulation 101: 454, para una revisión). La administración sistémica de una proteína PlGF-2 o de un derivado de PlGF-2 como el descrito anteriormente puede realizarse a través de cualquier ruta adecuada (p.ej., administración subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial, intra-aórtica, intracoronaria o parenteral, o mediante simple cateterización; un modo adicional de administración es una administración continua, tal como a través de una bomba osmótica). Una ruta preferida de administración sistémica es la administración intravenosa y/o subcutánea. No se considera que constituyan una administración sistémica de una proteína PlGF-2 o de un derivado de PlGF-2 la administración intramiorcardial (debido a la limitada propagación sistémica del compuesto administrado) y la administración mediante terapia génica.

En cualquiera de los casos anteriores, el ingrediente activo (una proteína PlGF-2 o un derivado de PlGF-2) puede ser incluido en una formulación que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa cualquier material o sustancia con la cual se formula el(los) ingrediente(s) activo(s) para facilitar su aplicación o diseminación, por ejemplo, mediante disolución, dispersión o difusión de dicho ingrediente, y/o para facilitar su almacenamiento, transporte o manejo sin afectar a su eficacia. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido, es decir, las composiciones de esta invención pueden, de forma adecuada, usarse o almacenarse como concentrados, emulsiones, disoluciones, granulados, partículas o polvos.

Los vehículos farmacéuticos para uso en las presentes composiciones son bien conocidos por los especialistas en la técnica, y no existe ninguna restricción particular para su selección en la invención. También pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes de dispersión, agentes emulsionantes, disolventes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro sódico) y similares, siempre que los mismos sean consistentes con la práctica farmacéutica, es decir, vehículos y aditivos que no creen un daño permanente en mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera conocida, por ejemplo, mezclando, recubrimiento y/o moliendo homogéneamente los ingredientes activos, en un procedimiento de una sola etapa o multi-etapa, con el material de vehículo seleccionado y, cuando sea apropiado, los demás aditivos, tales como agentes tensioactivos, también pueden prepararse mediante micronización, por ejemplo con el fin de obtenerlos en la forma de microesferas o nanopartículas para una liberación controlada o sostenida de los ingredientes activos.

Los agentes tensioactivos adecuados a usar en las composiciones farmacéuticas de la presente invención son materiales no iónicos, catiónicos y/o aniónicos que tienen buenas propiedades emulsionantes, dispersantes y/o humectantes. Los tensioactivos activos aniónicos adecuados incluyen jabones solubles en agua y agentes tensioactivos sintéticos solubles en agua. Los jabones adecuados son sales de metales alcalinos o alcalino-térreos, sales de amonio sustituidas o no sustituidas de ácidos grasos superiores (C_{10}-C_{22}), p.ej., las sales sódicas o potásicas de ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales obtenibles a partir de, p.ej., aceite de coco o aceite de sebo. Los tensioactivos sintéticos incluyen sales de sodio o de calcio de ácidos poliacrílicos; sulfonatos y sulfatos grasos; derivados de benzimidazol sulfonados y alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos habitualmente están en forma de sales de metal alcalino o alcalino-térreo, sales de amonio no sustituidas o sales de amonio sustituidas con radicales alquilo o acilo que presentan entre 8 y 22 átomos de carbono, p.ej., la sal sódica o cálcica de ácido lignosulfónico o de ácido dodecilsulfónico, o una mezcla de sulfatos de alcoholes grasos obtenida a partir de ácidos grasos naturales, sales de metal alcalino o alcalino-térreo de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico (tal como lauril sulfato sódico) y ácidos sulfónicos de aductos de alcohol graso/óxido de etileno. Los derivados de benzimidazol sulfonado preferiblemente contienen de 8 a 22 átomos de carbono. Los ejemplos de alquillaurilsulfonatos son las sales de sodio, calcio o alcanolamina de ácido dodecilbenceno sulfónico o de ácido dibutil-naftaleno sulfónico o un producto de condensación de ácido naftaleno sulfónico/formaldehído. También son adecuados los correspondientes fosfatos, p.ej., sales de éster de ácido fosfórico y un aducto de p-nonilfenol con óxido de etileno y/o de propileno, o fosfolípidos. Los fosfolípidos adecuados para este propósito son los fosfolípidos naturales (originarios

de células animales o vegetales) o sintéticos del tipo cefalina o lecitina, tal como, p.ej., fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina, lisolecitina, cardiolipina, dioctanilfosfatidil-colina, dipalmitoilfosfatidil colina, y sus mezclas.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen derivados polietoxilados y polipropoxilados de alquilfenoles, alcoholes grasos, ácidos grasos, aminas o amidas alifáticas que contienen al menos 12 átomos de carbono en la molécula, alquilarilsulfonatos y dialquilsulfosuccinatos, tal como derivados de poliglicol éter de alcoholes alifáticos y cicloalifáticos, ácidos grasos saturados e insaturados y alquilfenoles, conteniendo dichos derivados preferiblemente de 3 a 10 grupos de glicol éter y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto de hidrocarburo (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto del alquilfenol. Otros tensioactivos no iónicos adecuados son aductos solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilen glicol, etilendiaminopolipropilen glicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena alquílica, cuyos aductos contienen de 20 a 250 grupos de etilenglicol éter y/o de 10 a 100 grupos de propilenglicol éter. Dichos compuestos habitualmente contienen de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Los ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos son nonilfenol polietoxietanol, éteres poliglicolíticos de aceite de ricino, aductos de óxido de polipropileno/polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. Los ésteres de ácido graso de polietilen sorbitán (tales como el trioleato de polioxietilen sorbitán), glicerol, sorbitán, sacarosa y pentaeritritol también son tensioactivos no iónicos adecuados.

Los tensioactivos catiónicos adecuados incluyen sales de amonio cuaternarias, preferiblemente haluros, que tienen 4 radicales de hidrocarburo sustituidos opcionalmente con grupos halo, fenilo, fenilo sustituido o hidroxilo; por ejemplo sales de amonio cuaternarias que contienen como N-sustituyente al menos un radical alquilo C8-C22 (p.ej., cetilo, laurilo, palmitilo, miristilo, oleilo y similares) y, como sustituyentes adicionales, radicales alquilo inferiores no sustituidos o halogenados, radicales bencilo y/o radicales hidroxi-alquilo inferiores. Una descripción más detallada de agentes tensioactivos adecuados para este propósito se puede encontrar, por ejemplo, en “McCutcheon’s Detergents and Emulsifiers Annual” (MC Publishing Crop., Ridgewood, Nueva Jersey, 1981), “Tensid-Taschebuch”, 2ª ed. (Hanser Verlag, Viena, 1981) y “Encyclopaedia of Surfactants” (Chemical Publishing Co., Nueva York, 1981).

Se pueden incluir ingredientes adicionales en la formulación del ingrediente activo a fin de controlar la duración de la acción del ingrediente activo en la composición farmacéutica de la invención. Así, se pueden obtener composiciones de liberación controlada seleccionando los vehículos poliméricos adecuados, tal como por ejemplo poliésteres, poliamino ácidos, polivinil pirrolidona, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina y similares. La velocidad de liberación del fármaco y la duración de la acción también se pueden controlar incorporando el ingrediente activo en partículas, p.ej., microcápsulas, de una sustancia polimérica tal como hidrogeles, ácido poliláctico, hidroximetilcelulosa, polimetil metacrilato y los polímeros descritos anteriormente. Dichos métodos incluyen sistemas de administración de fármacos coloidales como liposomas, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, etc. Dependiendo de la ruta de administración, la composición farmacéutica también puede requerir recubrimientos protectores.

Las formas farmacéuticas adecuadas para inyección usan disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para su preparación extemporánea. Los vehículos típicos para este propósito incluyen por tanto tampones acuosos biocompatibles, etanol, glicerol, propilen glicol, polietilen glicol y similares, y mezclas de los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto de PlGF-2 en la insuficiencia cardíaca en un modelo porcino

1.1 Producción de PlGF-2

Se desarrolló una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) recombinante que expresa rhPlGF-2 (PlGF-2 humano recombinante) usando una construcción pEE144hP2 en la que se insertó la secuencia de ADNc de hPlGF-2. Se generó rhPlGF-2 glicosilado mediante cultivo de alta densidad celular sono-perfusionado en un biorreactor. Se purificó rhPlGF-2 procedente de las células CHO mediante diferentes etapas de cromatografía de afinidad. En una primera etapa, el medio de cultivo celular se concentró en una fibra hueca con un valor de corte de 3 kd, de tal modo que el PlGF-2 (28 kd) no pasó a través de la membrana. En segundo lugar, tras añadir sulfato amónico 2M, el concentrado fue purificado adicionalmente en una columna de Octil Sepharose hidrofóbica. El rhPlGF-2 fue eluído con dietanolamina 10 mM a pH 8,5 o en algunos casos incluso hizo falta etilen glicol al 40% en agua. La fracción eluída fue desalinizada y el tampón se cambió a PBS usando Sephadex™ G-25 (GE Healthcare). En la última etapa de cromatografía de afinidad se usó una columna Heparin Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare) para retener rhPlGF-2 que contenía un dominio de unión a heparina. La proteína purificada fue obtenida mediante una elución por etapas usando NaCl 1M en PBS. Tras reunir las diferentes fracciones, el rhPlGF-2 purificado fue almacenado en PBS tras una desalinización adicional en Sephadex™ G-25 (GE Healthcare) a -20ºC.

1.2 Grupo de estudio

Esta invención es acorde a las directrices del Instituto Nacional Belga de Salud para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y el protocolo del presente estudio controlado aleatorizado doblemente ciego fue aprobado por el Comité de Ética local sobre investigación con animales (“Ethische Commissie Dierproeven”, KU Leuven, Lovaina, Bélgica).

En el día 0, se indujo isquemia miocardial usando la implantación de un stent de limitación de flujo en la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) (Liu et al. 2013, Am J Heart Circ Physiol 304: H885). A las 4 semanas, tras confirmación de la isquemia miocardial crónica en comparación con el grupo de simulacro (Sham), los cerdos fueron asignados aleatoriamente a rhPlGF-2 (PlGF-2) o PBS (Control) durante 10 días. Se midieron los parámetros hemodinámicos, se hicieron estudios de imagen por resonancia magnética (MRI), y se midieron las microesferas coloreadas a las 4 semanas y a las 8 semanas. A las 8 semanas, los cerdos fueron sometidos a eutanasia usando una sobredosis de propofol y cloruro potásico saturado. El ventrículo izquierdo (LV) distal al stent fue seccionado en 5 láminas perpendiculares al eje largo miocardial desde la base hasta el ápice para el análisis de microesfera e histológico.

Treinta y tres cerdos domésticos híbridos de cualquier género (*Sus scrofa*, peso 20-25 kg, Animalium K.U. Leuven, Lovaina, Bélgica) fueron premedicados con 300 mg de aspirina (Dispril, Reckitt Benckiser, Bruselas, Bélgica) y 300 mg de clopidogrel (Plavix, Sanofi, París, Francia) 1 día antes de la intervención. Los cerdos fueron sedados con Telazol (tiletamina 4 mg/kg y zolazepam 4 mg/kg) (Zoletil 100, Virbac Animal Health, Carros, Francia) y xilazina (2,5 mg/kg) (Vexylan, CEVA Sante Animale, Bruselas, Bélgica) y se introdujo anestesia con propofol intravenoso (3 mg/kg) (Diprivan, AstraZeneca, Bruselas, Bélgica) seguido de 10 mg/kg/h de infusión continua de propofol (Diprivan) y remifentanil (18 µg/kg/h) (Ultiva, GSK, Genval, Bélgica). La ventilación mecánica con una mezcla de aire y oxígeno (1:1) a un volumen de oleada de 8-10 mL/kg se ajustó para mantener normocapnia y normoxia, controlada con los valores de gas sanguíneo arterial. Las pulsaciones (HR, del inglés “heart rate”), el ritmo y el segmento ST fueron monitorizados continuamente usando electrocardiografía. Tras tratamiento de anticoagulación (heparina 10000 IU) y antiplaquetario (ácido acetilsalicílico 450 mg), en el día 0, se implantó un stent de limitación de flujo en la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) para inducir la disfunción ventricular. Se continuó con aspirina (300 mg) y clopidogrel (75 mg) diariamente durante el seguimiento.

Se alistaron treinta y seis cerdos (3 simulacros y 33 del grupo de estudio). El stent de limitación de flujo se implantó en los 33 cerdos del grupo de estudio, de los cuales 7 cerdos murieron de complicaciones agudas; 1 cerdo murió a los 9 días y otro a los 11 días debido a un infarto de miocardio grave (25-30% de masa LV). Veinticuatro cerdos fueron evaluados a las 4 semanas, aleatorizados a ciegas para el tratamiento (12 de control y 12 de PlGF-2) y fueron reevaluados a las 8 semanas.

1.3 Tratamiento aleatorizado con PlGF-2 o PBS

Después de la confirmación de hipoperfusión miocardial regional y de disfunción en reposo y durante estrés usando MRI, los animales fueron aleatorizados para infusión IV de 10 días de rhPlGF-2 o de PBS vía minibombas osmóticas. Se cuantificaron los niveles de PlGF en circulación usando un inmunoensayo de PlGF (Quantikine Elisa, R&D systems, Inc), que detecta las isoformas de PlGF-2 tanto humana como porcina, ya que comparten un 95% de identidad de aminoácidos. Las placas fueron recubiertas durante una noche (4ºC) con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente PlGF y bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con 1% de BSA, lavadas e incubadas con un anticuerpo policlonal biotinilado de PlGF anti-humano de cabra. Se detectó el rhPlGF ligado tras la incubación con un sustrato de estreptavidina-HRP. Como muestras de control positivos se utilizaron diluciones estándar de rhPlGF-2.

1.4 Niveles de PlGF después de 10 días de infusión IV

En comparación con los simulacros, los niveles de PlGF en suero fueron similares en el día 0 antes de la inducción de la isquemia miocardial y 4 semanas después (10±4 frente a 7±0 de simulacro y 14±9 frente a 10±2 pg/mL de simulacro, respectivamente) (grupo de 3 simulacros y 24 estudios). Por el contrario, los cerdos tratados con PlGF-2 presentaron niveles de PlGF en circulación más de 63 veces superiores al control y el simulacro 1 y 2 semanas después del implante de minibomba (semana 5: 799±302 frente a 11±5 en el control y 13±5 pg/mL en el simulacro, $p<0,05$; semana 6: 867±423 frente a 11±4 en el control y 12±5 pg/mL en el simulacro, $p<0,05$). A las 8 semanas, los niveles de PlGF fueron todavía más de dos veces superiores (18±9 frente a 8±3 en el control y 8±1 pg/mL en el simulacro, $p<0,05$) (12 de PlGF-2 y 12 de control).

1.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el software estadístico BioStat 2009 (versión 5.8.3.0, AnalystSoft). Los datos se expresan como media±SD. Se usó ANOVA y un test Fisher post-hoc para analizar las diferencias entre grupos. Se usó el test de t de Student para comparar las diferencias antes y después de los tratamientos. Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se presentó la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW), y las diferencias entre grupos identificadas usando los tests de Mann-Whitney o Wilcoxon.

1.6 La contractabilidad ventricular izquierda, medida usando la técnica de volumen-presión invasiva, mejoró significativamente con el tratamiento de PlGF-2

Ni el ritmo cardíaco ni la tensión sanguínea fueron significativamente diferentes en comparación con el simulacro a las 4 semanas. En el grupo isquémico, el stent de limitación de flujo indujo una reducción en la función sistólica (dP/dt_{max}), y un aumento del volumen final diastólico LV. En comparación con el control, la mejora significativa de la fracción de

eyección EF y el trabajo latido reclutable por precarga (PRSW, del inglés “preload recruitable stroke work”) se asociaron a la reducción del volumen sistólico final LV (LVESV) en los animales tratados con PlGF-2 (Tabla 1).

A las 4 semanas, se midieron las variables hemodinámicas con un catéter de conductancia de presión Millar 5-F (Millar instruments, Houston, TX, EE.UU.) posicionado en el ventrículo izquierdo (LV). Se registró el ritmo cardíaco (HR), las tensiones LV sistólica y diastólica final, y las primeras derivadas del aumento y caída de presión (dP/dt_{max} y dP/dt_{min}). A las 8 semanas, se llevaron a cabo medidas instantáneas de la tensión intraventricular y de la conductancia. La precarga LV se alteró con un catéter de globo posicionado en la vena cava inferior (IVC). Para corregir y calibrar el volumen de LV, se determinó el resultado cardíaco mediante el método de termodilución usando un catéter Swan-Ganz (Edwards Lifesciences LLC, Irvine, California) colocado en la arteria pulmonar. Se midió la resistividad sanguínea con una cubeta de resistencia (cubeta Rho) y se evaluó la conductancia paralela, atribuible a conductancia de la pared ventricular y el tejido conectivo usando 10 mL de inyecciones de salino hipertónico al 30% en IVC. El volumen final diastólico (EDV), volumen final sistólico (ESV), fracción de eyección (EF), dP/dt_{max} y dP/dt_{min} se calcularon en condiciones de estado estacionario. El trabajo latido reclutable por precarga (PRSW), un parámetro robusto independiente de la carga de la contractabilidad ventricular, se derivó durante una reducción de precarga transitoria con oclusión de IVC. Todas las variables fueron digitalizadas y procesadas con la unidad de registro PowerLab y el software LabChart (ADInstruments, Oxfordshire, Reino Unido).

En comparación con el control, la mejora significativa de EF y PRSW se asoció a una reducción de LVESV en los animales tratados con rhPlGF2. El grupo de control presentó un aumento de 2 veces en LVESV y unos valores de EF y PRSW significativamente menores que en los cerdos de simulacro (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la función global ventricular 8 semanas después de la colocación de stent y 4 semanas después del tratamiento aleatorizado usando lazos de volumen de presión.

	Control (n=11)	PlGF-2 (n=12)	Simulacro (n=3)
EDV (mL)	152±47	122±35	94±13
ESV (mL)	105±45 †	69±31 *	50±17
EF (%)	41±9 †	52±11 *	59±1
dP/dt_{max} (mmHg/s)	1322±438	1596±423	1997±435
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-1759±507	-2071±311	-2402±592
PRSW (mmHg)	41±21 ‡	76±24 *	71±19
Los valores son medias ± SD. EDV: volumen final diastólico; ESV: volumen final sistólico; EF: fracción de eyección; PRSW: trabajo latido reclutable por precarga. * p<0,05 frente a control; † p<0,05 frente a simulacro; ‡ p=0,05 frente a simulacro.			

1.7 El tratamiento con PlGF-2 mejora la función cardíaca global y regional en reposo y durante estrés por dobutamina (datos derivados de MRI cardíaca)

Se llevó a cabo un estudio de MRI cardíaca en un sistema 3T (TRIO-Tim, Siemens, Erlangen) a las 4 y 8 semanas usando activación electrocardiográfica, bobinas de superficie con dedicación cardíaca y durante respiración suspendida. Se evaluó la función global y regional con cine MRI en los ejes largo y corto verticales y horizontales, cubriendo el LV completo usando láminas de 6 mm de espesor, en reposo y durante estrés inducido por dobutamina. La dobutamina (Dobutrex, Merck, Overijse, Bélgica) fue infundida intravenosamente a 5 µg/kg/min y a continuación se valoró hasta alcanzar un ritmo cardíaco diana del 80% por encima de la línea base. Se evaluó la perfusión regional en reposo y durante estrés (adenosina 180 µg/kg/min) usando imagen de primer paso de bolo dual. La viabilidad miocardial fue evaluada usando MRI potenciada con contraste de retardo (LE).

Se ha publicado previamente una descripción completa de las secuencias de MRI (Wu et al. 2011, Cardiovasc_Res 89: 166). Todos los estudios de MRI fueron analizados usando un software dedicado con investigadores ciegos a la ubicación del tratamiento. La perfusión, función y LE regionales miocardiales fueron evaluadas en regiones anatómicas idénticas. En dichas láminas las delineaciones de los bordes LV epicardiales y endocardiales fueron divididas en 6 segmentos equiangulares. Para la determinación de la función LV global, los bordes endocardiales y epicardiales fueron trazados en láminas de eje corto de final diastólico y final sistólico. Calculamos los EDV y ESV de LV, el volumen de latido (SV) y la EF como un índice para la función global. La masa de LV y todos los volúmenes fueron reportados indexados respecto al área superficial del cuerpo (Schmidt-Nielsen 1984, “Scaling: Why is Animal Size so Important?”, New York: Cambridge University Press). Se midió el engrosamiento de la pared miocardial como un índice de la función regional en la región remota e isquémica. El flujo sanguíneo miocardial (MBF) se calculó como un parámetro de la perfusión regional en el área remota e isquémica. Puesto que la perfusión hiperémica puede definir de forma precisa la región isquémica en la isquemia crónica, la región isquémica se definió usando los umbrales segmentales (media-t0,95, n-1*sd*sqrt((n+1)/n)) obtenidos en el grupo de simulacro durante la perfusión de estrés a las 4 semanas. Para

el cálculo del tamaño del infarto de miocardio, se contornearon los bordes endocardial y epicardial y las regiones LE. El tamaño del infarto de miocardio (IS) se calculó como el volumen LE total normalizado al volumen LV miocardial.

Tras la infusión de PlGF-2, la EF mejoró significativamente entre las 4 y las 8 semanas en comparación al tratamiento de PBS. Esta mejora se asocia a una reducción en el índice de volumen final diastólico ESVi (Tabla 2A). La implantación del stent limitante de flujo indujo un infarto limitado a las 4 semanas (tamaño de infarto IS 4±6%, oscilando en 0-15%). En ambos grupos el tamaño de infarto (IS) fue comparable. A destacar, el IS permaneció invariable entre las 4 y las 8 semanas (Tabla 2A). A fin de comparar fácilmente, los datos originales relevantes reportados para PlGF-1 en el mismo modelo usado en la presente memoria para determinar el PlGF-2 (Tabla 4 en Liu et al. 2013 Am J Physiol Heart Circ Physiol 304, H885) se incluyen en la presente memoria en la Tabla 2B. Debería señalarse, sin embargo, que los valores publicados reflejan medias ± error estándar (SE) mientras que los valores proporcionados en la Tabla 2B reflejan medias ± desviación estándar (SD). Al contrario que los efectos de PlGF-2, el PlGF-1 no mejora la EF, ni reduce el ESVi.

Tabla 2A. Función global ventricular izquierda y análisis de estructura mediante MRI; estudio de PlGF-2.

	Control (n=12)		PlGF-2 (n=12)		Simulacro (n=7)	
	Valor absoluto	Cambio vs. 4 semanas	Valor absoluto	Cambio vs. 4 semanas	Valor absoluto	Cambio vs. 4 semanas
BW (kg)	64±5	16±5	61±5	19±5	63±12	18±6
LVMi (g/m^2)	56±7	-6±4	60±9	-2±7	67±18	0±6
EDVi (mL/m^2)	111±35	-7±16	105±32	-15±21	91±15	-6±13
ESVi (mL/m^2)	64±32	-1±11	53±29	-13±9†	40±6	-5±6
SVi (mL/m^2)	47±10	-6±6	51±12	-2±15	51±10	-1±8
EF (%)	44±11*	-2±2	51±11	5±6†	56±3	2±2
IS (% de LV)	4±6	0±2	4±6	0±1		

Los valores son medias ± SD. EDVi: índice de volumen final diastólico; ESVi: índice de volumen final sistólico; SVi: índice de volumen de latido; EF: fracción de eyección; LVMi: índice de masa ventricular izquierda; IS: tamaño de infarto. Los parámetros volumétricos están indexados al área superficial de cuerpo. *p=0,01 frente a simulacro a 8 semanas; † p<0,001 frente a control.

Tabla 2B. Análisis MRI de función global LV 8 semanas después de la implantación de stent; estudio de PlGF-1.

	Control (n=9) (mL/min/g)	PlGF-1 (n=8) (mL/min/g)	Simulacro (n=4) (mL/min/g)
BW (kg)	65±6	63±8	64±14
LVMi (g/m^2)	81±9	80±20	74±12
EDVi (mL/m^2)	76±18	81±25	80±16
ESVi (mL/m^2)	45±12*	49±20*	35±4
SVi (mL/m^2)	31±6*	32±6*	44±14
EF (%)	41±6*	41±8*	54±8

Los valores son medias ± SD. Los parámetros volumétricos están indexados al área superficial de cuerpo (BSA) usando la fórmula de Meeh como se indica a continuación: BSA (en m^2) = k x [peso corporal (en kg)]$^{2/3}$ x 10^{-2}, donde k = 9,0. BW: peso corporal; EDVi: índice de volumen final diastólico; ESVi: índice de volumen final sistólico; LVMi: índice de masa ventricular izquierda; SVi: índice de volumen de latido; EF: fracción de eyección. *p<0,05 frente a simulacro.

A las 8 semanas, en los animales de simulacro, el engrosamiento de pared en reposo fue comparable en el territorio de perfusión LAD y en las áreas remotas (54±1% frente a 55±1%) y mostró respuestas progresivas similares al estrés incremental por dobutamina. En las áreas isquémicas el engrosamiento de pared en cerdos tratados con rhPlGF-2 aumento significativa y selectivamente en comparación con el control (37±15% frente a 23±9%, p=0,02), mientras que el PBS no tuvo efecto. Al contrario que la respuesta bifásica al estrés en el grupo de control, después de que el engrosamiento de pared del tratamiento con rhPlGF-2 aumentara durante el estrés a dosis bajas sin incrementos adicionales durante el estrés a dosis altas mostrando una fase de saturación en la región isquémica. En el área remota, el espesamiento de pared fue comparable en reposo y durante todas las fases de estrés entre los grupos de rhPlGF-2, de control o de simulacro (Figura 1).

Cuatro semanas después de la implantación del stent isquémico, el flujo sanguíneo miocardial (MBF) tanto en reposo como con estimulación hiperémica en la región isquémica se redujo significativamente en comparación con el simulacro (reposo: 0,63±0,18 frente a 0,87±0,06 mL/min/g, p=0,03 y estrés: 0,94±0,33 frente a 1,74±0,01 mL/min/g, p=0,0004), aunque todavía había una reserva de perfusión residual. A las 8 semanas, en el grupo tratado con rhPlGF-2, el MBF tanto en reposo (0,83±0,32 frente a 0,58 ±0,21 mL/min/g, p=0,03) como en la perfusión hiperémica (1,50±0,50 frente a 1,02±0,46 mL/min/g, p=0,03) aumentó significativamente, pero no en los controles. En la región remota, el MBF en reposo y tras perfusión hiperémica fue comparable entre los animales tratados con rhPlGF-2, de control y de simulacro (Figura 2).

1.8 Medidas de microesfera

Tras obtener los datos hemodinámicos, se insertó un catéter de cola de cerdo 6-F en el LV y se inyectaron 6 millones de microesferas coloreadas (diámetro de 15 µm; Triton Technologies, Inc) para medir el flujo sanguíneo miocardial (MBF) regional. Se cuantificó el flujo sanguíneo absoluto comparando las concentraciones de microesferas en diferentes regiones miocardiales con las medidas en una muestra sanguínea de referencia. La muestra sanguínea de referencia fue tomada de una aorta abdominal para un caudal constante y comenzó 20 segundos antes de la inyección de microesferas. Se obtuvieron dos muestras de tejido de referencia de los riñones derecho e izquierdo para evaluar la homogeneidad de la distribución de microesferas. Se analizaron las muestras miocardiales del área isquémica y remota (pared inferior) y muestras sanguíneas y renales usando un espectrofotómetro de luminiscencia (sistema de espectroscopía UV-visible Agilent 8453E).

En congruencia con las medidas de MRI, el MBF determinado usando microesferas coloreadas aumentó de forma significativa entre las 4 semanas y las 8 semanas en los animales tratados con rhPlGF-2, pero no en los controles (Tabla 3).

Tabla 3. Valores absolutos de flujo sanguíneo de miocardio regional en el área isquémica.

	Análisis de MRI		Análisis de microesferas	
	4W	*8W*	*4W*	*8W*
Control (mL/min/g)	0,64±0,22	0,58±0,21	0,58±0,32	0,66±0,47
rhPlGF2 (mL/min/g)	0,63±0,14	0,83±0,32 *	0,62±0,21	0,95±0,55 *
Los valores son medias ± SD. * p<0,05 frente a flujo sanguíneo miocardial regional a las 4 semanas.				

1.9 Análisis de biomarcador, medida de neovascularización

Se analizaron tests de marcadores de necrosis cardíaca (TnI, CK, CKMB, índice relativo de CKMB y LDH) y función hepática (AST y ALT) en el día 0 antes de la implantación del stent, 4 semanas antes del tratamiento, 5, 6 y 8 semanas de seguimiento. Estos valores fueron comparables en los grupos de rhPlGF-2, control y simulacro.

1.10 PlGF-2 induce neovascularización del miocardio isquémico

Se evaluó la neovascularización en secciones de 5 µm embebidas en parafina de las zonas isquémicas y remotas. Todas las imágenes fueron analizadas en 10 campos de alta potencia (HPF, del inglés “high-power field”) seleccionados aleatoriamente para cada zona. Se usaron marcadores de lectina y célula de músculo liso (SM-actina) para marcar las capilaridades y los vasos muscularizados pequeños, respectivamente. La densidad de capilares y de arteriolas muscularizadas fue evaluada contabilizando el número de vasos positivas en lectina y SM-actina y se expresó referida al área de tejido.

En los cerdos tratados con rhPlGF-2, las densidades capilares de lectina y de arteriolas detectables de actina de célula de músculo liso fueron significativamente superiores en las áreas isquémicas que en los controles (1691±509 frente a 1101±445 número de capilares/mm^2 de control, p<0,05; 69±29 frente a 39±13 número de vasos muscularizados pequeños/mm^2 de control, p<0,05).

1.11 Análisis de seguridad de PlGF-2 después de 10 días de infusión

Los tests de marcadores de necrosis cardíaca y de función hepática fueron comparables entre los 3 grupos y estuvieron dentro de los rangos fisiológicos.

1.12 Conclusión

En un modelo clínicamente representativo (es decir, *Sus scrofa*) de HF con una fracción de eyección (EF) reducida, se comparó el efecto de PlGF-2 humano recombinante frente a placebo en la disfunción ventricular izquierda. Se demostró usando medidas hemodinámicas invasivas que la función cardíaca global, representada por una mejora de la EF desde 41±9% hasta 52±11%. Adicionalmente, usando un estudio riguroso de imagen de resonancia magnética se confirmó una mejora de la EF mediada por PlGF-2 de 44±11% hasta 51±11%, respectivamente. Los datos

combinados indican que la prevención de la disfunción cardíaca tras un tratamiento con PlGF-2 es atribuible a un menor incremento en el volumen final sistólico (ESV) con el tiempo (ΔESVíndice: -13±9 mL/m^2 en el grupo PlGF-2 frente a -1±11 mL/m^2 en los controles). Estos cambios observados en EF (ΔEF) fueron de +5±6% en los animales tratados con PlGF-2 frente a -2±2% en los controles. La magnitud de ΔEF fue similar a los cambios observados durante los estudios de HF previos usando bloqueadores beta e inhibidores de ACE con un beneficio conferido de mortalidad significativo. Los resultados de estos estudios clínicos han conducido a la integración de los anteriores agentes en los protocolos de tratamiento de cuidados estándar para la HF. De forma sorprendentes, los efectos clínicos de PlGF-2 sobre la HF demostrados en la presente memoria (mejoría de los fenotipos de HF ESV y EF) son superiores a los de PlGF-1 usado en el mismo modelo de HF preclínico.

Ejemplo 2. Terapia de PlGF-2 para la isquemia miocardial en un modelo de ratón aterosclerótico

2.1 Introducción

En el Ejemplo previo, se ha demostrado que la administración sistémica de factor de crecimiento placentario 2 humano recombinante (rhPlGF-2) en cerdos con isquemia miocardial crónica potencia significativamente el flujo sanguíneo miocardial regional y la función contráctil ventricular en reposo y durante estrés. Adicionalmente, la administración sostenida de rhPlGF-2 también dio como resultado una recuperación destacada de la función cardíaca global sin efectos adversos. Sin embargo, el modelo porcino no aterosclerótico que estudiamos no permite una extrapolación directa a pacientes con aterosclerosis, en los cuales los factores de crecimiento angiogénicos podrían inducir una hiperplasia íntima y una progresión de las lesiones ateroscleróticas coronarias (Celleti et al. 2001, Nat Med 7: 42). Un estudio experimental previo en conejos ateroscleróticos indicó que la administración de PlGF-2 adenovírica local aumenta significativamente el engrosamiento íntimo y la acumulación de macrófagos en las arterias carótidas del cuello. Asimismo, el tamaño y el contenido de macrófagos de las lesiones ateroscleróticas tempranas se vieron reducidos en ratones deficientes en apolipoproteína (apo) E y PlGF en comparación con ratones deficientes en apo E (Apo E$^{-/-}$) (Khurana et al. 200, Circulation 111: 2828). En otro estudio, después de 5 semanas de administración de anticuerpo anti-PlGF, la infiltración de células inflamatorias en placas ateroscleróticas y el tamaño de placa se vieron reducidos en una etapa temprana de la aterosclerosis moderada (Roncal et al. 2010, Cardiovasc Res 86: 29). Sigue sin saberse si el aumento del nivel de PlGF refleja la gravedad de la isquemia miocardial o si contribuye a la progresión de la lesión. Por lo tanto, se investigó la respuesta inflamatoria de los tejidos miocardiales y vasculares tras una infusión de PlGF-2 en un modelo de ratón de aterosclerosis avanzada y de infarto/isquemia miocardial crónica. Se evaluó el efecto de la administración sistémica sostenida de PlGF-2 sobre diferentes parámetros: neovascularización miocardial, perfusión y función cardíaca, remodelación cardíaca, tamaño de las placas ateroscleróticas, acumulación y activación de macrófagos de las placas después de 5 meses.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Diseño del estudio

Esta investigación es acorde a las directrices del Instituto Nacional Belga de Salud para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, y el protocolo del presente estudio controlado aleatorizado doblemente ciego fue aprobado por el Comité de Ética local sobre investigación con animales (“Ethische Commissie Dierproeven”, KU Leuven, Lovaina, Bélgica).

En este estudio se usaron ratones Apo E$^{-/-}$ machos de cinco semanas de edad (B6.129P2-APOE/J, n=50, peso corporal 17,4±1,8 g) adquiridos a Charles River Laboratories. Todos los ratones fueron alimentados ad libitum con una dieta alta en colesterol (1,25%) (TD.88137, Teklad, Harlan Laboratory) durante todo el experimento. Después de 4 semanas, se evaluaron las lesiones ateroscleróticas en la aorta, la morfología cardíaca, la función global y regional, usando imágenes de ultrasonidos. A continuación, se llevó a cabo una oclusión de la arteria coronaria descendente (LAD) (60 min) seguida de reperfusión para inducir un infarto de miocardio (MI). A las 8 semanas, tras evaluación del infarto/isquemia de miocardio y de la aterosclerosis aórtica, los ratones fueron asignados aleatoriamente a tratamiento ciego de PlGF-2 (450µg/kg/día) (PlGF-2 humano recombinante derivado de células CHO; nº de cat. 6837-PL, R&D systems, R.U.) o salino tamponado con fosfato (PBS) usando mini bombas osmóticas (Alzet modelo 2004, Charles River Laboratories, Francia) durante 28 días. A las 12 semanas, la mitad de los ratones de cada grupo fueron sometidos a estudio de imagen de ultrasonidos y a análisis patológicos post-mortem. El resto de ratones fueron seguidos durante 20 semanas y se repitieron análisis similares (en la Figura 3 se muestra un diagrama de flujo del experimento). Se tomaron muestras de sangre para la determinación del colesterol total, el nivel de PlGF, los marcadores cardíacos y de inflamación. Tras aplicar eutanasia, se recolectó corazón, arteria aórtica, bazo y tibia para análisis histológico.

2.2.2 Inducción de infarto de miocardio

Tras aplicar anestesia con Nembutal (60 mg/kg), los ratones fueron colocados en posición supina sobre una almohadilla calefactada (37ºC) para prevenir la hipotermia durante la anestesia. Se mantuvo ventilación mecánica con un volumen de oleada de 250 µL y un ritmo de 150 por minuto para mantener normocapnia y normoxia.

Se expuso el corazón mediante una toracotomía en el espacio intercostal entre la tercera y cuarta costillas. Se practicó una sutura 7-0 para ligar la LAD durante 60 minutos. Para liberar la ligadura, se soltó el tambor de seda, y se confirmó

la reperfusión mediante inspección visual. A continuación, se cerró el torso. Tras la cirugía, se dejó que los ratones se recuperaran de la anestesia, y se retiró el tubo endotraqueal una vez que se recuperó la respiración espontánea. Se aplicó analgesia post-operativa de buprenorfina subcutánea (0,05-0,2 mg/kg).

2.2.3 Tratamiento aleatorizado con PlGF o PBS

Cuatro semanas después del infarto de miocardio, los animales fueron aleatorizados entre una infusión subcutánea de 28 días de PlGF-2 (PlGF-2 humana recombinante derivada de células CHO; nº de cat. 6837-PL, R&D systems, R.U.) o PBS a través de mini bombas osmóticas. Se cuantificaron los niveles de PlGF en circulación usando un inmunoensayo estándar de PlGF (Quantikine Elisa, R&D systems, Inc), que detecta la isoforma de PlGF-2 tanto humana como de ratón. Se recubrieron placas durante una noche (4ºC) con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente PlGF y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 1% de BSA, se lavaron y se incubaron con un anticuerpo policlonal biotinilado de PlGF anti-humano de cabra. El PlGF ligado se detectó tras la incubación con un sustrato de estreptavidina-HRP. Como muestras de control positivo se utilizaron diluciones estándar de PlGF-2.

2.2.4 Medidas de imagen de ultrasonidos

Se llevó a cabo un estudio de imágenes de ultrasonidos transtorácicas en condiciones de anestesia ligera (1-2% de isoflurano en oxígeno). Los animales se ubicaron supinos en una almohadilla calefactada eléctrica a 37ºC con ECG continuo y monitorización de respiración. Se adquirieron imágenes cardíacas y vasculares con transductores de disposición lineal de alta frecuencia de 18-38 y 32-6 MHz (MS400 y MS550S, respectivamente) con un sistema de ultrasonidos digital (Vevo 2100 Imaging System, VisualSonics, Toronto, Canadá).

Se llevó a cabo un estudio ecocardiográfico 2D en el eje largo paraesternal (Bhan et al. 2014, Am J Physiol Heart Circ Physiol 306, H1371). Para una calidad de imagen optimizada, se ajustaron consecuentemente los parámetros de profundidad de imagen, anchura y ganancia. La profundidad media fue de 14 mm y la tasa de renovación estuvo por encima de las 200 imágenes por segundo. Las imágenes se almacenaron digitalmente en cine-bucles que consistían en 300 imágenes.

Se caracterizó la velocidad de flujo sanguíneo en la arteria aórtica ascendente y el arco aórtico en diferentes puntos anatómicos usando imágenes Doppler de onda de pulso. La medida de la velocidad Doppler se llevó a cabo con el menor ángulo de incidencia posible entre el haz Doppler y la dirección de flujo sanguíneo asumida en el centro de la posición diana.

Todos los estudios de imágenes de ultrasonidos fueron analizados usando el software Vevo 2100 (1.5.0) con investigadores ciegos para la ubicación del tratamiento.

Se evaluó el volumen y la función ventricular izquierda (LV) usando análisis de seguimiento de mancha. Se seleccionaron bucles de modo B adecuados en base a una visualización adecuada del borde endocardial y la ausencia de artefactos de imagen. Se seleccionaron tres ciclos cardíacos consecutivos para el análisis basado en la calidad de imagen. Se llevó a cabo un seguimiento semiautomatizado de los bordes endocardial y epicardial y se verificó en los 3 ciclos cardíacos y a continuación se corrigió según fuera necesario para lograr una buena calidad de seguimiento a través de cada cine-bucle. Las imágenes seguidas fueron procesadas entonces de un modo imagen a imagen. Se calculó el volumen final sistólico de LV (LVESV) y el volumen final diastólico (LVEDV) usando un método de técnica de discos a partir del seguimiento. LVEF y la masa de LV fueron derivadas del volumen. La masa de LV y todos los volúmenes fueron reportados indexados respecto al área superficial de cuerpo (Schmidt-Nielsen 1984, ver anterior). Se obtuvieron las medidas de tensión longitudinal y radial sistólica máxima durante el análisis de seguimiento de mancha regional (Thibault et al. 2011, Circ Cardiovasc Imaging 4:550; Bauer et al. 2011, Circ Res 108:908). Cada vista de eje largo del miocardio de LV se dividió en 6 segmentos anatómicos estándar a lo largo del ciclo cardíaco. En las imágenes registradas 1 mes después del MI, la región isquémica se definió en los segmentos de pared medio-anterior, apical-anterior y apical-inferior y teniendo en cuenta la anormalidad de movimiento de la pared. Los segmentos de pared basal-inferior y medio-inferior fueron designados como la región remota. Los valores de tensión regional fueron obtenidos promediando estas mismas medidas a lo largo de los segmentos de infarto y remoto, respectivamente.

Se extrajo la velocidad máxima de flujo sanguíneo como índice de la rigidez arterial y se promedió para 3 ciclos cardíacos consecutivos.

2.2.5 Medida de colesterol total, proteína reactiva C (CRP) y troponina cardíaca I (cTnI)

El nivel total de colesterol se analizó en la semana 0, 1 mes y 3 meses después del tratamiento. Se midió la CRP de alta sensibilidad como indicador de inflamación en la semana 0 y para 2 puntos finales. La TnI cardíaca se analizó en la semana 0, 3 horas después de la reperfusión isquémica, y en 2 puntos finales.

2.2.6 Análisis histopatológico

Se arrestó el corazón en diástole tras inyección de 200 µL de KCl sobresaturado a través de la vena cava. Los tejidos fueron reperfusionados con salino heparinizado y fijados con fijador de formalina de zinc (Z2902, Sigma). Se recolectó el corazón, la arteria aórtica, el bazo y la tibia. Se midieron los pesos húmedos de corazón y bazo y se midió la longitud de la tibia. Los corazones y los arcos aórticos fueron almacenados en fijador durante una noche, a continuación, en etanol al 70%, y se embebieron en parafina usando un procedimiento estándar y se seccionaron en láminas de 5 µm de espesor. Los corazones fueron laminados transversalmente, desde el ápex hasta la parte de base del LV, y los arcos aórticos longitudinalmente.

En las láminas cardíacas, se evaluó la fibrosis, la angiogénesis y la inflamación. La fibrosis y el tamaño de infarto (IS) fueron cuantificados en láminas teñidas de rojo Sirius. El número mínimo de secciones por corazón requerido para una medida fiable del tamaño de infarto es de 1/3 del total de 20 láminas (Takagawa et al. 2007, J Appl Physiol 102: 2104). Analizamos 7 láminas a un intervalo regular para cubrir el LV entero. El colágeno teñido de rojo fue segmentado (aislado) usando aplicación de umbrales. El área de infarto se derivó del área de umbral y el área de LV se trazó manualmente. El IS se calculó dividiendo la suma de áreas de infarto de todas las secciones por la suma de las áreas LV de todas las secciones y multiplicando por 100. Se evaluó la neovascularización y la inflamación en las zonas isquémica y remota. Todas las imágenes fueron analizadas en 8 campos de alta-potencia (HPF) seleccionados aleatoriamente para cada zona. Se evaluaron las densidades capilar y arteriolar por el número de vasos positivos en lectina y SM-actina a lo largo de área de tejido. Se evaluó la respuesta de inflamación usando tinción inmunohistoquímica MAC3. La inflamación se expresó como el número de células MAC3 positivas a lo largo del área de tejido.

En las láminas de arco aórtico, se analizaron las placas ateroscleróticas en la curvatura menor del arco para determinar el tamaño de placa, la composición, la vascularización y la inflamación. Verhoeff van Gieson exclusivamente tiñe las láminas elásticas. SE midió el área de placa como la diferencia entre el área de lumen y el área delimitada por la lámina elástica interna, y los resultados fueron normalizados al área total de vasos para eliminar variaciones debidas al tamaño de vaso. El colágeno de placa y el área de calcificación se tiñeron en positivo para rojo Sirius y rojo alizarina. Se usó lectina y SM-actina para marcar los capilares y los vasos muscularizados pequeños de la placa. Se usó tinción de MAC3 para cuantificar la respuesta de inflamación. Las imágenes fueron adquiridas y analizadas usando aplicación de umbrales para determinar la tinción positiva total en cada método. Estos resultados fueron normalizados a continuación respecto al área de vasos total.

2.2.7 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico usando el software GraphPad Prism 6. Los datos se expresan como media±SD. Se usó ANOVA y un test post-hoc para evaluar la evolución del modelo desde la semana 0, semana 8 a 1 mes y 3 meses de control, y desde semana 0, 8 semanas a 1 mes y 3 meses de tratamiento, y para analizar las diferencias entre grupos. Se usó el test de t de Student para comparar las diferencias antes y después de los tratamientos. Cuando los datos no siguieron una distribución normal, se reportaron la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW), y las diferencias entre grupos se identificaron usando los tests de Mann-Whitney o de Wilcoxon.

2.3 Resultados

2.3.1 Grupo de estudio

Se alistaron cincuenta ratones Apo $E^{-/-}$ macho y fueron alimentados ad libitum con una dieta alta en colesterol. Cuatro semanas después, llevamos a cabo una oclusión de LAD de 60 min y una reperfusión en todos los ratones, de los cuales 10 ratones murieron de complicaciones isquémicas agudas. Se evaluaron cuarenta ratones a las 8 semanas, aleatorizados a ciegas para el tratamiento (20 de PBS y 20 de PlGF). La mitad de ellos (10 de PBS y 10 de PlGF) fueron reevaluados a las 12 semanas y la otra mitad a las 20 semanas. Dos ratones del grupo de PlGF (uno en la semana 12 y el otro en la semana 20) murieron durante el examen con ultrasonidos. Después de 20 semanas de seguimiento, se observó que 4 de 19 ratones presentaban caída de miembro superior (2 del lado derecho y 2 del lado izquierdo, 3 del grupo de PBS). Trece ratones presentaron problemas de piel (8 del grupo de PBS). El diagrama de flujo del estudio se muestra en la Figura 4.

2.3.2 Niveles de PlGF tras 28 días de infusión subcutánea

Los niveles en plasma de PlGF fueron similares en la semana 0 y en la semana 8, es decir 1 mes después de la inducción del MI (0±0 frente a 0,4±2,1 pg/mL en la semana 8). En el grupo de PBS, los valores de PlGF desde la semana 9 hasta la semana 20 fueron comparables a la semana 0 y la semana 8. Por el contrario, los ratones tratados con PlGF presentaron niveles de PlGF en circulación 1653, 92 y 23 veces superiores a los de PBS a 1, 2 y 3 semanas después del implante de mini bomba (semana 9: 5781±3710 frente a 3,5±8,6 pg/mL de PBS, p<0,0001; semana 10: 168,8±547,1 frente a 1,8±4,6 pg/mL de PBS, p=0,0009; semana 11: 42,0±78,0 frente a 1,8±5,4 pg/mL de PBS, p=0,019). En la semana 12 y 20, los niveles de PlGF retornaron a los niveles de la semana 0 y la semana 8.

2.3.3 El PlGF-2 no tiene un efecto significativo en los factores de riesgo cardiovasculares

El tratamiento con PlGF-2 no cambió significativamente los factores de riesgo cardiovascular, incluyendo el peso corporal, el nivel de colesterol total, el nivel de CRP de alta sensibilidad, el peso del corazón y el peso del corazón normalizado (peso del corazón referido al peso corporal, y peso del corazón referido a la longitud de la tibia).

2.3.4 El PlGF-2 mejora la función cardíaca y previene la remodelación de LV: volumen de LV, análisis de función cardíaca global y regional usando sistema de imágenes de seguimiento de mancha ecocardiográficas

El ritmo cardíaco aumento significativamente después del infarto de miocardio y siguió elevándose hasta las 12 semanas, permaneciendo elevado hasta las 20 semanas. La reperfusión isquémica de LAD indujo una reducción en la EF, y un aumento en LVEDVi y LVESVi. En comparación con el PBS, la mejora significativa de la EF se asoció con la reducción de LVEDVi y LVESVi en los animales tratados con PlGF-2 a las 12 semanas. La infusión de PlGF-2 previno una elevación adicional de LVEDVi y LVESVi y un deterioro adicional de EF a las 20 semanas. Esto confirma el efecto beneficioso de PlGF-2 en la estructura de LV global (Figura 5) y en la función de LV global (Figura 6).

Cuatro semanas después del MI, la tensión radial y longitudinal de la región isquémica se redujeron significativamente en comparación con la semana 0. Después del tratamiento con PlGF-2, la tensión radial y longitudinal regional mejoró transitoriamente a las 12 semanas.

2.3.5 PlGF-2 induce la neovascularización en el miocardio isquémico

En los ratones tratados con PlGF-2, la densidad capilar teñida con lectina fue significativamente mayor después de 1 mes en las áreas isquémicas que en los controles (2144±478 frente a 2813±212 número de capilares/mm^2, $p<0,05$ frente al control). La densidad arteriolar teñida con SM actina se volvió significativamente mayor en el grupo tratado con PlGF-2 a los 3 meses (125±18 frente a 77±13 número de vasos muscularizados pequeños/mm^2 en el control, $p=0,0014$).

2.3.6 PlGF-2 no induce daño cardíaco ni inflamación

En comparación con la semana 0, 12 y 20 semanas, el nivel de cTnI aumentó significativamente a las 3 horas de la reperfusión isquémica para confirmar el infarto de miocardio. No se observaron diferencias entre diferentes grupos de tratamiento a las 12 y 20 semanas. Esto demuestra que el PlGF-2 no indujo necrosis cardíaca.

En base a los análisis de la tinción de rejo Sirius, el IS fue comparable en ambos grupos a 12 y 20 semanas (9,7±5,3 frente a 11,5±6,2% de PlGF a las 12 semanas; 9,6±7,5 frente a 12,1±5,1% de PlGF a las 20 semanas). A 12 y 20 semanas, la densidad de células MAC3$^+$ fue comparable entre los grupos en las regiones isquémica y remota. Sin embargo, a las 20 semanas la densidad de células MAC3$^+$ aumentó significativamente en comparación con las 12 semanas, independientemente de las regiones (isquémica o remota no isquémica) y del tratamiento (PBS o PlGF-2), ver la Figura 7.

2.3.7 El PlGF-2 no promovió un fenotipo de placa inestable:

Medida de la rigidez arterial aórtica usando ultrasonido de onda de pulso Doppler.

Como índice la rigidez de la arteria aórtica, se midieron las velocidades máximas en 5 posiciones diferentes: en la raíz aórtica, en la aorta ascendente, 3 en el arco aórtico cerca de la innominada, la carótida y la arteria subclavia (Figura 8). La velocidad máxima aumentó significativamente 1 mes después del infarto de miocardio en todas las posiciones, excepto en la raíz aórtica. En comparación con el PBS, la aplicación de PlGF-2 no indujo una diferencia en la velocidad máxima a las 12 o las 20 semanas.

Morfometría, fibrosis, calcificación, angiogénesis e inflamación en el análisis de placa usando tinciones histológicas.

La administración de PlGF-2 no aumentó el área de placa normalizada, medida con tinción de Verhoeff van Gieson a 1 mes y 3 meses después del tratamiento. No obstante, las áreas de placa se volvieron más grandes en la última etapa, debido muy probablemente a la alimentación continua con dieta alta en colesterol. La infusión de PlGF-2 no indujo ningún cambio en la fibrosis de placa normalizada (tinción de rojo Sirius) y la calcificación (tinción de rojo Alizarina) a 12 y 20 semanas. A las 12 semanas, la calcificación de placa se reveló en 4 ratones (de los cuales 2 era del grupo de PBS), mientras que a las 20 semanas, en 14 ratones (de los cuales 7 eran del grupo de PBS). El tratamiento con PlGF-2 no aumentó las áreas capilares o arteriolares en las placas a 12 o 20 semanas (Figura 9). Esto representa una confirmación adicional de que el PlGF-2 no contribuyó a la vulnerabilidad de placa. En comparación con PBS, los ratones tratados con PlGF-2 mostraron una respuesta inflamatoria comparable en la placa, un área de células MAC3$^+$ similar a lo largo de la placa a 12 y 20 semanas (figura 10).

El peso de bazo y el peso de bazo referido a peso corporal no difirieron entre los grupos en los tiempos observados.

2.3.8 Conclusión

En conclusión, los datos presentados demuestran que la administración sistémica de PlGF-2 limita significativamente el progreso de la HF. Más particularmente, en la presente memoria se demuestra que PlGF-2 mejora la capacidad de neovascularización del miocardio, la función contráctil y preserva la estructura cardíaca sin aumentar el tamaño de las placas ateroscleróticas, sin aumentar la acumulación de macrófagos y sin desestabilización de las placas.

De esta manera, los presentes datos apoyan el uso de infusión de proteína de PlGF-2 en pacientes en el tratamiento de pacientes que necesiten de una perfusión y función miocardial mejorada.

Los presentes datos también apoyan el uso de PlGF-2 para la prevención de la remodelación cardíaca y para prevenir el desarrollo de la insuficiencia cardíaca causada por cardiomiopatía isquémica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende proteína de factor de crecimiento placentario 2 (PlGF-2) para uso en el tratamiento o la prevención de un fenotipo de insuficiencia cardíaca en un mamífero, en donde dicho mamífero es arteriosclerótico.

2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde dicho fenotipo de insuficiencia cardíaca es disfunción ventricular.

3. La composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha disfunción ventricular se define por un aumento del volumen final sistólico.

4. La composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha disfunción ventricular se define por una reducción de la fracción de eyección.

5. La composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha disfunción ventricular se define por un aumento del volumen final sistólico y una reducción de la fracción de eyección.

6. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde dicho fenotipo de insuficiencia cardíaca es remodelación ventricular.

7. La composición para uso según la reivindicación 6, en donde dicha remodelación ventricular se define por un aumento del volumen final diastólico.

8. La composición para uso según la reivindicación 2, en donde dicha disfunción ventricular se define por una relajación afectada, un aumento de la presión de llenado ventricular y una fracción de eyección preservada.

9. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho fenotipo de insuficiencia cardíaca se presenta en el ventrículo izquierdo y/o derecho.

10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha proteína de PlGF-2 es proteína de PlGF-2 recombinante.

11. La composición para uso según la reivindicación 10, en donde dicha proteína de PlGF-2 recombinante se obtiene de un cultivo celular de mamífero.

12. La composición para uso según la reivindicación 11, en donde dicho cultivo celular de mamífero es un cultivo de células de Ovario de Hámster Chino capaz de expresar transitoria o constitutivamente una PlGF-2.

13. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha proteína de PlGF-2 es proteína de PlGF-2 humana.

14. La composición para uso según la reivindicación 13, en donde dicha proteína de PlGF-2 humana está definida por la SEQ ID NO: 1, o un polimorfismo de la misma.

15. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es para uso mediante administración sistémica.

16. La composición para uso según la reivindicación 15, en donde dicha administración sistémica es administración endovascular o subcutánea.

17. La composición para uso según la reivindicación 16, en donde dicha administración endovascular es administración intravenosa.

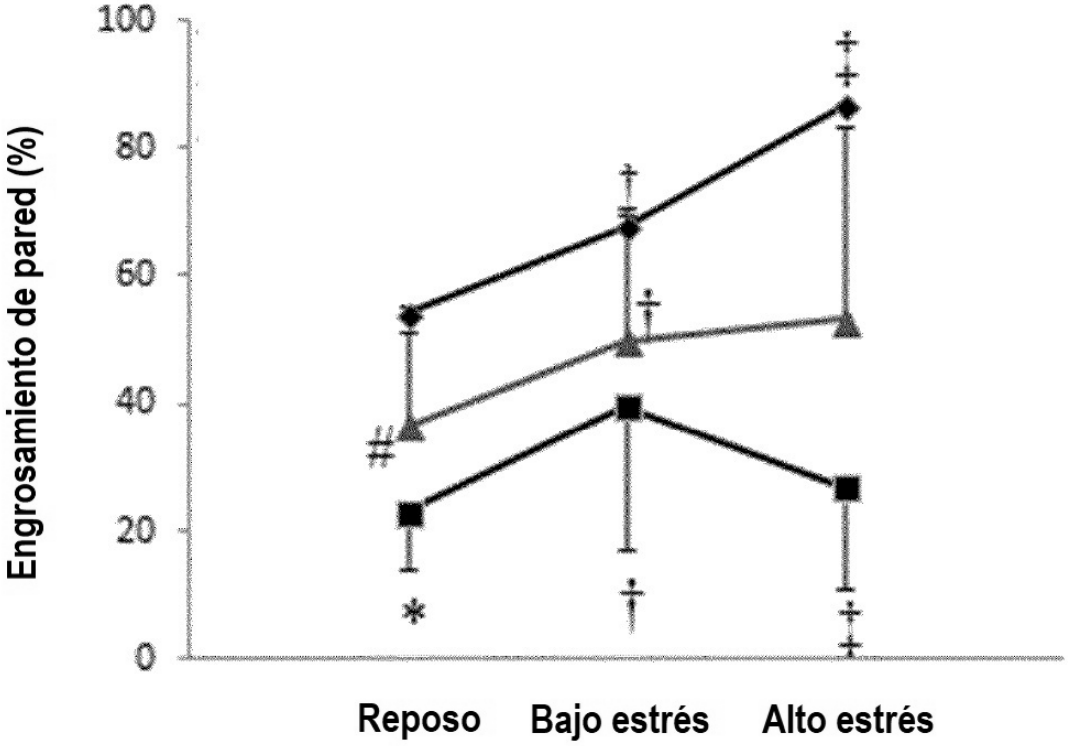

Engrosamiento de pared (%)
100
80
60
40
20
0
Reposo
Bajo estrés
Alto estrés

FIGURA 1

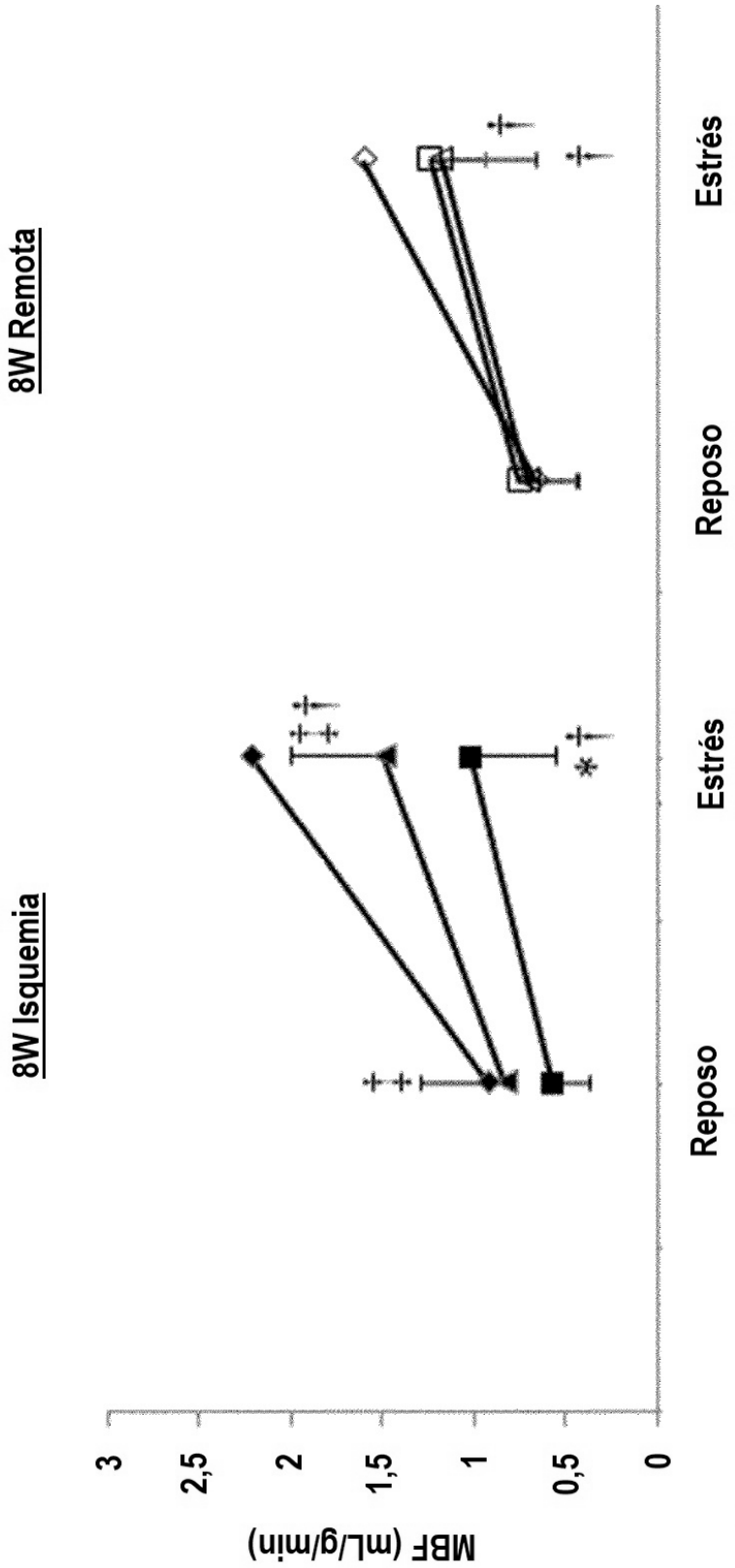

8W Isquemia
8W Remota
MBF (mL/g/min)
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Reposo
Estrés
Reposo
Estrés

FIGURA 2

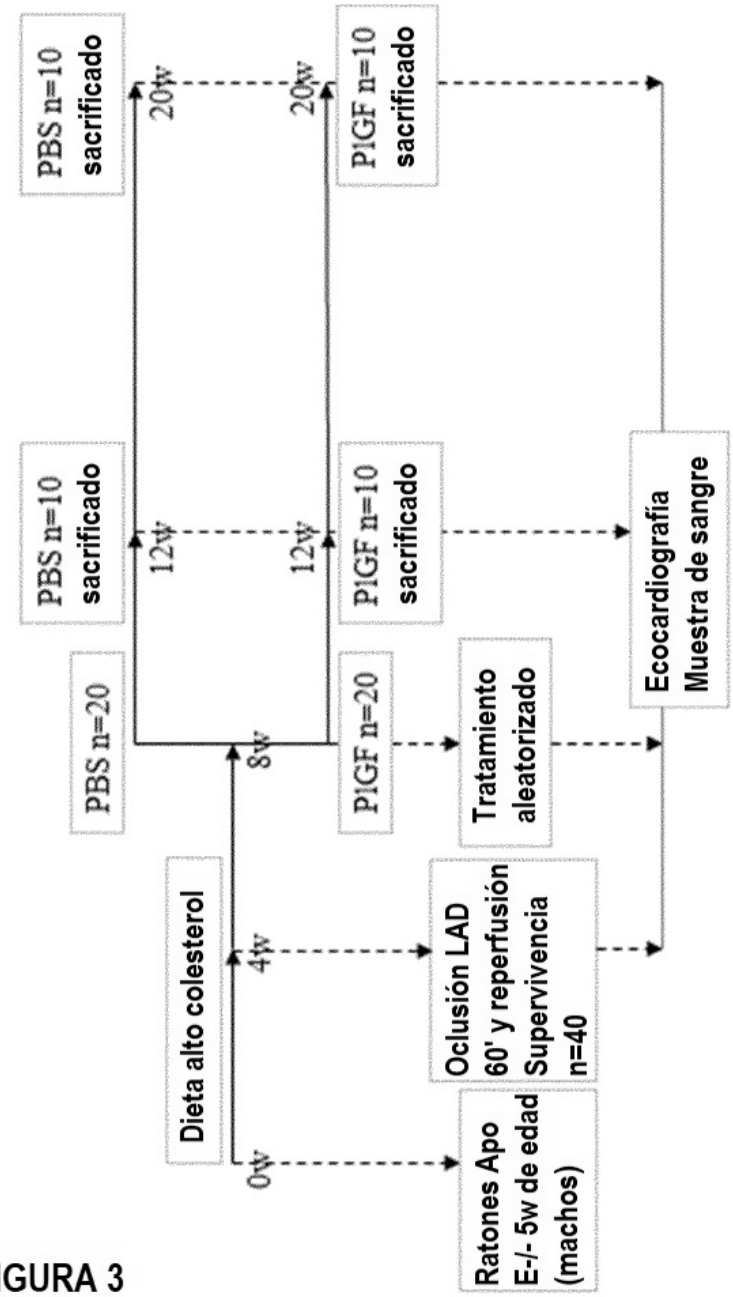

Ratones Apo
E-/- 5w de edad
(machos)
0w
Dieta alto colesterol
4w
Oclusión LAD
60' y reperfusión
Supervivencia
n=40
8w
PBS n=20
PIGF n=20
Tratamiento
aleatorizado
12w
PBS n=10
sacrificado
PIGF n=10
sacrificado
20w
PBS n=10
sacrificado
PIGF n=10
sacrificado
Ecocardiografía
Muestra de sangre

FIGURA 3

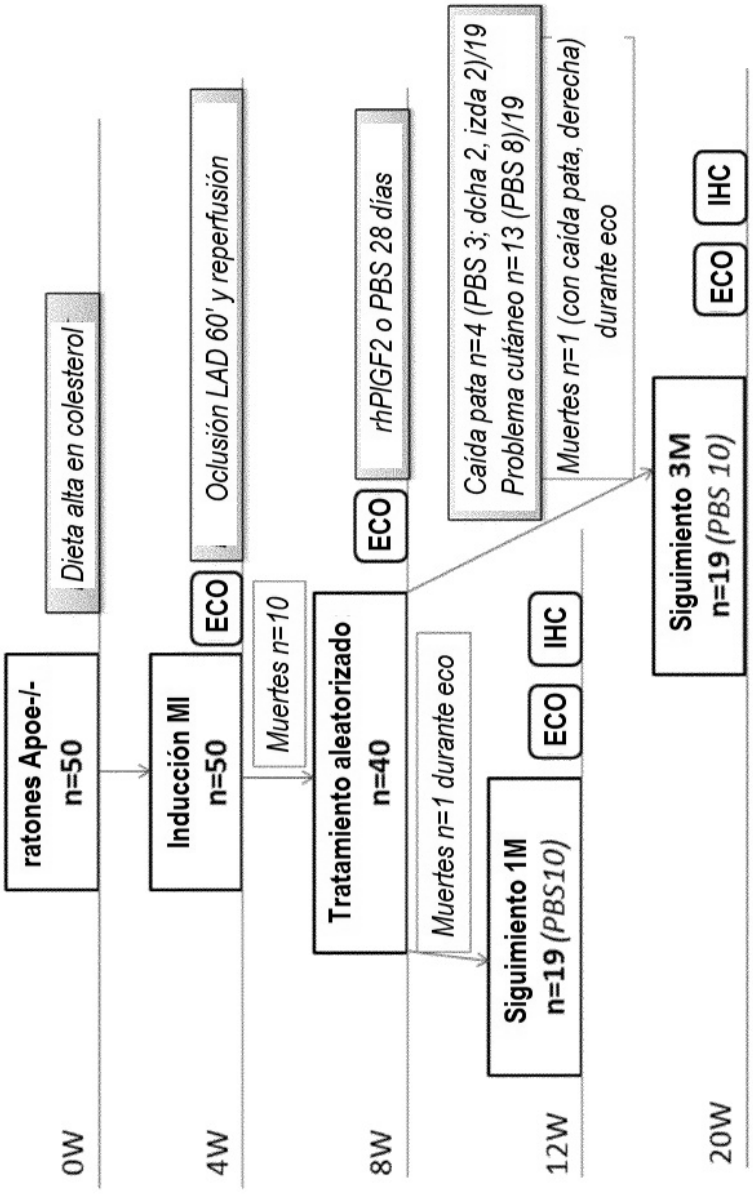

0W
4W
8W
12W
20W
ratones Apoe-/- n=50
Dieta alta en colesterol
Inducción MI n=50
ECO
Oclusión LAD 60' y reperfusión
Muertes n=10
Tratamiento aleatorizado n=40
ECO
rhPlGF2 o PBS 28 días
Muertes n=1 durante eco
Caída pata n=4 (PBS 3; dcha 2, izda 2)/19
Problema cutáneo n=13 (PBS 8)/19
Muertes n=1 (con caída pata, derecha) durante eco
Siguimiento 1M n=19 (PBS10)
ECO
IHC
Siguimiento 3M n=19 (PBS 10)
ECO
IHC

FIGURA 4

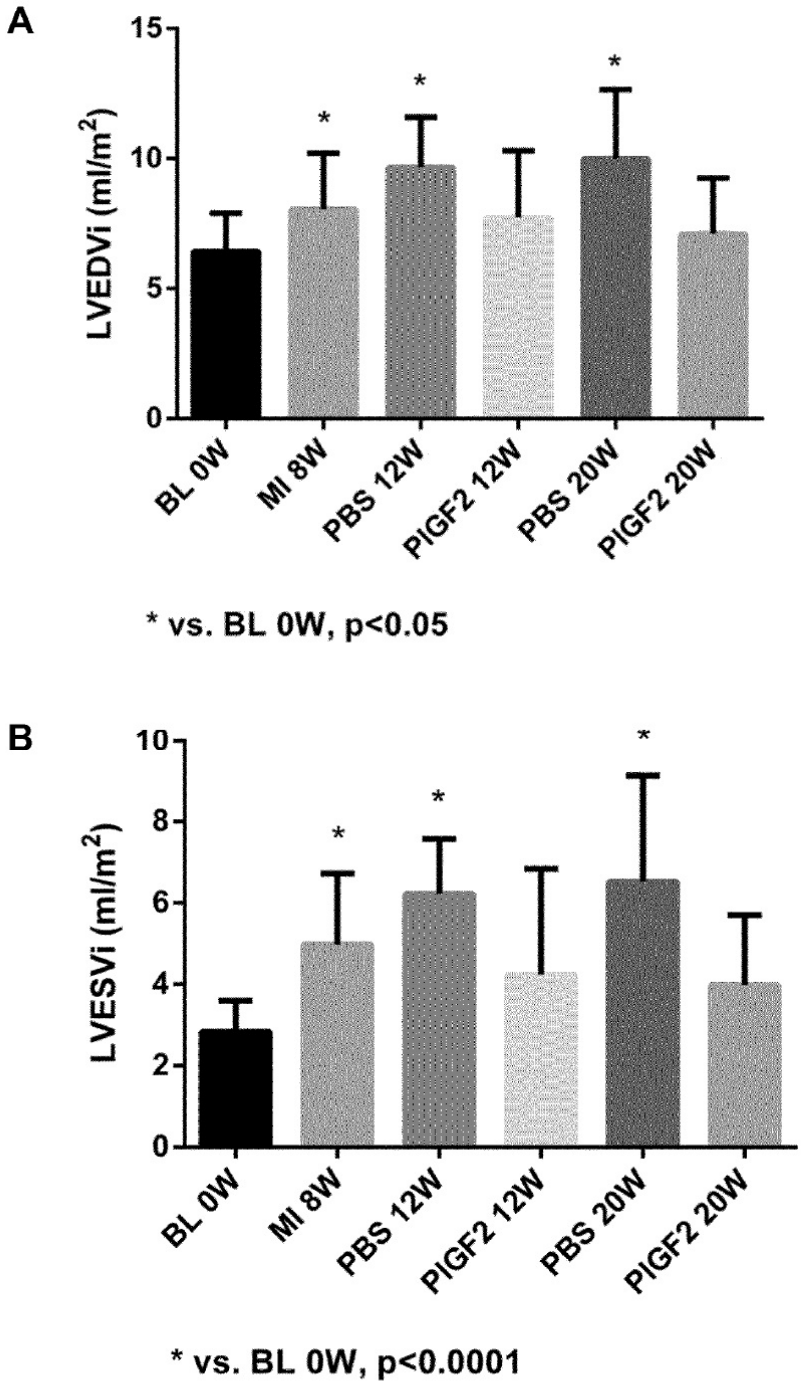
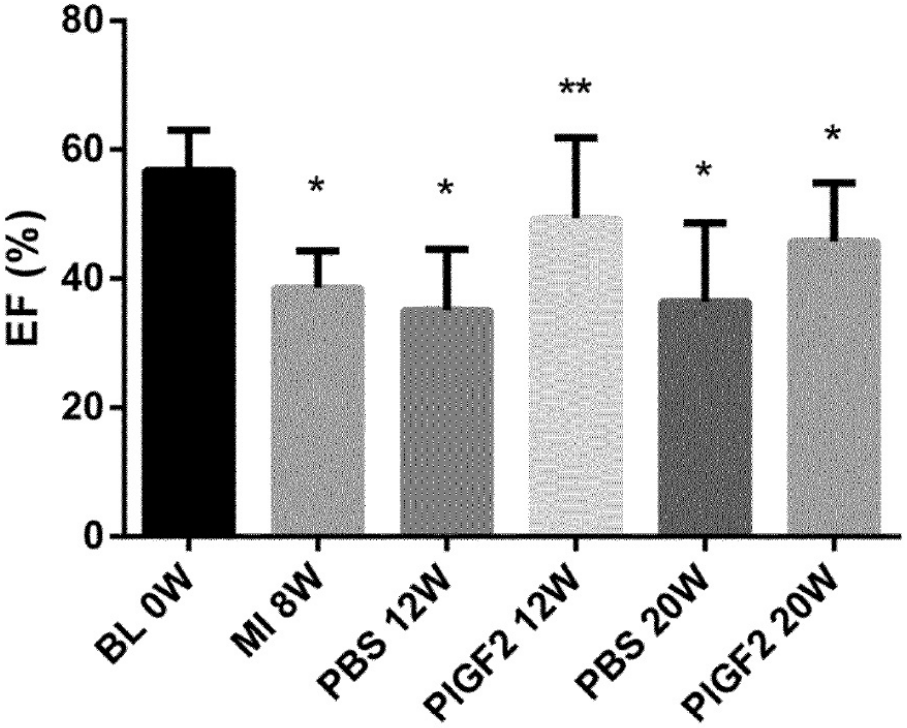

A
LVEDVi (ml/m2)
15
10
5
0
*
*
*
BL 0W
MI 8W
PBS 12W
PlGF2 12W
PBS 20W
PlGF2 20W
* vs. BL 0W, p<0.05
B
LVESVi (ml/m2)
10
8
6
4
2
0
*
*
*
BL 0W
MI 8W
PBS 12W
PlGF2 12W
PBS 20W
PlGF2 20W
* vs. BL 0W, p<0.0001

FIGURA 5



* vs. BL 0W, p<0.05; ** vs. MI 8W, p=0.0171

FIGURA 6

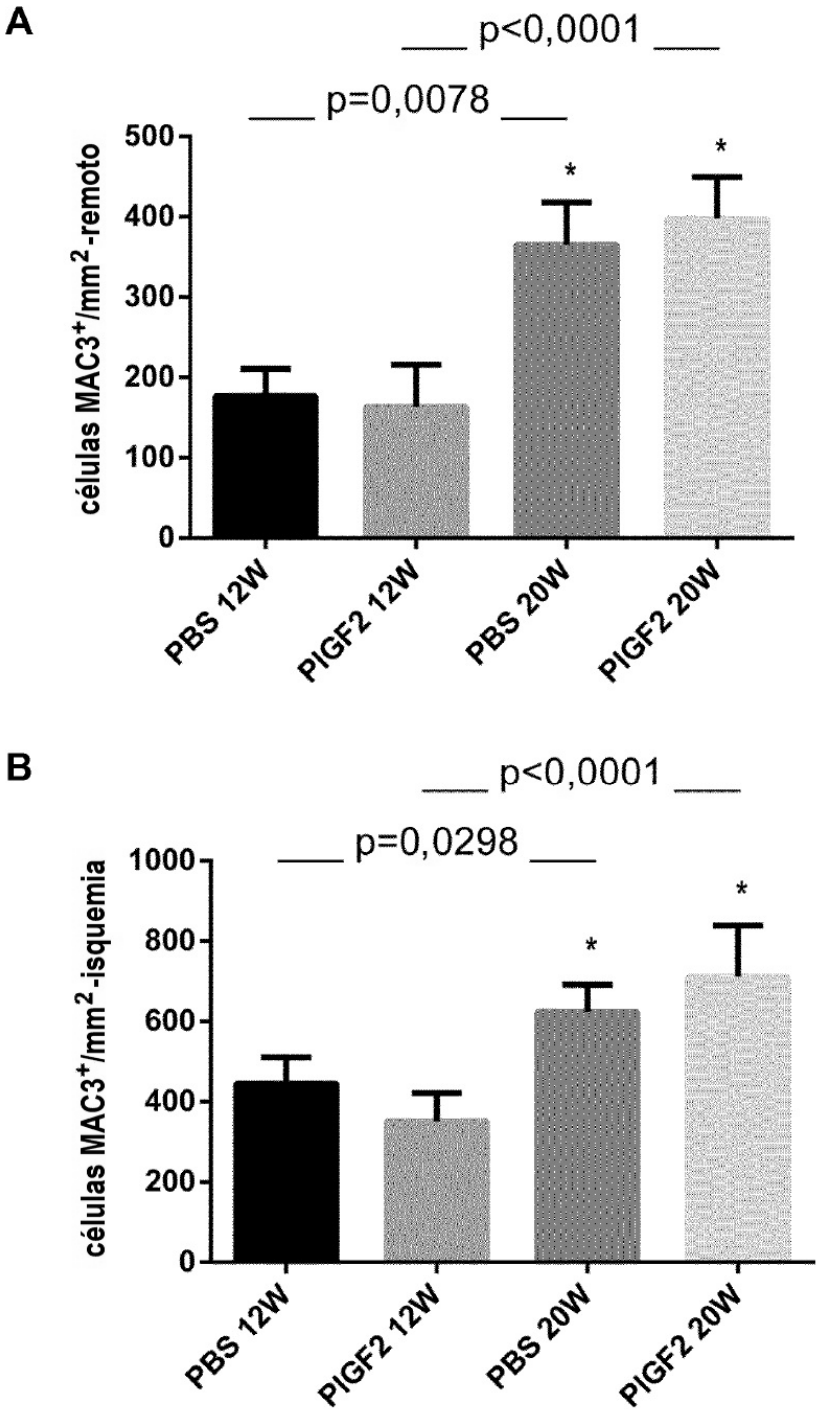
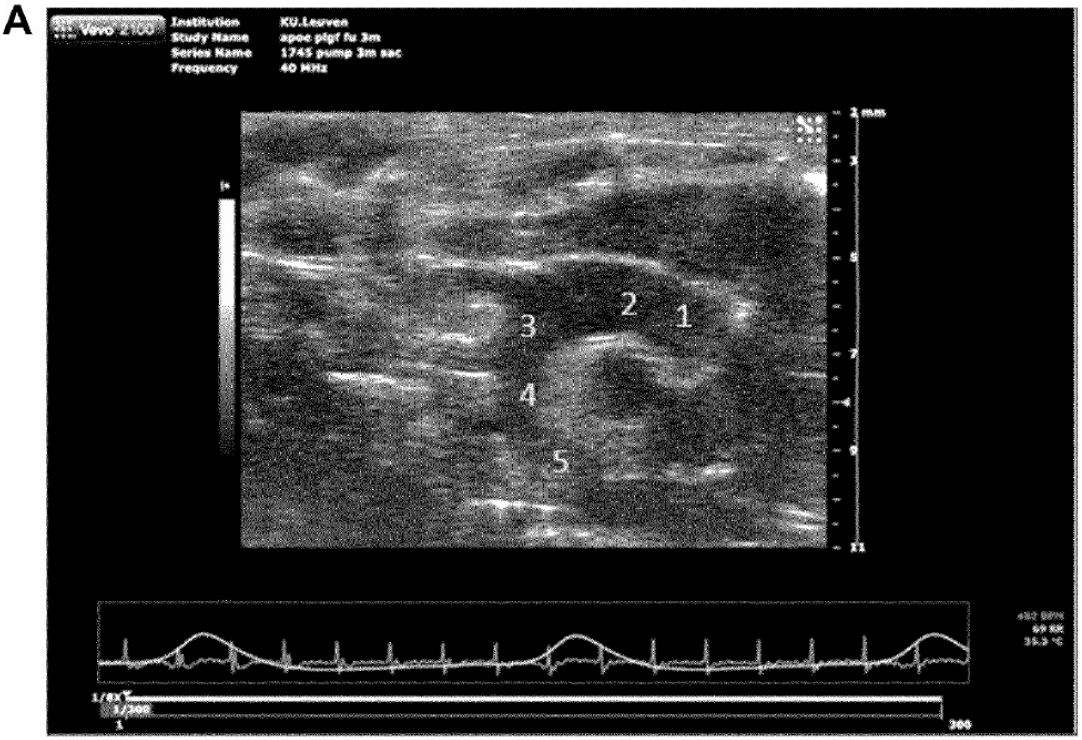
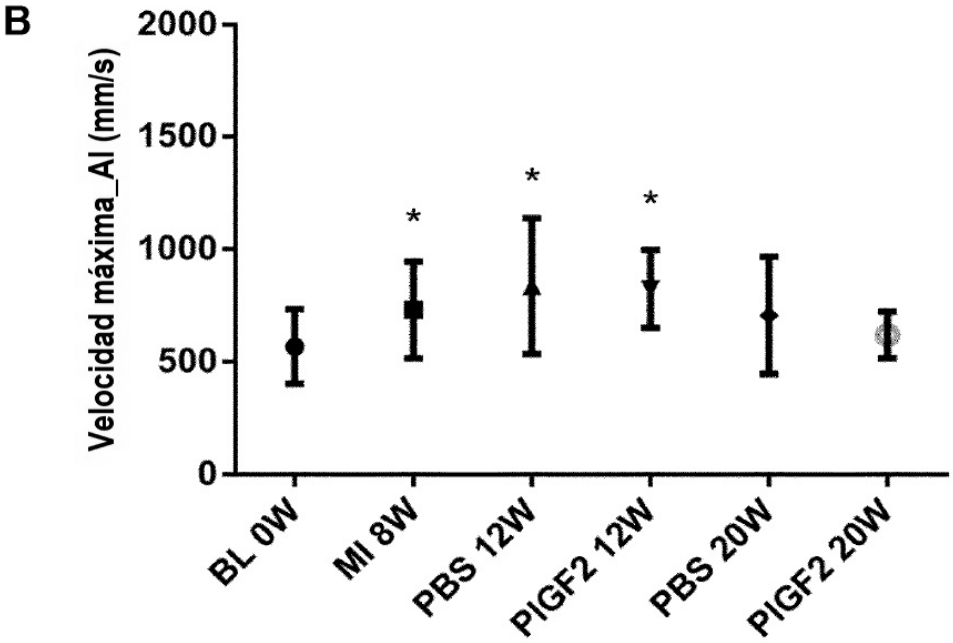

A
p<0,0001
p=0,0078
células MAC3+/mm2-remoto
500
400
300
200
100
0
*
*
PBS 12W
PIGF2 12W
PBS 20W
PIGF2 20W
B
p<0,0001
p=0,0298
células MAC3+/mm2-isquemia
1000
800
600
400
200
0
*
*
PBS 12W
PIGF2 12W
PBS 20W
PIGF2 20W

FIGURA 7





* vs. BL 0W, p<0,05

FIGURA 8

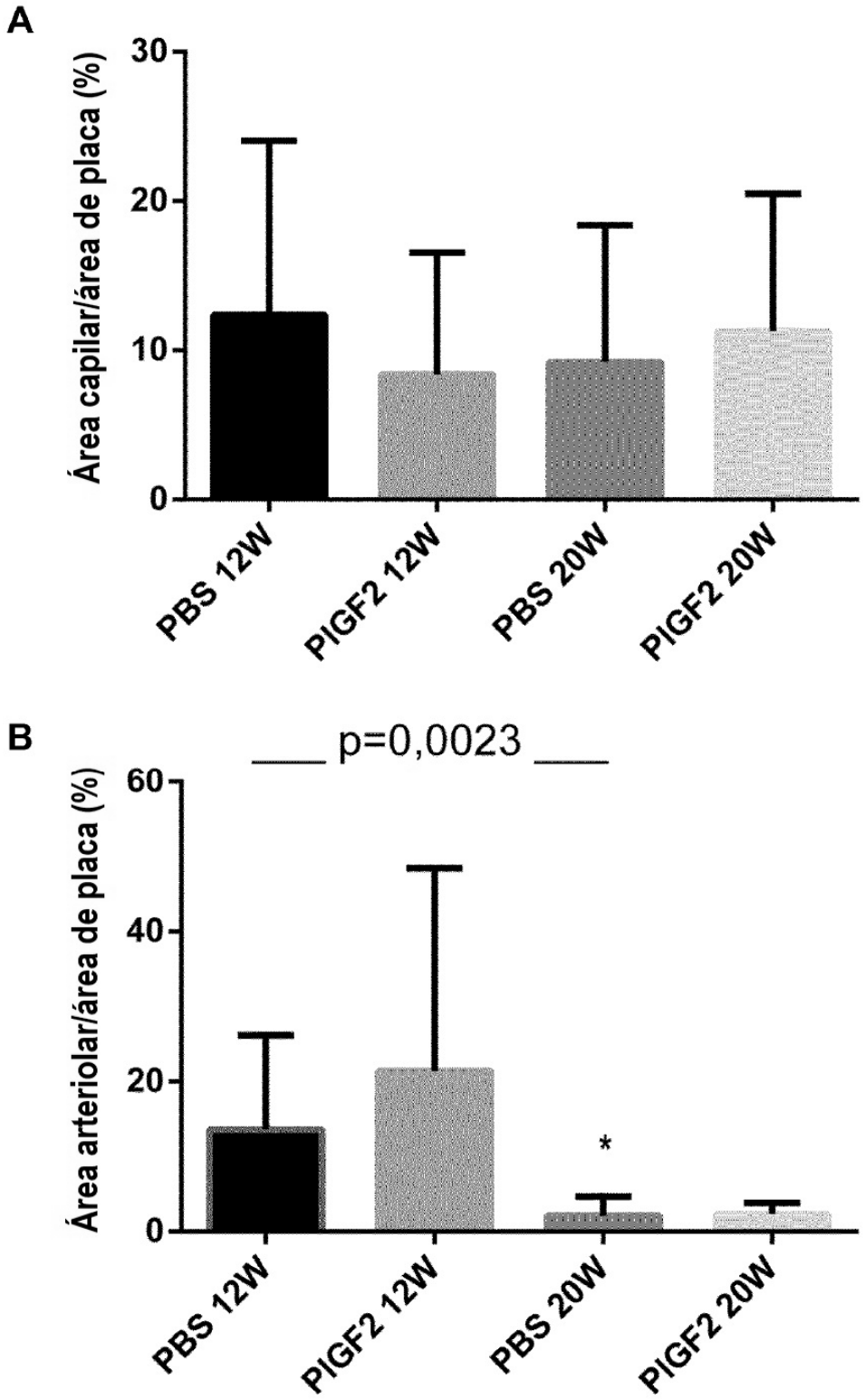

A
Área capilar/área de placa (%)
30
20
10
0
PBS 12W
PlGF2 12W
PBS 20W
PlGF2 20W
B
p=0,0023
Área arteriolar/área de placa (%)
60
40
20
0
*
PBS 12W
PlGF2 12W
PBS 20W
PlGF2 20W

FIGURA 9

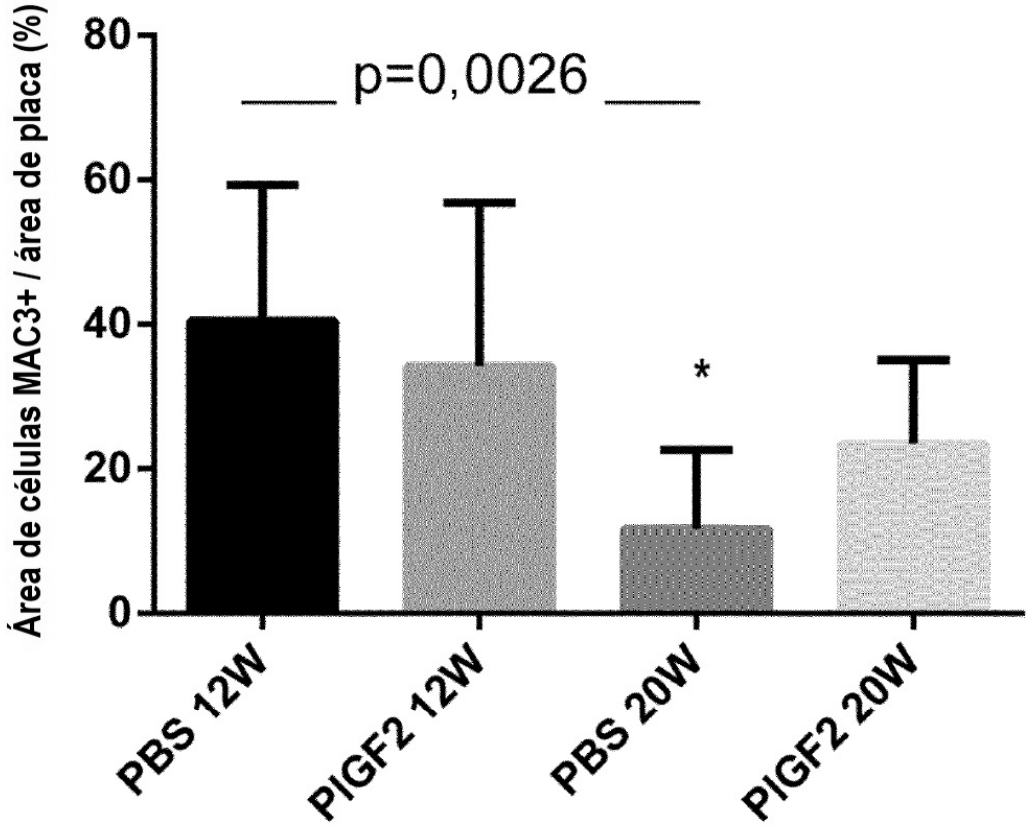

Área de células MAC3+ / área de placa (%)
80
60
40
20
0
p=0,0026
*
PBS 12W
PIGF2 12W
PBS 20W
PIGF2 20W

FIGURA 10