



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 655**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02808278 .2**
96 Fecha de presentación : **19.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1575354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Melusina, una proteína específica muscular, como diana para fármaco para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, y sus aplicaciones.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Universita' Degli Studi di Torino**
Via Verdi, 8
10124 Torino, IT

72 Inventor/es: **Brancaccio, Mara;**
Silengo, Lorenzo;
Altruda, Fiorella;
Lembo, Giuseppe;
Fratte, Luigi y
Tarone, Guido

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 316 655 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

Melusina, una proteína específica muscular, como diana para fármaco para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, y sus aplicaciones.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a mamíferos transgénicos no humanos como estudio modelo para patologías humanas, siendo transgénicos porque presentan una expresión del gen melusina reducida, inactivada, expresada o sobreexpresada. Los animales transgénicos no humanos están destinados a ser utilizados como modelos para estudiar patologías del corazón y para proporcionar terapias de las mismas, en las que las patologías del corazón son la insuficiencia cardíaca y en particular la cardiomiopatía dilatada. También se dan a conocer materiales y procedimientos para el desarrollo de enfoques terapéuticos para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, en particular la cardiomiopatía dilatada, por medio de la utilización de la proteína melusina y/o ácidos nucleicos codificantes de la proteína melusina, fragmentos y/o derivados de la misma.

10
15**Antecedentes de la invención**

En sujetos afectados por hipertensión arterial, el ventrículo izquierdo del corazón se somete a una actividad mecánica incrementada con el fin de bombear sangre contra una presión sanguínea incrementada. Bajo estas condiciones, el corazón experimenta una hipertrofia compensatoria en la que los cardiomiocitos se incrementan de tamaño como consecuencia del incremento de la síntesis y ensamblaje de proteínas contráctiles de las fibrillas de actomiosina.

20

Aunque la hipertrofia es compensatoria y resulta beneficiosa, permitiendo la generación de más fuerza contráctil bajo una condición de presión sanguínea elevada crónica, pueden producirse sucesos adicionales que reduzcan la eficacia de la respuesta hipertrófica o que activen rutas adicionales que causan la dilatación cardíaca y que conducen progresivamente a la disfunción e insuficiencia cardíacas.

25

La identificación de los mecanismos moleculares implicados en la hipertrofia cardíaca inicial y en la aparición de una respuesta posterior deficiente de los cardiomiocitos es un reto fundamental de la biología cardiovascular y de la medicina en la actualidad. De hecho, la comprensión de dichos mecanismos moleculares puede resultar de gran importancia para desarrollar estrategias terapéuticas destinada a luchar contra la insuficiencia cardíaca congestiva, una patología que, sólo en los Estados Unidos de América, afecta a más de 400.000 personas cada año.

30

Se han realizado considerables esfuerzos en la década pasada para identificar los mecanismos moleculares a nivel celular implicados en la respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos. Estos estudios han conducido a un modelo mecanístico, ilustrado en la figura 10, en el que el estiramiento mecánico inducido por la sobrecarga hemodinámica: (1) desencadena mecanosensores intracelulares que (2) activan rutas de señalización intracelular (3) conduciendo a la hipertrofia por dos modos: mediante la activación directa de genes específicos musculares (4a) y mediante la inducción de la secreción de factores neurohumorales y autocrinos (4b) que, a su vez, actúan sobre los cardiomiocitos a través de receptores específicos y señalización que contribuye a la respuesta hipertrófica.

35

40

Entre las moléculas de señalización (punto 3 de la figura 10) que se cree se encuentran implicadas en la hipertrofia cardíaca en respuestas a la sobrecarga mecánica se encuentran: la subunidad Gq alfa de la proteína G heterotrimérica acoplada a los receptores beta-adrenérgicos (Akhter *et al.*, 1998), la fosfolipasa C beta y la proteína quinasa C, que actúan después de las proteínas G (Wakasaki *et al.*, 1997), la ruta de la calcineurina/NF-AT3, la cascada Ras incluyendo las quinasas Raf-1 y ERK1/2 MAP, las quinasas de estrés Jnk y p38, la fosfoinositida 3-quinasa, la ruta de Jak-STAT (para una revisión ver Aoki e Izumo, 2001; Ruwhof y van der Laarse, 2000; Hunter y Chien, 1999). Estas moléculas, aunque muy importantes en la inducción de la respuesta hipertrófica, actúan en su totalidad considerablemente después a lo largo de las rutas de señalización.

50

De esta manera, resulta evidente que la identificación de los mecanosensores mismos (punto 2 de la figura 10) resultaría de gran importancia, debido a que la interferencia con dichos elementos reguladores corriente arriba permitirían un control mucho más específico de la respuesta hipertrófica.

55

La tensión mecánica en el músculo es ejercida por las proteínas contráctiles del citoesqueleto, las fibrillas de actomiosina que se encuentran físicamente unidas a la membrana plasmática y a la matriz extracelular mediante receptores de membrana que pertenecen a la familia de las integrinas.

60

En los músculos, las integrinas se localizan preferentemente en sitios específicos conocidos como unión miotendinosa y costámeros. Estos son sitios específicos en los que las fibrillas de actomiosina se encuentran conectados a la membrana plasmática, contribuyendo a una asociación correcta y estable de la maquinaria contráctil a la membrana de las células musculares.

65

Además de transmitir la fuerza contráctil a través de la membrana plasmática, estas uniones también son mecanosensores importantes que pueden transmitir señales en el interior de la célula en respuesta al estiramiento mecánico. De hecho, varias proteínas se localizan en estos sitios en la cara citoplasmática de la membrana plasmática y que interactúan con las integrinas. Entre estas proteínas se incluyen paxilina, vinculina, talina y la tirosina quinasa p125Fak.

ES 2 316 655 T3

Esta maquinaria molecular es activada por el estiramiento mecánico de las células (para una revisión ver Davis *et al.*, 2001; Carson y Wei, 2000) y es el mejor candidato a aparato mecanosensor.

5 Se ha dado a conocer una isoforma de integrina beta 1 (beta1D) que se expresa específicamente en el músculo cardíaco estriado y el músculo esquelético (Belkin *et al.*, 1996). En asociación con la subunidad alfa7, beta1D forma un heterodímero $\alpha 7\beta 1D$ con actividad de receptor hacia la merosina (laminina 2) de la matriz extracelular. El análisis funcional indica que la integrina beta1D se une tanto a elementos citoesqueléticos como a ligandos de la matriz extracelular con una afinidad mucho más alta en comparación con la isoforma beta1A presente en todos los tejidos no musculares (Belkin *et al.*, 1997), sugiriendo que beta1D proporciona una interacción estable actina-laminina a través de la membrana plasmática necesaria para soportar la tensión mecánica durante la contracción muscular.

15 Para definir con mayor detalle la base molecular de estas propiedades funcionales, los inventores han buscado proteínas que puedan unirse al dominio citoplasmático de beta1D. Utilizando el cribado de dos híbridos, los inventores han aislado la melusina, una nueva proteína expresada selectivamente en el músculo esquelético y en el corazón (Brancaccio *et al.*, 1999; GenBank n° AF140690; GenBank n° AF140691).

20 El análisis de secuencia de la melusina indica la presencia en la mitad aminoterminal de la proteína de una secuencia repetida en tándem rica en cisteínas e histidinas y de sitios de unión putativa para los dominios SH2 y SH3. La mitad C-terminal comprende el sitio de unión para el dominio citoplasmático de la integrina y se caracteriza por un tramo de residuos aminoácidos ácidos que pueden unirse a Ca^{2+} (figura 1). La melusina se localiza en costámeros en correspondencia con la línea Z, en la que también se concentran integrinas y vinculina (Brancaccio *et al.*, 1999).

25 La melusina de esta manera probablemente representa un nuevo transductor intracelular de la función de la integrina beta1 en las células musculares.

Descripción de la invención

30 La invención se refiere a mamíferos de laboratorio transgénicos no humanos susceptibles de desarrollar insuficiencia cardíaca bajo condiciones de hipertensión como estudio modelo de patologías humanas, en los que la expresión del gen de la melusina se encuentra reducido o inactivado.

35 Preferentemente la patología humana se encuentra comprendida en el grupo siguiente: insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertensiva, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto cardíaco. Más preferentemente la patología humana es la cardiomiopatía dilatada.

40 En una forma de realización preferida, el mamífero transgénico no humano sometido a condiciones experimentales de hipertensión, tales como, por ejemplo, la constricción quirúrgica de la aorta, el tratamiento farmacológico con fármacos hipertensivos o la dieta rica en sodio, muestra hipertrofia cardíaca dilatada y disfunción contráctil y resulta útil como estudio modelo para proporcionar terapias de los mismos.

45 Asimismo, la invención se refiere a un mamífero transgénico no humano en el que la insuficiencia cardíaca bajo condiciones hipertensivas se previene o se mejora mediante la expresión o la sobreexpresión de un transgén de la melusina.

Otro objetivo de la invención son las células derivables del mamífero transgénico humano de la invención. La invención se refiere a diferentes usos de las células para la selección de moléculas farmacológicamente efectivas en la inducción de la activación de la melusina.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un *mamífero* transgénico no humano que comprende esencialmente las etapas que consisten en: i) preparar un animal transgénico no humano portador de un alelo inactivado de la melusina, ii) someter a reproducción el animal transgénico parental con otro animal no transgénico, iii) seleccionar animales transgénicos heterocigóticos para la mutación de la melusina, iv) reproducción de los animales heterocigóticos para seleccionar animales homocigóticos para la mutación del gen de la melusina.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a la preparación de un mamífero transgénico no humano en el que se ha inactivado el gen de la melusina mediante enfoques genéticos diferentes de la recombinación homóloga, tales como, por ejemplo, transcritos antisentido de la melusina o ARNs dúplex cortos de 21 a 23 nucleótidos del gen de la melusina que pueden silenciar la expresión de la misma.

65 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a procedimientos para el desarrollo de enfoques terapéuticos para la prevención y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, en particular la cardiomiopatía dilatada, mediante la utilización de proteína melusina y/o ácidos nucleicos codificantes de la proteína melusina y/o derivados de la misma.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona procedimientos para identificar compuestos químicos que son agonistas de la melusina, encontrándose dichos agonistas en la forma de péptidos o compuestos orgánicos que son

análogos estructurales, que en consecuencia pueden utilizarse para la preparación de composiciones farmacéuticas para la terapia de patologías del corazón.

Asimismo, la presente invención se refiere a la utilización de melusina para la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de patologías del corazón en seres humanos; en particular se refiere a la utilización de: i) proteína melusina, péptidos, fragmentos y/o derivados de los mismos, ii) ácidos nucleicos codificantes de la proteína melusina, péptidos, fragmentos y/o derivados de la misma para la preparación de composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de patologías del corazón.

Según la presente invención, dichos objetivos se consiguen mediante las reivindicaciones, a continuación.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describe la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a los dibujos adjuntos, que se proporcionan únicamente a título de ejemplo no limitativo y en los que:

- figura 1. Secuencia de aminoácidos de melusinas de ratón (Mo) y humana (Hu) según se deduce de los ADNc correspondientes (secuencia GenBank AF140691 murina; secuencia GenBank A140690 humana). Se han subrayado los dominios ricos en cisteínas y en histidinas (línea continua) y el dominio ácido carboxi-terminal (línea punteada). Los sitios putativos de unión para los dominios SH2 y SH3 se indican en negrita. La región de unión a integrina se señala en una caja. Las columnas verticales indican aminoácidos idénticos en las moléculas de ratón y humana, mientras que los dobles puntos son residuos conservados (Brancaccio *et al.*, 1999).

- Figura 2. Constructo de ADN genómico utilizado para el suceso de recombinación homóloga en células ES.

- Figura 3. Análisis de transferencia southern de las células ES que portan el gen mutado de la melusina.

- Figura 4. Análisis de transferencia western de la expresión de melusina y de integrinas en los ratones de tipo salvaje y mutante.

- Figura 5. Parámetros ecocardiográficos y hemodinámicos en corazones de tipo salvaje (WT) y nulo para la melusina (KO) en condiciones basales. Figura 5A, diámetro de la cámara diastólica del extremo ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro de la cámara sistólica del extremo ventricular izquierdo (LVESD), grosor del septo interventricular al final de la diástole (IVSD) y grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVPWD). Figura 5B: peso del ventrículo izquierdo expresado como mg por gramo de peso corporal (LVW/BW). Figura 5C, acortamiento fraccional (FS) del ventrículo izquierdo calculado como $[(LVEDD-LVESD)/LVEDD] \times 100$. Figura 5D, presión del ventrículo izquierdo medida en ratones anestesiados con un micromanómetro de punta de catéter de alta fidelidad francés (Millar Instrument).

- Figura 6. Esquema de la constricción quirúrgica de la aorta transversal (TAC) utilizada para inducir la sobrecarga de presión.

- Figura 7. Respuesta de crecimiento del ventrículo izquierdo a la constricción aórtica transversal en ratones de tipo salvaje (+/+) y mutantes (-/-).

- Figura 8. Parámetros ecocardiográficos de corazones de tipo salvaje (WS) y nulo para la melusina (KO) de ratones de control (no inyectados) o de ratones sometidos a constricción aórtica transversal (TAC). Figuras 8A, diámetro de la cámara diastólica del extremo ventricular izquierdo (LVEDD). Figura 8B, diámetro de la cámara sistólica del extremo ventricular izquierdo (LVESD). Figura 8C, grosor del septo interventricular al final de la diástole (IVSD) y grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVPWD).

- Figura 9. Respuesta de crecimiento del ventrículo izquierdo a dosis subpresoras de fenilefrina y angiotensina II. Se evaluó la hipertrofia cardíaca a partir de la proporción de peso de ventrículo izquierdo/peso corporal según indica el eje Y. -/- y +/- indican los ratones mutantes (cuadrados negros) y de tipo salvaje (cuadrados blancos), respectivamente.

- Figura 10. Representación diagramática del mecanismo molecular a nivel celular implicado en la respuesta hipertrofica de los cardiomiocitos.

- Figura 11. Remodelado y función del ventrículo izquierdo tras 2 y 4 semanas de realizar la CAT en ratones de tipo salvaje (WT, columnas blancas) y mutantes (KO, columnas negras). Figura 11a: registro ecocardiográfico en modo M representativo del ventrículo izquierdo de ratones de tipo salvaje (dibujos superiores) y nulos para la melusina (dibujos inferiores). Figura 11b: diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDD). Figura 11c: grosor del septo interventricular al final de la diástole (IVSTD). Figura 11d: acortamiento fraccional en porcentaje (FS%) como parámetro indicador de la función contráctil del ventrículo izquierdo. Figura 11e: morfología gruesa representativa de corazones completos (filas superiores) y de secciones transversales a nivel basal de los ventrículos izquierdos de ratones de tipo salvaje y nulo para la melusina tras 4 semanas de TAC. §: $P < 0,01$, basal; *: $P < 0,01$ vs. tipo salvaje; °: $P < 0,05$ vs. tipo salvaje.

ES 2 316 655 T3

- Figura 12. Fosforilación por GSK3 β alterada en ratones nulos para la melusina en respuesta a la CAT mediante la comparación de los resultados de ratones de tipo salvaje (WT, columnas blancas) y nulos para la melusina (KO, columnas negras). Se analizaron los extractos de proteínas del ventrículo izquierdo mediante transferencia western con anticuerpos contra moléculas de señalización fosforiladas. Se controló la carga de muestras utilizando anticuerpos específicos para cada proteína. Se midió la intensidad de las bandas en dos experimentos independientes con un total de 8 ratones por grupo y se calculó la intensidad relativa tras restar el nivel basal en animales con operación simulada. ERK (figura 12a), p38 (figura 12b), GSK3 β (figuras 12c), AKT (figura 12d) son rápidamente fosforilados en respuesta a la CAT en ratones de tipo salvaje, aunque la fosforilación de GSK3 β y AKT resultó fuertemente alterada en los ratones nulo para la melusina. Se fosforiló GSK3 β a nivel comparable en ratones de tipo salvaje y nulos para la melusina 10 y 20 minutos después de la inyección IP de 2 IU de insulina (figura 12e). Se detectó una fosforilación reducida de serina9-GSK3 β (figura 12f) y una actividad incrementada de quinasa (figura 12g) en los corazones nulos para la melusina sometidos a 7 días de CAT. °: P<0,05 vs. tipo salvaje.

A continuación, se describe la presente invención haciendo referencia a algunas formas de realización preferidas proporcionadas a título de ejemplo no limitativo.

Tal como se pondrá de manifiesto a partir de los resultados descritos posteriormente, la melusina desempeña un papel crucial en la señalización mecanoquímica, conduciendo a una hipertrofia correcta de los cardiomiocitos en respuesta a la sobrecarga de presión.

En ausencia de melusina, la hipertrofia cardíaca resulta severamente alterada y el ventrículo izquierdo experimenta dilatación, adelgazamiento y muestra una capacidad contráctil reducida, perdiendo de esta manera la capacidad de resistir el estrés biomecánico impuesto por la presión sanguínea elevada.

La estimulación de la función y señalización de la melusina se espera que mejore la hipertrofia de los cardiomiocitos, evitando la dilatación y la insuficiencia cardíaca posterior. De esta manera, las estrategias terapéuticas implicarán la expresión o sobreexpresión de la melusina en corazones con insuficiencia mediante la transferencia génica, la utilización de fármacos que actúen como agonistas de la melusina o de moléculas efectoras por debajo de la melusina.

Aunque varias moléculas, tales como la subunidad alfa Gq, la fosfolipasa C beta, la proteína quinasa C, la calcineurina, NF-AT3, Ras, Raf-1, ERK1/2, quinasas Jnk y p38MAP, la fosfoinositida quinasa 3 y los STAT (ver comentario, anteriormente), son dianas potenciales para los fármacos destinados a estimular la hipertrofia cardíaca, todas estas proteínas presentan la gran desventaja de expresarse ubicuamente en la mayoría, si no en todos los tejidos. De esta manera, un fármaco que regule cualquiera de dichas proteínas inevitablemente causará efectos secundarios perjudiciales. La melusina, al ser una proteína específica del músculo, no presentará este problema y, por el contrario, representa una molécula diana ideal para dicho tipo de fármacos. Una segunda ventaja importante de la melusina respecto a otras proteínas implicadas en la hipertrofia cardíaca es su papel como mecanosensor, que sitúa a la melusina en las primerísimas etapas de la cascada de señalización bioquímica que desencadena la respuesta hipertrofica. De esta manera, la regulación de la función de la melusina permite un control muy específico de la respuesta cardíaca.

Los animales transgénicos no humanos en los que se inactiva el gen de la melusina mediante recombinación homóloga o mediante enfoques genéticos que no son la recombinación homóloga representan un modelo animal único para el ensayo de fármacos destinados a evitar la insuficiencia cardíaca. De hecho, estos animales no muestran defectos cardíacos funcionales en condiciones basales durante la duración de su vida. La insuficiencia cardíaca resulta evidente sólo tras exponer los animales transgénicos, y más preferentemente los ratones transgénicos nulos para la melusina, a condiciones hipertensivas crónicas. En una forma de realización preferida, las condiciones hipertensivas se determinan mediante restricción quirúrgica de la aorta, el tratamiento farmacológico con fármacos hipertensivos o una dieta rica en sodio. En estas condiciones, los ratones transgénicos desarrollan dilatación e insuficiencia cardíacas con una cinética relativamente lenta (en 4 semanas), un curso temporal mucho más lento comparado con el mostrado por otros modelos animales de cardiomiopatía dilatada (Arbet *et al.*, 1997; Hirota *et al.*, 1999; Badorff *et al.*, 2002), permitiendo someter a ensayo más exactamente los fármacos destinados a evitar la insuficiencia cardíaca.

La preparación de un animal transgénico no humano, preferentemente un animal transgénico nulo para la melusina, comprende esencialmente las etapas siguientes: i) preparar un constructo de ADN genómico que anule la expresión de la melusina y adecuado para los sucesos de recombinación homóloga, ii) utilizar dicho constructo de ADN para inducir la recombinación homóloga en células madre embrionarias, iii) la utilización de células madre que portan un gen inactivado de la melusina para generar un embrión quimérico, iv) seleccionar animales heterocigóticos y homocigóticos para la mutación de la melusina mediante el cruce de animales quiméricos con diferentes cepas de ratón.

Un animal transgénico para la melusina es un animal en el que se ha alterado/modificado la expresión de la proteína melusina en una dirección positiva o negativa mediante la introducción estable o transitoria en algunas o en todas las células de los animales de moléculas capaces de modificar la expresión de la melusina a nivel transcripcional, traduccional o postraduccional.

A título de ejemplo no limitativo, puede utilizarse un constructo de ADN codificante de un transcrito antisentido de melusina. La expresión de dicho constructo de ADN es dirigida por un promotor específico cardíaco, tal como el promotor de la cadena pesada de la α -miosina. Este constructo se introduce en oocitos fertilizados que después se

reimplantan en el útero de madres nodrizas con el fin de generar animales transgénicos no humanos que expresan niveles nulos o reducidos de melusina en el corazón. Un segundo ejemplo no limitativo consiste en la utilización de vectores codificantes de ARNs dúplex cortos, de 21 a 23 nt, capaces de silenciar genes que contienen secuencias homólogas (Hasuwa *et al.*, 2002).

La patología cardíaca mostrada por los ratones transgénicos nulos para la melusina descrita en la presente invención indica que la melusina resulta necesaria para sostener la respuesta hipertrófica compensatoria que se produce al exponer el corazón a una sobrecarga de presión. De esta manera, se concluye que la inhibición de la función de la melusina por compuestos naturales o sintéticos puede conducir a insuficiencia y dilatación cardíacas en animales que portan genes de la melusina de tipo salvaje y expuestos a condiciones hipertensivas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción de ratones transgénicos nulos para la melusina y caracterización molecular

Con el fin de investigar el papel de la melusina en la función de las integrinas, los inventores han generado una mutación en ratones (cepa 129SV consanguínea) que anula la expresión de melusina. Mediante la utilización de ADNc murino (Brancaccio *et al.*, 1999; n° GenBank AF140691), los presentes inventores aislaron un fragmento genómico de 14,8 kb que comprendía cuatro exones en el extremo 5' del gen de la melusina. La caracterización parcial con mapa de restricción y secuenciación indicó que el primer exón contenía el codón de inicio ATG. Se substituyó un fragmento PstI que contenía los exones 1 a 4 con un casete que contenía las secuencias IRES unidas al gen LacZ seguido del gen de resistencia a la neomicina controlado por un promotor PGK (figura 2). Este constructo, que presenta dos brazos de 4,1 y 5 kb homólogos al gen endógeno, se sometió a electroporación en células madre R1 embrionarias procedentes de ratones 129SV consanguíneos macho. Se han identificado mediante análisis de transferencia southern diferentes clones en los que se había producido recombinación homóloga (figura 3). Debido a que el gen de la melusina se encuentra situado en el cromosoma X (Brancaccio *et al.*, 1999) y las células ES R1 son de origen masculino, un único suceso de recombinación homóloga resultó suficiente para inactivar el gen de la melusina (figura 3). Tras la inyección de las células ES mutantes en blastocitos y la implantación en el útero de una madre nodriza, se obtuvieron ratones quiméricos en los que las células genéticamente modificadas habían colonizado la línea germinal. A continuación, se cruzaron quimeras con ratones 129SV para obtener ratones 129SV nulos para la melusina.

Los ratones nulos para la melusina son viables y fértiles y no muestran defectos musculares o cardíacos apreciables hasta los 18 meses de edad.

La inactivación con éxito del gen de la melusina se demostró mediante análisis de la expresión de proteínas en los músculos cardíaco y esqueléticos de ratones mutantes (figura 4). Estos indican, de esta manera, que la melusina no resulta necesaria para el desarrollo de los músculos y el corazón.

Ejemplo 2

Papel de la melusina en la hipertrófica cardíaca

Se investigó la morfología y rendimiento cardíacos basales mediante ecocardiografía y cateterización cardíaca y se descubrió que eran comparables en ratones de tipo salvaje y nulos para la melusina.

Tal como se muestra en la figura 5A, la ecocardiografía permitió medir el diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo (LVEDD), el diámetro sistólico final (LVESD), el grosor del septo interventricular al final de la diástole (IVSD), el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo al final de la diástole (LVPWD) y el acortamiento fraccional (FS) (figura 5C). También se midió la masa del ventrículo izquierdo (LVW/BW) a modo de parámetro indicador de hipertrofia y se encontró que era comparable en ratones nulos para la melusina y de control (figura 5B). Además, se midió directamente la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo mediante cateterización con un micromanómetro y se informó como dP/dt (figura 5D). De esta manera, la ausencia de melusina no afecta a la función cardíaca bajo condiciones fisiológicas.

Sin embargo, la deficiencia de melusina afecta a la función del músculo cardíaco al exponer los corazones a sobrecarga de presión. Para analizar la capacidad de responder a la sobrecarga biomecánica, se sometió a corazones nulos para la melusina a hipertensión crónica provocada mediante restricción quirúrgica de la aorta transversal tal como se describe posteriormente y en la figura 6.

Los ratones se anestesiaron mediante inyección de una mezcla de quetamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). Tras la esternotomía longitudinal, se restringió el arco aórtico entre el tronco anónimo y la arteria carótida izquierda con hilo de seda 8-0 atado contra el vaso y una aguja de calibre 27 de punta roma que después se extrajo rápidamente. En el grupo de control se llevaron a cabo los mismos procedimientos quirúrgicos anteriormente indicados. Se sometieron los ratones nulos para la melusina y de tipo salvaje al procedimiento quirúrgico anterior. Siete días después de la cirugía, se evaluó el grado de sobrecarga hemodinámica, indicada por el gradiente de presión sistólica, mediante canulación selectiva de las arterias carótidas izquierda y derecha (Lembo *et al.*, 1996).

ES 2 316 655 T3

Tras dichas evaluaciones hemodinámicas, los ratones se pesaron, se extirparon los corazones y se evaluó la hipertrofia cardíaca utilizando la proporción de peso ventricular izquierdo/peso corporal.

5 Aunque los ratones de tipo salvaje desarrollaron una hipertrofia cardíaca compensatoria clara 7 días después de la cirugía, los ratones nulos para la melusina sólo mostraron una hipertrofia muy modesta, según la evaluación de la proporción de peso ventricular izquierdo/peso corporal (figura 7).

10 Con el fin de caracterizar mejor la evolución del remodelado del ventrículo izquierdo durante la sobrecarga de presión crónica, se sometió a ratones nulos para la melusina a CAT (constricción aórtica transversal) durante un periodo de 4 semanas y se examinaron mediante análisis ecocardiográfico en serie a lo largo de este periodo. Se evaluó la estructura y funcionamiento cardíacos de manera no invasiva mediante ecocardiografía transtorácica en condiciones basales y tras 2 y 4 semanas de la CAT. Todas las mediciones se determinaron en una vista de eje corto a nivel de los músculos papilares.

15 Tal como se esperaba, los ratones de tipo salvaje mostraron un grosor incrementado del septo interventricular y diámetros reducidos del ventrículo izquierdo al final de la diástole. En contraste, tras 7 días de CAT, los ratones nulos para la melusina desarrollaron sólo un engrosamiento modesto de las paredes ventriculares y un agrandamiento significativo de la cámara (figura 8). Tras 2 semanas de CAT, los ratones nulos para la melusina mostraron un agrandamiento adicional de la cámara ventricular izquierda en comparación con la observada en los ratones de tipo salvaje (figura 11).
20 Tras 4 semanas, la dilatación ventricular izquierda era todavía más evidente y se asociaba a un deterioro marcado de la función contráctil, detectado por la alteración severa del acortamiento fraccional (figura 11). Finalmente, las tasas de letalidad a las 4 semanas de CAT eran mayores en los ratones mutantes comparado con los de tipo salvaje (53,3% frente a 30,7%).

25 La ausencia de melusina resulta, de esta manera, en hipertrofia cardíaca reducida y estimula la dilatación del ventrículo izquierdo al exponer el corazón a una presión sanguínea elevada. De esta manera, esta condición acelera la aparición de la respuesta cardíaca defectiva.

Ejemplo 3

30

Papel mecanosensor de la melusina en el corazón

Con el fin de someter a ensayo si la melusina se encuentra implicada en la hipertrofia cardíaca en respuesta a estímulos diferentes de la sobrecarga de presión, los inventores también sometieron a ensayo la respuesta cardíaca en
35 ratones nulos para la melusina tras la administración crónica de fenilefrina o angiotensina II a dosis supresoras que no incrementan la presión sanguínea.

La administración crónica de dosis supresoras de fenilefrina (100 mg/kg/día) o angiotensina II (0,1 mg/kg/día) (Harada *et al.*, 1998) se llevó a cabo mediante el implante subcutáneo de minibombas osmóticas (Alza Corp.) que
40 administran las dosis anteriores de fenilefrina o angiotensina II durante 21 días. En estos grupos de control de serie experimental se trataron con un vehículo solo.

Con el fin de verificar que la infusión de agonistas crónicos no altera la homeostasis de la presión sanguínea, se evaluó el perfil de presión sanguínea a partir de la medición radiotelemétrica realizada mediante la implantación de
45 un dispositivo comercialmente disponible en la arteria femoral y la captación de la señal de presión telemétrica en un sistema dedicado de análisis computerizado (Data Sciences International).

Se evaluó la hipertrofia cardíaca a partir de la proporción de peso del ventrículo izquierdo/peso corporal. Los resultados de estos experimentos indican que los ratones nulos para la melusina expuestos a dosis subpresores de fenilefrina
50 o angiotensina II desarrollan hipertrofia del ventrículo izquierdo de una manera no significativamente diferente de los ratones de tipo salvaje (figura 9).

Dichos resultados indican en conjunto que la melusina se encuentra implicada en la respuesta hipertrófica a la sobrecarga de presión (ver el Ejemplo 2), pero que no resulta necesaria en la respuesta a factores tróficos, tales como
55 la fenilefrina o la angiotensina II. De esta manera, lo expuesto anteriormente indica de manera convincente un papel mecanosensor de la melusina en el corazón.

Ejemplo 4

60 *La falta de melusina altera la fosforilación de gsk3 β*

Con el fin de investigar el impacto de la melusina sobre la señalización intracelular cardíaca desencadenada por estrés biomecánico, se analizó la fosforilación de las proteínas de señalización de las que se ha informado se encuentran
65 implicadas en la hipertrofia cardíaca (Aoki e Izumo, 2001; Hunter y Chien, 1999; Hardt y Sadoshima, *Circ. Res.*, 2002).

Se muestran experimentos representativos en la figura 12. Se sometieron los ratones de tipo salvaje (WT, columnas blancas) y los ratones nulos para la melusina (KO, columnas negras) a CAT durante 10 minutos o a falsas operaciones

(S) a modo de controles. Se analizaron los extractos de proteínas del ventrículo izquierdo mediante transferencia western con anticuerpos contra moléculas de señalización fosforiladas.

En particular, los inventores descubrieron que la glucógeno sintasa quinasa 3beta (GSK3 β) resultaba diferencialmente fosforilada en ratones de tipo salvaje comparado con ratones nulos para la melusina. Tal como se muestra en la figura 12c, GSK3 β se fosforiló fuertemente en la serina 9 pasados 10 minutos de la CAT en ratones de tipo salvaje concordando con la hipótesis de que esta señal era desencadenada en respuesta a un suceso mecánico. Sin embargo, en ratones nulos para la melusina, el grado de fosforilación de la serina 9 de GSK3 β resultó severamente reducido (figura 12c).

Debido a que AKT es una quinasa importante que regula la fosforilación de la serina 9 de GSK3 β , los inventores analizaron el estado de fosforilación de esta quinasa. Aunque AKT resulta rápidamente fosforilada en respuesta a la CAT en los ratones de tipo salvaje, esta respuesta resultó fuertemente reducida en los ratones nulos para la melusina (figura 12d).

La GSK3 β se encuentra implicada en múltiples rutas de señalización y es una diana bien conocida de la señalización de los receptores de la insulina (Cohen y Frame, 2001). A continuación, los inventores sometieron a ensayo si la falta de melusina podía afectar la fosforilación de GSK3 β en respuesta a la insulina. El análisis de transferencia western de extractos de corazón de ratones tratados durante 10 y 20 minutos con insulina (administrada con inyecciones IP de 2IU-) mostró que GSK3 β se encontraba fosforilada a nivel comparable en ambos genotipos de ratón (figura 12e).

Debido a que la atenuación de la hipertrofia cardíaca en ratones nulos para la melusina se observó transcurridos 7 días de la CAT, los inventores sometieron a continuación a ensayo la señalización de GSK3 β en este punto del tiempo. Resulta interesante que la fosforilación de la serina 9 de GSK3 β se encontraba reducida en ratones nulos para la melusina comparado con ratones de tipo salvaje transcurridos 7 días de la CAT (figura 12f). Además, la actividad de quinasa se encontraba incrementada según predijo la acción inhibitoria de la fosforilación de la serina 9 (figura 12g). De esta manera, la señalización alterada de GSK3 β es persistente en los ratones nulos para la melusina expuestos a 7 días de CAT.

Estos datos indican que la falta de melusina altera selectivamente la AKT ventricular izquierda y la fosforilación de GSK3 β en respuesta al estrés biomecánico.

Ejemplo 5

Aislamiento de compuesto orgánico agonista de melusina

Con el fin de identificar los agonistas de la melusina, se han identificado las moléculas que pueden activar la función de la melusina. Basándose en datos anteriormente publicados (Brancaccio *et al.*, 1999) y datos actuales, es conocido que las integrinas se unen a la melusina y desencadenan la activación de la misma. De esta manera, los péptidos o compuestos orgánicos ligantes de la melusina y que interfieren con la unión de melusina e integrina se espera que sean buenos candidatos a agonistas de la melusina mediante mimetización de la activación de la melusina inducida por integrina. Dichos agonistas de la melusina pueden identificarse a partir de una gran biblioteca de compuestos péptidos y similares a péptidos mediante la utilización de técnicas de cribado de alto rendimiento utilizando un ensayo bien definido para la detección de dichos agonistas.

Con dicho fin, puede utilizarse un ensayo ELISA en el que melusina recombinante purificada o fragmentos de la proteína se encuentran adsorbidos sobre la superficie de pocillos de microtitulación, se incuban con extractos celulares que contienen integrina para permitir la unión de integrina y melusina. A esta mezcla se le añaden compuestos específicos para seleccionar moléculas capaces de unirse a la melusina e impedir la unión de integrinas. Anteriormente se ha utilizado un procedimiento similar para seleccionar un compuesto que pueda interferir con la función de la integrina en otros sistemas celulares (Ambroise *et al.*, 2002).

Puede utilizarse el protocolo de ELISA siguiente. Se purifican mediante cromatografía de afinidad en glutatión-sefarosa 4B, proteínas de fusión constituidos por GST (glutatión S-transferasa) fusionada con la melusina humana de longitud completa y/o un fragmento de residuos aminoácidos 149 a 350 en la región C-terminal, que contiene el sitio de unión a integrina (Brancaccio *et al.*, 1999). Se adsorben sobre pocillos de microtitulación según procedimientos estándar proteínas de fusión purificadas y se utilizan como ligandos para la unión de integrinas. Se utilizan extractos de células COS como fuente de heterodímeros de integrina beta1.

Brevemente, se lavan las células COS dos veces con PBS frío y se extraen en PBS (Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, NaVO₄ 1 mM, NaF 10 mM, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 4 μ g/ml y aprotinina 0,1 TIU/ml), Nonidet P-40 al 0,5% más Ca²⁺ 1 mM o con TBS, Nonidet P-40 al 0,5% más EDTA 5 mM para solubilizar las proteínas membranales. Se incubaron 100 μ l de extractos celulares que contenían 2 mg de proteínas/ml durante la noche a 4°C en pocillos recubiertos con GST-melusina, GST-melusina (aminoácidos 149 a 350) y GST solo (como control). Tras el lavado, se detectó la unión de integrinas con el anticuerpo monoclonal TS2/16 seguido de anticuerpo antiratón conjugado con peroxidasa. Los compuestos que pueden interferir con la unión de integrina a melusina se añadieron

ES 2 316 655 T3

a concentraciones crecientes conjuntamente con el extracto de células COS durante la incubación con la proteína de fusión GST-melusina.

5 Como fuente de compuestos que pueden interferir con la unión de melusina a integrina, puede utilizarse una biblioteca de expresión fágica de péptidos aleatorios (Ladner y Ley, 2001). En estas bibliotecas, se insertan secuencias oligonucleótidas aleatorias codificantes de secuencias cortas de aminoácidos (8 a 18 residuos) en la secuencia codificante de las proteínas de la cubierta fágica. El fago resultante expresa en su superficie la secuencia de péptido aleatorio que debe seleccionarse por su capacidad de unión. La población fágica que expresa los péptidos aleatorios se deja que interactúe con la melusina recombinante adsorbida sobre la superficie de pocillos de microtitulación antes de la
10 incubación con integrinas. Se aíslan los fagos que interfieren con la unión de integrinas y se determina la secuencia peptídica codificada por el oligonucleótido aleatorio insertado mediante secuenciación del ADN.

15 Como fuente alternativa de compuestos orgánicos capaces de unirse a melusina interfiriendo con la unión de las integrinas se utilizan bibliotecas de química combinatorial (Floyd *et al.*, 1999; Ambroise *et al.*, 2002; Toogood, 2002).

20 Las secuencias peptídicas aisladas mediante el procedimiento descrito anteriormente se someten a ensayo para su capacidad de desencadenar la hipertrofia *in vitro* de los cardiomiocitos. Para este ensayo, se utilizan cardiomiocitos nulos para la melusina derivados de animales transgénicos de la invención para definir la especificidad del compuesto aislado para la melusina. Este compuesto resulta inefectivo en cardiomiocitos nulos para la melusina, mientras que debería encontrarse activo en las células de tipo salvaje.

Con el fin de permitir la penetración en las células, los péptidos se acoplan a péptidos troyanos (Derossi *et al.*, 1998) que permiten la administración intracelular espontánea y eficiente.

25 También se utilizan péptidos activos para desarrollar compuestos orgánicos análogos estructurales más adecuados para el tratamiento *in vivo*.

30 Se tratan modelos de ratón genéticamente modificado que desarrollan, espontáneamente o tras la inducción por sobrecarga de presión, cardiomiopatía dilatada (para una revisión ver Chien, 1999), se tratan mediante la administración de análogos péptidos con implante subcutáneo de minibombas de infusión y se analizan para su función y morfología cardíacas para monitorizar la actividad terapéutica potencial *in vivo* de los compuestos.

35 Se aplica la misma estrategia con moléculas que actúan por debajo de la melusina en el control de la respuesta de hipertrofia cardíaca. Mediante la utilización de diferentes enfoques experimentales, incluyendo la coimmunoprecipitación, la cromatografía de afinidad y el ensayo de dos híbridos, pueden identificarse proteínas que se unen a la melusina y que funcionan como transductores por debajo de la señal mecanoquímica que conduce a la hipertrofia (entre las etapas 2 y 3 en la figura 10). Tras identificar y caracterizar estas moléculas, puede aplicarse la misma estrategia descrita anteriormente para seleccionar agonistas que refuerzan la activación de dichas proteínas que actúan más abajo de la melusina. Dichos fármacos se someten a ensayo en ratones transgénicos nulos para la melusina para su capacidad de
40 rescatar la dilatación del ventrículo izquierdo observada en estos animales tras la CAT.

Ejemplo 6

45 *Terapia de gen de la melusina para prevenir y tratar la dilatación e insuficiencia cardíacas*

Tal como se ha expuesto anteriormente, puede conseguirse una estrategia terapéutica alternativa para prevenir y/o curar la dilatación e insuficiencia cardíacas mediante la inducción de la sobreexpresión de melusina.

50 Se ha demostrado que los constructos de adenovirus y/o otros vectores víricos, tales como los vectores lentivíricos, son un vector eficiente para la administración génica en patologías experimentales del corazón (Wright *et al.*, 2001). Se prepara un vector adenovírico que expresa el gen de la melusina siguiendo el protocolo siguiente proporcionado a título de ejemplo. También pueden prepararse vectores lentivíricos mediante procedimientos similares.

55 Se clona el ADNc de la melusina humana (GenBank AF 140690) en un vector lanzadera (pAdTrack-CMV) que contiene el marcador de GFP. Se linearizan 100 a 500 ng del plásmido resultante mediante digestión con endonucleasa de restricción PmeI y tras la digestión, se extraen mediante tratamiento con fenol-cloroformo, se precipitan con etanol y se resuspenden en 6 μ l de agua desionizada. Se cotransforma plásmido lanzadera digerido con PmeI y 100 ng de vector esqueleto adenovírico (pAdEasy-1) mediante electroporación en células de *E. coli* BJ5183. Las células de *E. coli* transformadas se resuspenden en 500 μ l de caldo L, se siembran en 3 placas de LB canamicina y se cultivan
60 durante la noche a 37°C. Se seleccionan 10 a 20 colonias y se cultivan en 2 ml de caldo L que contenía 25 μ g/ml de canamicina durante 10 a 15 horas. Se llevan a cabo minipreparaciones de ADN mediante procedimientos convencionales y se digieren plásmidos superenrollados con endonucleasa de restricción PacI. Los clones candidatos rinden tras la digestión un fragmento grande de aproximadamente 30 kb y uno de menor tamaño de 3 ó 4,5 kb. Se retransforma adenovirus recombinante en *E. coli* y se purifica utilizando kits de purificación disponibles comercialmente. A continuación, se linearizan 4 μ g de ADN adenovírico recombinante con endonucleasa de restricción PacI, se precipitan con etanol, se resuspenden en 20 μ l de agua estéril y se utilizan para la transfección de 2×10^6 células 293 (células de riñón embrionario humano transformadas por E1) a una confluencia de entre 50% y 70%. La transfección y la producción vírica se monitorizan mediante la expresión de proteína GFP fluorescente. Se raspan las células con una varilla con

extremo de goma 7 a 10 días después de la transfección y se recogen en tubos de 50 ml, después se centrifugan y se resuspenden en 2 ml de PBS estéril. Las células se congelan en un baño de hielo seco-metanol y se descongelan en un baño de agua a 37°C y después se agitan con vórtex. Las células se congelan y se descongelan en un total de 4 ciclos. A continuación, las muestras se centrifugan brevemente y se almacenan a -20°C. Este sobrenadante vírico se utiliza para infectar células 293 confluyentes al 50% a 70% con el fin de producir una gran cantidad de stocks víricos. Los virus se recogen tras desenganchar entre un tercio y la mitad de las células. Resulta posible confirmar la presencia de virus utilizando PCR y análisis de transferencia western. El título vírico se mide mediante recuento de las células 293 fluorescentes verdes 18 horas después de la infección con diversas diluciones de sobrenadante vírico.

El vector adenovírico se administra en los animales siguiendo un protocolo basado en catéteres para la inyección intracardíaca según Hajjar *et al.* (Hajjar *et al.*, 1998).

Como prueba de la eficacia *in vivo*, el vector adenovírico de la melusina se somete a ensayo para su capacidad de rescatar la dilatación cardíaca en ratones nulos para la melusina sometidos a restricción de la aorta transversal. Este procedimiento también se aplica en diferentes modelos de ratón transgénico con una respuesta hipertrófica alterada o con cardiomiopatía dilatada espontánea.

Referencias

Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit *in vivo* pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 1998; 280:574-7

Ambroise Y, Yaspan B, Ginsberg MH, Boger DL. Inhibitors of Cell Migration that Inhibit Intracellular Paxillin/alpha4 Binding. A Well-Documented Use of Positional Scanning Libraries. *Chem Biol.* 2002; 9:1219-26.

Aoki H and Izumo S. Signal transduction of cardiac myocyte hypertrophy. Heart Physiology and Pathophysiology; Fourth Edition, Chapter 58 páginas 1065-1086; *Academic Press* 2001.

Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 1997; 88:393-403.

Badorff C, Ruetten H, Mueller S, Stahmer M, Gehring D, Jung F, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3 beta and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J Clin Invest.* 2002; 109:373-81.

Belkin AM, Retta SF, Pletjushkina OY, Balzac F, Silengo L, Fassler R, Koteliensky VE, Burrridge K, Tarone G. Muscle beta1D integrin reinforces the cytoskeleton-matrix link: modulation of integrin adhesive function by alternative splicing. *J Cell Biol* 1997; 139:1583-95

Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, Maier A, Tarone G, Koteliensky VE, Burrridge K. Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 1996; 132:211-26

Brancaccio M, Guazzone S, Menini N, Sibona E, Hirsch E, De Andrea M, Rocchi M, Altruda F, Tarone G, Silengo L. *J Biol Chem* 1999; 274: 29282-8

Carson JA, Wei L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2000, 88:337-43

Chien KR, 1999, *Cell* 98; 555-558 **Cohen P, Frame S.** The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:769-76.

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001, 280:H1427-33.

Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. Trojan peptides: the penetrating system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8:84-7, 1998

Floyd CD, Leblanc C, Whittaker M. Combinatorial chemistry as a tool for drug discovery. *Prog Med Chem.* 1999; 36:91-168.

Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A. Modulation of ventricular function through gene transfer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:5251-6

Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y (1998) Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation*; 97:1952-9

ES 2 316 655 T3

Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res.* 2002; 90:1055-63.

5 **Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, Muller W, Chien KR** Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999, 97:189-98

Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002; 532:227-30

10 **Hunter JJ, Chien KR.** Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999, 341:1276-83

Ladner RC, Ley A. Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12:406-410

15 **Lembo G, Rockman HA, Hunter JJ, Steinmetz H, Koch WJ, Ma L, Prinz MP, Ross J Jr, Chien KR, Powell-Braxton L.** (1996) Elevated blood pressure and enhanced myocardial contractility in mice with severe IGF-1 deficiency. *J Clin Invest*; 98:2648-55

20 **Ruwhof C, van der Laarse A.** Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 2000, 47:23-37

Toogood PL. Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *J Med Chem.* 2002; 45:1543-58.

25 **Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL.** Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:9320-5.

30 **Wright MJ, Wightman LM, Lilley C, de Alwis M, Hart SL, Miller A, Coffin RS, Thrasher A, Latchman DS, Marber MS.** *In vivo* myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 2001, 96:227-36.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 655 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mamífero de laboratorio transgénico no humano susceptible de desarrollar insuficiencia cardíaca bajo condiciones hipertensivas, en el que la expresión del gen de la melusina se encuentra disminuida o inactivada.
2. Mamífero transgénico según la reivindicación 1, en el que la expresión del gen de la melusina se ha inactivado mediante recombinación homóloga.
- 10 3. Mamífero transgénico según la reivindicación 2, en el que el animal es un animal con inactivación génica nulo para la melusina.
4. Mamífero transgénico según la reivindicación 1, en el que la expresión del gen de la melusina es reducido o inactivado mediante procedimientos genéticos distintos a la recombinación homóloga.
- 15 5. Mamífero transgénico según la reivindicación 4, en el que el procedimiento genético implica transcritos anti-sentido de la melusina, o ARN dúplex cortos de 21 a 23 nucleótidos del gen de la melusina que pueden silenciar la expresión de la melusina.
- 20 6. Mamífero transgénico no humano en el que se previene o se mejora la insuficiencia cardíaca bajo condiciones hipertensivas, **caracterizado** porque se expresa o se sobreexpresa un transgén de la melusina.
7. Mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 6, en el que la reducción o inactivación de la expresión o de la sobreexpresión es transitoria.
- 25 8. Mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, sometido además a condiciones hipertensivas.
9. Mamífero transgénico según la reivindicación 8, en el que dichas condiciones hipertensivas son inducidas mediante operación quirúrgica.
- 30 10. Mamífero transgénico según la reivindicación 8, en el que dicha operación quirúrgica consiste en la constricción quirúrgica de la aorta transversal.
- 35 11. Mamífero transgénico según la reivindicación 8, en el que dichas condiciones hipertensivas son inducidas mediante tratamiento farmacológico con fármacos hipertensivos.
12. Mamífero transgénico según la reivindicación 8, en el que dichas condiciones hipertensivas son inducidas con una dieta rica en sodio.
- 40 13. Mamífero transgénico según la reivindicación 6 y cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho animal por lo menos desarrolla menos hipertrofia cardíaca que un animal de tipo salvaje tras la exposición a condiciones hipertensivas.
- 45 14. Mamífero transgénico según la reivindicación 1 y cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho animal desarrolla por lo menos una dilatación cardíaca.
15. Mamífero transgénico según la reivindicación 1 y cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho animal desarrolla por lo menos una insuficiencia cardíaca.
- 50 16. Mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el animal es un ratón (*Mus musculus*).
17. Mamífero transgénico según la reivindicación 16, en el que dicho ratón pertenece a las cepas 129SV, C57BI o 129SVxC57BI.
- 55 18. Célula derivable de un mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó 7, **caracterizada** porque la expresión de la melusina se encuentra disminuida o inactivada.
- 60 19. Célula derivable de un mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizada** porque la melusina se encuentra sobreexpresada.
20. Utilización de un mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o de una célula según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 para la selección de compuestos farmacológicamente activos en la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.
- 65 21. Utilización de un mamífero transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 como modelo para el estudio de patologías cardíacas seleccionadas de entre el grupo constituido por: insuficiencia cardíaca, insufi-

ES 2 316 655 T3

ciencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertensiva, cardiomiopatía hipertrófica, infarto cardíaco.

5 22. Procedimiento para la preparación de un mamífero transgénico según la reivindicación 1, que comprende esencialmente las etapas que consisten en:

- i) preparar un animal parental transgénico portador de un alelo de la melusina inactivado,
- 10 ii) cruzar el mamífero transgénico parental con un animal no transgénico,
- iii) seleccionar los mamíferos transgénicos heterocigóticos para la mutación del gen de la melusina.

15 23. Procedimiento según la reivindicación 22, que comprende además la etapa que consiste en iv) cruzar los mamíferos transgénicos heterocigóticos para seleccionar los mamíferos transgénicos homocigóticos para la mutación del gen de la melusina.

20 24. Procedimiento para cribar compuestos que pueden interaccionar con la melusina, siendo dichos compuestos agonistas de la melusina y farmacológicamente activos en la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, en el que dicho procedimiento comprende utilizar melusina, fragmentos y/o derivados de la misma.

25 25. Utilización de melusina, fragmentos y/o derivados de la misma para la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

26. Utilización de melusina, fragmentos y/o derivados de la misma para el cribado de compuestos farmacológicamente activos para la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

27. Utilización según la reivindicación 26, en la que dicho compuesto farmacológicamente activo es un agonista de la melusina.

30 28. Utilización de un vector de ADN para la preparación de un medicamento para su utilización en la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, comprendiendo dicho vector un transgén codificante de la proteína melusina o de fragmentos de la misma y que expresa dicho transgén en el miocardio.

35 29. Utilización según la reivindicación 28, en la que dicho transgén comprende ADNc de melusina o fragmentos del mismo.

30. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, en la que dicho vector es un vector adenovírico o un vector lentivírico.

40 31. Composiciones farmacéuticas que comprenden melusina, fragmentos y/o derivados de la misma, para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

45

50

55

60

65

ES 2 316 655 T3

Figura 1

```

1      10      20      30      40      50      60
Mo MSLLCYNKGGCGQHFDPNLNLPSDCRYHPGVPIFHDALKGWCCRKRRTVDFSEFLNIKGCTVGLHCAEKL
   ||||| : ||||| : ||||| : ||||| : ||||| : |||||
hu MSLLCRNKGGCGQHFDPNLNLPSDCCHHPGVPIFHDALKGWCCRKRRTVDFSEFLNIKGCTMGPHCAEKL

70      80      90      100     110     120     130
mo PEVPPQPEGPATSS-LQEOKPLNTIPKSAETLFRERPKSEMPKLLPLLISQALGVALEQKELDQEPGA
   ||:| ||||| ||||| : ||||| ||||| : ||||| ||||| : ||||| |||||
hu PEAP-QPEGPATSSSLQEOKPLNVIKSAETLRRERPKSELPLKLLPLNISQALEMALEQKELDQEPGA

140     150     160     170     180     190     200
mo GLDNSLIWTGSSCQNPGCDAVYQGPESDATPCTYHPGAPRFHEGMKSWSCCGIQTLDGFAFLAQPGCRV
   ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
hu GLD-SLIRTGSSCQNPGCDAVYQGPESDATPCTYHPGAPRFHEGMKSWSCCGIQTLDGFAFLAQPGCRV

210     220     230     240     250     260     270
mo GRHDWAKQLPASQRHDWHQTDVVVLTVYGGIPLPAFNWVKASQTELHVHIVFDGNRVFOAQMKLWGVJ
   ||||| : ||||| ||||| : ||||| ||||| : ||||| ||||| : ||||| |||||
hu GRHDWGKQLPASQRHDWHQTDVSLVVVTVYGGIPLPAFNWVKASQTELHVHIVFDGNRVFOAQMKLWGVJ

280     290     300     310     320     330     340
mo NVEQSSVSLMPSRVEISLVKADPGSWAQLEHPDLSLAEKARAGVLLLEMDDEESESDDDLSTWTEEEDEEE
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| : ||||| ||||| : ||||| |||||
hu NVEQSSVFLMPSRVEISLVKADPGSWAQLEHPDALAKKARAGVLLLEMDDEESESDDDLSTWTEE--EEE

350
mo EEAMGE
   |||||
hu EEAMGE
   .....
```

Figura 2

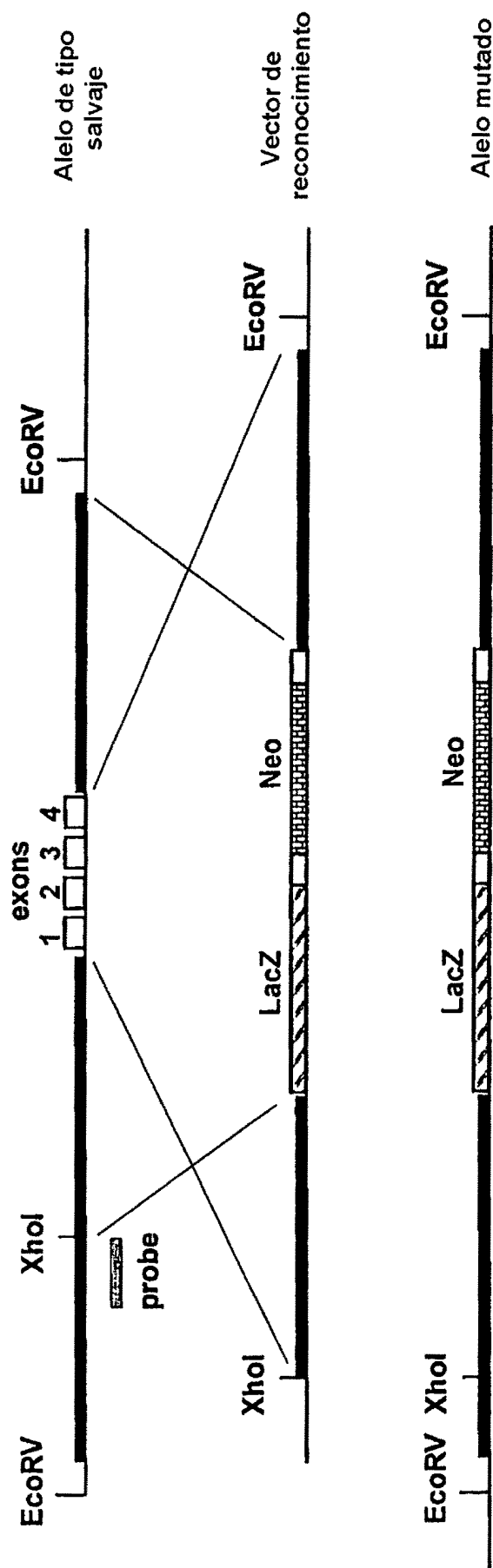


Figura 3

b

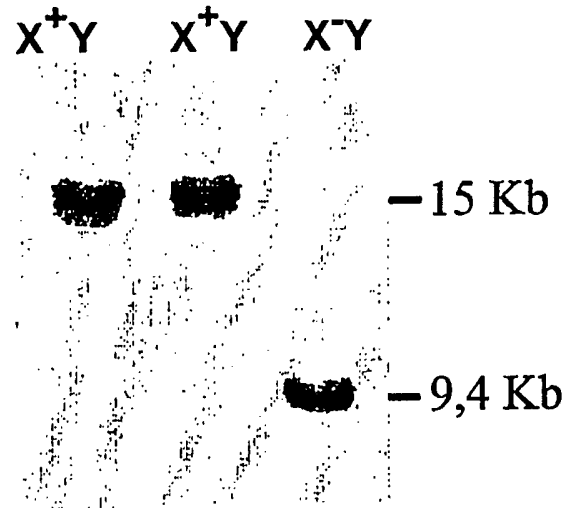


Figura 4

C

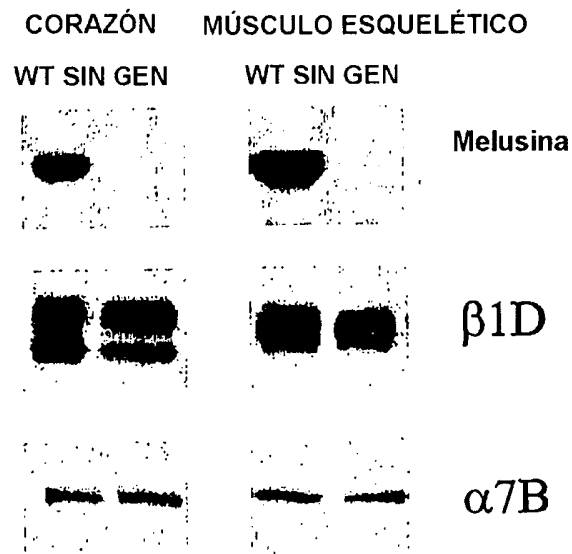


Figura 5

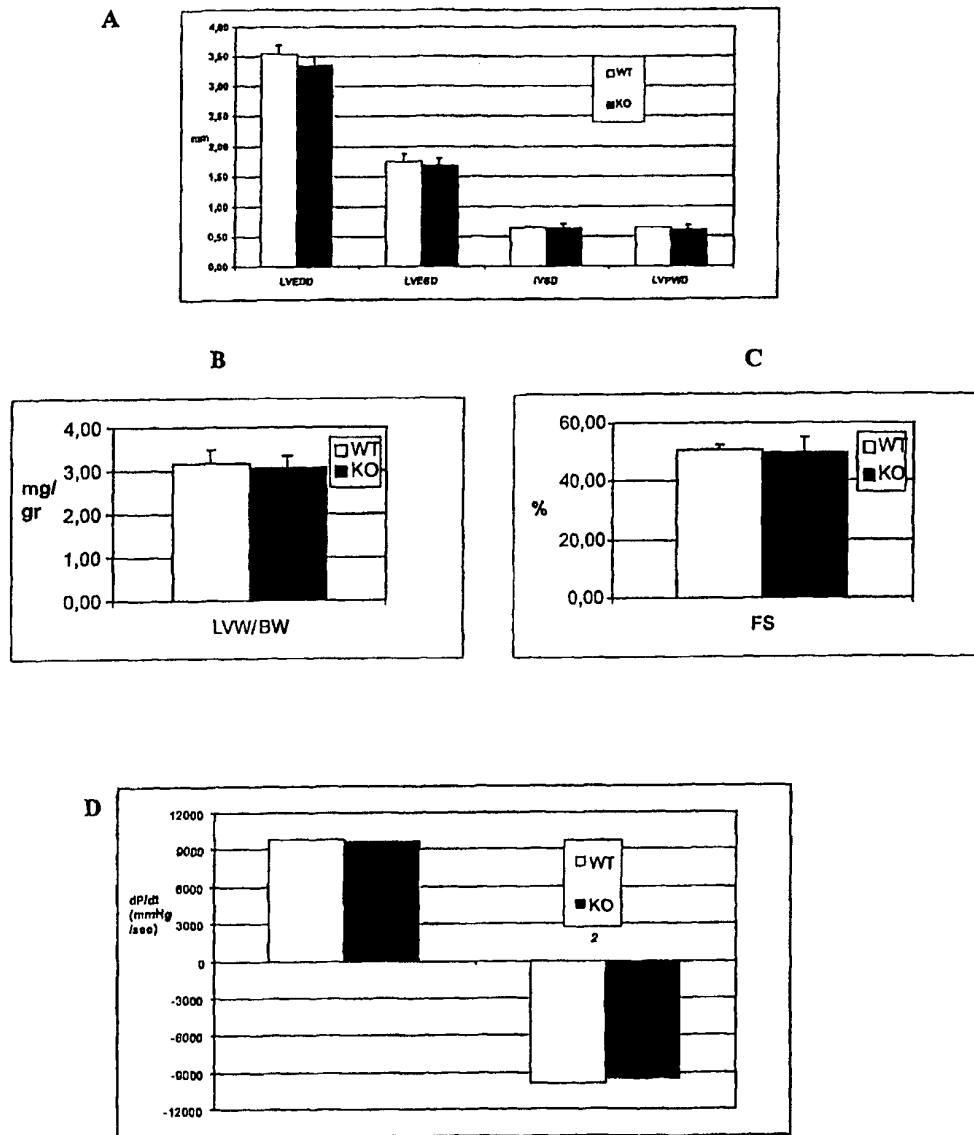


Figura 6

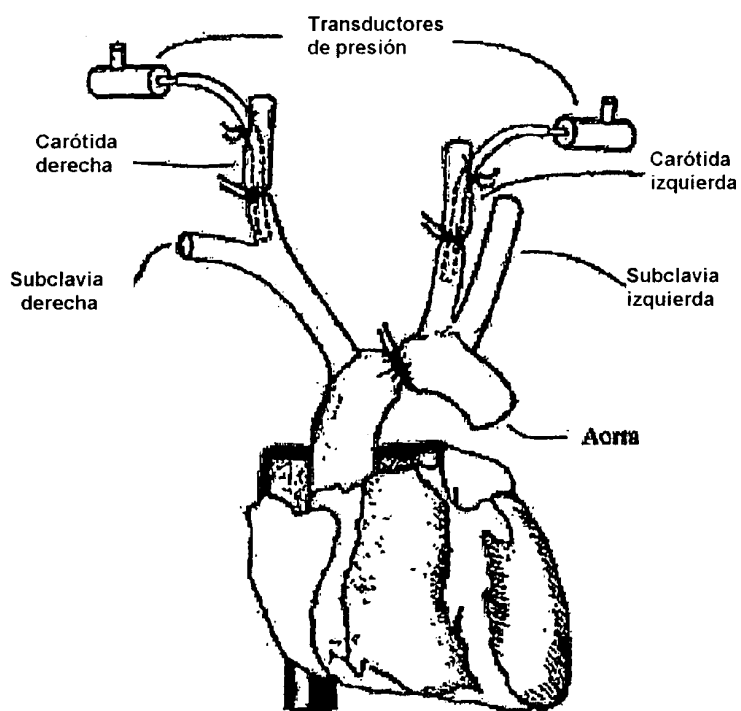


Figura 7

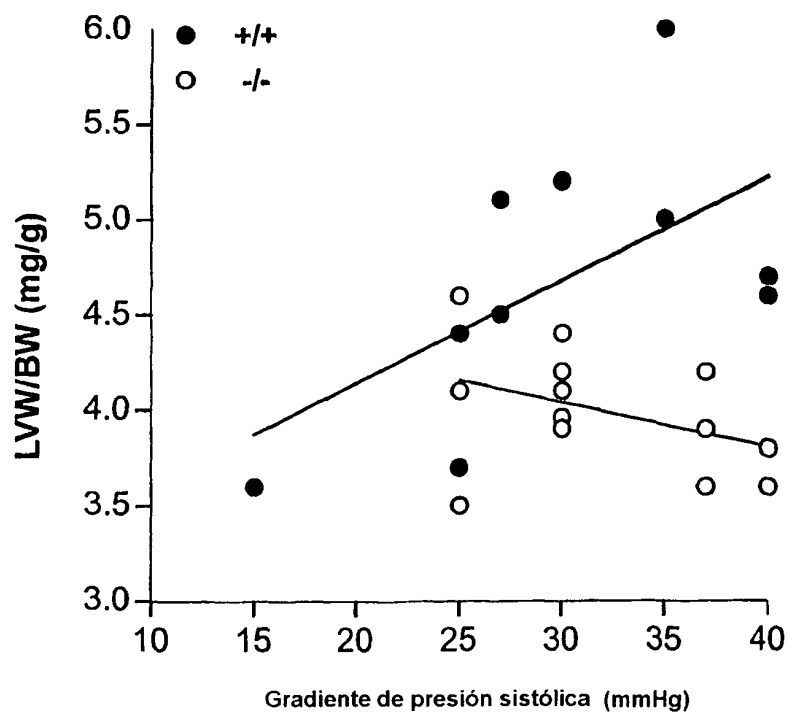


Figura 8

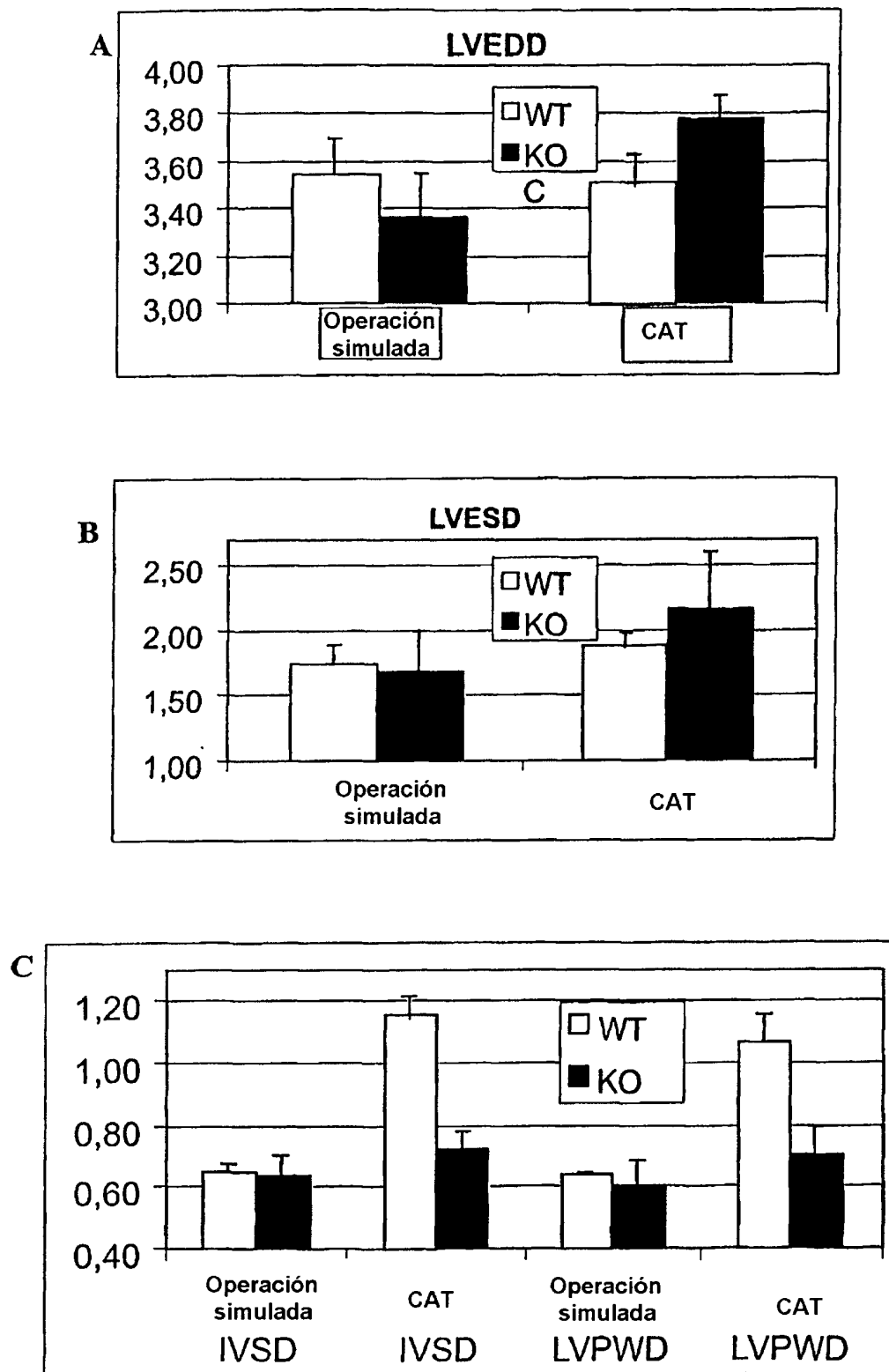


Figura 9

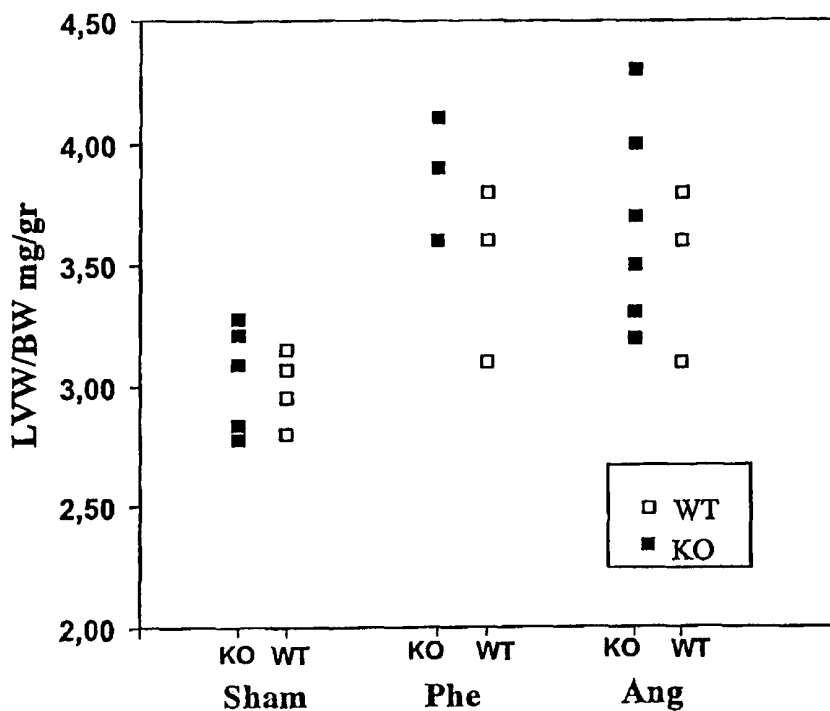


Figura 10

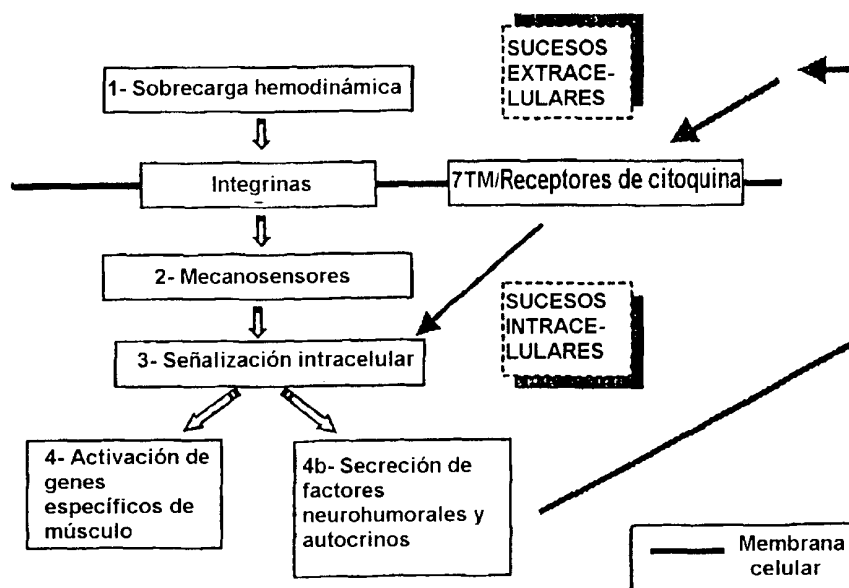


Figura 11

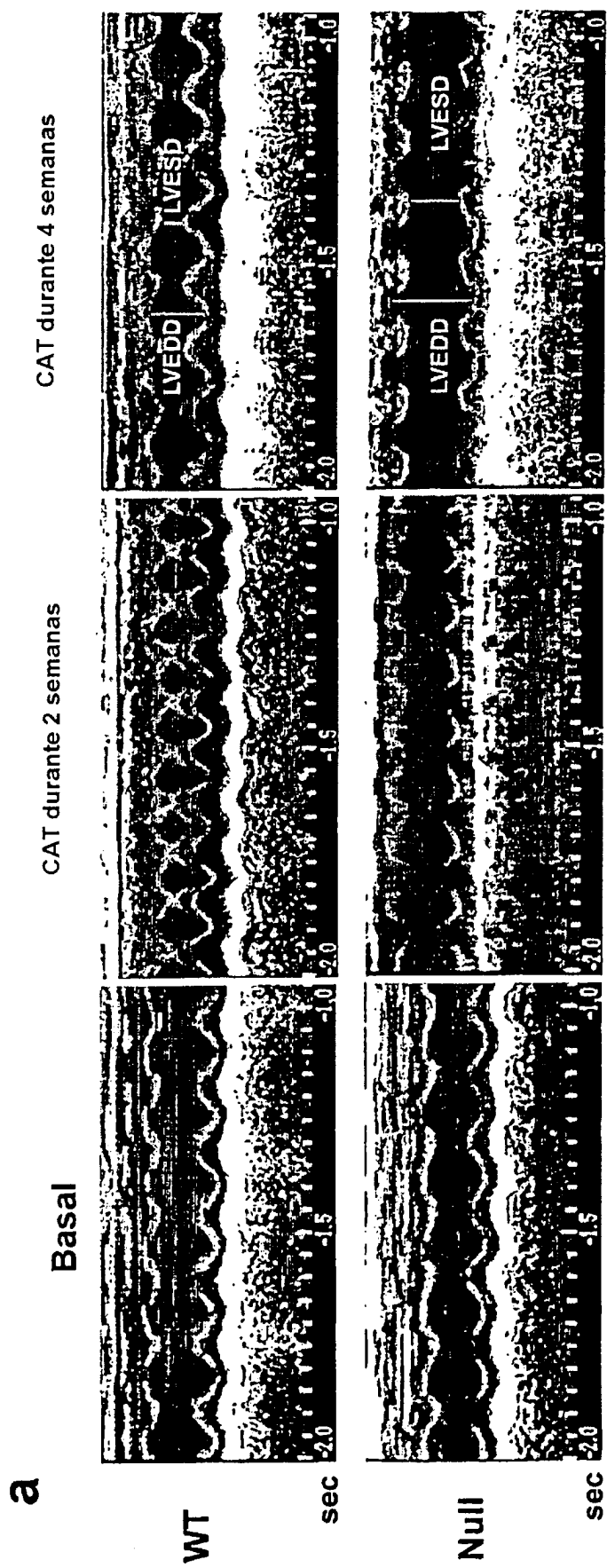


Figura 11

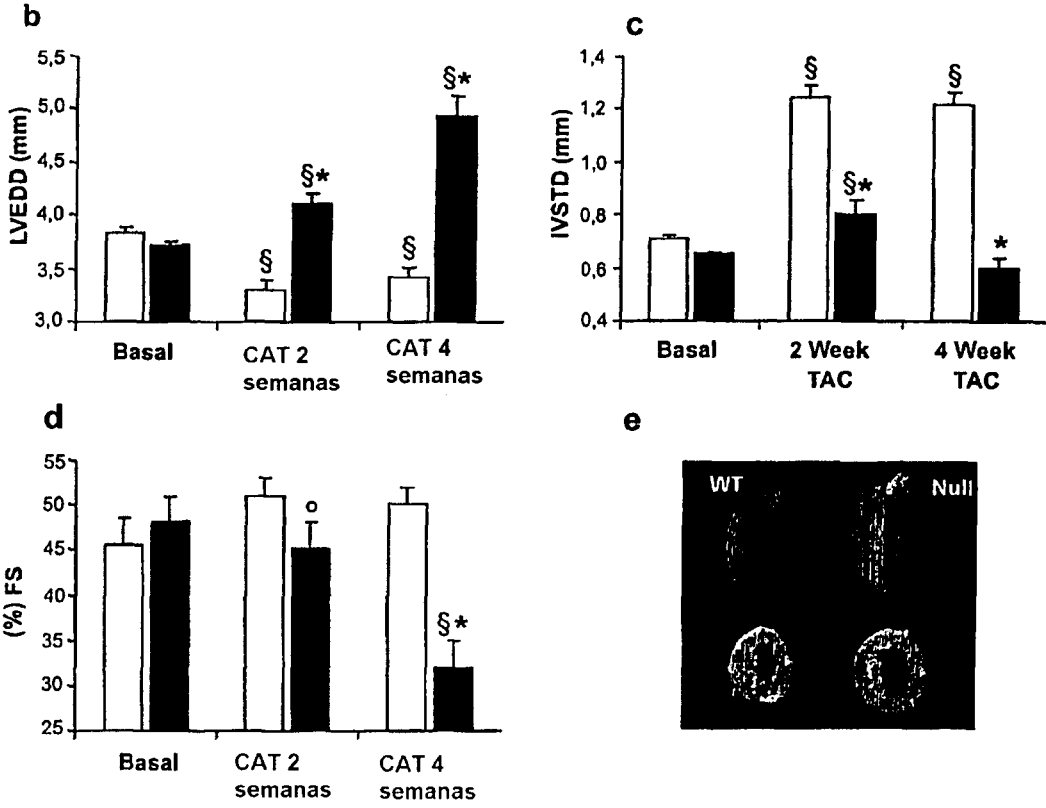


Figura 12

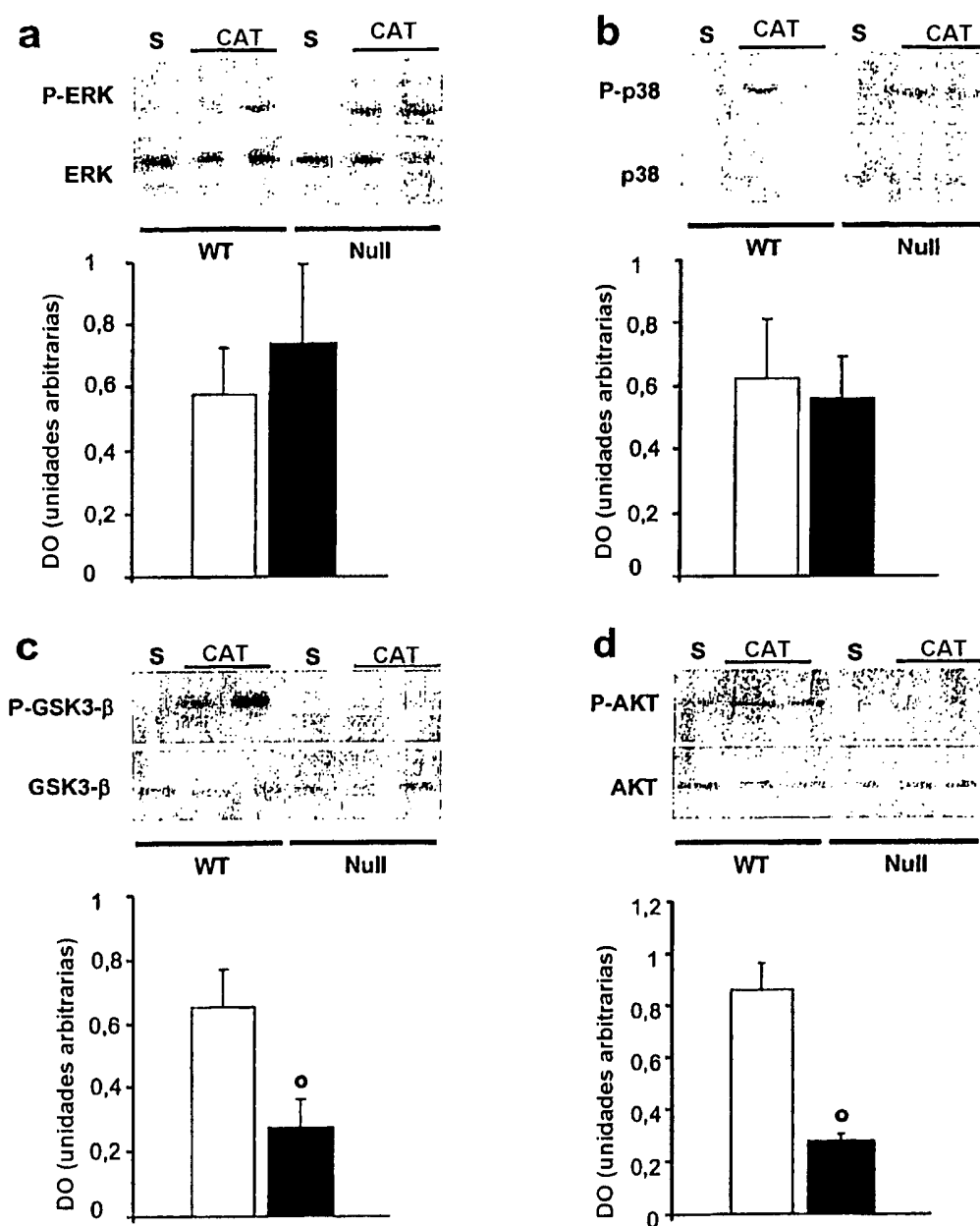


Figura 12

