

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 422**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2020 PCT/EP2020/062156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2020 WO20221906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2020 E 20721637 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 3962534**

54 Título: **Proteínas con actividad cardioprotectora**

30 Prioridad:

30.04.2019 GB 201906052

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2024

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL CENTRE FOR GENETIC
ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY (ICGEB)
(100.0%)
AREA Science Park, Padriciano 99
34149 Trieste, IT**

72 Inventor/es:

**GIACCA, MAURO;
RUOZI, GIULIA y
BORTOLOTTI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 975 422 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

Proteínas con actividad cardioprotectora

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de *Fam3c* como medicamentos, por ejemplo, en el contexto de la terapia génica o mediante su administración en forma de proteínas, tales como proteínas recombinantes o sintéticas, para tratar o reducir el riesgo de enfermedad cardíaca. En particular, la invención se refiere a la protección del corazón contra el desarrollo de insuficiencia cardíaca (IC) preservando la viabilidad de las células musculares cardíacas. Las condiciones para las que los medicamentos son eficaces incluyen, pero no se limitan a, isquemia cardíaca (infarto de miocardio y lesión por reperfusión), daño tóxico cardíaco y cardiomiopatía de origen genético.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

A pesar de los recientes avances en cirugía y terapia cardiovascular, los trastornos o enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen representando el -30% de las muertes en todo el mundo, de las cuales aproximadamente el 50% se deben a enfermedad cardíaca isquémica, con una tendencia a aumentar a más de 23 millones en 2030, según la OMS (www.who.int/cardiovascular_diseases/en/). La enfermedad arterial coronaria y el infarto de miocardio representan la principal causa (65-70% de los casos) de insuficiencia cardíaca. El pronóstico de esta condición sigue siendo malo, con una mortalidad estimada del 40% de los pacientes a los 4 años del diagnóstico (Owan, T.E., et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 355, 251-259 (2006)). Un componente esencial que subyace a la carga epidémica de la IC es la incapacidad del músculo cardíaco para regenerarse en la vida adulta. La lesión cardíaca, como consecuencia de la isquemia, hipertensión, infección, inflamación o daño tóxico, suele provocar una pérdida irreversible de cardiomiocitos (CM), con la consiguiente fibrosis y cicatrización (Laflamme, M.A. y Murry, C.E. Heart regeneration. *Nature* 473, 326-335 (2011); Xin, M., Olson, E.N. y Bassel-Duby, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 529-541 (2013)).

El desarrollo de fármacos en este campo ha sido marginal en términos de eficacia desde mediados de los años 90, y todos los fármacos disponibles son moléculas químicas pequeñas. Si se tienen en cuenta los lineamientos actuales de la ESC para la IC crónica con fracción de eyección reducida (Ponikowski, P., et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 18, 891-975 (2016)), los tres fármacos recomendados en todos los pacientes (inhibidores de la ECA, β -bloqueadores y antagonistas de los receptores mineralocorticoides/aldosterona) se introdujeron en la práctica clínica en la década de 1970 o antes (Gavras, H., Faxon, D.P., Berkoben, J., Brunner, H.R. & Ryan, T.J. Angiotensin converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. *Circulation* 58, 770-776 (1978); Swedberg, K., Hjalmarson, A., Waagstein, F. & Wallentin, I. Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade. *Lancet* 1, 1374-1376 (1979); Goldberger, E. Aldosterone and the Edema of Congestive Heart Failure. *Am J Cardiol* 15, 274 (1965)); de los fármacos sólo recomendados en pacientes seleccionados, los antagonistas de los receptores de la angiotensina II-ARB datan de mediados de los años 90 (Gottlieb, S.S., et al. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure. *Circulation* 88, 1602-1609 (1993)), mientras que el más reciente LCZ696 se basa en una combinación de un antiguo ARB (valsartán) con sacubitrilo, perteneciente a la clase de los inhibidores de neprilisina, que también se desarrollaron a finales de la década de 1980 (Jhund, P.S. y McMurray, J.J. The neprilysin pathway in heart failure: a review and guide on the use of sacubitril/valsartan. *Heart* 102, 1342-1347 (2016)). El último fármaco de las recomendaciones, la ivabradina, un inhibidor del canal I_f que controla el ritmo cardíaco, también se desarrolló a mediados de los noventa (Thollon, C., et al. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sino-atrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol* 112, 37-42 (1994)).

Los estudios sobre factores biológicos candidatos para estas condiciones indicados por estudios bioquímicos (por ejemplo, relaxina, péptidos natriuréticos, antagonistas de AVP) han fracasado todos en ensayos clínicos de fase III (Teerlink, J.R., et al. Serelaxin in addition to standard therapy in acute heart failure: rationale and design of the RELAX-AHF-2 study. *Eur J Heart Fail* 19, 800-809 (2017); O'Connor, C.M., et al. Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *N Engl J Med* 365, 32-43 (2011); Matsuzaki, M., Hori, M., Izumi, T. y Fukunami, M. Efficacy and safety of tolvaptan in heart failure patients with volume overload despite the standard treatment with conventional diuretics: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study (QUEST study). *Cardiovasc Drugs Ther* 25 Suppl 1, S33-45 (2011); Wang, G., et al. Efficacy and Safety of 1-Hour Infusion of Recombinant Human Atrial Natriuretic Peptide in Patients With Acute Decompensated Heart Failure: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *Medicine (Baltimore)* 95, e2947 (2016)).

En particular, ningún fármaco ni tratamiento de ningún tipo protege el corazón durante la isquemia aguda, ni tampoco después de un infarto de miocardio. Cuando un paciente sufre un infarto de miocardio, las células cardíacas mueren progresivamente por la falta repentina de oxígeno debida a la obstrucción de una arteria coronaria. Si se revasculariza a un paciente (intervención coronaria percutánea, angioplastia) en las primeras horas tras el infarto, se salva una parte importante del miocardio, pero aún así un gran número de células miocárdicas mueren irremediablemente. La propia angioplastia promueve un daño adicional, debido al flujo repentino de oxígeno que se produce tras restablecer la perfusión

sanguínea. Debido a la incapacidad de las células contráctiles del miocardio para experimentar una regeneración significativa en la vida adulta, la parte perdida del miocardio se repara de forma irreversible mediante la formación de una cicatriz que, a largo plazo, es un factor determinante de la insuficiencia cardíaca.

5 Por lo tanto, sigue existiendo la imperiosa necesidad de proporcionar un fármaco, en particular un fármaco biológico que imite los procesos de supervivencia endógenos, que pueda salvar las células miocárdicas inmediatamente después de un agravio que provoque la pérdida de cardiomiocitos y la consiguiente remodelación patológica del corazón. En concreto, esta necesidad es relevante para el tratamiento de varias condiciones que conducen a la IC, incluyendo el infarto de miocardio, la lesión por reperfusión tras una angioplastia, el daño tóxico cardíaco por quimioterapia contra el cáncer, la miocarditis, la miocardiopatía de origen genético y no genético.

10 Proteger a los cardiomiocitos de la muerte sería de inmensa relevancia, ya que permitiría preservar el miocardio y conservar a largo plazo la integridad y la función cardíacas, evitando que se produzca un deterioro de la función cardíaca que conduzca a la IC.

15 A pesar de la falta de terapias curativas, se han logrado notables avances en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la degeneración de los tejidos.

20 Por lo tanto, también existe la necesidad de nuevas terapias biológicas, capaces de interferir específicamente en los diferentes mecanismos de aparición y progresión de la enfermedad, ofreciendo oportunidades terapéuticas.

25 Desde la aprobación de la insulina recombinante en 1982 (Humulin®), el número de fármacos biotecnológicos ha aumentado exponencialmente en las últimas tres décadas. Si se consideran los anticuerpos monoclonales, las enzimas, los moduladores de receptores, las vacunas de subunidades y los péptidos, en la actualidad más de 350 fármacos biotecnológicos han obtenido la aprobación clínica y más de 400 han entrado en ensayos clínicos (Kinch, M.S. An overview of FDA-approved biologics medicines. Drug Discov Today 20, 393-398 (2015); Rader, R.A. (Re)defining biopharmaceutical. Nat Biotechnol 26, 743-751 (2008)). En WO 02/08284 se divulgan métodos y composiciones para estimular o inhibir la cardiovascularización, que pueden utilizarse para el tratamiento de la aterosclerosis y la hipertrofia cardíaca.

30 En la investigación genética, varios de los descubrimientos pioneros se han obtenido mediante enfoques de cribado. A partir de la década de 1980, la identificación de genes se ha visto facilitada inicialmente por la selección de bibliotecas de ADN genómico mediante hibridación, seguida de la identificación de ADNc mediante el cribado de anticuerpos en bibliotecas de fagos. A finales de los 80 y en los 90, el cribado funcional de bibliotecas en células cultivadas condujo a la identificación de varios oncogenes y receptores celulares de virus animales. La mayoría de los primeros enfoques se basaban en el uso de bibliotecas combinadas (normalmente, bibliotecas de ADNc), en las que se identificaba un factor deseado mediante una selección basada en el fenotipo. En la década de 2000, junto con los avances en robótica, el cribado de bibliotecas avanzó progresivamente hacia el análisis de cribado de alto rendimiento (HTS), basado en el uso de bibliotecas en matriz. La HTS ha ABIERTO el camino al uso no sólo de bibliotecas de ADNc, sino también de bibliotecas de péptidos, ácidos nucleicos (Eulalio, A., et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. Nature 492, 376-381 (2012)) y moléculas pequeñas. Hoy en día, los avances en la transferencia de genes permiten dar un paso más en este campo, específicamente, cribar bibliotecas directamente en animales, pasando así de la selección bioquímica o fenotípica in vitro a una verdadera selección funcional in vivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

45 La invención proporciona Fam3c, o un polinucleótido que lo codifica, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2.

50 En algunas realizaciones, el uso reduce el riesgo de insuficiencia cardíaca. En algunas realizaciones, se reduce el riesgo de insuficiencia cardíaca en un sujeto que padece una enfermedad cardíaca. En algunas realizaciones, el riesgo de insuficiencia cardíaca se reduce en un sujeto con riesgo de enfermedad cardíaca.

55 En algunas realizaciones, se reduce el riesgo de insuficiencia cardíaca en un sujeto que padece una enfermedad cardíaca. En algunas realizaciones, el riesgo de insuficiencia cardíaca se reduce en un sujeto con riesgo de enfermedad cardíaca.

60 En algunas realizaciones, se preserva la viabilidad de las células musculares cardíacas en un sujeto que padece una enfermedad cardíaca. En algunas realizaciones, se preserva la viabilidad de las células musculares cardíacas en un sujeto con riesgo de padecer una enfermedad cardíaca.

65 En algunas realizaciones, el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el Fam3c comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.

- La enfermedad cardíaca puede deberse, por ejemplo, a la pérdida de cardiomiocitos como consecuencia de un infarto de miocardio, una lesión por reperfusión tras una intervención coronaria percutánea (angioplastia coronaria), hipertensión, daño tóxico cardíaco (en particular, por quimioterapia contra el cáncer), miocarditis, cardiomiopatía de origen genético y no genético.
- 5 En algunas realizaciones, la enfermedad cardíaca está asociada a una isquemia cardíaca. En algunas realizaciones, la enfermedad cardíaca está asociada a la pérdida de cardiomiocitos.
- 10 En algunas realizaciones, la enfermedad cardíaca se selecciona entre el infarto de miocardio; las consecuencias del infarto de miocardio; la lesión por reperfusión tras una intervención coronaria percutánea (angioplastia coronaria); la miocarditis; la hipertensión; el daño tóxico cardíaco (en particular, por quimioterapia contra el cáncer); o la cardiomiopatía.
- En algunas realizaciones, la enfermedad cardíaca es una disfunción ventricular.
- 15 En algunas realizaciones, el corazón está protegido del infarto de miocardio. En algunas realizaciones, se preserva la función cardíaca tras un infarto de miocardio o una intervención coronaria percutánea (angioplastia coronaria). En algunas realizaciones, se reduce la fibrosis tras el infarto.
- 20 En algunas realizaciones, el Fam3c o polinucleótido da como resultado la protección del corazón frente al infarto de miocardio y/u otras condiciones que conducen a la pérdida de cardiomiocitos, preferiblemente preservando la función cardíaca y reduciendo la fibrosis reparativa.
- En algunas realizaciones, se previene la insuficiencia cardíaca.
- 25 En algunas realizaciones, el Fam3c se administra mediante suministro directo de proteínas. En algunas realizaciones, el polinucleótido se utiliza en terapia génica.
- En algunas realizaciones, el Fam3c es una proteína recombinante.
- 30 En algunas realizaciones, el Fam3c se obtiene a partir de un cultivo celular bacteriano, de levadura o de mamífero. En algunas realizaciones, el Fam3c se obtiene a partir de *E. coli*, *Pichia pastoris* o células de ovario de hámster chino.
- En algunas realizaciones, el Fam3c está glicosilado.
- 35 En algunas realizaciones, el Fam3c es una proteína de fusión. En algunas realizaciones, el Fam3c es una proteína de fusión Fc.
- En algunas realizaciones, el polinucleótido está en forma de un vector.
- 40 En algunas realizaciones, el polinucleótido está en forma de un vector viral.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector viral adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector adenoviral. En realizaciones preferidas, el vector es un vector viral adenoasociado (AAV).
- 45 En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV2.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV9.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV8.
- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un vector para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas, en donde el vector comprende un polinucleótido como el divulgado en la presente que codifica Fam3c, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2.
- 55 En algunas realizaciones, el vector es un vector viral.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector viral adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector adenoviral. En realizaciones preferidas, el vector es un vector viral adenoasociado (AAV).
- 60 En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV2.
- En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV9.
- 65 En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV8.

En algunas realizaciones, el Fam3c se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones, el Fam3c se administra por vía intramiocárdica. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra por vía parenteral. En algunas realizaciones, el polinucleótido se administra por vía intramiocárdica.

- 5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el Fam3c como se divulga en la presente, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca.
- 10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector como se divulga en la presente, que comprende un polinucleótido como se divulga en la presente que codifica Fam3c, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca.
- 15 En algunas realizaciones, la composición está formulada para inyección. En realizaciones preferidas, la composición está formulada para administración intracárdica o intravenosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 *Figura 1. FunSel, un procedimiento de selección in vivo para identificar nuevas terapias cardíacas para el infarto de miocardio (IM)*

A. Representación esquemática del plásmido vector pGi utilizado para la generación de la biblioteca de secretomas. **B.** Esquema del procedimiento de selección funcional (FunSel) para identificar factores cardioactivos tras un infarto de miocardio (IM). Brevemente, se utilizan grupos de 50 vectores para transducir el ventrículo izquierdo del corazón; cada vector entra en un cardiomiocito diferente. A continuación, se induce el IM, que mata a la mayoría de los cardiomiocitos, pero no a los que expresan un factor cardioprotector. Al cabo de 3 semanas, se recupera el ADN del código de barras del corazón mediante amplificación por PCR y se determina la frecuencia de los vectores mediante secuenciación de última generación (NGS). A continuación, se compara el número de lecturas de secuenciación de los vectores con o sin infarto; los factores enriquecidos son los que ejercen una actividad cardioprotectora. **C.** Resultados acumulativos obtenidos del cribado competitivo in vivo de los 1198 vectores AAV de la biblioteca, organizados en 24 AAV9-grupos, cada uno compuesto por 50 insertos de tamaño similar. La frecuencia de cada factor recuperado del corazón tras el infarto (n=9 ratones por grupo en el grupo IM) se presenta como una relación con la frecuencia del mismo factor en ausencia del tratamiento selectivo (n=6 ratones por grupo en el grupo de Control), tal y como se detectó mediante la cuantificación del código de barras NGS 3 semanas después de la inyección de los grupos de AAV. **D.** Resultados acumulativos obtenidos del cribado in vivo de los 200 factores más enriquecidos en la primera ronda de selección. De esta ronda adicional de selección se eligieron 3 factores, específicamente, Chrd1, Fam3c y Fam3b, nunca antes asociados a la función cardíaca, para una investigación individual más exhaustiva. El nivel de enriquecimiento se expresa como puntuación Z respecto a los corazones no dañados (0=sin selección) ($Z > 1,96$ o $Z < -1,96$; $p < 0,05$).

Figura 2. Sobreexpresión de Chrd1, Fam3c y Fam3b en un modelo de ratón de infarto de miocardio

A-B. Análisis ecocardiográfico para evaluar la función cardíaca a los 15, 30 y 60 días post-IM en ratones CD1 adultos transducidos con AAV2/9-Chrd1, AAV2/9-Fam3c, AAV2/9-Fam3b o un AAV2/9-control (1×10^{11} vg/animal; n=8 animales por grupo). La sobreexpresión cardíaca de los tres factores secretados mediada por vectores AAV9 preserva la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) (**A**) y reduce la dilatación cardíaca (Vd - volumen del ventrículo izquierdo en diástole) (**B**), si se compara con los animales de control AAV2/9. **C.** Dos meses después del IM, los ratones fueron sacrificados para el análisis histológico y se cuantificó el tamaño de la cicatriz tras la tinción con tricrómico de Masson (tamaño del infarto expresado en % del ventrículo izquierdo). El tratamiento cardíaco con los tres factores redujo notablemente el tamaño de la cicatriz. **D.** Medición del área transversal del CM tras la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) de secciones de corazón en ratones tratados con AAV2/9-Chrd1, AAV2/9-Fam3c, AAV2/9-Fam3b o AAV2/9-control, 60 días después del IM. El tratamiento con los tres factores contrarrestó la hipertrofia celular miocárdica tras el IM, lo que indica una mejora de la función cardíaca. Los datos se muestran como media±EEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Figura 3. Chrd1, Fam3c y Fam3b contrarrestan el patrón de expresión génica asociado al remodelado patológico del VI

A-D. Cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de expresión cardíaca de los genes α -MHC (**A**), β -MHC (**B**), SERCA2a (**C**) y RYR2 (**D**) en animales no infartados y en corazones tratados con AAV2/9-control o AAV2/9-Chrd1, AAV2/9-Fam3c o AAV2/9-Fam3b 60 días después del IM. Los valores se normalizan para GAPDH y se expresan como niveles respecto a los no tratados (n=6). Cada uno de los tres factores fue eficaz para preservar el corazón contra el remodelado patológico del VI. No tr: controles no tratados, Ctr: controles con IM. Los datos se muestran como media±EEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Figura 4. La sobreexpresión cardíaca mediada por AAV9 de Chrdl1, Fam3c y Fam3b reduce la muerte celular y promueve la autofagia beneficiosa tras un IM

A. Cuantificación de la apoptosis mediante la evaluación de los núcleos TUNEL-positivos (% del total) en la zona del borde del infarto. Los animales fueron transducidos con vectores AAV2/9 que expresaban Chrdl1, Fam3c o Fam3b después de IM. La tinción TUNEL de las células apoptóticas se realizó 2 días después en una sección congelada del corazón (n=5 por grupo). Los tres factores fueron eficaces en la protección de las células miocárdicas contra la muerte apoptótica. Como control para estos experimentos, se utilizó un vector AAV2/9 que no expresaba ninguna proteína. **B-C.** La inducción de la autofagia se evaluó analizando la lipidación de la proteína LC3 (conversión de LC3-I a LC3-II) en los ventrículos izquierdos de los corazones transducidos recolectados 2 días después del IM. Inmunotransferencia tipo Western representativa (**B**) y análisis densitométrico. Tanto AAV2/9-Chrdl1 como AAV2/9-Fam3c fueron capaces de inducir la autofagia (**C**). **D.** Para analizar el flujo autofágico in vivo, se transdujeron ratones CD1 adultos con AAV2/9-mRFP-EGFP-LC3 junto con AAV2/9s que expresaban Chrdl1, Fam3c, Fam3b o AAV2/9-Control (n=5 por grupo). Los autofagosomas (amarillo) y los autolisosomas (rojo) se cuantificaron 2 días después del IM en secciones de corazón congeladas mediante el recuento de puntos LC3+ amarillos y rojos. Tanto AAV2/9-Chrdl1 como AAV2/9-Fam3c aumentaron notablemente el flujo autofágico in vivo. Los datos son media±EEM; *P<0,05; **P<0,01.

Figura 5. Efecto terapéutico de Chrdl1, Fam3c y Fam3b circulantes tras un infarto de miocardio

A. Esquema de la estrategia de valoración de la eficacia terapéutica de los factores liberados en la circulación desde el hígado, para imitar la administración sistémica de proteínas recombinantes. Los vectores AAV2/8 que expresan Chrdl1, Fam3c y Fam3b bajo el control del promotor de la α -1 antitripsina humana (hAAT) específica de los hepatocitos se inyectaron en el hígado mediante inoculación intraparenquimatosa directa (n=7; 3 puntos de inyección por hígado para un total de 5×10^{11} vg/animal); 7 días después los animales se sometieron a un IM por ligadura de la arteria coronaria. **B.** A los 7 días del suministro intraparenquimatoso de AAV2/8, se detectaron las proteínas Chrdl1, Fam3c y Fam3b circulantes en los sueros de los animales mediante inmunotransferencia tipo Western. **C-D.** A los 15, 30 y 60 días después del IM, la circulación de Chrdl1, Fam3c y Fam3b preservó la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FE) (**C**), y redujo la dilatación cardíaca (medida como volumen diastólico, μ l) (**D**). **E.** El tamaño de la cicatriz se midió como % del VI mediante la tinción de tricrómico de Masson. Los tres factores redujeron el tamaño del infarto. Los datos se muestran como media±EEM; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Figura 6. Chrdl1, Fam3c y Fam3b recombinantes protegen a los cardiomiocitos contra la muerte celular inducida por doxorubicina

Los cardiomiocitos de rata se trataron con las dosis indicadas de doxorubicina y después se les administraron 100 ng/ml de los factores indicados. Después de 20 horas, se midió la apoptosis mediante la valoración de los niveles de activación de la caspasa 3/7. Las tres proteínas recombinantes protegieron las células. Los datos se muestran como media±EEM; *P<0,05; **P<0,01.

Figura 7. Efecto de Chrdl1 en la prevención de la activación fibroblástica y la fibrosis cardíaca tras el daño miocárdico

A. Esquema experimental para evaluar los efectos de Chrdl1 en la conversión inducida por Tgf β 1 de fibroblastos adultos primarios en miofibroblastos pro-fibróticos. **B.** Los fibroblastos adultos se trataron con dosis crecientes de Tgf β 1 (1-10-50 ng/ml) en presencia o ausencia de Chrdl1 recombinante (100 ng/ml). Tres días después de los tratamientos, se evaluaron los niveles de Col1a1 y α -Sma mediante inmunofluorescencia. **C.** La modulación de Chrdl1 sobre la respuesta fibrótica inducida por el IM se confirmó in vivo en ratones transgénicos Col1 α 1(I)-EGFP. Los corazones que sobreexpresaban AAV2/9-Chrdl1 mostraron una reducción de la cicatriz fibrótica y de los niveles de activación de Col1a1 y α -Sma. **D.** Cuantificación de los niveles transcripcionales de Col1a1, α -Sma, Tgf β 1 y MMP9 mediante qPCR en tejido cardíaco de ratones CD1 3 días después del IM. En conjunto, estos resultados indican que Chrdl1 ejerce un efecto antifibrótico después del IM. Los datos se muestran como media±EEM; *P<0,05; **P<0,01.

Figura 8. La expresión de Chrdl1, Fam3c y Fam3b protege a los ratones de la toxicidad y la muerte cardíacas inducidas por doxorubicina.

Los ratones CD1 (n=8) fueron inyectados intramiocárdicamente con vectores AAV9 que expresaban las tres proteínas (Chrdl1, Fam3c o Fam3b), seguidos de un tratamiento con doxorubicina durante 80 días mediante bombas de infusión. **A.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra una fuerte actividad protectora de Chrdl1, Fam3c y Fam3b frente a la muerte inducida por fármacos. **B.** y **C.** Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) y diámetro interno telesistólico, FEVI y DIVI respectivamente, en diferentes momentos del tratamiento. Los datos muestran un efecto cardioprotector notable del tratamiento con cualquiera de los tres factores. Los datos se muestran como media±EEM; *P<0,05; **P<0,01.

DESCRIPCIÓN DE DETALLADA DE LA INVENCION

Los términos "comprender", "comprende" y "comprendiendo", como se utilizan en la presente, son sinónimos de "incluir" o "incluye"; o "contener" o "contiene", y son inclusivos o abiertos, y no excluyen miembros, elementos o pasos adicionales no repetidos. Los términos "comprender", "comprende" y "comprendiendo" también incluyen el término "consiste en".

Proteínas

Chrd11 es un inhibidor extracelular de la proteína morfogenética ósea (BMP), que se expresa principalmente en tipos de células derivadas del mesénquima, pericitos en la retina y en células neurales (Sakuta, H., et al. Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science* 293, 111-115 (2001); Nakayama, N., et al. A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol* 232, 372-387 (2001); Chandra, A., et al. Neurogenesis-1 differentially inhibits the osteoblastic differentiation by bone morphogenetic proteins in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 786-791 (2006); Coffinier, C., Tran, U., Larrain, J. y De Robertis, E.M. Neuralin-1 is a novel Chordin-related molecule expressed in the mouse neural plate. *Mech Dev* 100, 119-122 (2001)).

El nombre Chrd11 deriva de su similitud de secuencia con Cordina, otro inhibidor de BMP identificado como factor dorsalizador del embrión de *Xenopus*. Chrd11 tiene un patrón de expresión espaciotemporal distinto de la Cordina, pero ambos genes contienen unidades ricas en cisteína diseñadas como repeticiones de procolágeno (CR), que también están presentes en diversas proteínas de la matriz extracelular. CR1 y CR3 son responsables de la unión Chrd11-BMPs. La proteína se une con gran afinidad a BMP4 y con menor afinidad a BMP5, BMP6 y BMP7.

Fam3b y **Fam3c** son dos miembros de la familia con similitud de secuencia 3, FAM3 (Zhu, Y., et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family. *Genomics* 80, 144-150 (2002)). **Fam3b**, también conocido como PANDER, está altamente expresado en el páncreas, en donde participa en la regulación de la homeostasis de la glucosa y la función de las células β (Robert-Cooperman, C.E., Wilson, C.G. y Burkhardt, B.R. PANDER KO mice on high-fat diet are glucose intolerant yet resistant to fasting hyperglycemia and hyperinsulinemia. *FEBS Lett* 585, 1345-1349 (2011); Robert-Cooperman, C.E., et al. Targeted disruption of pancreatic-derived factor (PANDER, FAM3B) impairs pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 59, 2209-2218 (2010); Yang, J., et al. Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 3217-3228 (2005)).

Fam3c, también conocido como ILEI, se expresa de forma ubicua. Induce la proliferación de las células del oído interno (Pilipenko, V.V., Reece, A., Choo, D.I. y Greinwald, J.H., Jr. Genomic organization and expression analysis of the murine **Fam3c** gene. *Gene* 335, 159-168 (2004)), modula la diferenciación osteogénica (Bendre, A., Buki, K.G. y Maatta, J.A. **Fam3c** modula la diferenciación osteogénica mediante la regulación a la baja de Runx2. *Differentiation* 93, 50-57 (2017)) y tiene un papel en la transición epitelial-mesenchimal (EMT) durante la progresión del cáncer (Waerner, T., et al. ILEI: a cytokine essential for EMT, tumor formation, and late events in metastasis in epithelial cells. *Cancer Cell* 10, 227-239 (2006); Lahsnig, C., et al. ILEI requires oncogenic Ras for EMT of hepatocytes and liver carcinoma progression. *Oncogene* 28, 638-650 (2009)). La restauración de sus niveles en el hígado de ratones diabéticos obesos mejora la resistencia a la insulina y reduce el hígado graso (Chen, Z., et al. Hepatic Activation of the FAM3C-HSF1-CaM Pathway Attenuates Hyperglycemia of Obese Diabetic Mice. *Diabetes* 66, 1185-1197 (2017); Chen, Z., et al. FAM3C activates HSF1 to suppress hepatic gluconeogenesis and attenuate hyperglycemia of type 1 diabetic mice. *Oncotarget* 8, 106038-106049 (2017)).

Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de Chrd11 es SEQ ID NO: 1 (humano) - ID UniProt: Q9BU40-1.

```
MRKKWKMGGMKYIFSLFLFLLEGGKTEQVKHSETYCMFQDKKYRVGERWHPYLEPYGLVYCVNCICSENGN
VLC SRVRCPNVHCLSPVHI PHLCCPRCPDLSPPVNNKVTSKSCEYNGTTYQHGLFVAEGLFQNRQPNQCTQ
CSCSEGNVYCGLKTCPKLTCAFPVSVDPDSCCRVCRGDGELSWEHSDGDI FRQPANREARHSYHRSHYDPPPS
RQAGGLSRFPGARSHRGALMDSQQASGTIVQIVINNKHKHGQVCVSNKTYSHGESWHPNLRAFGIVECVLC
TCNVTKQECKKIHCNRYPCYPQKIDGKCKVCPGKKAKELPGQSF DNKGYFCGEETMPVYESVFMEDGET
TRKIALETERPPQVEVHVWTRKGIHQHFHIEKISKRMFEELPHFKLVTRTTL SQWKIFTEGEAQISQMCS
RVCRTLEDLVKVLVYLERSEKGHG
```

(SEQ ID NO: 1)

Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de **Fam3c** es SEQ ID NO: 2 (humano) - ID UniProt: Q92520-1.

```
MRVAGAAKLVA VAVVAVLLTFYVISQVFEIKMDASLGNLFARSALDTAARSTKPPRYKCGISKACPEKHFAPK
MASGAANVVGPKICLEDNVLMSGVKNNVGRGINVALANGKTGEVLDTKYFDMWGGDVAFPIEFLKAIQDGTI
VLMGTYYDDGATKLNDEARLLIADLGST'SITNLGFRDNVWVFCGGKGIKTKSPFEQHIKNNKDTNKYEGWPEV
EMEGCIPQKQD
```

(SEQ ID NO: 2)

Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de **Fam3b** es SEQ ID NO: 3 (humano) - ID UniProt: P58499-1.

MRPLAGLLKVVVVFASLCAWYSGYLLAELIPDAPLSSAAYSIRSIGERPVLKAPVPKRQKCDHWTPCPSD
 TYAYRLLSGGGRSKYAKICFDNLLMGEQLGNVARGINIAIVNYVTGNVTATRCFDMYEGDNSGPMTKFIQS
 AAPKSLLEFMVTYDDGSTRLNNDAKNAIEALGSKELRNMKFRSSWVFIAAKGLELPEIQREKINHSDAKNNR
 YSGWPAEIQIEGCI PKERS

(SEQ ID NO: 3)

Un ejemplo de secuencia de nucleótidos que codifica *Chrd1* (humano) es SEQ ID NO: 4 (Chrd1) - Seq ID: NM_001143981.1 (secuencia codificante).

5

ATGAGAAAAAAGTGAAAAATGGGAGGCATGAAATACATCTTTTCGTTGTTGTTCTTTCTTTTGC TAGAAGGA
 GGCAAAACAGAGCAAGTAAAACATTGAGAGACATATTGCATGTTTCAAGACAAGAAGTACAGAGTGGGTGAG
 AGATGGCATCCTTACCTGGAACCTTATGGGTTGGTTTACTGCGTGAAGTGCATCTGCTCAGAGAATGGGAAT
 GTGCTTTGCAGCCGAGTGCAGATGTCCAAATGTTTCATTGCCTTTCTCCTGTGCATATTCCTCATCTGTGCTGC
 CCTCGCTGCCAGAAAGACTCCTTACCCCAAGTGAACAATAAGGTGACCAGCAAGTCTTGGCAGTACAATGGG
 ACAACTTACCAACATGGAGAGCTGTTCTGAGCTGAAGGGCTTTT CAGAATCGGCAACCCAATCAATGCACC
 CAGTGCAGCTGTTGCGAGGGAAACGTGATTGTGGTCTCAAGACTTGCCCCAAATTAACCTGTGCCTGCCA
 GTCTCTGTTCCAGATTCTGCTGCCGGGTATGCAGAGGAGATGGAGAAGTGCATGGGAACATTCTGATGGT
 GATATCTTCCGGCAACCTGCCAACAGAGAAGCAAGACATTCTTACCACCGCTCTCACTATGATCCTCCACCA
 AGCCGACAGGCTGGAGGTCTGTCCCGCTTTCTGGGGCCAGAAAGTCAACGGGGAGCTCTTATGGATTCCAG
 CAAGCATCAGGAACCATTTGTCAAATTTGCATCAATAACAAACAAGCATGGACAAGTGTGTGTTTCCAAT
 GGAAGACCTATTCTCATGGCAGTCTGGCACCCAAACCTCGGGGCATTTGGCATTGTGGAGTGTGTGCTA
 TGTACTTGTAAATGTCAACCAAGCAAGAGTGTAAAGAAATCCACTGCCCAATCGATAACCCCTGCAAGTATCCT
 CAAAAATAGACGGAAATGCTGCAAGGTGTGTCCAGGTAAGAAAGCAAAAAGAAAGAACTTCCAGGCCAAAGC
 TTTGACAATAAAGGCTACTTCTGCGGGGAAAGAAAGCATGCCTGTGTATGAGTCTGTATTATGGAGGATGGG
 GAGACAACCAGAAAAATAGCACTGGAGACTGAGAGACCACCTCAGGTAGAGGTCCACGTTTGGACTATTGCA
 AAGGGCATTCTCCAGCACTTCCATATTGAGAAGATCTCCAAGAGGATGTTT GAGGAGCTTCTCACTTCAAG
 CTGGTGACCAGAACACCCTGAGCCAGTGAAGATCTTCAACGAAGGAGAAGCTCAGATCAGCCAGATGTGT
 TCAAGTCTGTATGCAGAACAGAGCTTGAAGATTTAGTCAAGGTTTGTACCTGGAGAGATCTGAAAAGGGC
 CACTGTTAG

(SEQ ID NO: 4)

Un ejemplo de secuencia de nucleótidos que codifica *Fam3c* es SEQ ID NO: 5 (Fam3c) - Seq ID: NM_014888.3 (secuencia codificante).

10

ATGAGGGTAGCAGGTGCTGCAAAGTTGGTGGTAGCTGTGGCAGTGTTTTTACTGACATTTTATGTTATTTCT
 CAAGTATTTGAAATAAAAAATGGATGCAAGTTTAGGAAATCTATTTGCAAGATCAGCATTGGACACAGCTGCA
 CGTTCTACAAAGCCTCCAGATATAAGTGTGGGATCTCAAAAGCTTGCCCTGAGAAGCATTGTTGCTTTTAAA
 ATGGCAAGTGGAGCAGCCACCGTGGTGGGACCCAAAATCTGCCTGGAAGATAATGTTTAAATGAGTGGTGT
 AAGAATAATGTTGGAAGAGGGATCAATGTTGCCCTTGGCAAATGGAAAACAGGAGAAGTATTAGACACTAAA
 TATTTTACATGTGGGGAGGAGATGTGGCACCATTATTGAGTTTCTGAAGGCCATACAAGATGGAACAATA
 GTTTTAAATGGGAACATACGATGATGGAGCAACCAACTCAATGATGAGGACCGGGCGCTCATTGCTGATTTG
 GGGAGCACACTTATTACTAATCTTGGTTTTAGAGACAACACTGGGTCTTCTGTGGTGGGAAGGGCATTAAGACA
 AAAAGCCTTTTGAACAGCACATAAAGAACAATAAGGATACAAACAATATGAAGGATGGCCTGAAGTTGTA
 GAAATGGAAGGATGCATCCCCAGAAGCAAGACTAA

(SEQ ID NO: 5)

Un ejemplo de secuencia de nucleótidos que codifica *Fam3b* es SEQ ID NO: 6 (Fam3b) - Seq ID: NM_058186.3 (secuencia codificante).

15

ATGCGCCATTGGCTGGTGGCCTGCTCAAGGTGGTGTTCGTTGGTCTTTCGCTCCTTGTGTGCCTGGTATTTCG
 GGTACCTGCTCGCAGAGCTCATTCCAGATGCACCCCTGTCCAGTGTGCTGCCTATAGCATCCGCAGCATCGGG
 GAGAGGCCTGTCTCAAAGCTCCAGTCCCCAAAAGGCAAAAATGTGACCACTGGACTCCCTGCCATCTGAC
 ACCTATGCCTACAGGTTACTCAGCGGAGGTGGCAGAAGCAAGTACGCCAAAATCTGCTTTGAGGATAACCTA
 CTATGGGAGAACAGCTGGGAAATGTTGCCAGAGGAATAAACATTGCCATTGTCAACTATGTAACCTGGGAAT
 GTGACAGCAACACGATGTTTGTATATGATGAAGGTGATAAAGTCTGGACCGATGACAAAGTTTATTCAGAGT
 GCTGCTCCAAAATCCCTGCTCTTCATGGTGCCTATGACGACGGAGCACAAGACTGAATAACGATGCCAAG
 AATGCCATAGAAGCACTTGGAAAGTAAAGAAATCAGGAACATGAAATTCAGTCTAGCTGGGTATTTATTGCA
 GCAAAAGGCTTGGAACTCCCTCCGAAATTCAGAGAGAAAGATCAACCCTCTGATGCTAAGAACAACAGA
 TATTCTGGCTGGCCTGCAGAGATCCAGATAGAAGGCTGCATACCCAAAGAACGAAGCTGA

(SEQ ID NO: 6)

Cualquier otro polinucleótido que codifique el Fam3c anterior está comprendido en la presente invención.

20

La actividad de las proteínas de la divulgación y de sus fragmentos puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica. Por ejemplo, los ensayos in vitro adecuados incluyen: (a) protección frente a la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno o doxorrubicina, por ejemplo, mediante ensayos TUNEL o ensayos de activación de caspasas; (b) inducción de la autofagia, por ejemplo, ensayando la formación de vesículas de autofagia LC3-positivas; y/o (c) para

Chrdl1: reducción de las actividades de BMP y TGF-beta, por ejemplo, la activación de la expresión de α SMA en fibroblastos cardíacos tras el tratamiento con TGF-beta recombinante, o la reducción de la fosforilación de SMAD 1/5/8 tras el tratamiento con BMP4 recombinante.

5 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente un papel hasta ahora desconocido de Chrdl1, Fam3c y Fam3b en la promoción de la supervivencia de los cardiomiocitos, lo que indica su actividad terapéutica para contrarrestar la isquemia y otras formas de daño cardíaco, y prevenir así la insuficiencia cardíaca.

10 Según la presente divulgación, Chrdl1, Fam3c y Fam3b aumentan eficazmente la función cardíaca y reducen el tamaño del infarto tras la inyección intracardíaca de vectores virales que expresan estos factores. Se divulga el uso terapéutico de Chrdl1 y Fam3b, pero no se reivindica.

15 Aunque los presentes inventores no desean ceñirse a una teoría o mecanismo de acción, se cree que las proteínas Chrdl1, Fam3c y Fam3b ejercen efectos terapéuticos en el corazón al prevenir la apoptosis de los cardiomiocitos e inducir la autofagia de los cardiomiocitos. En conjunto, esto se traduce en la prevención de la función cardíaca, reducción de la fibrosis y remodelado patológico del ventrículo izquierdo, e inducción de un patrón de expresión beneficioso de los genes asociados al remodelado cardíaco patológico, tal como el aumento de Serca2a (ATPasa de calcio 2a del retículo sarcoplásmico/endoplásmico) y RYR2 (receptor 2 de la rianodina), y la conservación de la relación α -miosina-cadena pesada (α MHC) frente a β -miosina-cadena pesada (β MHC).

20 Un mecanismo a través del cual Chrdl1, Fam3c y Fam3b ejercen efectos cardioprotectores en el corazón isquémico es la preservación de la viabilidad de los miocitos mediante la prevención de la muerte celular apoptótica, por ejemplo, tras la inyección intracardíaca de vectores virales que expresan los factores.

25 Chrdl1 y Fam3c pueden promover la autofagia beneficiosa para contrarrestar la muerte celular de los cardiomiocitos tras un infarto de miocardio.

30 Chrdl1, Fam3c y Fam3b pueden preservar la viabilidad de los miocitos al prevenir la muerte celular apoptótica tras el tratamiento con doxorubicina.

Un efecto positivo adicional de Chrdl1 es prevenir la activación de los fibroblastos cardíacos y la fibrosis cardíaca.

35 El corazón es un órgano incapaz de una regeneración significativa durante la vida adulta, por lo que la integridad de los miocitos cardíacos se mantiene gracias a la autofagia, un mecanismo que permite la renovación de componentes intracelulares específicos, incluyendo las mitocondrias. Este mecanismo es de especial relevancia tras un infarto de miocardio, ya que la isquemia súbita, o la isquemia seguida de reperfusión como tras una revascularización percutánea, provoca daños importantes en las mitocondrias, que empiezan a utilizar el oxígeno para generar especies químicas dañinas (Yellon, DM., Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. N. Engl. J. Med. 357, 1121-1135 (2007); Gustafsson AB., Gottlieb RA. Circ. Res. 104(2), 150-158 (2009)). Por lo tanto, la autofagia y la apoptosis están muy interconectadas, ya que el primer mecanismo se activa tras los agravios para eliminar los orgánulos celulares dañados como una respuesta protectora para evitar la muerte celular apoptótica.

45 Por lo tanto, los *Chrdl1*, *Fam3c* y *Fam3b* pueden utilizarse para la cardioprotección, reduciendo así el riesgo de enfermedad cardíaca o insuficiencia cardíaca. La cardioprotección puede deberse a la preservación de la viabilidad de las células musculares cardíacas.

Suministro de proteínas

50 Como alternativa al suministro de polinucleótidos, el Fam3c puede suministrarse mediante el suministro directo de proteínas.

Las proteínas pueden administrarse directamente a un sujeto. En algunas realizaciones, el Fam3c es una proteína de fusión, preferiblemente una fusión con una segunda proteína capaz de aumentar la vida útil de el Fam3c en el sujeto. Por ejemplo, el Fam3c puede ser una proteína de fusión de dominio Fc de inmunoglobulina.

55 El suministro de proteínas puede realizarse mediante vectores (Cai, Y. et al. (2014) Elife 3: e01911; Maetzig, T. et al. (2012) Curr. Gene Ther. 12: 389-409). El suministro de vectores implica la modificación de partículas virales (por ejemplo, partículas lentivirales) para que incluyan las proteínas que se van a suministrar a una célula. Por consiguiente, cuando las partículas virales modificadas entran en una célula como parte de su ciclo vital natural, las proteínas comprendidas en las partículas son transportadas al interior de la célula.

60 El suministro de proteínas (Gaj, T. et al. (2012) Nat. Methods 9: 805-7) también puede conseguirse, por ejemplo, utilizando un vehículo (por ejemplo, liposomas).

65

Polinucleótido

Los polinucleótidos pueden comprender ADN o ARN, preferiblemente ADN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Un experto en la técnica entenderá que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que los expertos en la técnica pueden, utilizando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedero particular en el que se vayan a expresar los polipéptidos de la invención.

Las secuencias de nucleótidos de la invención divulgadas en la presente pueden comprender o carecer de codones de parada en su extremo 3', por ejemplo, en función de su posición en un vector bicistrónico. Por lo tanto, la presente divulgación abarca las SEQ ID NO divulgadas en la presente con los codones de parada presentes o ausentes.

Los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para potenciar la actividad in vivo o la vida útil de los polinucleótidos de la invención.

Los polinucleótidos, tales como los polinucleótidos de ADN, pueden producirse de forma recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas estándar.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente utilizando medios recombinantes, por ejemplo, mediante técnicas de clonación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esto implicará fabricar un par de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanqueen la secuencia objetivo que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que provoquen la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo, purificando la mezcla de reacción con un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan sitios adecuados de reconocimiento de enzimas de restricción, de modo que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector adecuado.

Vectores

Un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro.

En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica Fam3c, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2. En realizaciones preferidas, el vector es un vector viral. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral adenoasociado (AAV), un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector adenoviral, preferiblemente un vector AAV.

Vectores virales adenoasociados (AAV)

En un aspecto, la invención proporciona un vector AAV que comprende un polinucleótido que codifica Fam3c, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedades cardíacas, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el vector AAV está en forma de una partícula vectorial AAV.

En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende un genoma AAV2. En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende un genoma AAV9. En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende un genoma AAV8.

En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende proteínas de la cápside AAV9. En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende proteínas de la cápside AAV8.

En algunas realizaciones, la partícula del vector AAV comprende un genoma AAV2 y proteínas de la cápside AAV9 (AAV2/9). En otras realizaciones, la partícula del vector AAV comprende un genoma AAV2 y proteínas de la cápside AAV8 (AAV2/8).

Los métodos de preparación y modificación de vectores virales y partículas de vectores virales, tales como los derivados de AAV, son bien conocidos en la técnica.

El vector AAV puede comprender un genoma AAV, o un fragmento o derivado del mismo.

Se sabe que los AAV son capaces de empaquetar genomas de hasta 5,2 kb de tamaño (Dong, J.-Y. et al. (1996) Human Gene Therapy 7: 2101-2112).

Un genoma AAV es una secuencia de polinucleótidos, que puede codificar funciones necesarias para la producción de una partícula AAV. Estas funciones incluyen las que operan en el ciclo de replicación y empaquetamiento del AAV en una célula hospedera, incluyendo la encapsidación del genoma del AAV en una partícula AAV. Los AAV de origen natural son

deficientes en replicación y dependen de la provisión de funciones auxiliares en trans para completar un ciclo de replicación y empaquetamiento. En consecuencia, el genoma AAV del vector AAV es típicamente deficiente en replicación.

5 El genoma AAV puede estar en forma monocatenaria, en sentido positivo o negativo, o alternativamente en forma bicatenaria. El uso de una forma bicatenaria permite eludir el paso de replicación del ADN en la célula objetivo, por lo que puede acelerar la expresión del transgén.

10 El genoma AAV puede proceder de cualquier serotipo, aislado o clado de AAV de origen natural. Por lo tanto, el genoma AAV puede ser el genoma completo de un AAV de origen natural. Como es sabido por el experto en la técnica, los AAV de origen natural pueden clasificarse según diversos sistemas biológicos.

15 Comúnmente, se hace referencia a los AAV en términos de su serotipo. Un serotipo corresponde a una subespecie variante de AAV que, debido a su perfil de expresión de antígenos de superficie de la cápside, tiene una reactividad distintiva que puede utilizarse para distinguirla de otras subespecies variantes. Típicamente, un virus que tiene un serotipo particular de AAV no reacciona eficazmente de forma cruzada con anticuerpos neutralizantes específicos para cualquier otro serotipo de AAV.

20 Los serotipos de AAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAV11, y también serotipos recombinantes, tales como Rec2 y Rec3, identificados recientemente a partir de cerebro de primate. Cualquiera de estos serotipos AAV puede utilizarse en la invención.

En algunas realizaciones, la partícula vectorial AAV es una partícula del vector AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rec2 o Rec3 AAV.

25 En algunas realizaciones, el AAV es un serotipo AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8 o AAV9.

En algunas realizaciones, el AAV es un serotipo AAV9 o AAV8.

30 En algunas realizaciones, el AAV es un serotipo AAV9. En otras realizaciones, el AAV es un serotipo AAV8.

La proteína de la cápside puede ser una proteína de la cápside mutante, tal como la divulgada en WO 2008/124724.

En algunas realizaciones, el vector AAV comprende una cápside AAV8 con una mutación Y733F.

35 Puede encontrar revisiones de los serotipos de AAV en Choi et al. (2005) Curr. Gene Ther. 5: 299-310 y Wu et al. (2006) Molecular Therapy 14: 316-27. Las secuencias de genomas AAV o de elementos de genomas AAV que incluyan secuencias ITR, genes rep o cap para su uso en la invención pueden derivarse de los siguientes números de acceso para secuencias de genomas completos AAV: Virus adenoasociado 1 NC_002077, AF063497; Virus adenoasociado 2 NC_001401; Virus adenoasociado 3 NC_001729; Virus adenoasociado 3B NC_001863; Virus adenoasociado 4 NC_001829; Virus adenoasociado 5 Y18065, AF085716; Virus adenoasociado 6 NC_001862; AAV aviar ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; Cepa de AAV aviar DA-1 NC_006263, AY629583; AAV bovino NC_005889, AY388617.

45 También se puede hacer referencia al AAV en términos de clados o clones. Se refiere a la relación filogenética de los AAV derivados de forma natural, y típicamente a un grupo filogenético de AAV que puede remontarse a un ancestro común, e incluye a todos sus descendientes. Además, se puede hacer referencia a los AAV en términos de un aislado específico, es decir, un aislado genético de un AAV específico encontrado en la naturaleza. El término aislado genético describe una población de AAV que se ha sometido a una mezcla genética limitada con otros AAV de origen natural, definiendo así una población reconociblemente distinta a nivel genético.

50 El experto en la técnica puede seleccionar un serotipo, clado, clon o aislado apropiado de AAV para su uso en la invención basándose en sus conocimientos generales comunes. Por ejemplo, se ha demostrado que la cápside del AAV5 transduce eficazmente los fotorreceptores cónicos de los primates, como demuestra la corrección con éxito de un defecto hereditario de la visión del color (Mancuso et al. (2009) Nature 461: 784-7).

55 El serotipo del AAV determina la especificidad tisular de la infección (o tropismo) de un AAV. En consecuencia, los serotipos AAV preferidos para su uso en AAV administrados a pacientes de acuerdo con la invención son aquellos que tienen tropismo natural para o una alta eficacia de infección de células objetivo dentro del corazón.

60 Típicamente, el genoma AAV de un serotipo, aislado o clado de AAV derivado naturalmente comprende al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Una secuencia ITR actúa en cis para proporcionar un origen de replicación funcional y permite la integración y escisión del vector del genoma de una célula. En realizaciones preferidas, una o más secuencias ITR flanquean las secuencias de nucleótidos que codifican el Fam3c. El genoma AAV también comprende típicamente genes de empaquetamiento, tales como los genes *rep* y/o *cap* que codifican funciones de empaquetamiento para una partícula de AAV. El gen *rep* codifica una o más de las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 o variantes de

las mismas. El gen *cap* codifica una o más proteínas de la cápside, tal como VP1, VP2 y VP3, o variantes de las mismas. Estas proteínas constituyen la cápside de una partícula AAV. Las variantes de la cápside se discuten a continuación.

5 Un promotor estará enlazado operativamente a cada uno de los genes de empaquetamiento. Ejemplos específicos de tales promotores incluyen los promotores p5, p19 y p40 (Laughlin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571). Por ejemplo, los promotores p5 y p19 se utilizan generalmente para expresar el gen *rep*, mientras que el promotor p40 se utiliza generalmente para expresar el gen *cap*.

10 Como se ha comentado anteriormente, el genoma AAV utilizado en el vector AAV puede ser, por lo tanto, el genoma completo de un AAV de origen natural. Por ejemplo, puede utilizarse un vector que comprenda un genoma completo de AAV para preparar un vector AAV o partícula del vector *in vitro*. Sin embargo, aunque en principio se puede administrar un vector de este tipo a los pacientes, esto rara vez se hará en la práctica. Preferiblemente, el genoma AAV se derivatizará con el fin de administrarlo a los pacientes. Dicha derivatización es estándar en la técnica y la invención abarca el uso de cualquier derivado conocido de un genoma AAV, y los derivados que podrían generarse aplicando técnicas conocidas en la técnica. La derivatización del genoma AAV y de la cápside AAV se revisan en: Coura y Nardi (2007) Virology Journal 4: 15 99, y en Choi et al. y Wu et al., citados anteriormente.

Los derivados de un genoma AAV incluyen cualquier forma truncada o modificada de un genoma AAV que permita la expresión de un transgén de un vector AAV *in vivo*. Normalmente, es posible truncar el genoma AAV de forma significativa para incluir una secuencia viral mínima y, sin embargo, conservar la función mencionada. Esto es preferible por razones de seguridad para reducir el riesgo de recombinación del vector con virus de tipo silvestre, y también para evitar que se desencadene una respuesta inmunitaria celular por la presencia de proteínas génicas virales en la célula objetivo.

25 Típicamente, un derivado incluirá al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), preferiblemente más de una ITR, tal como dos ITR o más. Una o más de las ITR pueden derivarse de genomas AAV que tengan serotipos diferentes, o pueden ser una ITR quimérica o mutante. Una ITR mutante preferida es una que tiene una delección de un trs (sitio de resolución terminal). Esta delección permite la replicación continua del genoma para generar un genoma monocatenario que contiene tanto secuencias codificantes como complementarias, es decir, un genoma AAV autocomplementario. Esto permite eludir la replicación del ADN en la célula objetivo y, por lo tanto, posibilita la expresión acelerada del transgén.

Preferiblemente, una o más ITR flanqueará la secuencia de nucleótidos que codifica Fam3c en cualquiera de sus extremos. Se prefiere la inclusión de una o más ITR para ayudar a la formación de concatámeros del vector en el núcleo de una célula hospedera, por ejemplo, tras la conversión del ADN monocatenario del vector en ADN bicatenario por la acción de las ADN polimerasas de la célula hospedera. La formación de estos concatámeros episomales protege el constructo vectorial durante la vida de la célula hospedera, permitiendo así una expresión prolongada del transgén *in vivo*.

40 En las realizaciones preferidas, los elementos ITR serán las únicas secuencias conservadas del genoma AAV nativo en el derivado. Por lo tanto, un derivado preferiblemente no incluirá los genes *rep* y/o *cap* del genoma nativo ni ninguna otra secuencia del genoma nativo. Esto es preferible por las razones descritas anteriormente, y también para reducir la posibilidad de integración del vector en el genoma de la célula hospedera. Además, la reducción del tamaño del genoma AAV permite una mayor flexibilidad a la hora de incorporar otros elementos de secuencia (tales como elementos reguladores) dentro del vector, además del transgén.

45 Por lo tanto, en un derivado podrían eliminarse las siguientes porciones: una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), los genes de replicación (*rep*) y de la cápside (*cap*). Sin embargo, en algunas realizaciones, los derivados pueden incluir adicionalmente uno o más genes *rep* y/o *cap*, u otras secuencias virales de un genoma AAV. El AAV de origen natural se integra con una alta frecuencia en un sitio específico del cromosoma 19 humano y muestra una frecuencia insignificante de integración aleatoria, de modo que la retención de una capacidad integradora en el vector puede tolerarse en un entorno terapéutico.

50 Cuando un derivado comprende proteínas de la cápside, es decir, VP1, VP2 y/o VP3, el derivado puede ser un derivado quimérico, mezclado o modificado de la cápside de uno o más AAV naturales. En particular, la invención abarca el suministro de secuencias de proteínas de la cápside de diferentes serotipos, clados, clones o aislados de AAV dentro del mismo vector (es decir, un vector pseudotipado).

60 Los derivados quiméricos, mezclados o modificados de la cápside se seleccionarán típicamente para proporcionar una o más funcionalidades deseadas para el vector AAV. Por lo tanto, estos derivados pueden mostrar una mayor eficacia en el suministro de genes, una menor inmunogenicidad (humoral o celular), un rango de tropismo alterado y/o un objetivo mejorado de un tipo celular concreto en comparación con un vector AAV que comprenda un genoma AAV de origen natural, tal como el de AAV2. La mayor eficacia del suministro de genes puede lograrse mediante una mejor unión al receptor o al co-receptor en la superficie celular, una mejor internalización, un mejor tráfico dentro de la célula y hacia el núcleo, un mejor desenrollado de la partícula viral y una mejor conversión de un genoma monocatenario a una forma bicatenaria. El aumento de la eficacia también puede estar relacionado con un rango de tropismo alterado o dirigido a una población celular específica, de forma que la dosis de vector no se diluya por la administración a tejidos en los que no se necesita.

Las proteínas de cápside quiméricas incluyen las generadas por recombinación entre dos o más secuencias codificantes de la cápside de serotipos AAV naturales. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un enfoque de rescate de marcadores en el que las secuencias de la cápside no infecciosas de un serotipo se co-transfectan con secuencias de la cápside de un serotipo diferente, y se utiliza la selección dirigida para seleccionar las secuencias de la cápside que tengan las propiedades deseadas. Las secuencias de la cápside de los diferentes serotipos pueden alterarse mediante recombinación homóloga dentro de la célula para producir nuevas proteínas quiméricas de la cápside.

Las proteínas de la cápside quiméricas también incluyen las generadas por modificación de secuencias de proteínas capsulares para transferir dominios específicos de proteínas de la cápside, bucles de superficie o residuos de aminoácidos específicos entre dos o más proteínas de la cápside, por ejemplo, entre dos o más proteínas de la cápside de serotipos diferentes.

Las proteínas de la cápside mezcladas o quiméricas también pueden generarse mediante mezclado del ADN o por PCR susceptible a errores. Los genes de la cápside de AAV híbridos pueden crearse fragmentando aleatoriamente las secuencias de genes de AAV relacionados, por ejemplo, los que codifican proteínas de la cápside de varios serotipos diferentes, y reensamblando posteriormente los fragmentos en una reacción de polimerasa auto-cebante, lo que también puede provocar cruces en regiones de homología de secuencia. Una biblioteca de genes AAV híbridos creada de este modo mezclando los genes de la cápside de varios serotipos puede examinarse para identificar clones virales que tengan una funcionalidad deseada. Del mismo modo, la PCR susceptible a errores puede utilizarse para mutar aleatoriamente los genes de la cápside del AAV para crear una biblioteca diversa de variantes que luego pueden seleccionarse por una propiedad deseada.

Las secuencias de los genes de la cápside también pueden modificarse genéticamente para introducir deleciones, sustituciones o inserciones específicas con respecto a la secuencia nativa de tipo silvestre. En particular, los genes de la cápside pueden modificarse mediante la inserción de una secuencia de una proteína o péptido no relacionado dentro de un marco de lectura abierto de una secuencia codificante de la cápside, o en el extremo N- y/o C-terminal de una secuencia codificante de la cápside.

La proteína o péptido no relacionado puede ser ventajosamente uno que actúe como ligando para un tipo celular particular, confiriendo así una mejor unión a una célula objetivo o mejorando la especificidad del direccionamiento del vector a una población celular concreta. La proteína no relacionada también puede ser una que ayude a la purificación de la partícula viral como parte del proceso de producción, es decir, un epítipo o etiqueta de afinidad. El lugar de inserción se seleccionará normalmente para que no interfiera con otras funciones de la partícula viral, por ejemplo, la internalización o el tráfico de la partícula viral. El experto en la técnica puede identificar los lugares adecuados para la inserción basándose en su conocimiento general común. En Choi et al., al que se ha hecho referencia anteriormente, se divulgan lugares particulares.

La invención abarca además el suministro de secuencias de un genoma AAV en un orden y configuración diferentes a los de un genoma AAV nativo. La invención también abarca la sustitución de una o más secuencias o genes AAV por secuencias de otro virus o por genes quiméricos compuestos por secuencias de más de un virus. Dichos genes quiméricos pueden estar compuestos por secuencias de dos o más proteínas virales relacionadas de diferentes especies virales.

El vector AAV puede adoptar la forma de una secuencia de nucleótidos que comprenda un genoma AAV o un derivado del mismo y una secuencia que codifique el Fam3c.

Las partículas AAV incluyen formas transcapsidadas en donde un genoma AAV o un derivado que tiene una ITR de un serotipo se empaqueta en la cápside de un serotipo diferente. Las partículas AAV también incluyen formas de mosaico, en donde una mezcla de proteínas de la cápside no modificadas de dos o más serotipos diferentes compone la cápside viral. La partícula AAV también incluye formas químicamente modificadas que portan ligandos adsorbidos a la superficie de la cápside. Por ejemplo, dichos ligandos pueden incluir anticuerpos para dirigirse a un receptor particular de la superficie celular.

El vector AAV puede comprender múltiples copias (por ejemplo, 2, 3, etc.) de la secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia en la presente.

En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende además una o más ITR de AAV. En realizaciones preferidas, el polinucleótido comprende además dos ITR de AAV. En algunas realizaciones, el polinucleótido comprende una ITR de AAV en su extremo 5' y una ITR de AAV en su extremo 3'. En algunas realizaciones, las ITR de AAV son las ITR de AAV2, AAV9 o AAV8.

Promotores y secuencias reguladoras

El polinucleótido o vector también puede incluir elementos que permitan la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica el Fam3c in vitro o in vivo. Éstas pueden denominarse secuencias de control de la expresión. Por lo tanto, el polinucleótido o vector comprende típicamente secuencias de control de la expresión (por ejemplo, que comprenden una secuencia promotora) enlazadas operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el Fam3c.

Puede utilizarse cualquier promotor adecuado, cuya selección puede realizar fácilmente el experto en la técnica. La secuencia promotora puede ser constitutivamente activa (es decir, operativa en cualquier entorno celular hospedero), o alternativamente puede ser activa sólo en un entorno celular hospedero específico, permitiendo así la expresión dirigida del transgén en un tipo celular particular (por ejemplo, un promotor específico de tejido). El promotor puede mostrar una expresión inducible en respuesta a la presencia de otro factor, por ejemplo, un factor presente en una célula hospedera. En cualquier caso, cuando el vector se administra con fines terapéuticos, se prefiere que el promotor sea funcional en el fondo de la célula objetivo.

En realizaciones preferidas, el promotor es un promotor específico del hígado. En realizaciones preferidas, el promotor es un promotor hAAT específico del hígado.

El promotor hAAT específico del hígado puede conferir una especificidad selectiva para los hepatocitos. Cuando los vectores se administran a través de la vena porta, los inventores han demostrado que cada factor circulante, segregado por el hígado, puede proteger el corazón tras sufrir daños.

Entre los promotores adecuados se incluye el promotor de la beta-actina de pollo (CBA), opcionalmente en combinación con un elemento potenciador del citomegalovirus (CMV). Un ejemplo de promotor para su uso en la invención es un promotor CAG.

En algunas realizaciones, el promotor es un promotor CMV.

El polinucleótido o vector también puede comprender una o más secuencias reguladoras adicionales que pueden actuar pretranscripcionalmente o postranscripcionalmente. La secuencia reguladora puede formar parte del locus transgénico nativo o puede ser una secuencia reguladora heteróloga. El polinucleótido o vector puede comprender porciones de la 5'-UTR o 3'-UTR del transcrito nativo del transgén.

Las secuencias reguladoras son todas aquellas que facilitan la expresión del transgén, es decir, que actúan para aumentar la expresión de un transcrito, mejorar la exportación nuclear del ARNm o potenciar su estabilidad. Dichas secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, elementos potenciadores, elementos reguladores postranscripcionales y sitios de poliadenilación.

Entre los potenciadores adecuados se incluye el elemento regulador WPRE. Entre las señales poli-A adecuadas se incluye la señal poli-A de la hormona de crecimiento bovina.

El experto en la técnica puede seleccionar fácilmente secuencias reguladoras adicionales.

Método de administración

Pueden utilizarse diversas vías de administración y técnicas, entre ellas técnicas parenterales, tales como inyecciones intravenosas, intracardíacas e intraarteriales, cateterismos y similares. Las cantidades promedio del agente activo pueden variar y, en particular, deben basarse en las recomendaciones y la prescripción de un médico cualificado.

El Fam3c, polinucleótido o vector puede administrarse sistémicamente (por ejemplo, mediante infusión en vena periférica), o puede administrarse local o regionalmente.

Preferiblemente, el Fam3c se administra por vía parenteral, en particular intravenosa, intraarterial o intramiocárdica.

La administración del polinucleótido que codifica el Fam3c puede lograrse mediante terapia génica, véase, por ejemplo, WO 2013/093870.

De acuerdo con la presente divulgación, Chrdl1, Fam3c y Fam3b también son activos cuando llegan al corazón infartado a través de la circulación sistémica.

Composiciones farmacéuticas y soluciones inyectadas

Los medicamentos, por ejemplo, Fam3c, polinucleótidos o vectores, pueden formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además del medicamento, un portador farmacéuticamente aceptable, diluyente, excipiente, disolución amortiguadora, estabilizador u otros materiales bien conocidos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material puede ser determinada por el experto en la técnica en función de la vía de administración.

Según la vía de administración elegida, las composiciones pueden estar en forma sólida o líquida, aptas para administración oral, parenteral, intravenosa o intraarterial. La composición farmacéutica suele estar en forma líquida. Las composiciones farmacéuticas líquidas suelen incluir un portador líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse disolución salina fisiológica, cloruro de magnesio, dextrosa u

otra disolución de sacáridos, o glicoles, tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. En algunos casos, puede utilizarse un tensoactivo, tal como el ácido plurónico (PF68) al 0,001%.

5 Para su inyección en el lugar de la afección, el principio activo puede presentarse en forma de una disolución acuosa exenta de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. El experto en la técnica es capaz de preparar disoluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como la inyección de cloruro sódico, la inyección de Ringer o la inyección de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, disoluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario.

10 Para la liberación retardada, el medicamento puede incluirse en una composición farmacéutica formulada para una liberación lenta, tal como en microcápsulas formadas a partir de polímeros biocompatibles o en sistemas portadores liposomales según métodos conocidos en la técnica.

15 Tales composiciones son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences; última edición, Mack Pub.

Método de tratamiento

20 Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos siguientes de esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

25 Debe entenderse que todas las referencias en la presente al tratamiento incluyen el tratamiento curativo paliativo y profiláctico; aunque en el contexto de la invención las referencias a la prevención se asocian más comúnmente con el tratamiento profiláctico. El tratamiento también puede incluir la detención de la progresión en la gravedad de una enfermedad.

30 Se prefiere el tratamiento de mamíferos, en particular humanos. Sin embargo, tanto los tratamientos humanos como los veterinarios están dentro del alcance de la invención.

El régimen de administración, la dosificación y la posología serán determinados por el médico según su experiencia, la enfermedad a tratar y las condiciones del paciente.

35 El Fam3c y/o los polinucleótidos pueden administrarse por separado o en combinación.

El término "combinación", o los términos "en combinación", "utilizado en combinación con" o "preparación combinada", como se usan en la presente, pueden referirse a la administración combinada de dos o más agentes de forma simultánea, secuencial o separada.

40 El término "simultáneo", como se usa en la presente, significa que los agentes se administran de forma concurrente, es decir, al mismo tiempo.

El término "secuencial", como se usa en la presente, significa que los agentes se administran uno tras otro.

45 El término "por separado", como se usa en la presente, significa que los agentes se administran independientemente unos de otros, pero dentro de un intervalo de tiempo que permite que los agentes muestren un efecto combinado, preferiblemente sinérgico. Por lo tanto, la administración "por separado" puede permitir que un agente se administre, por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos o 10 minutos después del otro.

50 Variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos

Una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la que la secuencia específica de residuos (ya sean residuos de aminoácidos o de ácidos nucleicos) ha sido modificada de tal manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión conserva sustancialmente su funcionalidad. Una secuencia variante puede obtenerse mediante adición, delección, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de al menos un residuo presente en la proteína de origen natural.

60 El término "derivado", tal como se utiliza en la presente, en relación con las proteínas o polipéptidos de la invención incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, delección de y/o adición de uno (o más) residuos de aminoácidos desde o a la secuencia, siempre que la proteína o polipéptido resultante conserve sustancialmente al menos una de sus funciones endógenas.

El término "análogo", como se utiliza en la presente, en relación con los polipéptidos o polinucleótidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos a los que imita.

65

Típicamente, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 o 3 a 10 o 20 sustituciones siempre que la secuencia modificada conserve sustancialmente la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos de origen no natural.

5 Las proteínas utilizadas en la invención también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan lugar a una proteína funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones deliberadas de aminoácidos basándose en la similitud de la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se conserve la función endógena. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen la lisina y la arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen la asparagina, la glutamina, la serina, la treonina y la tirosina.

10 Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente de la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

15

ALIFÁTICOS	No polar	GAP ILV
	Polar - sin carga	CSTM NQ
	Polar - con carga	DE KRH
AROMÁTICOS		FWY

20 El término "homólogo", como se usa en la presente, significa una entidad que tiene cierta homología con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre y la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre. El término "homología" puede equipararse a "identidad".

25 Las comparaciones de homología pueden realizarse visualmente, lo que es más habitual, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el porcentaje de homología o identidad entre dos o más secuencias.

El porcentaje de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente de la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, estos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente corto de residuos.

30 Aunque se trata de un método muy sencillo y coherente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción en la secuencia de nucleótidos puede hacer que los codones siguientes queden fuera del alineamiento, lo que puede dar como resultado una gran reducción del porcentaje de homología cuando se realiza un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tengan en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente el puntaje de homología global. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de secuencias para intentar maximizar la homología local.

35 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en el alineamiento, de modo que, para un mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número posible de huecos, que refleje un mayor parentesco entre las dos secuencias comparadas, obtendrá un mayor puntaje que uno con muchos huecos. Se suelen utilizar "costes de hueco afines" que cobran un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntaje de huecos más utilizado. Por supuesto, las penalizaciones por huecos elevadas producirán alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, es preferible utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

40 El cálculo del porcentaje máximo de homología requiere, por lo tanto, en primer lugar la elaboración de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo un alineamiento de este tipo es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12. (1984) Nucleic Acids Res. 12): 387). Algunos ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase, Ausubel et al. (1999) ibid - Cap. 18), FASTA (Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase, Ausubel

et al. (1999) *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, es preferible utilizar el programa GCG Bestfit. También existe otra herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase, *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187-8).

5 Aunque el porcentaje final de homología puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí no suele basarse en una comparación de pares de todo o nada. En su lugar, se suele utilizar una matriz de puntaje de similitud escalada que asigna puntajes a cada comparación por pares según la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de matriz de este tipo utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto del conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin suelen utilizar los valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, es preferible utilizar los valores públicos por defecto del paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

15 Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de secuencia. El software suele hacerlo como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

20 Los "fragmentos" de una Chrd11, Fam3c o Fam3b de longitud completa también son variantes y el término se refiere típicamente a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que es de interés ya sea funcionalmente o, por ejemplo, en un ensayo. "Fragmento" se refiere así a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que es una porción de un polipéptido o polinucleótido de longitud completa.

25 Dichas variantes pueden prepararse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, tal como la mutagénesis dirigida al sitio. Cuando deban realizarse inserciones, podrá fabricarse ADN sintético que codifique la inserción junto con regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia de origen natural a ambos lados del lugar de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes que correspondan a sitios de la secuencia de origen natural, de modo que la secuencia pueda cortarse con la(s) enzima(s) adecuada(s) y el ADN sintético pueda ligarse al corte. A continuación, el ADN se expresa de acuerdo con la invención para fabricar la proteína codificada. Estos métodos son sólo ilustrativos de las numerosas técnicas estándar conocidas en el arte para la manipulación de secuencias de ADN y también pueden utilizarse otras técnicas conocidas.

30 El experto en la técnica comprenderá que puede combinar todas las características de la invención divulgadas en la presente sin apartarse del alcance de la invención divulgada.

35 A continuación se describirán, a modo de ejemplos no limitativos, características y realizaciones preferentes de la invención.

40 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, bioquímica, biología molecular, microbiología e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995) y suplementos periódicos *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. y Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. y McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y Lilley, D.M. Y Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press.

EJEMPLOS

50 Ejemplo 1

FunSel, un procedimiento de selección in vivo para identificar nuevas terapias cardíacas para el infarto de miocardio

55 Recientemente hemos desarrollado FunSel (1,2), un novedoso procedimiento para la identificación funcional in vivo de nuevos factores terapéuticos contra condiciones degenerativas que aquí aplicamos con el objetivo de identificar factores que garanticen la protección cardíaca tras un infarto de miocardio (IM). Se basa en el uso de vectores de virus adenoasociados (AAV), que son herramientas excelentes para la transferencia de genes cardíacos de gran eficacia (3).

60 En resumen, generamos una biblioteca de genes en matrices que corresponde al secretoma, definido como el subconjunto de proteínas secretadas al medio extracelular de una célula. Mediante un enfoque computacional (4), se han identificado 2033 proteínas únicas en el genoma, que portan un péptido señal y carecen de cualquier dominio transmembrana o señal de localización intracelular y, por lo tanto, potencialmente son secretadas por las células. El tamaño del genoma AAV, que limita la clonación a 4,5 kb, y la disponibilidad de clones de ADNc, limitaron el número de ADNc aptos para la clonación a 1198. La región codificante de estos genes se clonó individualmente en un plásmido pAAV pGi de cadena principal bajo

el control del promotor constitutivo CMV IE y se confirmó mediante secuenciación. Un código de barras único de 10 nt, que puede ser amplificado por PCR y secuenciado, identifica unívocamente cada clon (**Figura 1A**).

5 FunSel se basa en la siguiente estrategia: se utilizó un grupo de plásmidos AAV de la biblioteca, cada uno codificando para un factor específico e identificado por un código de barras único, para la producción por lotes de vectores AAV de serotipo 9 (AAV9) (para un total de 24 grupos compuestos por 50 factores de tamaño similar cada uno). Los ratones CD1 de ocho semanas de edad (n=9 animales por cada reserva de AAV9), se sometieron a un infarto de miocardio inducido por la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente izquierda, que en este escenario representa el estímulo selectivo. Inmediatamente después del IM, cada grupo de vectores AAV9 se inyectó in vivo en la región periinfarto del ventrículo izquierdo (VI) con una multiplicidad por la que cada vector, en principio, entra en una célula diferente (10¹⁰ genomas virales por animal). Después de tres semanas, se recuperaron las inserciones del vector del tejido del VI superviviente y se determinó la frecuencia de cada vector mediante secuenciación de última generación (NGS) de los códigos de barras y se comparó con la encontrada en los animales de control (n=6 animales por grupo) inyectados con el mismo grupo de AAV9, pero no sometidos a IM. Tras un infarto, la mayoría de las células miocíticas mueren, sin embargo, cuando una célula expresa un factor protector sobrevive selectivamente, por lo que el enriquecimiento para un código de barras indica una selección genética positiva (efecto beneficioso), mientras que una representación reducida indica una selección negativa (efecto neutro o perjudicial) (Esquema experimental en la **Figura 1B**).

20 La **Figura 1C** informa de los resultados acumulados obtenidos del cribado in vivo de los 1198 factores. En el gráfico, la frecuencia de cada factor recuperado del corazón tras el IM se presenta como una relación con la frecuencia del mismo factor en ausencia del tratamiento selectivo. Con base en el cálculo de la puntuación Z, seleccionamos los 200 factores con mejores resultados y realizamos 4 cribas adicionales sobre estos factores (4 grupos de 50 vectores). Once factores resultaron competitivamente enriquecidos puntuación Z de 1,96 o más (P<0,05) (**Figura 1D**). Apoyando la solidez del enfoque FunSel, entre los aciertos de esta segunda ronda de cribado encontramos algunos factores cardioprotectores conocidos y factores desconocidos relacionados de algún modo con la biología de los cardiomiocitos. Estar incluían Mdk, una molécula pleiotrópica, que desempeña un papel protector frente a la lesión cardíaca y Rln1, un agente antifibrótico bien descrito, capaz de reducir la producción de ROS, la apoptosis y la inflamación en el corazón infartado. Sin embargo, lo más destacable es que entre los primeros puestos se encontraban tres nuevas proteínas de las que no se dispone de información ni se han realizado estudios relativos a la protección cardíaca. Se trata de proteína similar a Cordina 1 (Chrdl1) y de dos miembros de la familia con similitud de secuencia 3, específicamente, Fam3b y Fam3c. Estos factores fueron elegidos para una mayor investigación individual con el fin de valorar la eficacia y el mecanismo de acción.

Ejemplo 2

Eficacia de Chrdl1, Fam3c y Fam3b en la conservación de la integridad y la función cardíacas tras un infarto de miocardio en ratones

35 Con base en los resultados de FunSel, decidimos validar y caracterizar el efecto de los principales factores secretados seleccionados (Chrdl1, Fam3c y Fam3b) expresados como vectores AAV2/9 individuales sobre el infarto de miocardio en corazones de ratón, con el propósito específico de valorar la capacidad de cada factor para contrarrestar o reducir el daño isquémico y promover la función cardíaca.

45 Se sometió a ratones CD1 de ocho semanas de edad a un IM y, al mismo tiempo, se les inyectó en la zona periinfartada del VI vectores AAV2/9 que expresaban Chrdl1, Fam3c, Fam3b o un vector vacío de control (1×10¹¹ vg/animal; n=8 por grupo). Nuestra experiencia previa indica que este procedimiento da lugar a una transducción miocárdica eficaz y a una expresión del transgén durante un mes (1,5). La función cardíaca de los animales se monitoreó mediante ecocardiografía a los 15, 30 y 60 días tras el IM.

50 Como se indica en la **Figura 2**, la sobreexpresión mediada por AAV2/9 de Chrdl1, Fam3c o Fam3b preservó con éxito la fracción de eyección del VI (FEVI) (**Figura 2A**) de los ratones infartados en comparación con los animales tratados como control. Los valores de la FEVI empezaron a mejorar notablemente a los 15 días tras el IM y se mantuvieron con el paso del tiempo (60 días después del IM: AAV9-Chrdl1 39,96±2,67%, AAV2/9-Fam3c 39,02±2,53% y AAV2/9-Fam3b 32,50±2,70%, en comparación con 19,86±0,98% para los animales que recibieron el vector de control, P<0,001 para todos los tratamientos). Tanto a los 30 como a los 60 días tras el IM, el volumen diastólico del VI (Vd) era significativamente mayor, como era de esperar cuando empieza a producirse la insuficiencia cardíaca, en los animales control si se comparaba con los ratones tratados (**Figura 2B**) (60 días tras el IM: AAV2/9-Chrdl1 101,22±10,31 µl, AAV2/9-Fam3c 107,31±8,85 µl y AAV2/9-Fam3b 115,16±11,03 µl, en comparación con 168,64±7,47 µl para los animales que recibieron el vector de control, P<0,001 para todos los tratamientos).

60 Cuando se produce un infarto de miocardio, los fibroblastos cardíacos proliferan, se diferencian en miofibroblastos y producen matriz extracelular para crear una cicatriz que sustituya al hueco generado por la pérdida de cardiomiocitos. Esto suele provocar rigidez miocárdica y conduce a una remodelación patológica del ventrículo izquierdo, dilatación y disfunción. El análisis morfométrico de las secciones de corazón teñidas con tricrómico en el día 60 indicó que los ratones tratados con AAV2/9-Chrdl1, AAV2/9-Fam3c y AAV2/9-Fam3b mostraban una conservación significativa del tejido contráctil del VI y una reducción del área fibrótica (tamaño del infarto): AAV2/9-Chrdl1 6,88±1,60%, AAV2/9-Fam3c 10,19±2,05%, AAV2/9-Fam3b 13,35±1,79%, frente a 26,26±2,35% del VI en los animales de control; **Figura 2C**).

Por último, una tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) reveló que la sobreexpresión de *Chrdl1*, *Fam3c* o *Fam3b* no inducía una respuesta hipertrófica de los cardiomiocitos, ya que el área transversal de las fibras no aumentaba en los animales tratados en comparación con los controles (**Figura 2D**).

5 En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión cardíaca mediada por AAV2/9 de *Chrdl1*, *Fam3c* o *Fam3b* tras una isquemia aguda favorece la viabilidad celular de los miocitos, reduce el tamaño del infarto y preserva la función cardíaca tras un infarto de miocardio.

Ejemplo 3

10

La expresión mediada por AAV2/9 de *Chrdl1*, *Fam3c* o *Fam3b* contrarresta el remodelado patológico del ventrículo izquierdo asociado a la aparición de insuficiencia cardíaca en ratones

15

Dos meses después del IM, investigamos también el efecto de cada factor secretado sobre la expresión de un conjunto de genes previamente asociados con la remodelación patológica del VI (que consiste en la sobreexpresión de la cadena pesada de β -miosina (β MHC) y la disminución de los niveles de la cadena pesada de α -miosina (α MHC), la Ca^{2+} -ATPasa 2a del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA2a) y el receptor de rianodina 2 (RYR2)).

20

Se extrajo el ARN total del tejido del VI y se analizó mediante qRT-PCR utilizando sondas TaqMan específicas para los genes investigados. En consonancia con las observaciones ecocardiográficas y morfométricas, AAV2/9-*Chrdl1*, AAV2/9-*Fam3c* y AAV2/9-*Fam3b* contrarrestaron el patrón característico de expresión génica típicamente asociado al remodelado patológico del VI observado en los ratones AAV2/9-control, reduciendo el nivel de β -MHC y aumentando los de α -MHC, SERCA2a y RYR2 (**Figura 3**, panel A-D).

25

Ejemplo 4

Los tres factores preservan la viabilidad de los tejidos protegiendo a los cardiomiocitos de la muerte celular y tanto *Chrdl1* como *Fam3c* promueven la autofagia beneficiosa cardíaca tras un IM

30

Hasta ahora, la información disponible sobre los factores *Chrdl1*, *Fam3c* y *Fam3b* es escasa y ciertamente no puede explicar por qué estos factores ejercen un efecto cardioprotector tras un infarto de miocardio. Por ello, nos propusimos explorar los posibles mecanismos biológicos que podrían mediar su actividad. Dado que el enfoque FunSel se basa en la selección de factores en función de la supervivencia de los cardiomiocitos, se realizó una primera serie de experimentos probando los niveles de muerte celular por apoptosis, que suele ser masiva a los dos días de la oclusión de la arteria coronaria (6), en los corazones de ratones CD1 adultos infartados tratados con los tres vectores AAV, en comparación con los controles (1×10^{11} vg/animal; n=5 por grupo). *Fam3b*, *Fam3c* y, en particular, *Chrdl1*, fueron extremadamente eficaces en la prevención de la muerte celular apoptótica en los corazones infartados, como se valoró mediante tinción nuclear TUNEL (etiquetado de fina de corte de dUTP mediado por TdT) en secciones de corazón congeladas a los 2 días del IM (% de núcleos TUNEL positivos: AAV2/9-*Chrdl1* $4,01 \pm 1,21\%$, AAV2/9-*Fam3c* $10,33 \pm 1,43\%$, AAV2/9-*Fam3b* $19,83 \pm 3,01\%$, frente al $30,67 \pm 4,38\%$ de los animales de control) (cuantificación en la **Figura 4A**).

35

40

El corazón es un órgano incapaz de una regeneración significativa durante la vida adulta, por lo que la integridad de los miocitos cardíacos se mantiene gracias a la autofagia, un mecanismo que permite la renovación de componentes intracelulares específicos, en particular las mitocondrias. Este mecanismo es de especial relevancia tras un infarto de miocardio, ya que la isquemia súbita, o la isquemia seguida de reperusión como tras una revascularización percutánea, provoca daños importantes en las mitocondrias, que empiezan a utilizar el oxígeno para generar especies químicas dañinas (7). No es sorprendente, por lo tanto, que la autofagia y la apoptosis estén muy interconectadas, ya que el primer mecanismo se activa tras un daño para eliminar los orgánulos celulares dañados como respuesta protectora para evitar la muerte celular apoptótica (8).

50

Para evaluar la inducción de la autofagia tras la isquemia cardíaca aguda, inyectamos a otro grupo de ratones CD1 adultos infartados vectores AAV2/9 que expresaban *Chrdl1*, *Fam3c*, *Fam3b* o un vector de control (1×10^{11} vg/animal; n=5 por tratamiento). Dos días después del IM, hallamos un aumento de la conversión de la proteína soluble LC3-I en LC3-II unida a lípidos, en particular en los corazones de los ratones tratados con *Chrdl1* y *Fam3c*, que se asoció a la formación de autofagosomas (blots representativos y cuantificación para los corazones AAV2/9-*Chrdl1*, AAV2/9-*Fam3c*, AAV2/9-*Fam3b* y AAV2/9-control en las **Figuras 4B** y **4C**, respectivamente).

55

Para visualizar directamente el flujo autofágico en los corazones infartados, generamos previamente un vector AAV2/9 que expresaba la proteína LC3 marcada con fluorescencia en tándem de proteína roja fluorescente monomérica (mRFP)-proteína verde fluorescente potenciada (EGFP), derivada del plásmido ptfLC3, en el que la fluorescencia verde, pero no la roja, es sensible a la diferencia de pH entre el autofagosoma neutro y el autolisosoma ácido (9). Este vector se administró, junto con AAV2/9-*Chrdl1*, AAV2/9-*Fam3c*, AAV2/9-*Fam3b* o AAV2/9-control (1×10^{11} vg/animal; n=5 por tratamiento), inmediatamente después del IM. Dos días después, el número de vesículas amarillas positivas para LC3 y, en particular, de las que mostraban sólo fluorescencia roja, aumentó significativamente en la región perinfarto del VI de los corazones inyectados con AAV2/9-*Chrdl1* y *Fam3c*, lo que indica que estos dos factores estimulan el flujo autofágico in vivo (la cuantificación de los puntos amarillos y rojos para cada tratamiento se recolecta en la **Figura 4D**).

60

65

En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión cardíaca mediada por AAV2/9 de Chrdl1 Fam3c, Fam3b preserva la viabilidad de los miocitos cardíacos al prevenir la muerte celular apoptótica y, en particular Fam3c y Chrdl1, al promover la autofagia beneficiosa cardíaca.

5 **Ejemplo 5**

Los Chrdl1, Fam3c y Fam3b circulantes, producidos y secretados por el hígado tras la expresión tisular específica mediada por AAV8, contrarrestan el remodelado patológico del ventrículo izquierdo tras un infarto de miocardio

10 Para valorar si Chrdl1, Fam3b y Fam3c circulantes son activos una vez que llegan al corazón desde la circulación, en contraposición a que se expresen endógenamente mediante vectores virales, diseñamos una estrategia por la que cada uno de los tres factores es expresado por el hígado y secretado a la circulación antes del infarto de miocardio (**Figura 5A**). Más detalladamente, realizamos una inyección intraparenquimatosa en ratones CD1 adultos (5×10^{11} vg/animal; n=6 por grupo) con vectores AAV serotipo 8 (AAV2/8), que transfieren genes selectivamente a las células hepáticas; en estos vectores, el factor se expresa bajo el control del promotor de la α -1 antitripsina humana (hAAT), lo que garantiza una expresión específica únicamente en los hepatocitos (10). Siete días después de la administración, cuando el hígado producía y liberaba activamente cantidades dosificables de cada factor en la circulación (**Figura 5B**), se indujo un infarto de miocardio ligando la arteria coronaria descendente izquierda.

20 Como se indica en la **Figura 5C**, la producción hepática mediada por AAV2/8 de Chrdl1, Fam3c o Fam3b preservó con éxito la fracción de eyección del VI (FEVI) de los ratones infartados en comparación con los animales tratados como control. Los valores de la FEVI empezaron a mejorar notablemente a los 15 días tras el IM y se mantuvieron con el paso del tiempo (60 días después del IM: AAV2/8-Chrdl1 $28,77 \pm 1,66\%$, AAV2/8-Fam3c $28,09 \pm 1,61\%$ y AAV8-Fam3b $31,22 \pm 1,40\%$, frente al $20,05 \pm 1,47\%$ para los animales que recibieron el vector de control). Dos meses después del IM, como era de esperar, el volumen diastólico del VI era significativamente mayor en los animales de control que en los ratones tratados (**Figura 5D**) (60 días después del IM: AAV2/8-Chrdl1 $150,2 \pm 10,2 \mu\text{l}$, AAV2/8-Fam3c $137,9 \pm 16,8 \mu\text{l}$ y AAV2/8-Fam3b $134,7 \pm 9,2 \mu\text{l}$, frente a $193,2 \pm 11,6 \mu\text{l}$ para los animales que recibieron el vector de control).

30 Por último, también en este experimento, el análisis morfométrico de secciones de corazón teñidas con tricómico en el día 60 indicó que los ratones tratados con AAV8-Chrdl1, AAV2/8-Fam3c y AAV2/8-Fam3b mostraron una reducción significativa de la zona fibrótica (tamaño del infarto: AAV2/8-Chrdl1 $13,6 \pm 3,1\%$, AAV2/8-Fam3c $15,0 \pm 3,4\%$, AAV2/8-Fam3b $13,2 \pm 2,7\%$, frente a $28,7 \pm 3,3\%$ del VI en los animales de control; **Figura 5E**).

35 En conjunto, estos resultados demuestran que cada factor circulante, expresado terapéuticamente desde el hígado, protege a los cardiomiocitos del daño isquémico y mejora la funcionalidad cardíaca tras un IM. Esto representa una prueba de eficacia preliminar a la inyección de Chrdl1, Fam3c y Fam3b como proteínas recombinantes.

Ejemplo 6

40 **Chrdl1, Fam3c y Fam3b recombinantes protegen a los cardiomiocitos contra la muerte celular inducida por doxorrubina**

45 Para evaluar el efecto potencial de Chrdl1, Fam3c y Fam3b en la preservación de la viabilidad celular frente al daño tóxico, se probaron las proteínas recombinantes correspondientes en cardiomiocitos ventriculares primarios de rata neonatal tratados con el fármaco quimioterapéutico doxorrubina (**Figura 6**).

50 El tratamiento con 100 ng/ml de proteínas recombinantes Chrdl1, Fam3c o Fam3b contrarrestó significativamente la activación de la caspasa 3/7 (como medida de la muerte celular apoptótica), después de 20 horas de tratamiento con doxorrubina (1 y 1,5 μM).

Ejemplo 7 (no de acuerdo con las reivindicaciones)

Chrdl1 previene la activación de fibroblastos y la fibrosis cardíaca tras un infarto de miocardio

55 Cuando se produce un IM, los fibroblastos cardíacos proliferan, se diferencian en miofibroblastos y estimulan la deposición de colágeno para crear una cicatriz que sustituya al hueco generado por la pérdida de cardiomiocitos. Resulta interesante que los corazones infartados que sobreexpresaban Chrdl1 no sólo presentaban cicatrices muy pequeñas, sino que además no sufrían remodelación patológica ni dilatación dos meses después del IM. Esto sugería un efecto específico de Chrdl1 sobre la formación de cicatrices, además de sobre la supervivencia de los cardiomiocitos.

60 El factor de crecimiento transformante- β 1 (Tgf β 1), que se expresa a niveles elevados en la cicatriz tras un IM, es un inductor clave de la deposición de colágeno y de la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos (11). Para evaluar si Chrdl1 era capaz de modular la transdiferenciación de fibroblastos inducida por Tgf β 1, se trataron fibroblastos cardíacos primarios de ratón adulto durante 3 días con diferentes dosificaciones de Tgf β 1 (1-10-50 ng/ml) en presencia o ausencia de Chrdl1 recombinante (100 ng/ml) (**Figura 7A**). El Tgf β 1 indujo un aumento masivo y dependiente de la dosis de la expresión de colágeno α -1(I) (Col1 α 1) y α -Sma, mientras que Chrdl1 atenuó este efecto (**Figura 7B**).

Para investigar adicionalmente el efecto de Chrdl1 en la respuesta fibrótica in vivo, se transdujeron los corazones de ratones Col1 α 1(I)-EGFP (un modelo de ratón transgénico en el que EGFP sólo se expresa en los fibroblastos (12)) con AAV2/9-control o AAV2/9-Chrdl1 y se indujo el IM. Los corazones de los ratones Col1 α 1-eGFP que sobreexpresaban Chrdl1 mostraron una fibrosis cardíaca significativamente atenuada y una expresión reducida de colágeno α 1 y α -SMA (Figura 7C). Estos datos también se confirmaron mediante q-PCR cuantificando los niveles de transcripción de Col1 α 1, α -SMA, Tgf β 1 y MMP9 3 días después del infarto en ratones CD1 (Figura 7D).

Ejemplo 8

La expresión de Chrdl1, Fam3c y Fam3b protege a los ratones de la toxicidad y muerte cardíacas inducidas por doxorubicina

A pesar de su eficacia como medicamentos contra el cáncer, las antraciclinas (incluida la doxorubicina) pueden inducir una cardiotoxicidad aguda y crónica (Swain, S.M. et al. (2003) Cancer 97: 2869-2879). En particular, las dosis acumuladas de estos fármacos pueden causar disfunción sistólica ventricular izquierda e insuficiencia cardíaca. La incidencia notificada de disfunción ventricular como consecuencia del tratamiento con estos fármacos puede alcanzar aproximadamente el 10% de los pacientes (Cardinale, D. (2015) Circulation 131: 1981-1988), produciéndose la gran mayoría de los casos durante el primer año de tratamiento. En la actualidad, no existe un tratamiento estándar para prevenir la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (Zamorano, J.L. et al. (2016) Eur Heart J 37: 2768-2801).

Se inyectaron intramiocárdicamente 30 μ l de preparaciones de vectores AAV9 que expresaban Chrdl1, Fam3c o Fam3b en ratones hembra C57/BL6 de seis semanas de edad con una jeringa de aguja 30 G. Una semana después, se administró doxorubicina por vía intraperitoneal los días 0, 2, 5, 8, 10 y 12 a una concentración de 4 mg/kg (dosis acumulada: 24 mg/kg), de acuerdo con un protocolo establecido para el tratamiento crónico (Li M. et al. (2018) Circulation 138: 696-711). Se realizó un seguimiento de los ratones mediante ecocardiografía en las semanas 0, 6 y 8.

Cada uno de Chrdl1, Fam3c y Fam3b mostró una fuerte actividad protectora contra la muerte inducida por fármacos (Figura 8A). Se observa un efecto cardioprotector notable tras el tratamiento con cualquiera de los tres factores, como demuestra la protección significativa tanto contra el deterioro de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) (Figura 8B), como contra los efectos deletéreos sobre los diámetros internos del VI (Figura 8C).

REFERENCIAS

1. Ruozi, G., et al. AAV-mediated in vivo functional selection of tissue-protective factors against ischaemia. Nature communications 6, 7388 (2015).
2. Bortolotti, F., et al. In Vivo Functional Selection Identifies Cardiotrophin-1 as a Cardiac Engraftment Factor for Mesenchymal Stromal Cells. Circulation 136, 1509-1524 (2017).
3. Zacchigna, S., Zentilin, L. y Giacca, M. Adeno-associated virus vectors as therapeutic and investigational tools in the cardiovascular system. Circ Res 114, 1827-1846 (2014).
4. Grimmond, S.M., et al. The mouse secretome: functional classification of the proteins secreted into the extracellular environment. Genome Res 13, 1350-1359 (2003).
5. Eulalio, A., et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. Nature 492, 376-381 (2012).
6. Krijnen, P.A., et al. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. J Clin Pathol 55, 801-811 (2002).
7. Gustafsson, A.B. y Gottlieb, R.A. Autophagy in ischemic heart disease. Circ Res 104, 150-158 (2009).
8. Wang, X., Guo, Z., Ding, Z. y Mehta, J.L. Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction. J Am Heart Assoc 7(2018).
9. Kimura, S., Noda, T. y Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy 3, 452-460 (2007).
10. Mingozzi, F., et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. J Clin Invest 111, 1347-1356 (2003).
11. Bujak, M. y Frangogiannis, N.G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. Cardiovasc Res 74, 184-195 (2007).
12. Zacchigna, S., et al. Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction. Nature communications 9, 2432 (2018).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fam3c, o un polinucleótido que lo codifica, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2.
2. El Fam3c o polinucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el Fam3c o polinucleótido que lo codifica se utiliza para preservar la viabilidad de las células musculares cardíacas.
- 10 3. El Fam3c o polinucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el Fam3c comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 2.
4. El Fam3c o polinucleótido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 5.
- 15 5. El Fam3c o polinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la enfermedad cardíaca está asociada a isquemia cardíaca o pérdida de cardiomiocitos.
- 20 6. El Fam3c o polinucleótido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la enfermedad cardíaca se selecciona entre el infarto de miocardio; las consecuencias del infarto de miocardio; la lesión por reperfusión tras una intervención coronaria percutánea; la miocarditis; la hipertensión; el daño tóxico cardíaco (en particular, por quimioterapia); o la cardiomiopatía.
- 25 7. El Fam3c o polinucleótido para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde se protege el corazón de un infarto de miocardio; se preserva la función cardíaca tras un infarto de miocardio o una intervención coronaria percutánea; o se reduce la fibrosis tras un infarto; y/o se previene la insuficiencia cardíaca.
- 30 8. El Fam3c para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el Fam3c está glicosilado, y/o en donde el Fam3c es una proteína de fusión, preferiblemente una proteína de fusión Fc.
- 35 9. El polinucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el polinucleótido está en forma de vector, opcionalmente un vector viral, preferentemente un vector viral adenoasociado (AAV).
10. Un vector para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca, en donde el vector comprende un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o 9.
- 40 11. El vector de uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el vector es un vector viral, opcionalmente en donde el vector viral es un vector viral adenoasociado (AAV).
- 45 12. Una composición farmacéutica que comprende el Fam3c como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca.
13. Una composición farmacéutica que comprende el vector como se define en la reivindicación 10 u 11 y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la reducción del riesgo de enfermedad cardíaca.
14. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la composición está formulada para inyección.

FIGURA 1

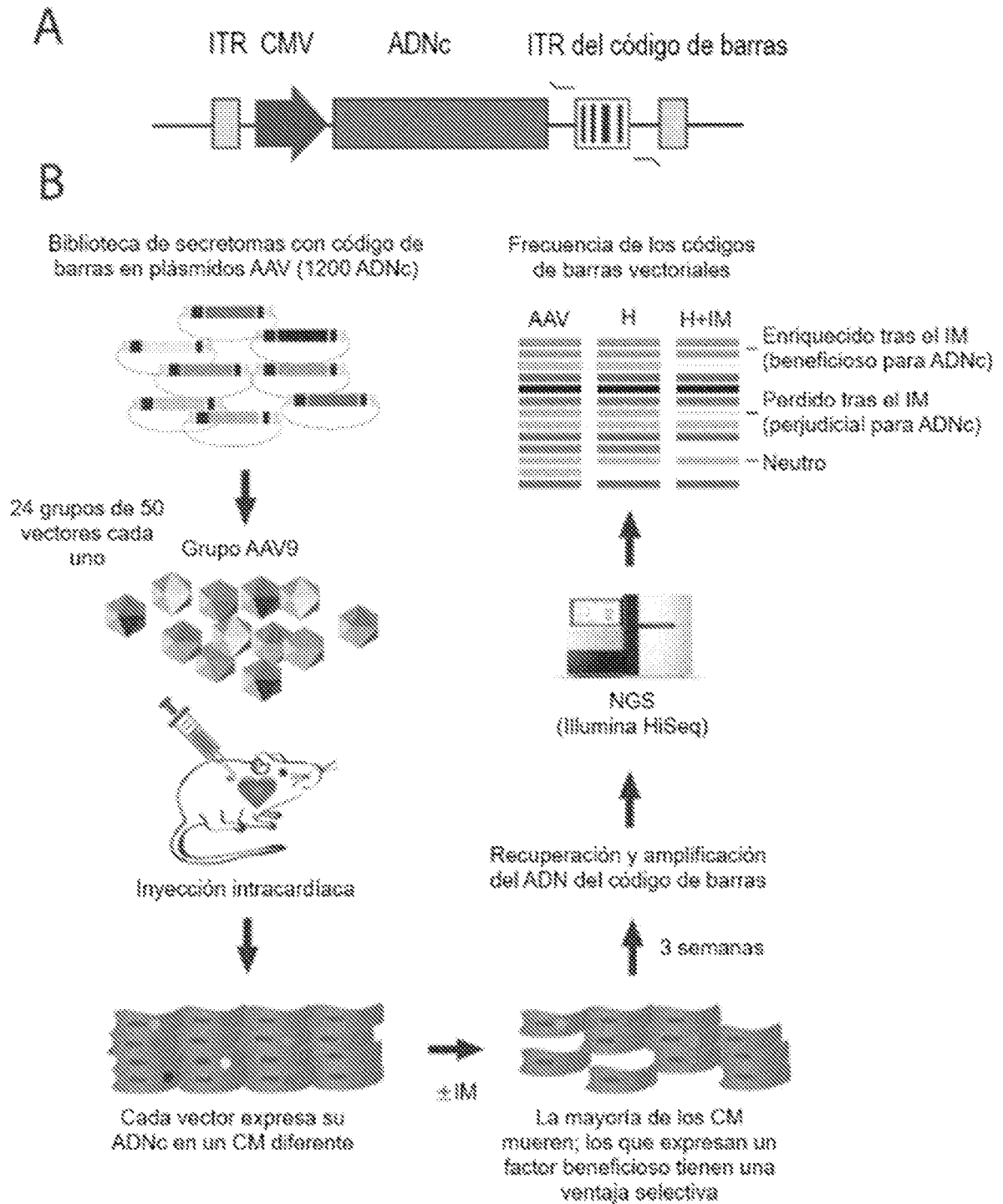
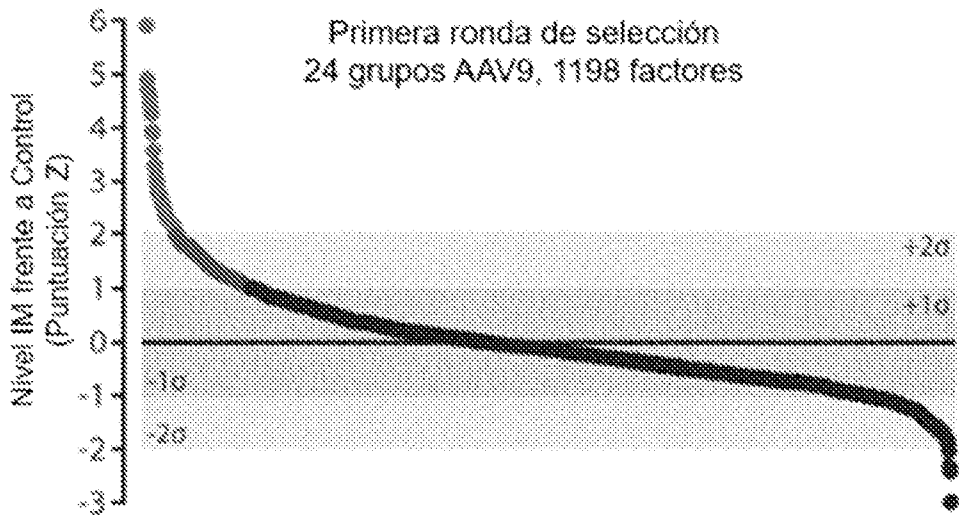


FIGURA 1

C



D

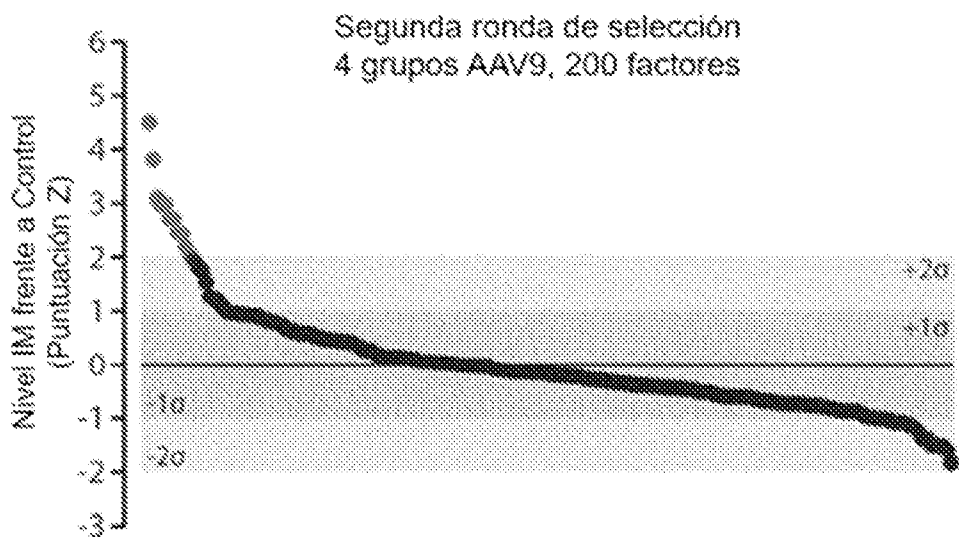


FIGURA 2

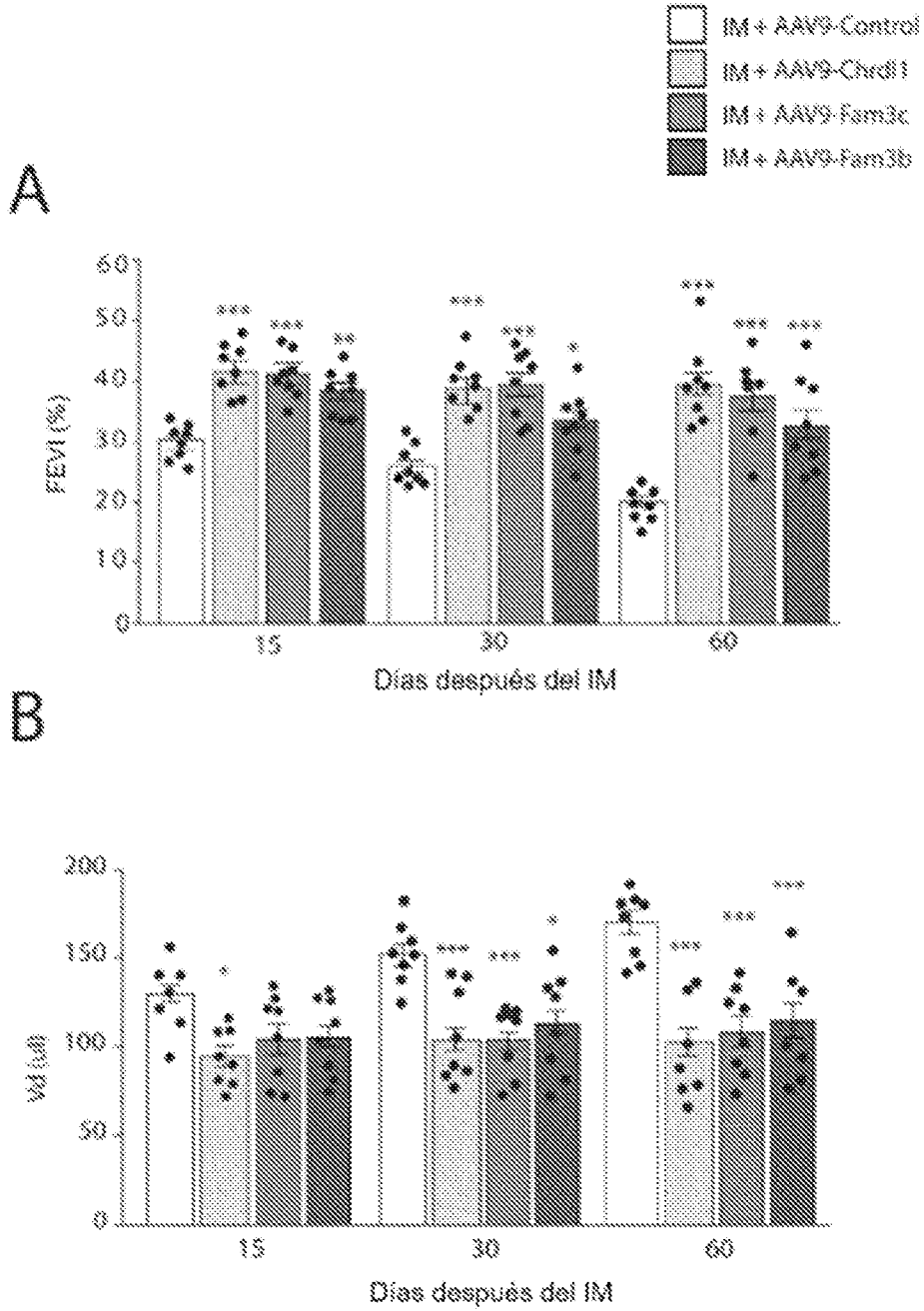


FIGURA 2

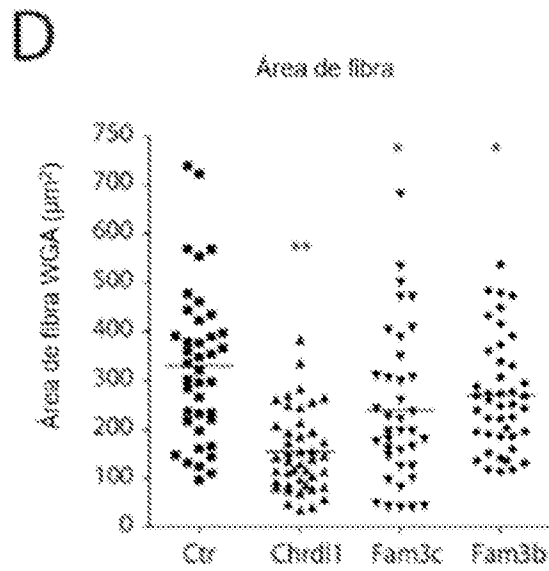
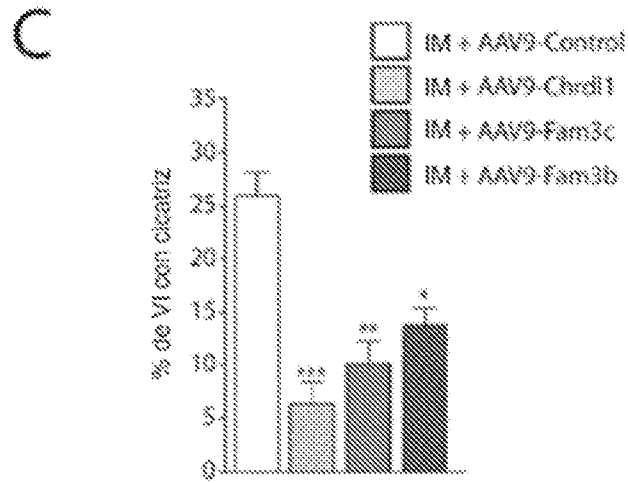


FIGURA 3

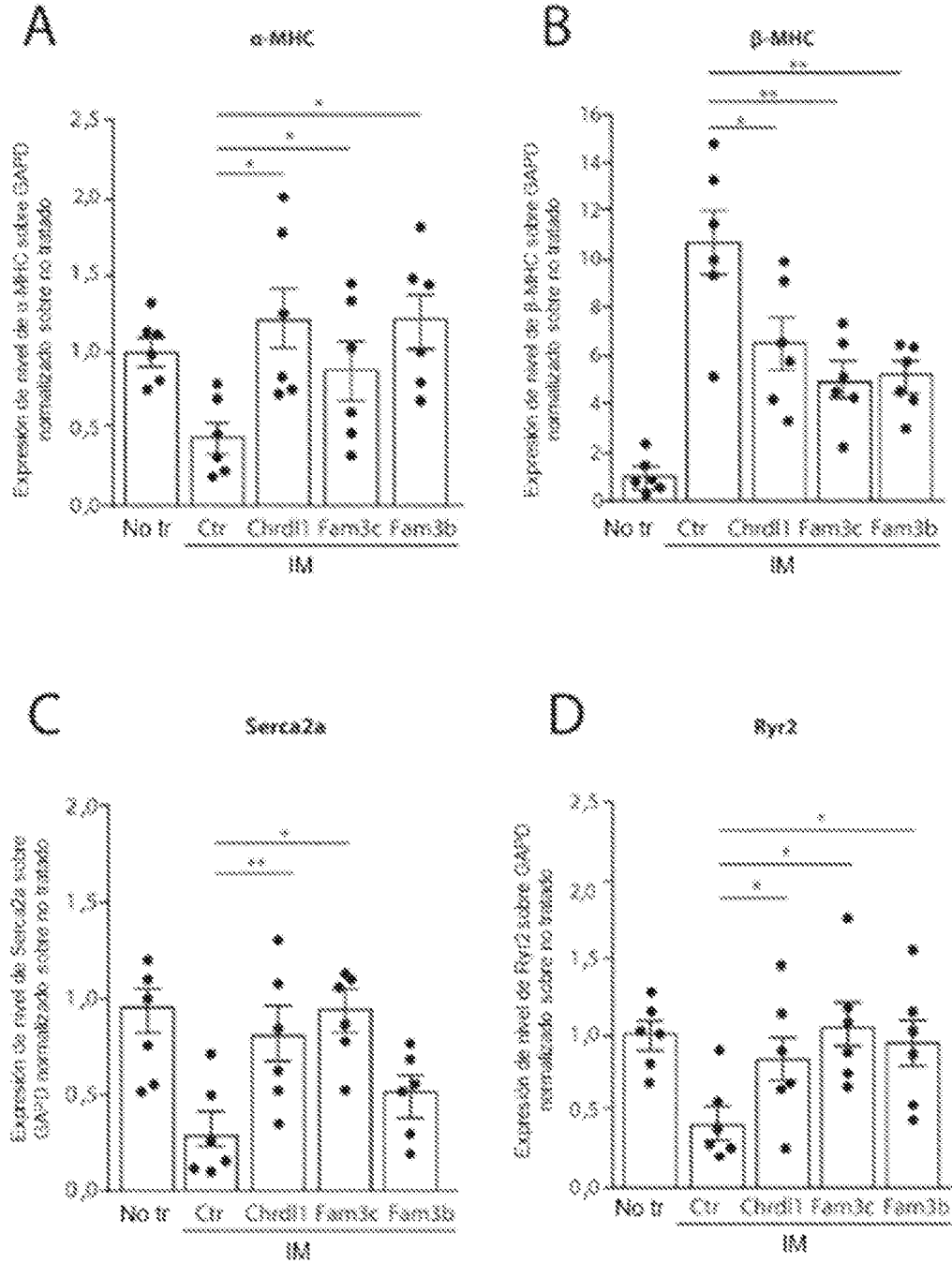


FIGURA 4

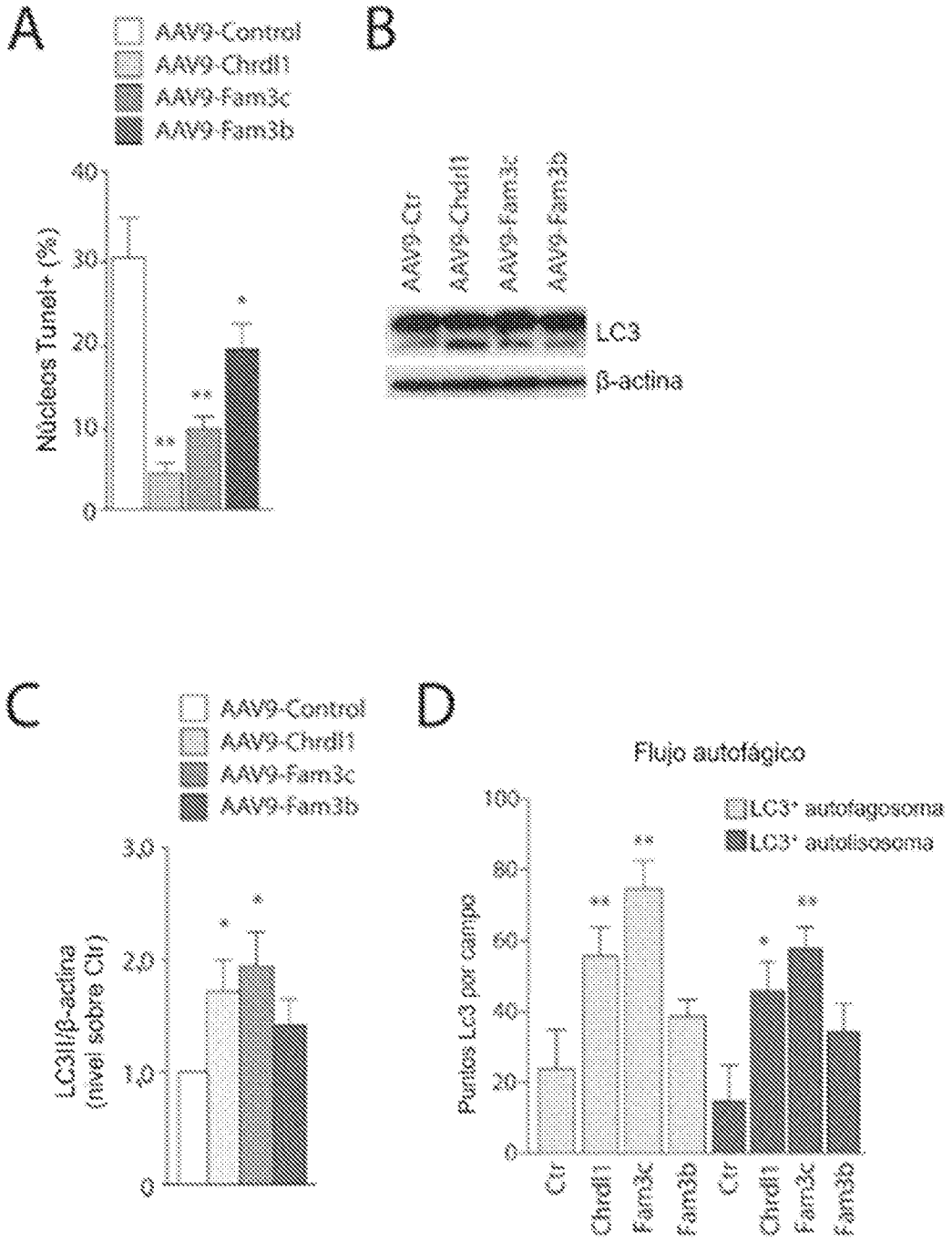


FIGURA 5

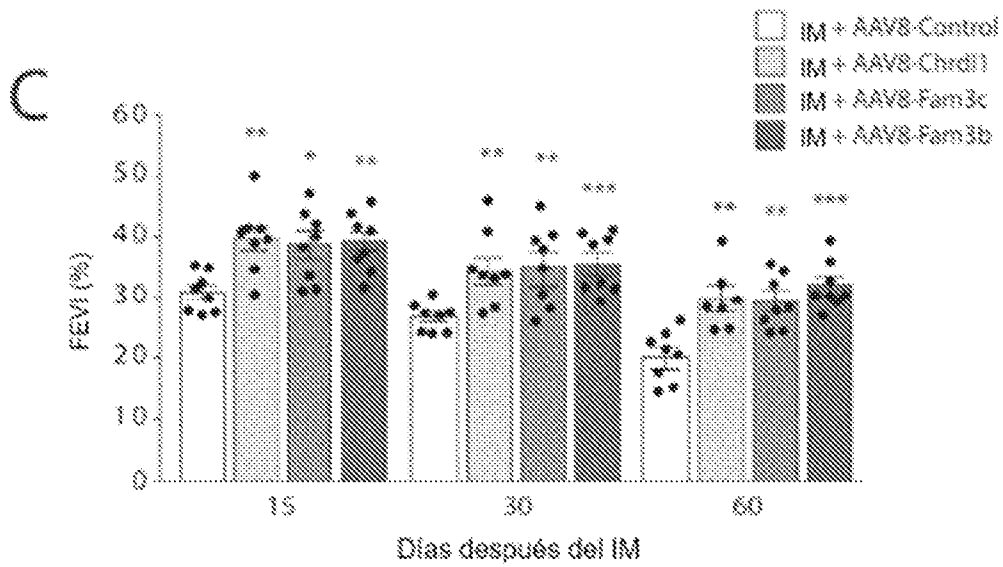
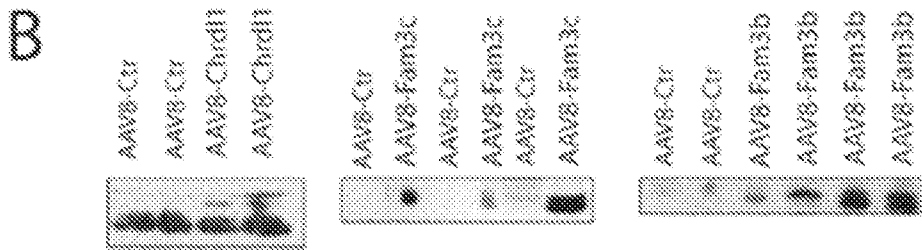
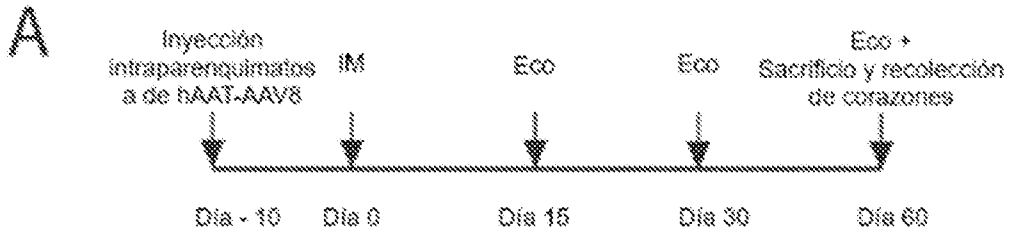


FIGURA 5

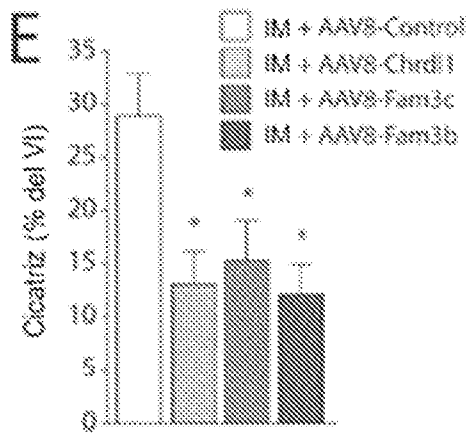
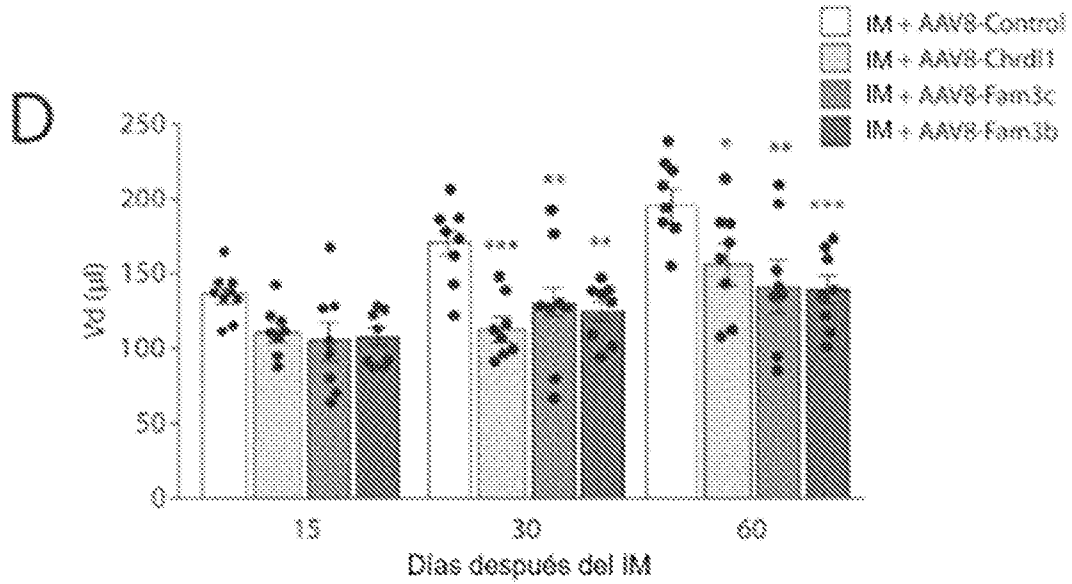


FIGURA 6

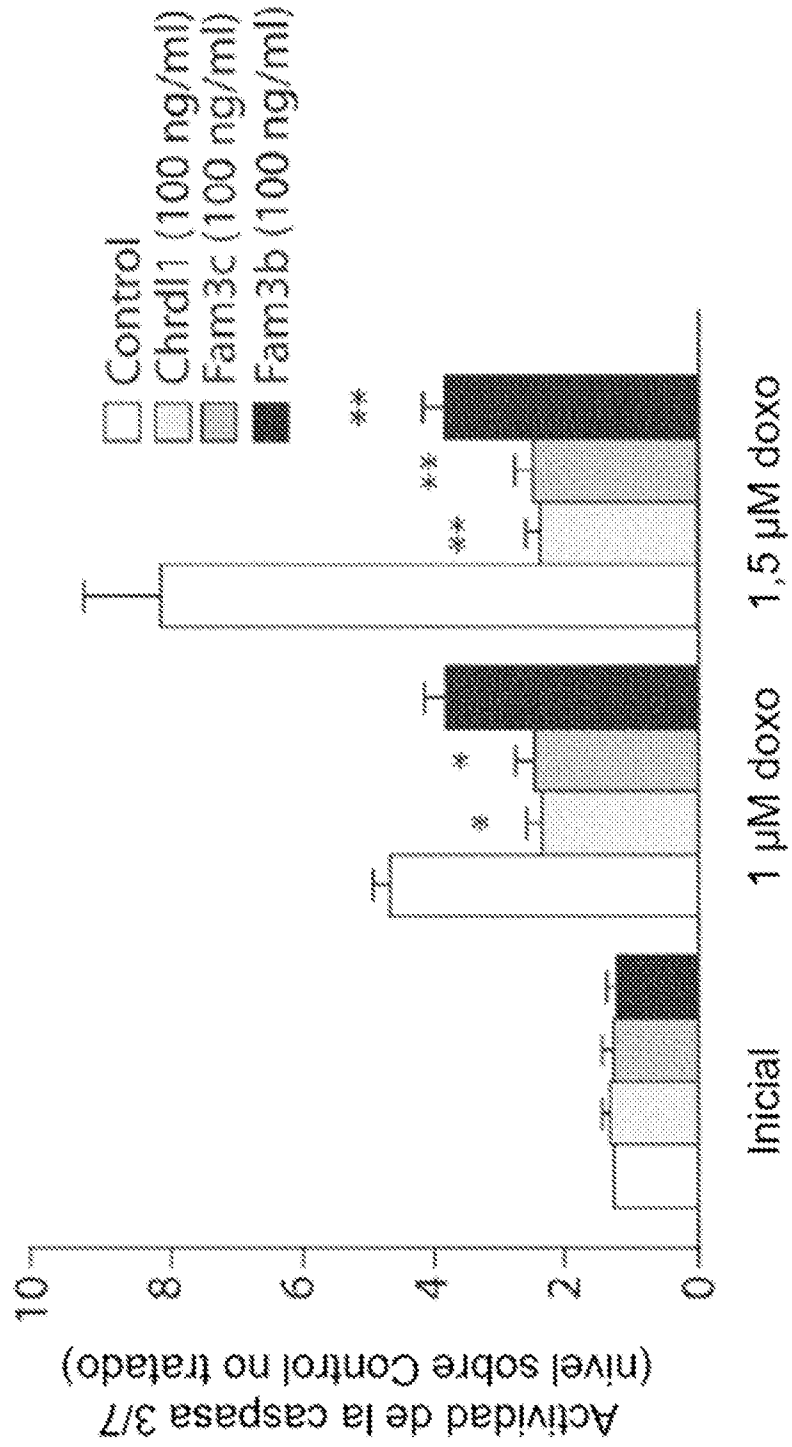


FIGURA 7

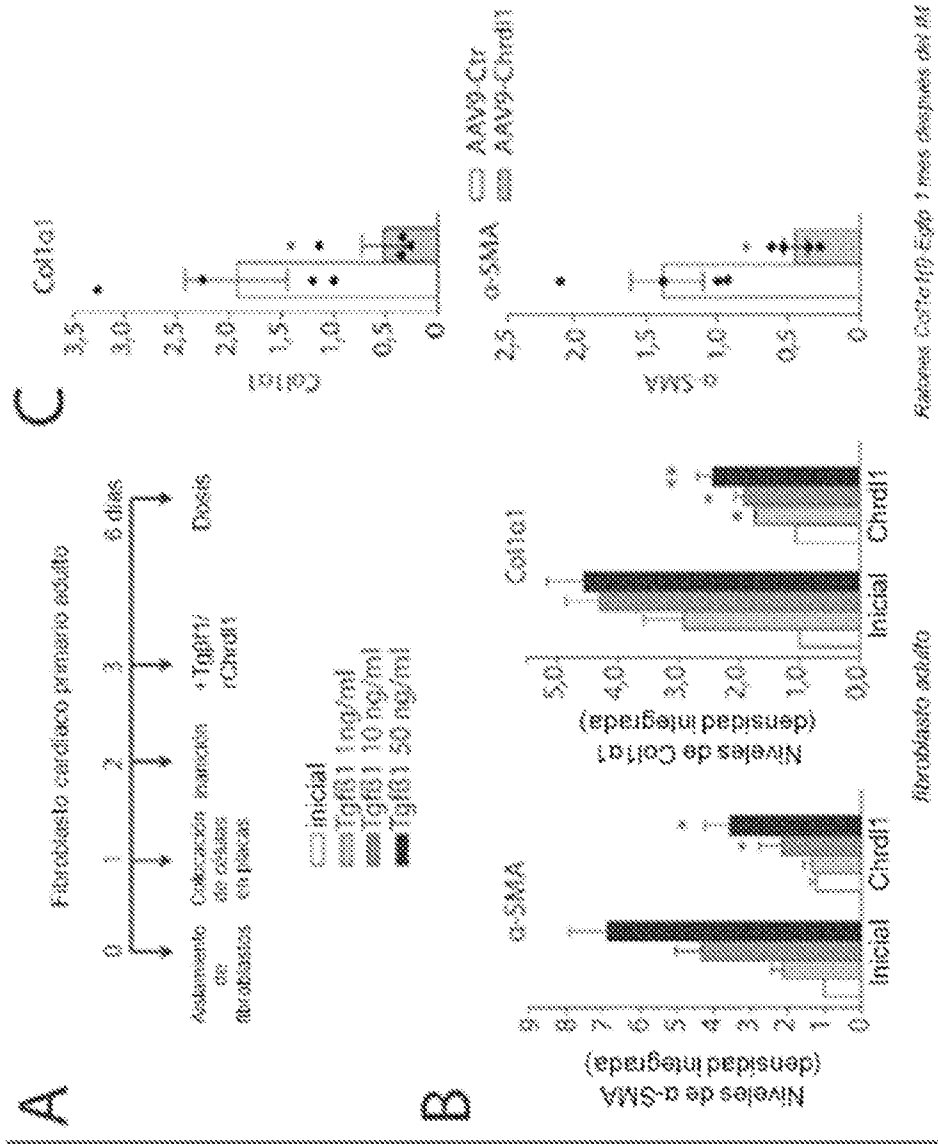


FIGURA 7

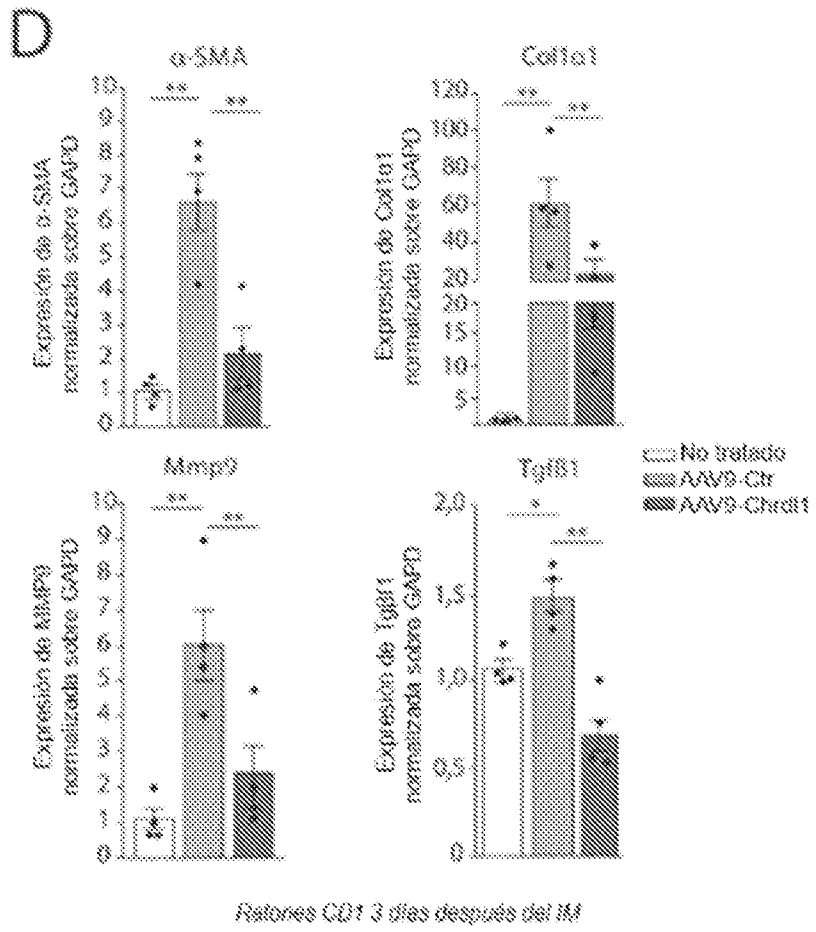


FIGURA 8

