(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 983 584**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2018 PCT/EP2018/081584**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19097001**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2018 E 18803673 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3710043**

(54) Título: **FGF10 para el tratamiento de cardiopatías**

(30) Prioridad:

16.11.2017 EP 17306594

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2024

(73) Titular/es:

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE (50.0%)
Jardin du Pharo, 58, boulevard Charles Livon
13007 Marseille, FR y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)

(72) Inventor/es:

ROCHAIS, FRANCESCA, NADÈGE, JOËLLE

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

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

FGF10 para el tratamiento de cardiopatías

Campo de la invención

La presente invención se refiere al FGF10 para usar en el tratamiento de cardiopatías.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad, representando el 33 % de todas las muertes en Estados Unidos en 2008 y el 29 % en Francia. En 2008, el coste económico anual de las enfermedades cardiovasculares en Estados Unidos se estimó en 297.7 millones de dólares, lo que supuso el 16 % del gasto sanitario total, esto demuestra claramente que las enfermedades cardiovasculares son un importante problema de salud pública en los países industrializados. Las enfermedades cardiacas, incluido el infarto de miocardio, se caracterizan por la pérdida de cardiomiocitos, lo que provoca una afectación drástica de la función cardiaca y, en última instancia, insuficiencia cardiaca congestiva. A pesar de los importantes avances, los tratamientos convencionales no corrigen los defectos en el número de células musculares cardiacas y el pronóstico de la insuficiencia cardiaca congestiva sigue siendo malo. Siguen existiendo necesidades específicas de nuevas estrategias para mejorar la regeneración cardiaca y sustituir los cardiomiocitos tras una lesión cardiaca o cardiopatía. La existencia, en el corazón de los mamíferos adultos, de capacidades proliferativas de los cardiomiocitos, bajas pero que pueden detectarse, (Bergmann O, et al. (2009), Science, 324:98-102) ha desplazado el objetivo de la terapia regenerativa hacia nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la promoción de la reentrada en el ciclo celular de los cardiomiocitos maduros. Las pruebas recientes que demuestran que el potencial de renovación de los cardiomiocitos de los mamíferos se pierde poco después del nacimiento apoyan firmemente la hipótesis de que es esencial conocer en detalle la regulación de la proliferación fetal de los cardiomiocitos para identificar objetivos de reparación y regeneración cardiaca en cardiopatías congénitas y adquiridas.

El documento WO 00/38518 divulga usos de vectores virales adenoasociados recombinantes para administrar genes a cardiomiocitos con el fin de tratar o mejorar afecciones cardiovasculares, en los que la molécula expresada eficaz terapéuticamente puede ser FGF-1, FGF-2, FGF-5, VEGF o HIF-1.

Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de ningún tratamiento eficaz destinado a promover la reentrada al ciclo celular de los cardiomiocitos maduros.

Los inventores han descubierto recientemente un papel de la señalización del FGF10 en la regulación de la proliferación de cardiomiocitos tanto fetales como en adultos (Rochais F, et al. 2014, Cardiovasc Res, 104:432-42). El papel de *Fgf10* en el control de la proliferación de los cardiomiocitos fetales se descubrió utilizando cortes de corazón y cultivos primarios de células cardiacas procedentes de embriones de tipo silvestre (WT) y knock-out (deficientes) en *Fgf10*. Además, utilizando un modelo de ratón transgénico inducible, la sobreexpresión de *Fgf10* produjo un aumento de la proliferación de cardiomiocitos. Sin embargo, este estudio no investigó el papel del FGF10 en la patogénesis de las cardiopatías, en particular el infarto de miocardio. Por tanto, no era seguro que el FGF10 fuera realmente un objetivo de elección para el tratamiento de las cardiopatías.

Sumario de la invención

Inesperadamente, en el presente documento se demuestra, utilizando un modelo de ratón de infarto de miocardio, que el FGF10 promueve específicamente la proliferación de los cardiomiocitos tras un infarto de miocardio, lo que conduce a la regeneración cardiaca. Además, los resultados muestran que el FGF10 también es necesario para impedir la infiltración de fibrosis cardiaca y para reprimir la inflamación prolongada, ambos parámetros participan fuertemente en la remodelación cardiaca deletérea después del infarto; de este modo se demuestra que el FGF10 es crucial para la reparación cardiaca en condiciones patológicas. Por último, los resultados presentados demuestran claramente que el FGF10 es necesario para preservar el funcionamiento cardiaco tras un infarto de miocardio. De esta manera, éste es el primer informe que demuestra el efecto protector de la vía de señalización del FGF10 en el contexto de las cardiopatías. La invención proporciona, por tanto, una potente estrategia para el tratamiento de cardiopatías, incluido el infarto de miocardio.

En consecuencia, la presente invención se refiere a FGF10, o a un vector que codifica *FGF10* para su uso en un método para tratar una cardiopatía que se selecciona entre infarto de miocardio, cardiopatía isquémica, fibrosis cardiaca o inflamación cardiaca.

En particular, el FGF10, o un vector que lo codifique, se utiliza para mejorar la reparación y regeneración cardiaca (sustitución de cardiomiocitos dañados) en particular en un paciente que presenta una cardiopatía como se definió anteriormente, como infarto de miocardio y cardiopatía isquémica (por ejemplo, cardiopatía isquémica crónica). Gracias a la invención, el FGF10, o un ácido nucleico que codifica el mismo puede utilizarse para reparar y/o regenerar tejido cardiaco de dicho paciente. En otra realización, la invención proporciona FGF10, o un vector que codifica el

mismo, para su uso en la prevención de la insuficiencia cardiaca congestiva.

Leyendas de las figuras

Figura 1: La expresión de ***Fgf10*** aumenta en los cardiomiocitos tras un infarto de miocardio. (A) Vista de montaje completo de medio corazón de ratones *Fgf10-LacZ* operados en condiciones simuladas (SHAM) y con infarto de miocardio (IM), 21 días (21d) después del IM, mostrando células X-gal$^+$ (cabezas de flecha). (B) Experimento de qRT-PCR en corazones con IM del ventrículo izquierdo que muestra un aumento de la expresión de *Fgf10* a 1 día (1d), 5 días (5d) y 21 días (21d) después del IM. (C) Cortes criostáticos de corazones *Fgf10-LacZ*-IM que muestran núcleos X-gal$^+$ (punta de flecha) en cardiomiocitos (células que expresan α-actinina). **, 0,001<p<0,01; ***, p<0,001; prueba t de Student.

Figura 2: La disminución de la expresión de ***Fgf10*** tras el nacimiento se correlaciona con la pérdida de capacidades regenerativas. Experimentos de qRT-PCR en tejidos del ventrículo derecho e izquierdo de fetos de ratones (E18) y posnatales (P2) de tipo silvestre. Ventrículo derecho (VD), ventrículo izquierdo (VI). *p<0,05; prueba t de Student.

Figura 3: La disminución de la dosis *de Fgf10* empeora la remodelación del corazón y la función cardiaca tras un infarto de miocardio. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. Tres semanas después de la cirugía, se midió la relación peso del corazón/longitud de la tibia (A) y se evaluaron la fracción de eyección **(B),** la fracción de acortamiento **(C)** y el volumen diastólico del ventrículo izquierdo **(D)** mediante ecocardiografía (CERIMED, Marsella). *p<0,05; **, 0,001<p<0,01; ***, p<0,001; prueba t de Student.

Figura 4: La disminución de la dosis de *Fgf10* empeora la remodelación patológica del corazón tras un infarto de miocardio. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. Se realizaron experimentos de qRT-PCR en tejidos del ventrículo izquierdo tres semanas después del infarto de miocardio (IM-21d).

Figura 5: La disminución de la dosis de *Fgf10* deteriora considerablemente las capacidades máximas de proliferación de los cardiomiocitos. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. **(A)** Tres semanas después del IM, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cortes de parafina para evaluar la proliferación de los cardiomiocitos (MF20$^+$; puntas de flecha amarillas) y no cardiomiocitos (MF20$^-$; flechas blancas) (Ki67$^+$). (**B**) Se observó una afectación significativa de los niveles de proliferación de los cardiomiocitos en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM. **(C)** No se detectaron alteraciones en la proliferación de no miocitos. (**D-G**) La proliferación se evaluó 5 días después del IM. **(D)** La inmunofluorescencia con el anticuerpo PH3 reveló una afectación significativa de los niveles de proliferación de cardiomiocitos en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM. **(E)** No se detectaron alteraciones en la proliferación de no miocitos. (F) La inmunofluorescencia con el marcador de citocinesis Aurora B confirmó la afectación de la división celular de los cardiomiocitos en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM (G). ns, no significativo; *, p<0,05; **, 0,001<p<0,01; prueba t de Student.

Figura 6: La disminución de la dosis de *Fgf10* afecta las capacidades máximas de proliferación de los cardiomiocitos a través de la regulación al alza de los niveles de expresión de *p27*^{kip1} y *αMHC*. Ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ fueron sometidos a infarto de miocardio. Se realizaron experimentos de qRT-PCR en tejidos del ventrículo izquierdo 5 días **(A)** y tres semanas después del infarto de miocardio **(B).** ns, no significativo; ***, p<0,001; prueba t de Student.

Figura 7: La disminución de la dosis *de Fgf10* no influye en la supervivencia celular después de un IM. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. (A) Cinco días después del IM, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cortes de parafina para evaluar la apoptosis de cardiomiocitos (MF20$^+$; puntas de flecha amarillas) y no cardiomiocitos (MF20$^-$; flechas blancas) (Caspasa 3$^+$). **(B-C)** No se detectaron alteraciones de la apoptosis. ns, no significativo; prueba t de Student.

Figura 8: La disminución de la dosis *de Fgf10* no influye en la hipertrofia de los cardiomiocitos. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. **(A)** Cinco días (IM-5d) y tres semanas (IM-21d) después del infarto de miocardio, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cortes de parafina para evaluar el área de la sección transversal de los cardiomiocitos (WGA-TRITC). **(B)** No se detectaron diferencias en el tamaño de los cardiomiocitos. ns, no significativo; prueba t de Student.

Figura 9: La disminución de la dosis *de Fgf10* empeora la infiltración de fibrosis 3 semanas después del infarto de miocardio. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. 21 días después del infarto de miocardio, la tinción histológica con rojo sirio realizada en cortes de parafina reveló que, en comparación con los ratones WT-IM **(A),** los ratones *Fgf10+/-*-IM **(B)** mostraron una mayor deposición de fibrosis. Los experimentos de qRT-PCR realizados en tejidos del ventrículo izquierdo 21 días después del infarto de miocardio mostraron niveles regulados al alza de los genes *CollA* **(C)** y *Col3A1* **(D)** en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM.

Figura 10: La disminución de la dosis *de Fgf10* empeora la infiltración de fibrosis 5 días después del infarto de miocardio. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. **(A)** Cinco días después del IM, se realizaron experimentos histológicos en cortes de parafina para evaluar la infiltración de fibrosis (tinción con rojo sirio). **(B)** La cuantificación bioinformática reveló que los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM mostraron una mayor deposición de fibrosis en comparación con los ratones WT-IM. Los experimentos de qRT-PCR realizados en tejidos del ventrículo izquierdo mostraron niveles regulados al alza de *CollA* **(C)** y *Col3A1* **(D)** en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM. *p<0,05; ***, p<0,001; prueba t de Student.

Figura 11: La disminución de la dosis de *Fgf10* empeora la respuesta inflamatoria después de un infarto de miocardio. Se sometieron ratones adultos WT y *Fgf10*$^{+/-}$ a infarto de miocardio. 5 días después del IM, los experimentos de qRT-PCR realizados en tejidos del ventrículo izquierdo revelaron niveles de *Tnf*α regulados al alza en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$-IM en comparación con los ratones WT-IM. *p<0,05; prueba t de Student.

Figura 12: La regulación al alza de los niveles de *Fgf10* después de un infarto de miocardio preserva la función cardiaca. Se sometieron ratones R26R-*RTTA/Tet(O)-Fgf10* a infarto de miocardio. Un día después del IM, los ratones fueron alimentados con comida normal o suplementada con doxiciclina necesaria para inducir la sobreexpresión de *Fgf10*. Experimentos ecocardiográficos realizados 21 días después del infarto de miocardio revelaron que la regulación al alza de *Fgf10* preserva la función cardiaca después del infarto.

Figura 13: La regulación al alza de *Fgf10* después de un infarto de miocardio preserva la función y la remodelación cardiacas. Se sometieron ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10* a infarto de miocardio. Un día después del IM, los ratones fueron alimentados con comida normal o suplementada con doxiciclina necesaria para inducir la sobreexpresión de *Fgf10*. Los experimentos ecocardiográficos realizados 21 días después del IM revelaron que la regulación al alza de *Fgf10* preserva la fracción de eyección, la fracción de acortamiento y el volumen sistólico del ventrículo izquierdo después del IM. ns, no significativo; *, p<0,05; **, 0,001<p<0,01; ***, p<0,001; prueba t de Student.

Figura 14: La regulación al alza de los niveles de *Fgf10* después de un infarto de miocardio favorece la proliferación de los cardiomiocitos. Se sometieron ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10* a infarto de miocardio. Un día después del IM, los ratones fueron alimentados con comida normal (CTRL) o suplementada con doxiciclina (DOX) necesaria para inducir la sobreexpresión de *Fgf10*. Tres semanas después del IM, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cortes de parafina para evaluar la proliferación de cardiomiocitos (MF20^{+}) (Ki67^{+} y Aurora B^{+}). Se observó un aumento significativo en los niveles de proliferación de los cardiomiocitos **(A)** y la citocinesis de los cardiomiocitos **(B)** en ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento DOX en comparación con ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento CTRL. **(C)** Los experimentos de inmunofluorescencia en cortes de parafina realizados para evaluar el área de la sección transversal de los cardiomiocitos (WGA-TRITC) revelaron una disminución del tamaño de los cardiomiocitos en los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento DOX en comparación con los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento CTRL. *p<0,05; **, 0,001<p<0,01; prueba t de Student.

Figura 15: La regulación al alza de los niveles de *Fgf10* después de un infarto de miocardio impide la infiltración de fibrosis 3 semanas después de un infarto de miocardio. Se sometieron ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10* a infarto de miocardio. Un día después del IM, los ratones fueron alimentados con comida normal (CTRL) o suplementada con doxiciclina (DOX) necesaria para inducir la sobreexpresión de *Fgf10*. Pasados 21 días después del IM, la tinción histológica con rojo sirio realizada en cortes de parafina reveló que, en comparación con los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos CTRL **(A)**, los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos DOX **(B)** mostraban una menor deposición de fibrosis. **(C)** Los experimentos de qRT-PCR realizados en tejidos del ventrículo izquierdo 21 días después del infarto de miocardio mostraron niveles regulados a la baja del gen *Col6A5* en ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento DOX en comparación con ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento CTRL.

Figura 16: Los niveles regulados al alza de *FGF10* en el corazón humano con insuficiencia se correlacionan con una mayor proliferación de cardiomiocitos. Se tomaron muestras del ventrículo derecho (VD), la zona remota (ZR), la zona limítrofe (ZL) y el área infartada (AI) de corazón humano con insuficiencia explantado de 6 pacientes (A-F). **(A)** Los experimentos de qRT-PCR revelaron niveles de *FGF10* regulados al alza en la ZL (3 pacientes de 6) y el AI (4 pacientes de 6). Los experimentos de inmunofluorescencia con el marcador del ciclo celular Ki67 mostraron que los niveles elevados de *FGF10* se correlacionan con una mayor proliferación de cardiomiocitos en la ZL **(B)** y el AI (C).

Figura 17: Los niveles regulados al alza de *FGF10* en el corazón humano con insuficiencia se correlacionan con un menor tamaño de los cardiomiocitos. Se tomaron muestras de corazón humano con insuficiencia explantado de 6 pacientes (A-F). Los experimentos de inmunofluorescencia con el marcador de membrana celular WGA mostraron que la reducción del tamaño celular de los cardiomiocitos se correlaciona en la zona limítrofe con **(A)** el aumento de la proliferación de cardiomiocitos y **(B)** los niveles elevados de *FGF10* se correlacionan.

Figura 18: Los niveles regulados al alza de *FGF10* en el corazón humano con insuficiencia se correlacionan con una menor infiltración de fibrosis. Se tomaron muestras de corazón humano con insuficiencia explantado de 6 pacientes (A-F). La tinción histológica con rojo sirio **(A)** y los experimentos de qRT-PCR **(B)** mostraron que los niveles elevados de FGF10 se correlacionan con una menor infiltración de fibrosis en la zona limítrofe.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una estrategia novedosa para el tratamiento de una cardiopatía como se definió anteriormente. Se basa en el hallazgo inesperado de que el FGF10 es capaz de promover la reentrada de los cardiomiocitos al ciclo celular en el corazón de ratón.

El factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) es una proteína que desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular y la diferenciación celular. En particular, es necesario para la morfogénesis de la ramificación normal. De acuerdo con la invención, el FGF10 puede proceder de cualquier especie. Sin embargo, en una realización preferida, en particular para la terapia en humanos, el FGF10 procede de primates tales como primates no humanos o es FGF10 humano. En una realización particular, FGF10 es FGF10 humano (como FGF10 con número de acceso de Uniprot 015520).

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a FGF10 o a un vector que codifica FGF10, para usar como medicamento.

La invención se basa en la administración de FGF10 al tejido cardiaco de un sujeto que necesita el mismo.

Un sujeto que necesita FGF10 es un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano, que padece o tiene el riesgo de padecer una cardiopatía como se definió anteriormente. El sujeto padece una cardiopatía como se definió anteriormente, tal como infarto de miocardio o cardiopatía isquémica (por ejemplo, cardiopatía isquémica crónica).

En el contexto de la presente invención, la expresión "agente terapéutico" denota la proteína FGF10 o el vector que codifica la misma, siendo todos ellos moléculas o complejos que pueden utilizarse en la presente invención.

En una realización particular de la invención, el agente terapéutico es FGF10 o un vector que codifica FGF10.

La administración puede lograrse de acuerdo con una serie de medios, como la administración de una proteína recombinante o un vector de expresión.

En una realización particular, la administración se consigue administrando una proteína recombinante como la proteína FGF10. En una realización particular, la proteína recombinante es la proteína FGF10.

En otra realización particular, la administración se consigue administrando un vector de expresión, tal como un vector que codifica FGF10. En una realización particular, el vector de expresión codifica FGF10.

De acuerdo con la presente invención, un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido o un vector viral, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente útil para la terapia en el contexto de la presente invención, unido operativamente a un promotor. Un "vector de expresión que codifica FGF10" comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica FGF10, unida operativamente a un promotor. Basarse en vectores, tal como en vectores virales, tiene la ventaja de dar lugar a la expresión constitutiva del agente codificado, como el FGF10, a partir de una célula o tejido de interés, en particular a partir de células cardiacas.

En una realización particular, el promotor es un promotor funcional en células cardiacas, tal como un promotor ubicuo (por ejemplo el promotor CMV) o un promotor específico del corazón (como los promotores αMHC y TnT).

Los vectores virales útiles en la práctica de la invención incluyen, sin limitación, vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores lentivirales y vectores AAV. En una realización particular, el vector viral es un vector AAV. En una realización más particular, el vector AAV se selecciona del grupo que consiste en un vector AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 y AAVM41.

La administración del fármaco puede realizarse por una serie de vías, por ejemplo por vía oral, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal, o preferentemente por vía intravascular (tal como intraarterial o intravenosa) o mediante inyección en el corazón del sujeto, tal como por inyección intracardiaca o intracoronaria.

El terapéutico para usar de acuerdo con la presente invención puede estar en forma de una composición inyectable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del terapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos, Europea u otra farmacopea, reconocido de manera general para usarse en animales y seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Dichos vehículos farmacéuticos

pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin se describen ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del terapéutico, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración adecuada al sujeto.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravascular, tal como la administración intravenosa o intraarterial, a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravascular son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local como la lidocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección.

El terapéutico se utiliza en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad del terapéutico que será eficaz en el tratamiento de una cardiopatía como se definió anteriormente puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vivo* y/o *in vitro* para ayudar a predecir las cantidades óptimas de la dosis. La cantidad precisa que se empleará dependerá también de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad y debe decidirse de acuerdo con el criterio de un médico experto y las circunstancias de cada paciente. La cantidad del terapéutico administrada al sujeto que la necesita variará basándose en varios factores, incluyendo, sin limitación, la vía de administración, la enfermedad específica tratada, la edad del sujeto o el nivel de proteína requerido, o el nivel de expresión necesario para lograr el efecto terapéutico. Un experto en la materia puede determinar fácilmente, basándose en sus conocimientos en este campo, el intervalo de dosis necesario basándose en estos factores y otros.

El término "tratamiento" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquier régimen que pueda beneficiar a un animal, en particular a un mamífero, más particularmente a un sujeto humano. Por consiguiente, un tratamiento puede incluir efectos curativos, paliativos o profilácticos. En consecuencia, el tratamiento terapéutico y profiláctico incluye la mejoría de los síntomas de una cardiopatía concreta, como se definió anteriormente, o la prevención o reducción del riesgo de aparición de una cardiopatía concreta, tal como se ha definido anteriormente. El término "profiláctico" puede considerarse como la reducción de la gravedad o la aparición de una afección concreta. "Profiláctico" también incluye la prevención de la reaparición de una afección concreta en un paciente al que se le haya diagnosticado previamente dicha afección. "Terapéutico" también puede incluir la reducción de la gravedad de una afección existente.

El agente terapéutico de la invención puede utilizarse en el tratamiento de una cardiopatía como se definió anteriormente. Las cardiopatías particulares que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, el infarto o la cardiopatía isquémica (por ejemplo, la cardiopatía isquémica crónica). Además, la invención puede aplicarse para tratar la fibrosis cardiaca o la inflamación del corazón. Además, la invención puede aplicarse para la prevención de la insuficiencia cardiaca congestiva. En otro aspecto, el agente terapéutico es para usarse en el tratamiento de cualquier consecuencia de una cardiopatía como se definió anteriormente. Las consecuencias particulares de una cardiopatía incluyen, sin limitación, la fibrosis cardiaca y la inflamación del corazón.

La administración del agente terapéutico se realiza preferentemente lo antes posible tras la aparición de la cardiopatía. En particular, la administración puede realizarse el mismo día del infarto, o el día en que el paciente recibe atención médica por una cardiopatía como la definida anteriormente o se le diagnostica una cardiopatía como se definió anteriormente. En una realización particular, la administración puede realizarse hasta la normalización de los parámetros fisiológicos cardiacos, aunque la administración puede realizarse durante más tiempo. En una realización particular, el agente terapéutico se administra lo antes posible tras la aparición de la cardiopatía como se definió anteriormente y hasta la normalización de los parámetros fisiológicos cardiacos.

La administración del agente terapéutico, en particular de la proteína FGF10 o de un vector que codifica la misma, puede incluir administraciones únicas o múltiples. En particular, la administración puede realizarse, por ejemplo, una vez al día, una vez a la semana o una vez al mes durante un tiempo suficiente para que el tratamiento de la enfermedad sea eficaz. En una realización particular, cuando la enfermedad es un infarto de miocardio, el agente terapéutico, por ejemplo una proteína (tal como FGF10), se administra poco tiempo después del día del infarto. En particular, la administración puede realizarse el mismo día del infarto de miocardio, o un día después del episodio de infarto de

miocardio, o puede realizarse el mismo día en que el paciente que lo necesita recibe atención médica por una cardiopatía como se definió anteriormente o se le diagnostica una cardiopatía como se definió anteriormente, o al día siguiente de la atención médica o el diagnóstico. En otra realización particular, la administración del agente terapéutico (tal como la administración de una proteína, por ejemplo la administración de FGF10) se realiza diariamente a partir del día del infarto (también denominado día 0) o a partir del día de la atención médica o del diagnóstico del paciente. En otra realización, la administración del agente terapéutico (tal como la administración de una proteína, por ejemplo la administración de FGF10) se realiza diariamente a partir del día siguiente al día del infarto (es decir, en el día 1) o a partir del día siguiente a la atención médica o diagnóstico del paciente, o a partir de 2 días (es decir, en el día 2) después del día del infarto o después del día de la atención médica o diagnóstico del paciente. En una variante de esta realización, la administración terapéutica (tal como la administración de una proteína, por ejemplo la administración de FGF10) se realiza diariamente a partir del día 0, del día 1 o del día 2 después del infarto de miocardio o a partir del día de la atención médica o del diagnóstico del paciente. En una realización particular, la administración es discontinua, es decir, la administración no se realiza diariamente. En otra realización particular, la administración se realiza diariamente durante la fase de tratamiento. En otra realización, el tratamiento es un tratamiento agudo, realizado durante un corto periodo de tiempo (tal como durante varios días, por ejemplo durante no más de 30 días, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o no más de 10 días). En otra realización particular, el tratamiento es un tratamiento crónico, en donde la administración del agente terapéutico se realiza durante al menos varias semanas, varios meses o incluso varios años.

En otro aspecto, la invención describe un método para preparar un trasplante de corazón, que comprende sumergir un corazón que será sometido a un trasplante en un medio que contiene FGF10 o un activador de la vía de señalización del FGF10. Gracias a este método, el corazón que se va a trasplantar se conserva y activa gracias al medio en el que se sumerge. El medio puede comprender además uno o más componentes como sales (por ejemplo NaCl o KCl), y otros factores de crecimiento.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas de ratones transgénicos y genotipado. Los ratones *Fgf10*$^{+/-}$, *Fgf10-LacZ, Rosa26-rtTA* y *Tet(O)-Fgf10* se mantuvieron en fondos genéticos mixtos C57Bl/6, CD1 y FVB/N consanguíneos, respectivamente. La expresión inducible de *Fgf10* se consigue alimentando secuencialmente a los ratones con comida que contiene doxiciclina (625 mg/kg DOX, Envigo). Para el sacrificio de los ratones se utilizó el método de dislocación cervical. El cuidado de los animales se ajustó a las directrices nacionales e institucionales. Los ratones fueron genotipados utilizando ADN extraído de las puntas de las colas de los adultos. Las muestras se lisaron en tampón de lisis (50 mM de KCL, 10 mM de Tris, 2 mM de $MgCl_2$, 0,1 mg/ml de gelatina, 0,45 % de NP40 al 10 %, 0,45 % de tween 20) con Proteinasa K al 1 % (Roche, 11733400) durante 2 horas a 55 °C para extraer el ADN y, a continuación, se procedió a la inactivación térmica de la Proteinasa K a 95 °C durante 15 minutos. La PCR se realizó utilizando los cebadores específicos que se indican a continuación. Las etapas de la PCR incluyen una predesnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94 °C durante 45 segundos), hibridación (60 °C durante 45 segundos) y extensión (72 °C durante 45 segundos) seguidos de una etapa final de extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa para detectar los fragmentos amplificados específicos. Cebadores para el genotipado (secuencia 5'-3'):

Fgf10$^{+/-}$-F1 CTTCCAGTATGTTCCTTCTGATGAGAC;
Fgf10$^{+/-}$-F2 TACGGACAGTCTTCTTCTTGGTCCC;
Fgf10$^{+/-}$-R GAGCTTGCTGGGGGAAACTTCCTGACTAGG;
Fgf10-LacZ-F ATCCTCTGCATGGTCAGGTC;
Fgf10-LacZ-R CGTGGCCTGATTCATTCC.
Ratones *Rosa26-rtTA*:

Directo AAGTCGCTCTGAGTTGTTATCAG;
WT-Rev GGAGCGGGAGAAATGGATATGA;
Mut-Rev CGGGTTGTTAAACCTTCGATTCCG.

Ratones Tet(O)-Fgf10:

Directo GACGCCATCCACGCTGT;
Rev TGCTGCCAGTTAAAAGATGC.

Modelo de infarto de miocardio. Los ratones adultos fueron sedados con isoflurano y, tras la intubación endotraqueal, se pusieron en respiración artificial. Tras la incisión cutánea, se practicó una toracotomía lateral en el cuarto espacio intercostal mediante disección roma de los músculos intercostales. Después de la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (con suturas de seda no absorbibles de 8,0), las incisiones de la pared torácica y de la piel se suturaron con suturas de seda no absorbibles de 6,0 y absorbibles de 4,0, respectivamente. A continuación, los ratones fueron calentados durante varios minutos hasta su recuperación.

Ecocardiografía. La función cardiaca se evaluó en el CERIMED-Marsella, mediante ecocardiografía transtorácica realizada en ratones sedados con isoflurano utilizando un Vevo 2100 de VisualSonics. Todas las mediciones ecocardiográficas se realizaron a ciegas.

Procesamiento de los tejidos. Los corazones se diseccionaron y analizaron utilizando un microscopio de disección estereoscópico Zeiss Lumar. Para la tinción con X-gal, se extrajeron los corazones y se fijaron durante 3 horas en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se lavaron ampliamente en PBS 1X y se tiñeron durante 12 horas a 37 °C en una solución con 4 mg/ml de X-gal. Tras la tinción, las muestras se lavaron en PBS, se posfijaron en PFA 4 % y se observaron con un estereomicroscopio Zeiss Lumar.

Para la inmunotinción y la tinción con rojo sirio, los corazones se fijaron en PFA al 4 % durante 3 horas y se lavaron ampliamente en PBS 1X. La inclusión en parafina se realizó tras la deshidratación utilizando una serie graduada de etanol (50, 70, 90 y 100 %), dos lavados con xileno y tres lavados con parafina (Paraplast X-tra, Sigma P3808). La crioconservación se consiguió incubando los corazones en una serie de sacarosa (15 y 30 %) y embebiéndolos en OCT (VWR, 361603E).

Tinción con rojo sirio en cortes de parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 13 µm y se montaron en portaobjetos tratados con polilisina. Tras desparafinar (xileno, 2 veces) y rehidratar en una serie de etanol (100, 90, 70, 50 % y H_2O), los cortes de parafina se incubaron en una solución de rojo sirio al 0,1 % disuelta en solución acuosa saturada de ácido pícrico durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se lavaron 3 veces en agua acidificada (ácido acético al 0,5 %), se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol (70 %, 90 % y 100 %) y se aclararon en xileno. Los cortes se montaron en medio resinoso (Entellan). Los componentes con colágeno y sin colágeno se tiñeron de rojo y naranja, respectivamente.

Inmunofluorescencia en cortes de parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 13 µm y se montaron en portaobjetos tratados con polilisina. Tras desparafinar (xileno, 2 veces) y rehidratar en una serie de etanol (100, 90, 70, 50 % y H_2O), se recuperó el antígeno hirviendo las muestras en Vector Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories, H-3300) durante 15 minutos. Los portaobjetos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos y se lavaron con PBS. Para el bloqueo, las muestras se incubaron durante al menos 1 hora en TNB (0,1 M de Tris-HCl, 0,15 M de NaCl, 0,5 % (p/v) de reactivo de bloqueo (PerkinElmer FP1020) antes de la incubación con anticuerpos en TNB durante toda la noche a 4 °C. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (PBST) al 0,05 %. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en TNB durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados en PBST y los núcleos se contrateñieron con Hoescht (1/1000) y se montaron con FluoroMount (Southern Biotech). Los cortes se visualizaron utilizando un microscopio fluorescente Zeiss AxioImager con un módulo Apotome.

Inmunofluorescencia en cortes congelados. Se obtuvieron cortes criostáticos seriados de 13 µm a partir de corazones embebidos en OCT. Los cortes se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se secaran y después se lavaron con PBS. Los portaobjetos se incubaron durante al menos una hora en solución de bloqueo (3 % de BSA-0,05 % de saponina) antes de la incubación con anticuerpos primarios en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. A continuación se realizaron 3 lavados con PBST. Después se realizaron 3 lavados en PBST. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados en PBST. Los núcleos se contratiñeron con Hoescht (1/1000) y se montaron con FluoroMount (Southern Biotech). Los cortes se visualizaron utilizando un microscopio fluorescente Zeiss AxioImager con un módulo Apotome.

Anticuerpos primarios: nombre/ especie/ dilución/ referencias:

α-actinina/ ratón/ 1/500/ Sigma A7811
Aurora B/ conejo/ 1/400/ Abcam ab2254
Caspasa 3/ conejo/ 1/100/ Cell signalling 9665
β-galactosidasa/ conejo/ 1/500/ MP Biomedicals 0855976
Ki-67/ rata/ 1/25/ Dako M7249
MF20 cadena pesada de miosina sarcomérica/ ratón/ 1/50/ DSHB
Fosfo histona H3/ conejo/ 1/400/ Upstate cell signalling 06-570
WGA-Alexa Fluor 555/ 1/50/ Thermofisher W32464.

Anticuerpos secundarios: nombre/ especie/ dilución/ referencias:

Alexa Fluor 488 anti-conejo/ burro/ 1/500/ ThermoFisher A-21206
Alexa Fluor 488 anti-ratón/ burro/ 1/500/ ThermoFisher A-21202
Alexa Fluor 647 anti-ratón/ burro/ 1/500/ ThermoFisher A-31571
Alexa Fluor 488 anti-rata/ burro/ 1/500/ ThermoFisher A-21208
Alexa Fluor 647 anti-rata/ cabra/ 1/500/ ThermoFisher A-21247.

PCR cuantitativa en tiempo real. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Trizol LS (Life technologies). El ADNc de la primera cadena se sintetizó utilizando la Transcriptasa Inversa Maxima (Life technologies). La qRT-PCR se realizó utilizando los siguientes cebadores y Luminaris qPCR SuperMix (Life technologies) y un Light Cycler 480 de Roche. Cada experimento se realizó por duplicado y se normalizó con respecto a Hprt. Los cebadores de la RT-PCR cuantitativa son los siguientes:

ANF-F CAACACAGATCTGATGGATTTCA,
ANF-R CCTCATCTTCTACCGGCATC
BNP-F GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC,
BNP-R AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
Col1A-F CATGTTCAGCTTTGTGGACCT,
ColA-R GCAGCTGACTTCAGGGATGT
Col3A1-F TGGTCCTGCTGGAAAGGAT,
Col3A-R GAGGTCCAGGCAGTCCAC
Fgf10-F GAGAAGAACGGCAAGGTCAG,
Fgf10-R TTTCCCCTTCTTGTTCATGG
Hprt-F CTGGTGAAAAGGACCTCTCG,
Hprt-R TGGCAACATCAACAGGACTC
p27kip1-F AACTAACCCGGGACTTGGAG,
p27kip1-R AGTAGAACTCGGGCAAGCTG
aMHC-F CCTCAAGCTCATGGCTACAC,
aMHC-R TTGCCTCCTTTGCCTTTACC
bMHC-F AGGCAAAGAAAGGCTCATCC,
bMHC-R TGGAGCGCAAGTTTGTCATA
TNFa-F AGCCTCTTCTCATTCCTGCTT,
TNFa-R ATGAGAGGGAGGCCATTTG.

Los inventores demuestran aquí el papel protector de la vía de señalización del FGF10 sobre la remodelación y la función cardiacas en el contexto del infarto de miocardio. De hecho, de forma inesperada, los inventores, utilizando un modelo de ratón de infarto de miocardio, demuestran por primera vez que el FGF10 promueve específicamente la proliferación de cardiomiocitos tras un infarto de miocardio, lo que conduce a la regeneración cardiaca. Además, muestran que el FGF10 también es necesario para prevenir la infiltración de fibrosis cardiaca y para reprimir la inflamación prolongada; ambos parámetros participan en gran medida en la remodelación cardiaca deletérea después del infarto. Por último, se demuestra claramente que el FGF10 es esencial para preservar el funcionamiento cardiaco tras un infarto de miocardio. De este forma, en conjunto, los inventores comprobaron que el FGF10 es crucial para la regeneración y reparación cardiaca en condiciones patológicas.

Para determinar el papel del FGF10 en condiciones patológicas, se sometió a ratones WT y *Fgf10-LacZ* de tres meses de edad a un infarto de miocardio mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Los ratones fueron sacrificados tres semanas después de la ligadura, se extrajeron los corazones y se tiñeron para X-gal, representativo de la expresión de *Fgf10* (Figura 1A). Los corazones de los animales sometidos a una operación en condiciones simuladas (Sham) casi no presentaban células X-gal$^+$ en el ventrículo izquierdo. En cambio, en los corazones con infarto de miocardio se detectaron múltiples células X-gal$^+$ agrupadas en racimos, lo que sugiere que la expresión de *Fgf10* está regulada al alza en condiciones patológicas (Figura 1A). Los experimentos de qRT-PCR en tejidos del ventrículo izquierdo de ratones WT-IM confirmaron los niveles regulados al alza de *Fgf10* en el ventrículo lesionado (**Figura 1B**). El análisis de cortes criostáticos de corazones con *Fgf10-LacZ*-IM mostró la presencia de células X-gal positivas en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo (**Figura 1C**). Todos estos resultados sugieren que, tras un infarto de miocardio, la expresión de *Fgf10* aumenta en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo.

Para comprobar si la fluctuación de los componentes de señalización de *Fgf10* se correlaciona con las capacidades regenerativas, se ha realizado el análisis del patrón de expresión de *Fgf10* durante la ventana regenerativa posnatal (P1-5) mediante experimentos de qRT-PCR (**Figura 2**). Los resultados muestran que la expresión de *Fgf10* disminuye tras el nacimiento, correlacionándose fuertemente con la pérdida de capacidades regenerativas, lo cual permite identificar a FGF10 como un posible regulador crucial de la regeneración cardiaca.

Para evaluar el papel del FGF10 en condiciones patológicas, se sometió a infarto de miocardio a ratones transgénicos con expresión reducida de (*Fgf10 Fgf10*$^{+/-}$) y, tres semanas después del infarto de miocardio, se investigó la función cardiaca *in vivo* mediante ecocardiografía (CERIMED, Marsella). En comparación con los ratones WT con infarto, los

ratones *Fgf10*$^{+/-}$ con infarto mostraron un empeoramiento de la remodelación (**Figura 3A**) y la función cardiacas, incluida la reducción de la fracción de eyección (**Figura 3B**), la reducción de la fracción de acortamiento (**Figura 3C**) y el aumento de la dilatación ventricular izquierda (**Figura 3D**).

Además, el análisis de marcadores clave de insuficiencia cardiaca mediante experimentos de qRT-PCR confirmó el empeoramiento de la remodelación patológica en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$ con infarto en comparación con los ratones WT con infarto (**Figura 4**).

A continuación se investigó el efecto protector del FGF10 tras un infarto de miocardio analizando la proliferación de células cardiacas en ratones adultos WT en comparación con *Fgf10*$^{+/-}$, tres semanas (**Figura** 5A-C) y 5 días (Figura 5D-G) después de un infarto de miocardio. El análisis de inmunofluorescencia de las capacidades proliferativas en puntos temporales tempranos y tardíos tras el IM, utilizando el marcador del ciclo pancelular Ki-67, el marcador mitótico PK3 y el marcador de citocinesis Aurora B, reveló una afectación significativa de la proliferación de cardiomiocitos en los ratones *Fgf10*$^{+/-}$ con infarto en comparación con los ratones WT-IM. **(**Figura **5B, 5D y 5G**). No se ha detectado ninguna alteración en la capacidad de proliferación de los no miocitos (**Figura 5C y 5E**).

Con el fin de descubrir el mecanismo molecular por el que el FGF10 es necesario en condiciones patológicas para mantener la proliferación máxima de cardiomiocitos, se evaluaron los niveles de expresión del marcador de diferenciación *αMHC* y del inhibidor del ciclo celular *p27*^{Kip1} en corazón WT-IM y *Fgf10*$^{+/-}$-IM. La qRT-PCR reveló que la disminución de la dosis de *Fgf10* mantiene niveles elevados de expresión de *αMHC* después de un IM (**Figura 6A**). Además, en comparación con los corazones WT-IM, se detectaron niveles más elevados de p27^{Kip1} en los corazones *Fgf10*$^{+/-}$-IM (**Figura 6B**). En conjunto, estos resultados demuestran que el FGF10 en condiciones patológicas es necesario para promover la desdiferenciación parcial de los cardiomiocitos y limitar la expresión de p27^{kip1}, dos requisitos críticos para la progresión del ciclo celular de los cardiomiocitos adultos.

A continuación se evaluó el impacto de la disminución de la dosis de *Fgf10* tras el IM sobre la mortalidad celular 5 días después del IM (**Figura 7**) y sobre la hipertrofia de cardiomiocitos 5 días y 3 semanas después del IM (**Figura 8**). No se detectaron alteraciones en la mortalidad celular (**Figuras 7B y 7C**) ni en el tamaño de los cardiomiocitos (**Figura 8B**).

A continuación, se realizó un análisis histológico mediante tinción con rojo sirio para determinar el papel del FGF10 en la progresión de la fibrosis cardiaca tras el IM. Tres semanas después del infarto, se observó un aumento de la infiltración de fibrosis en los corazones *FGF10*$^{+/-}$-IM en comparación con los corazones WT-IM (**Figuras 9A** y B), en correlación con una expresión génica de colágeno aumentada *(Col1A1*; **Figura 9C** y *Col3A;* **Figura 9D**).

El análisis histológico realizado a los 5 días tras el infarto de miocardio condujo a observaciones similares (**Figura 10**), lo que confirma claramente que el FGF10 es crucial para prevenir la acumulación temprana y tardía de fibrosis cardiaca tras el infarto de miocardio.

Por último, se evaluó el papel del FGF10 en la respuesta inflamatoria tras el infarto de miocardio (**Figura 11**). Los experimentos de qRT-PCR en corazones WT-IM y *Fgf10*$^{+/-}$-IM 5 días después del infarto de miocardio demuestran que, en condiciones patológicas, *Fgf10* es necesario para reprimir la expresión de *Tnfα* y, por tanto, limita la respuesta inflamatoria excesiva.

En conjunto, estos resultados demuestran que, al promover la proliferación de cardiomiocitos e impedir la infiltración de fibrosis, el FGF10 preserva el funcionamiento cardiaco tras un infarto de miocardio. De esta manera, para determinar si el aumento de los niveles de *FgF10* tras un infarto de miocardio protegería la función cardiaca, se obtuvo la sobreexpresión condicional temporal de *Fgf10* utilizando la línea de ratones *Rosa26-RTTA/Tet(O)-Fgf10* tratados con Doxiciclina un día después del infarto de miocardio. El análisis de la función cardiaca 3 semanas después del infarto de miocardio mediante ecocardiografía reveló que la regulación al alza de *Fgf10* es suficiente para mejorar la función cardiaca después del infarto de miocardio (**Figura 12**).

En conjunto, estos resultados demuestran que el FGF10 es necesario para preservar la función y la remodelación cardiacas tras un infarto de miocardio y apoyan el hecho de que el FGF10 es, por lo tanto, un objetivo clínicamente relevante para la regeneración cardiaca.

Ejemplo 2:

MATERIAL Y MÉTODOS

PCR cuantitativa en tiempo real en muestras humanas. El ARN total se extrajo utilizando el reactivo Trizol LS (Life technologies). El ADNc de la primera cadena se sintetizó utilizando la Transcriptasa Inversa Maxima (Life technologies). La qRT-PCR se realizó utilizando los siguientes cebadores y Luminaris qPCR SuperMix (Life technologies) y un Light Cycler 480 de Roche. Cada experimento se realizó por duplicado y se normalizó con respecto a PPIA e YWHAZ. Los cebadores de la RT-PCR cuantitativa son los siguientes:

COL1A2-F CTCGCTCAGCACCTTCTC
COL1A2-R CACTCTGGGTGGCTGAGTC
FGF10-F GAAGGAGAACTGCCCGTACA
FGF10-R GGCAACAACTCCGATTTCTACT
PPIA-F ATGCTGGACCCAACACAAAT
PPIA-R TCTTTCACTTTGCCAAACACC
YWHAZ-F GTGGACATCGGATACCCAAG
YWHAZ-R AAGTTGGAAGGCCGGTTAAT

RESULTADOS

Para determinar si el aumento de los niveles de *FgF 10* tras un infarto de miocardio protegería la función cardiaca, se obtuvo la sobreexpresión condicional temporal de *Fgf10* utilizando la línea de ratones *Rosa26-RTTA/Tet(O)-Fgf10* tratados con Doxiciclina un día después del infarto de miocardio IM. El análisis de la función cardiaca 3 semanas después del infarto de miocardio mediante ecocardiograma reveló que la regulación al alza de *Fgf10* es suficiente para preservar la función y la remodelación cardiacas después del infarto de miocardio (**Figura 13**). Estos resultados confirman los presentados en la **Figura 12.**

A continuación se investigó cómo el FGF10 sería protector tras el infarto de miocardio analizando la proliferación de células cardiacas en ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimento CTRL o DOX, tres semanas (**Figura 14**). El análisis de inmunofluorescencia de las capacidades proliferativas, utilizando el marcador del ciclo pancelular Ki-67 (**Figura 14A**) y el marcador de citocinesis Aurora B (**Figura 14B**), reveló que los niveles regulados de *Fgf10* tras el IM promueven la proliferación de cardiomiocitos. Además, la medición del área de la sección transversal de los cardiomiocitos (**Figura 14C**) reveló una disminución del tamaño celular de los cardiomiocitos en los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos DOX en comparación con los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos CTRL, lo que refuerza notablemente el efecto proproliferativo del FGF10 en los cardiomiocitos después de un infarto de miocardio.

A continuación, se realizó un análisis histológico mediante tinción con rojo sirio para determinar el impacto de los niveles de regulación al alza de *Fgf10* en la progresión de la fibrosis cardiaca tras el IM. Tres semanas después del infarto de miocardio se observó una disminución de la infiltración de fibrosis en los corazones de los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos DOX en comparación con los ratones *R26R-RTTA/Tet(O)-Fgf10*-IM tratados con alimentos CTRL (**Figura 15A** y B) correlacionada con una expresión génica *Col6A5* regulada a la baja (**Figura 15C**).

En conjunto, estos resultados demuestran que el FGF10 es necesario para preservar la función y la remodelación cardiacas tras un infarto de miocardio y apoyan el hecho de que el FGF10 es, por lo tanto, un objetivo clínicamente relevante para la regeneración cardiaca.

A continuación, se investigaron los niveles de expresión de *FGF10* en muestras de corazón humano con insuficiencia explantado. Nuestros resultados revelaron que se observan niveles elevados de *FGF10* en la zona limítrofe (ZL; 3 de 6 pacientes) y en el área infartada (AI; 4 de 6 pacientes) de pacientes con insuficiencia cardiaca terminal (**Figura 16A**). Los experimentos de inmunofluorescencia con el marcador del ciclo celular Ki-67 y la tinción WGA revelaron que, en ambas zonas, los niveles elevados de *FGF10* se correlacionan estrechamente con una mayor proliferación de cardiomiocitos (**Figura 16B** y C) y una disminución del tamaño celular de los cardiomiocitos (**Figura 17**). Además, el análisis histológico mediante tinción con rojo sirio (Figura 18A) y los experimentos de qRT-PCR (**Figura 18B**) demostraron que los niveles elevados de *FGF10* se correlacionan estrechamente con la reducción de la infiltración de fibrosis.

En conjunto, estos resultados demuestran claramente las capacidades regenerativas del FGF10 y apoyan el hecho de que el FGF10 podría ser un objetivo clínicamente relevante para la regeneración cardiaca en humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un agente seleccionado del grupo que consiste en una proteína FGF10 o un vector que codifica FGF10, para usar en un método para tratar una cardiopatía seleccionada entre infarto de miocardio, cardiopatía isquémica, fibrosis cardiaca e inflamación cardiaca, o para usar en un método para prevenir la insuficiencia cardiaca congestiva.

2. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cardiopatía es infarto de miocardio.

3. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el agente es para la administración por vía oral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intracardiaca o intravascular.

4. El agente para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente es para la administración en la vasculatura o en el corazón.

5. El agente para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el agente es una proteína FGF10 que se administrará diariamente desde el día del infarto de miocardio o desde el día en que el sujeto que necesita el tratamiento recibe atención médica para una cardiopatía, o se le diagnostica una cardiopatía.

6. El agente para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente es una proteína FGF10 que se administrará de forma aguda o crónica.

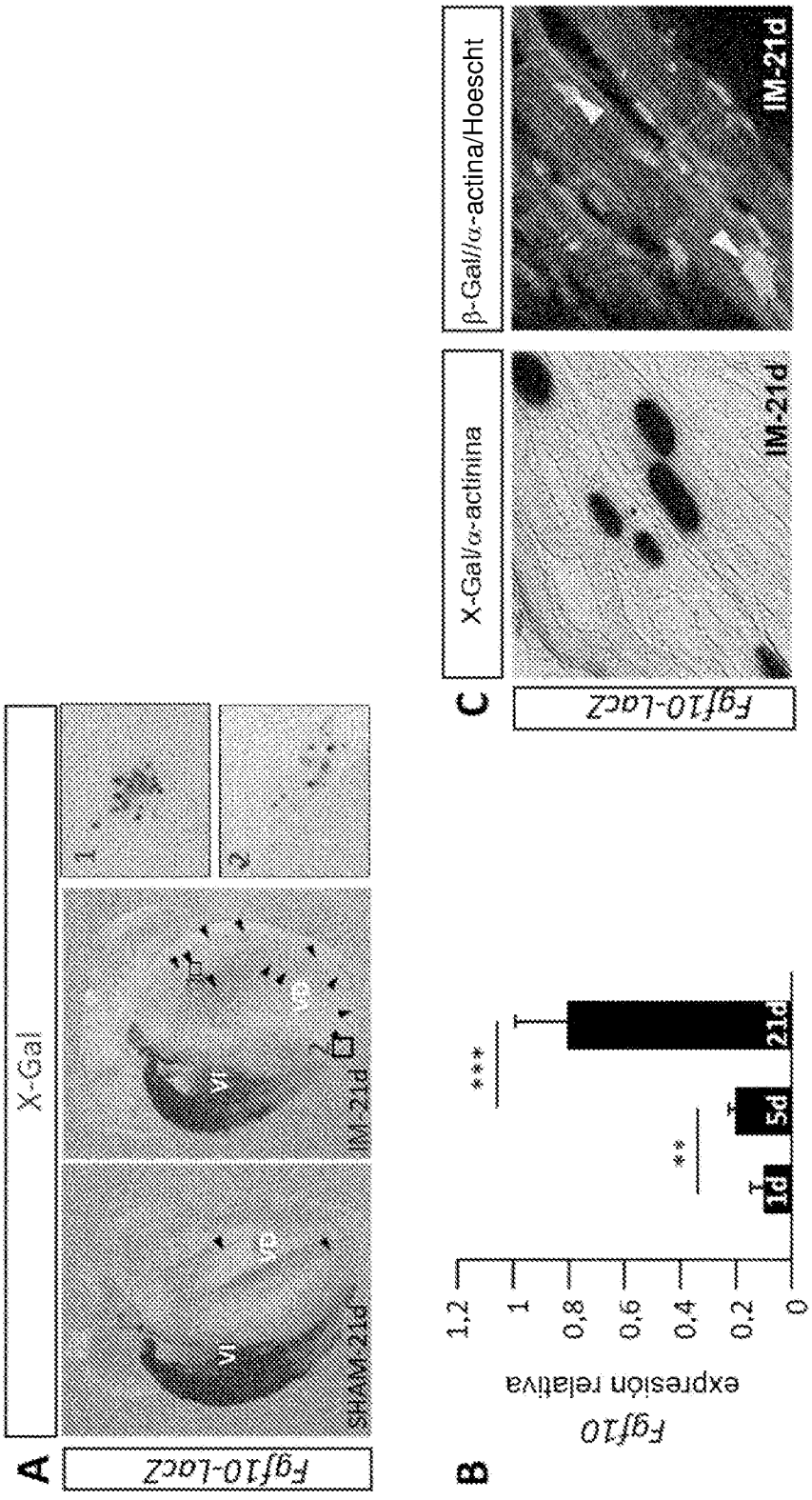
A
Fgf10-lacZ
X-Gal
SHAM-21d
IM-21d
VL
VR
1
2
B
Fgf10
expresión relativa
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
1d
5d
21d
**
***
C
Fgf10-lacZ
X-Gal/α-actinina
β-Gal/α-actina/Hoescht
IM-21d

FIGURA 1

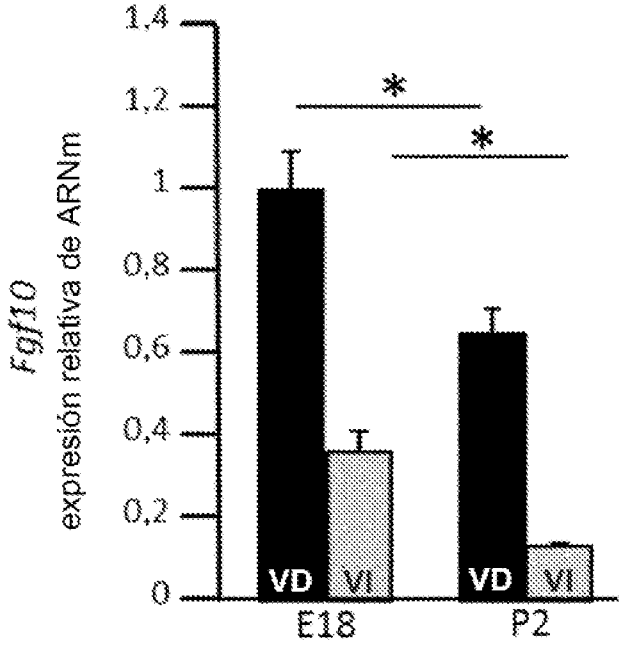
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Fgf10
expresión relativa de ARNm
*
*
VD
VI
VD
VI
E18
P2

FIGURA 2

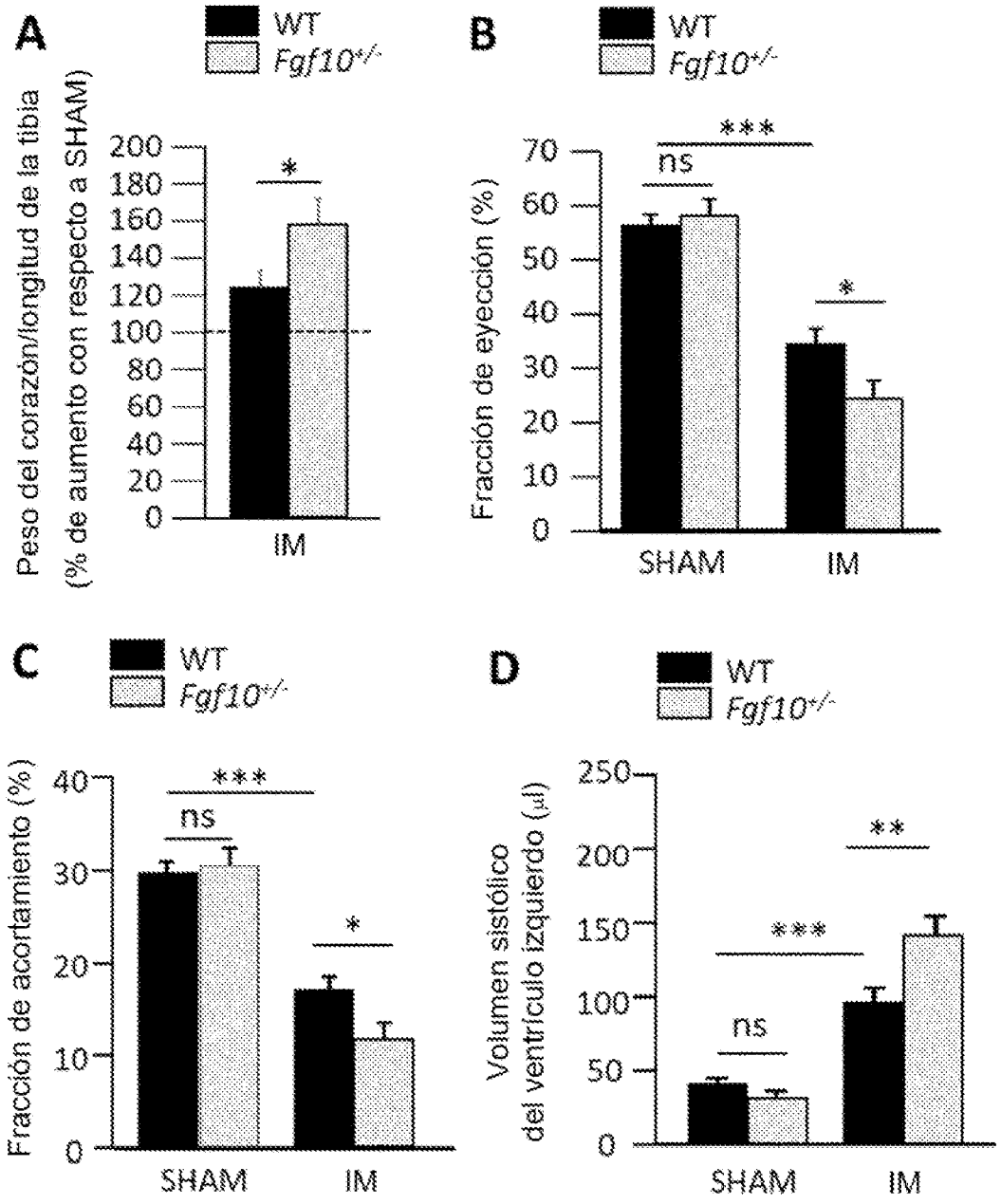
A
WT
Fgf10+/-
Peso del corazón/longitud de la tibia
(% de aumento con respecto a SHAM)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
IM
B
WT
Fgf10+/-
Fracción de eyección (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
***
ns
*
SHAM
IM
C
WT
Fgf10+/-
Fracción de acortamiento (%)
40
30
20
10
0
***
ns
*
SHAM
IM
D
WT
Fgf10+/-
Volumen sistólico
del ventrículo izquierdo (µl)
250
200
150
100
50
0
**
***
ns
SHAM
IM

FIGURA 3

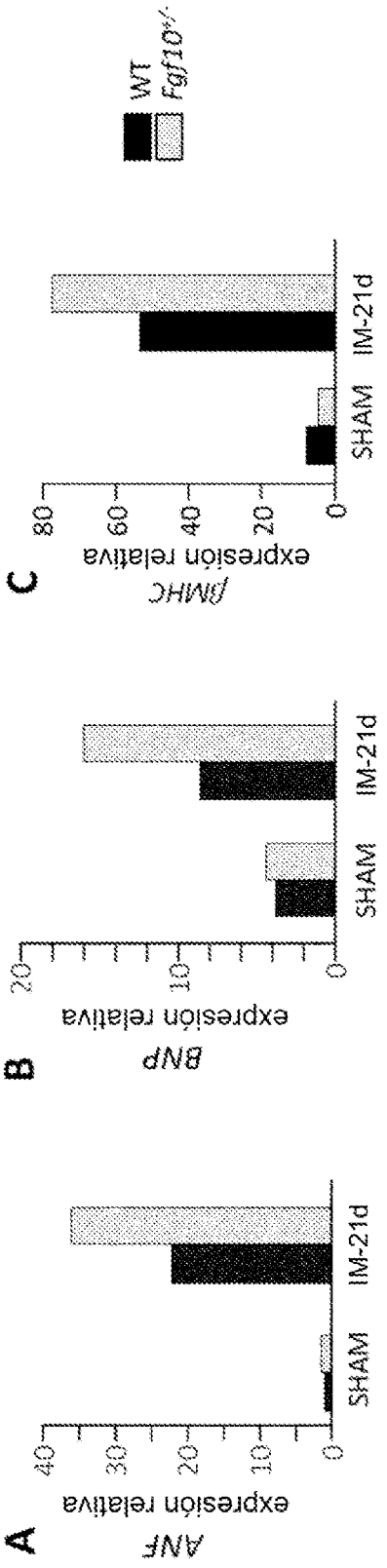
A
ANF
expresión relativa
0
10
20
30
40
SHAM
IM-21d
B
BNP
expresión relativa
0
10
20
SHAM
IM-21d
C
βMHC
expresión relativa
0
20
40
60
80
SHAM
IM-21d
WT
Fgf10+/-

FIGURA 4

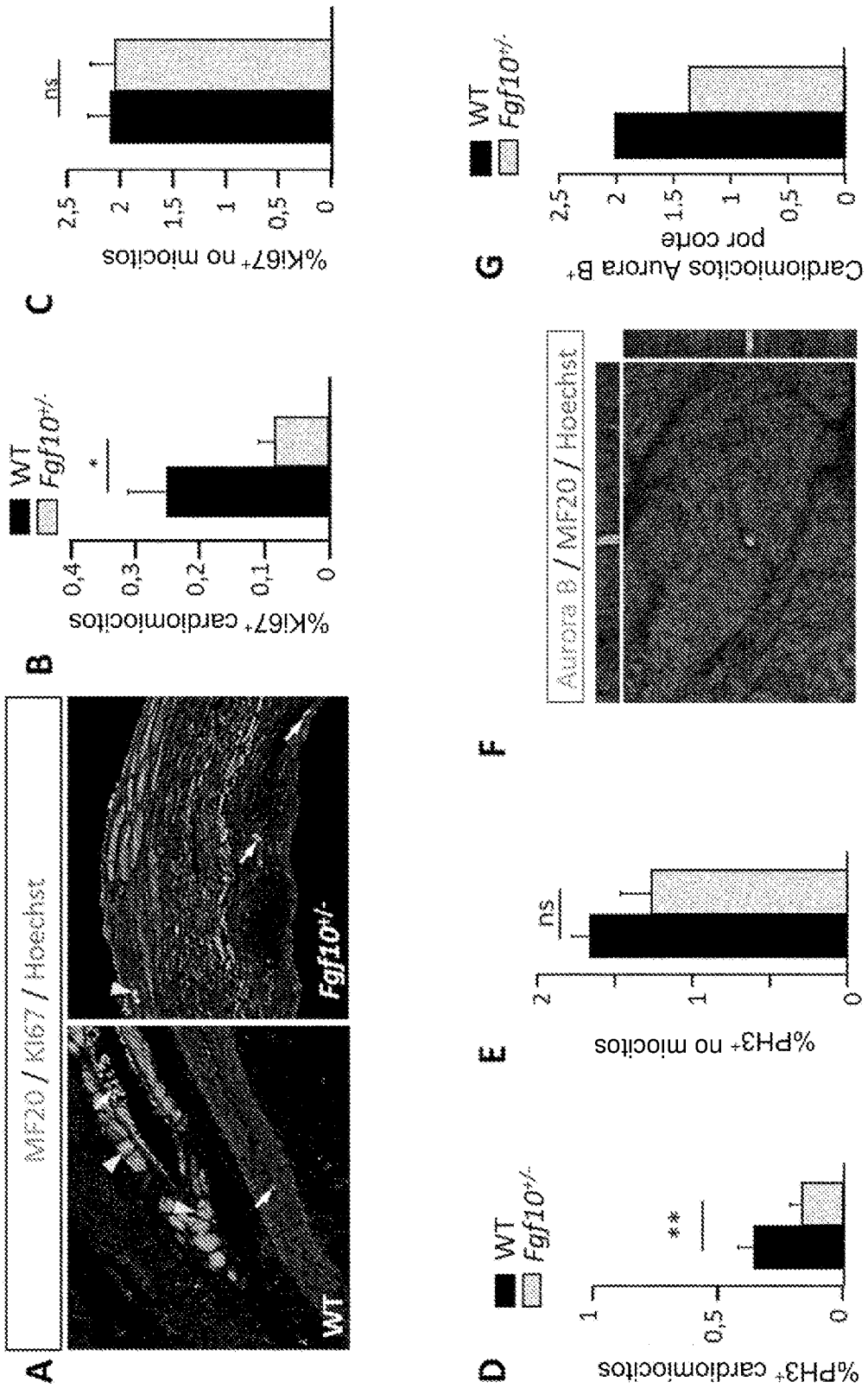
A
MF20 / Ki67 / Hoechst
WT
Fgf10+/-
B
%Ki67+ cardiomiocitos
WT
Fgf10+/-
*
0,4
0,3
0,2
0,1
0
C
%Ki67+ no miocitos
ns
2,5
2
1,5
1
0,5
0
D
%PH3+ cardiomiocitos
WT
Fgf10+/-
**
1
0,5
0
E
%PH3+ no miocitos
ns
2
1
0
F
Aurora B / MF20 / Hoechst
G
Cardiomiocitos Aurora B+ por corte
WT
Fgf10+/-
2,5
2
1,5
1
0,5
0

FIGURA 5

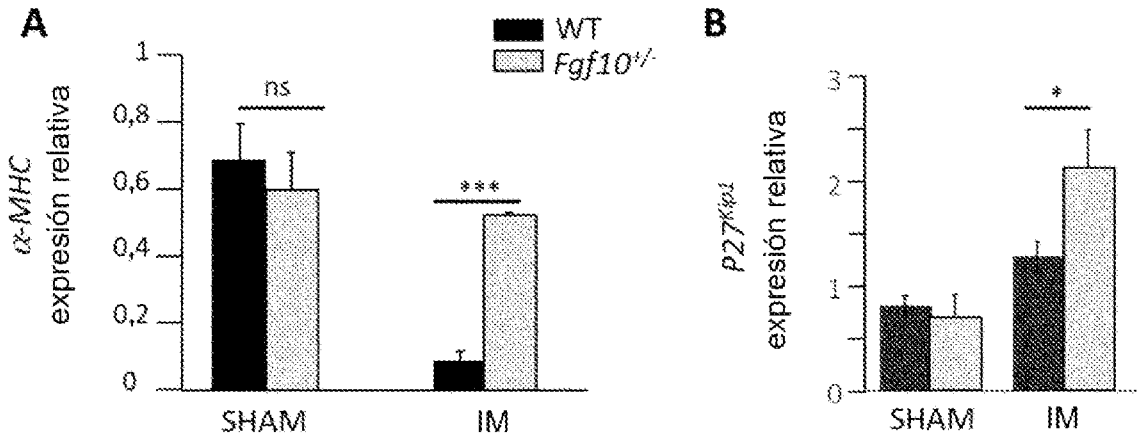

FIGURA 6

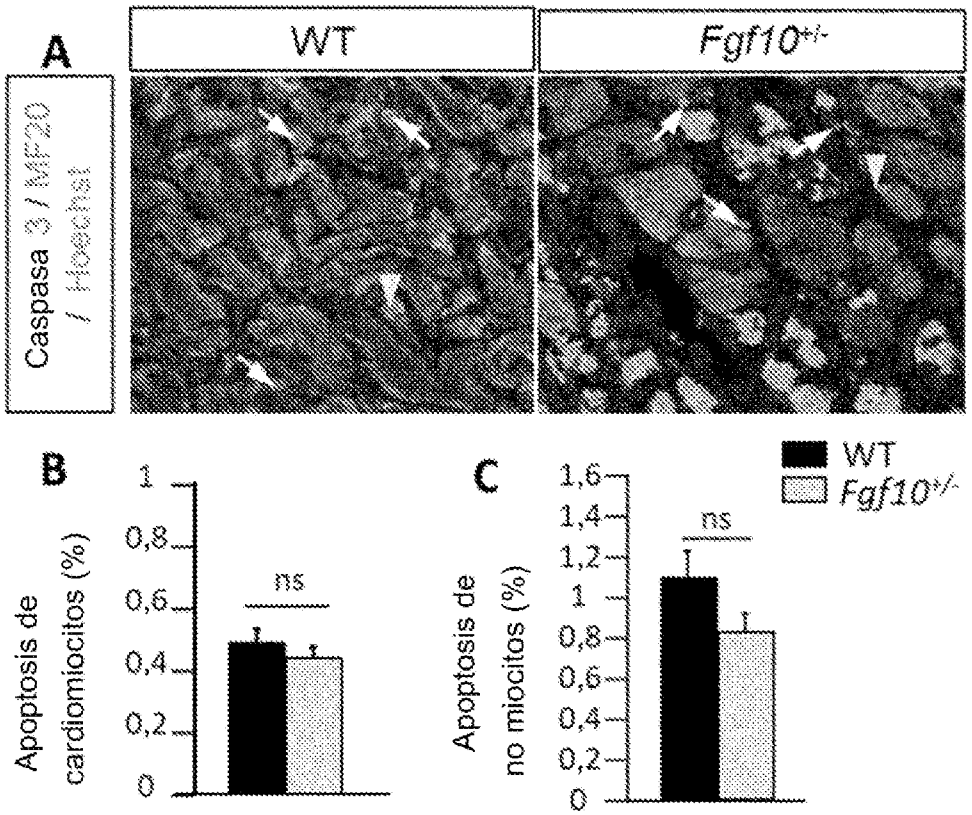

FIGURA 7

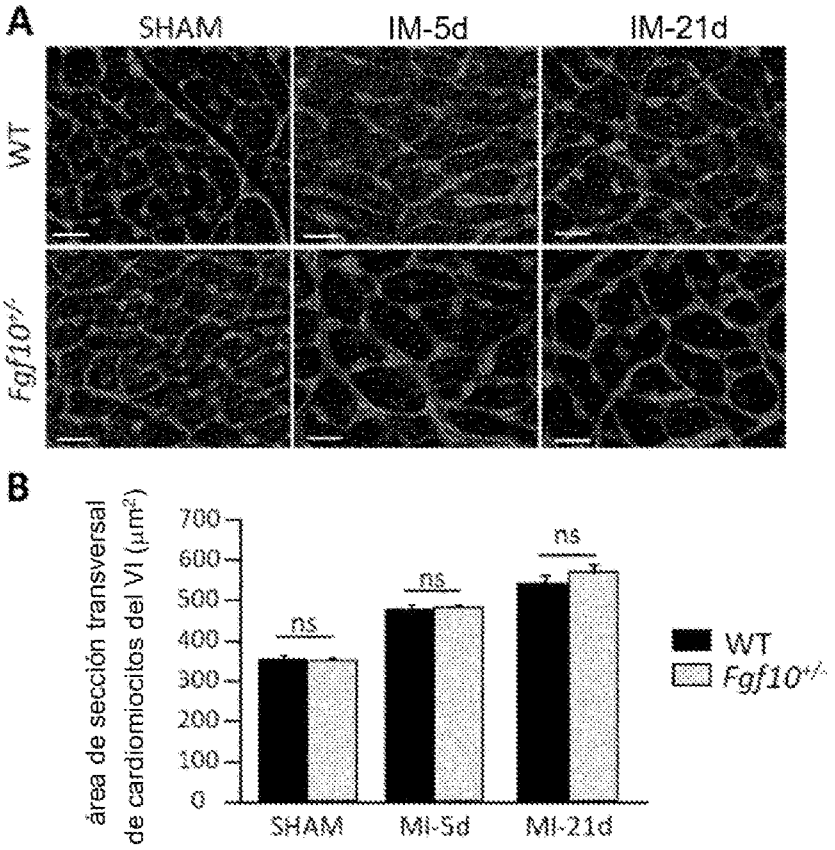
A
SHAM
IM-5d
IM-21d
WT
Fgf10+/-
B
área de sección transversal de cardiomiocitos del VI (μm²)
700
600
500
400
300
200
100
0
ns
ns
ns
SHAM
MI-5d
MI-21d
WT
Fgf10+/-

FIGURA 8

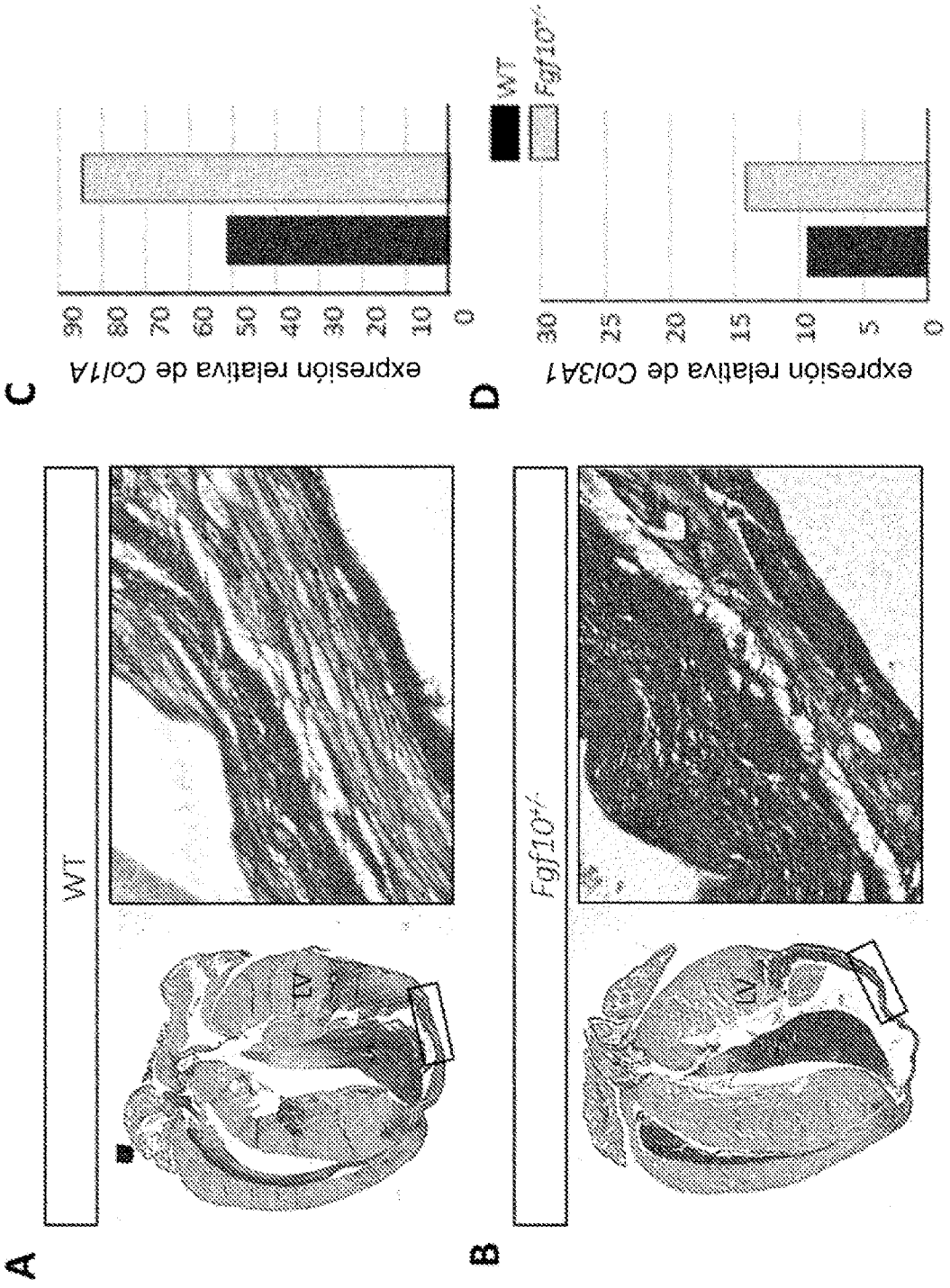
A
WT
AT
B
Fgf10-/-
VT
C
expresión relativa de Col1A
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
D
WT
Fgf10-/-
expresión relativa de Col3A1
30
25
20
15
10
5
0

FIGURA 9

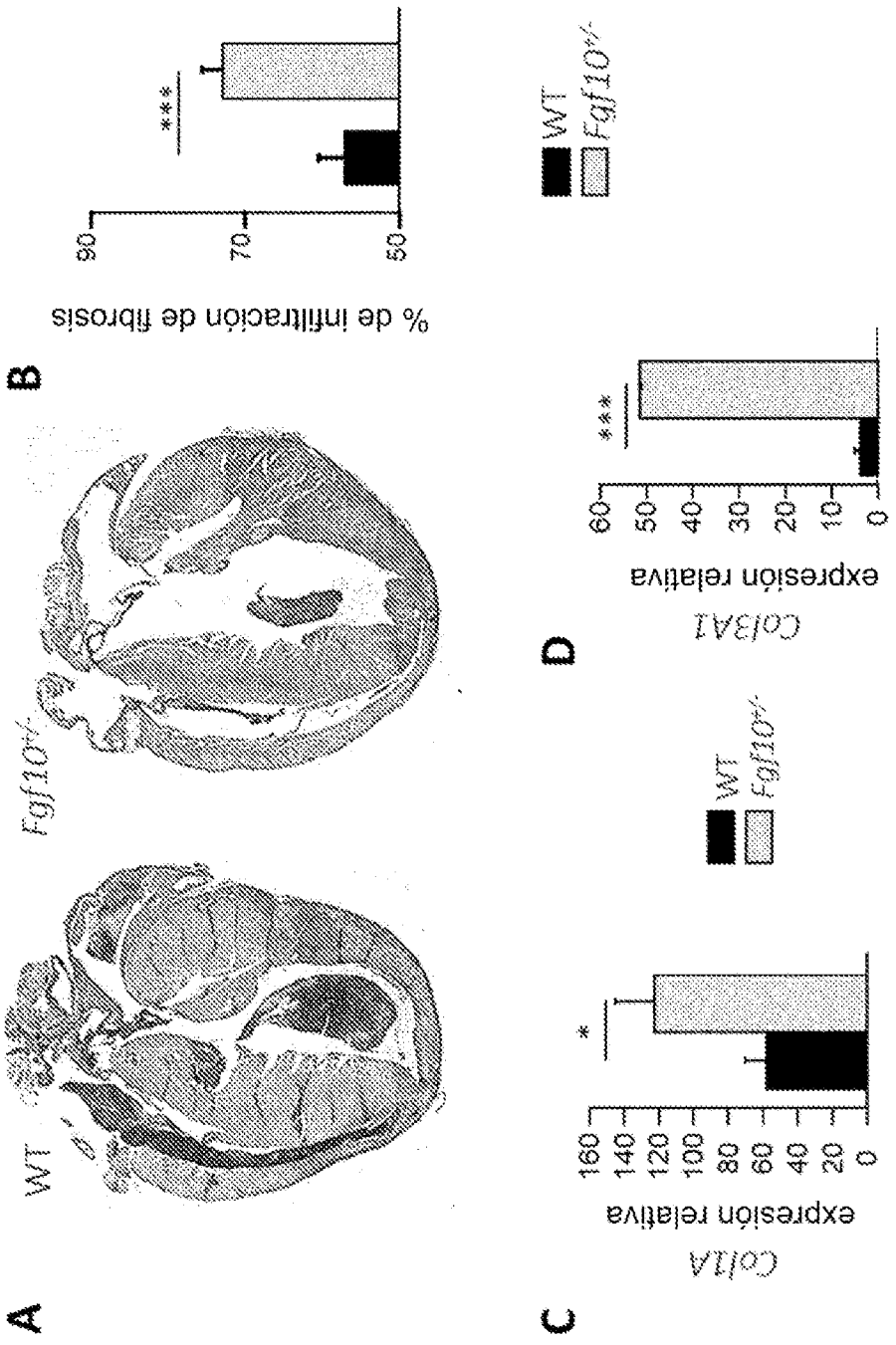
A
WT
Fgf10+/-
B
% de infiltración de fibrosis
90
70
50
***
C
Col1A
expresión relativa
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
WT
Fgf10+/-
D
Col3A1
expresión relativa
60
50
40
30
20
10
0
***
WT
Fgf10+/-

FIGURA 10

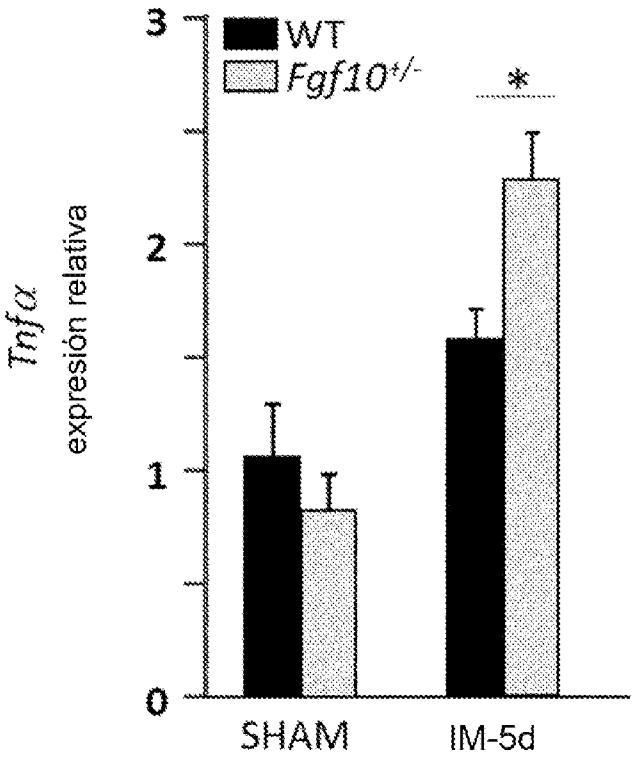

FIGURA 11

SHAM
IM
IM + FGF10
Fracción de eyección (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
Fracción de acortamiento (%)
70
60
50
40
30
20
10
0

FIGURA 12

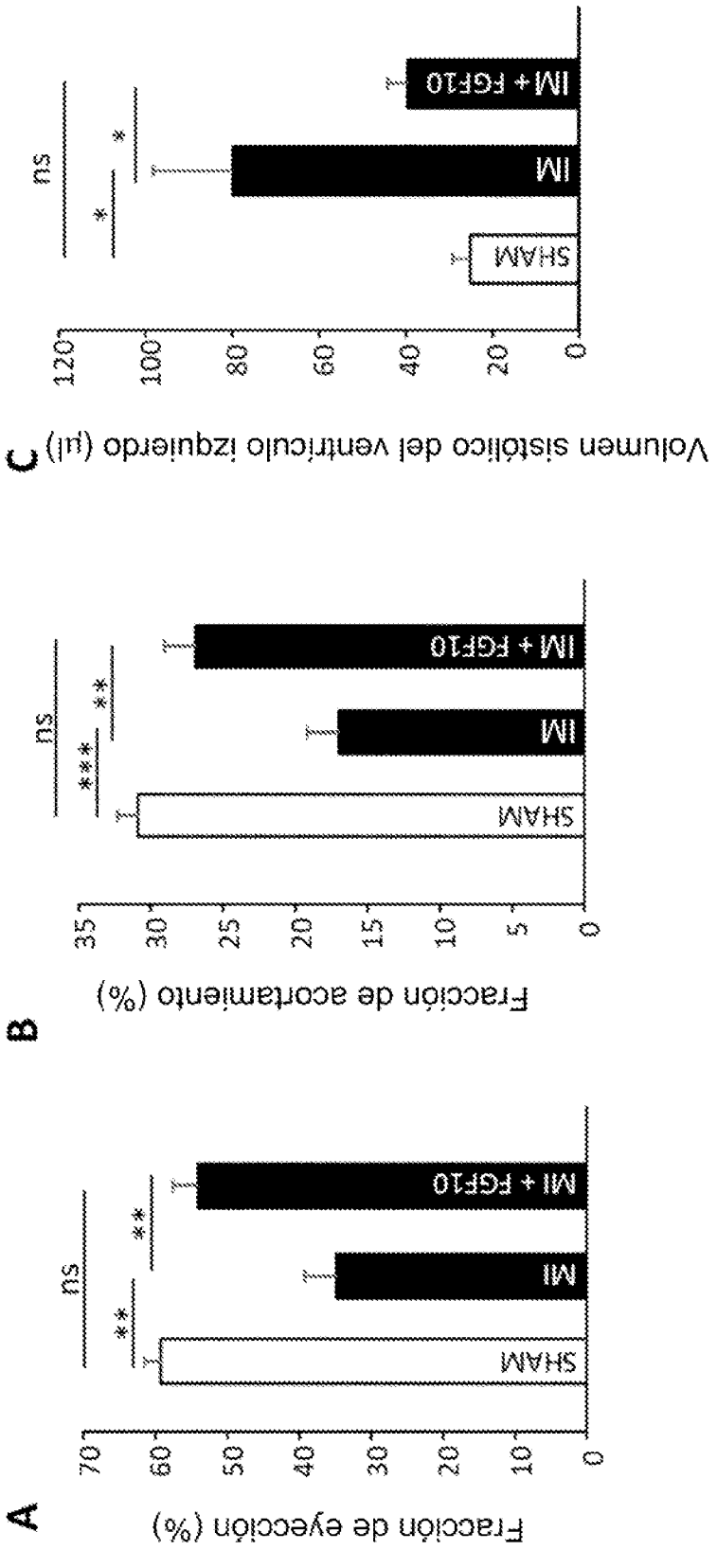
A
Fracción de eyección (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
SHAM
MI
MI + FGF10
ns
**
**
B
Fracción de acortamiento (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
SHAM
IM
IM + FGF10
ns
***
**
C
Volumen sistólico del ventrículo izquierdo (µl)
0
20
40
60
80
100
120
SHAM
IM
IM + FGF10
ns
*
*

FIGURA 13

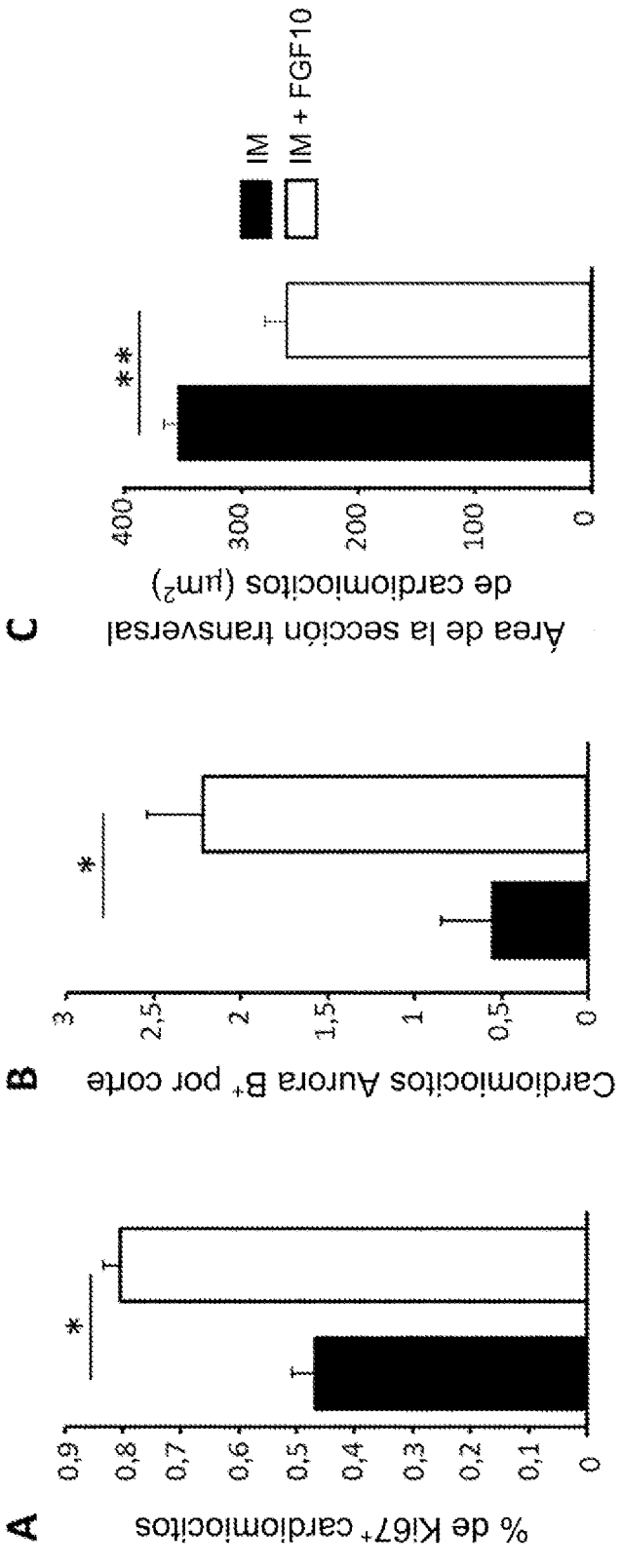
A
% de Ki67+ cardiomiocitos
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
*
B
Cardiomiocitos Aurora B+ por corte
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
*
C
Área de la sección transversal de cardiomiocitos (µm2)
400
300
200
100
0
**
IM
IM + FGF10

FIGURA 14

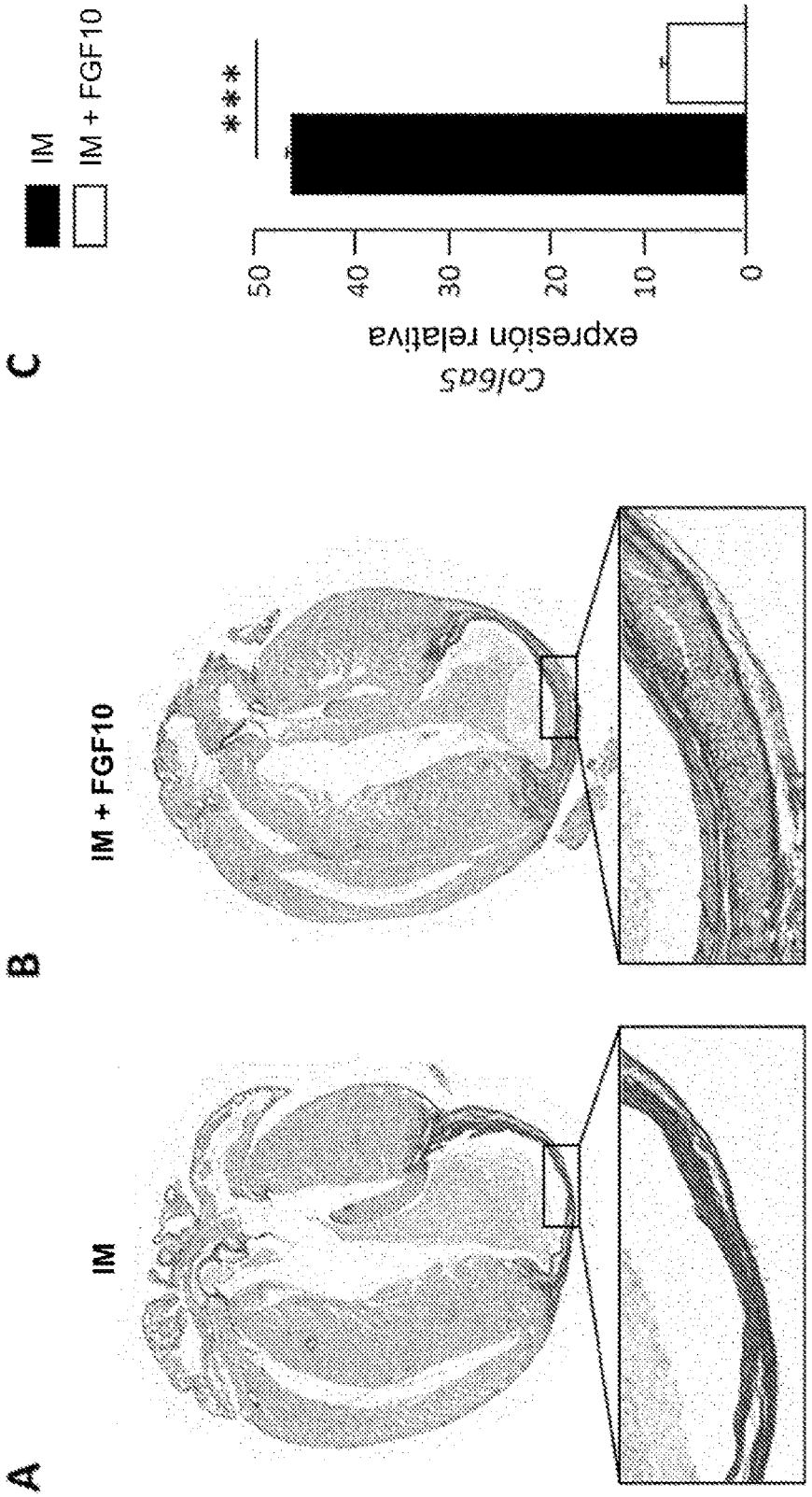
A
IM
B
IM + FGF10
C
IM
IM + FGF10
***
Col6a5
expresión relativa
50
40
30
20
10
0

FIGURA 15

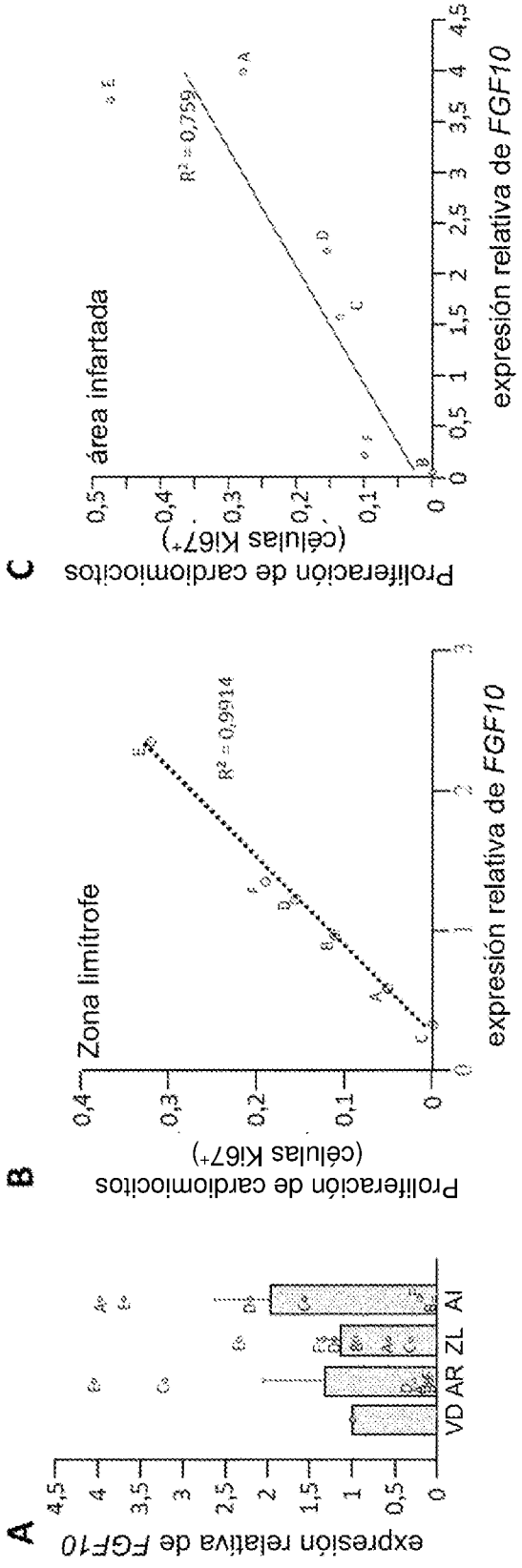
A
expresión relativa de FGF10
VD AR ZL AI
B
Proliferación de cardiomiocitos (células Ki67+)
Zona limítrofe
R² = 0,9914
expresión relativa de FGF10
C
Proliferación de cardiomiocitos (células Ki67+)
área infartada
R² = 0,759
expresión relativa de FGF10

FIGURA 16

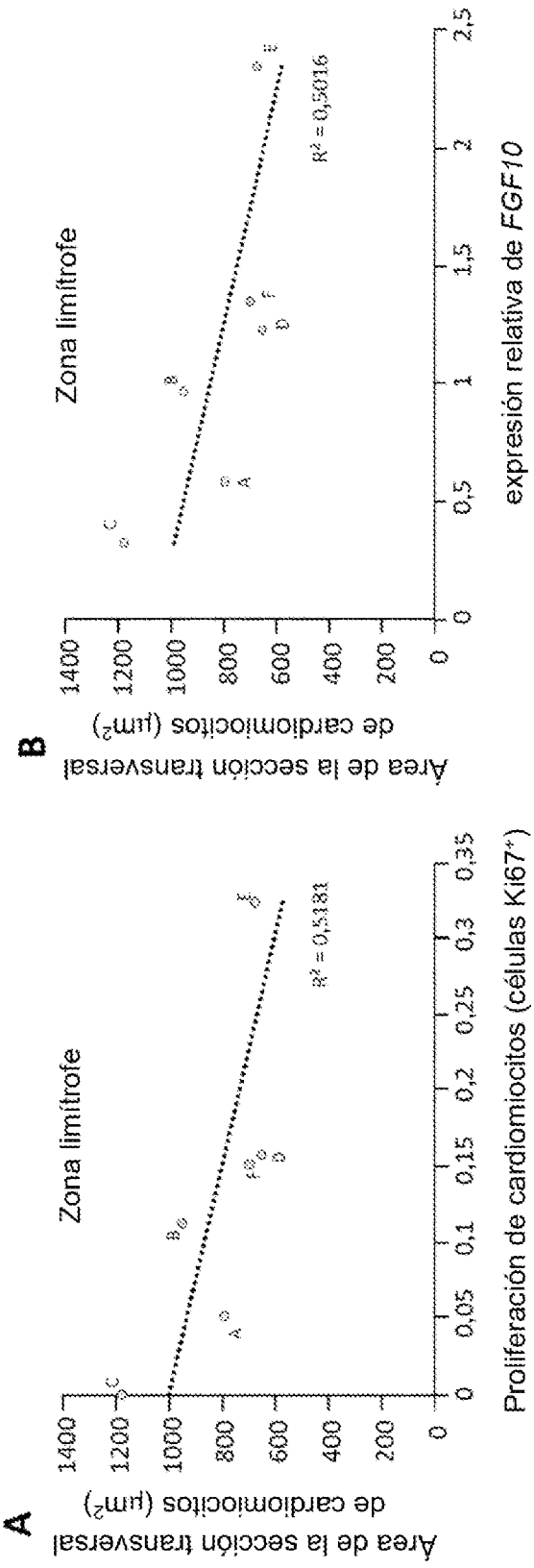
A
Área de la sección transversal de cardiomiocitos (µm²)
Zona limítrofe
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
0,05
0,1
0,15
0,2
0,25
0,3
0,35
Proliferación de cardiomiocitos (células Ki67⁺)
R² = 0,5131
B
Área de la sección transversal de cardiomiocitos (µm²)
Zona limítrofe
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
0,5
1
1,5
2
2,5
expresión relativa de FGF10
R² = 0,5016

FIGURA 17

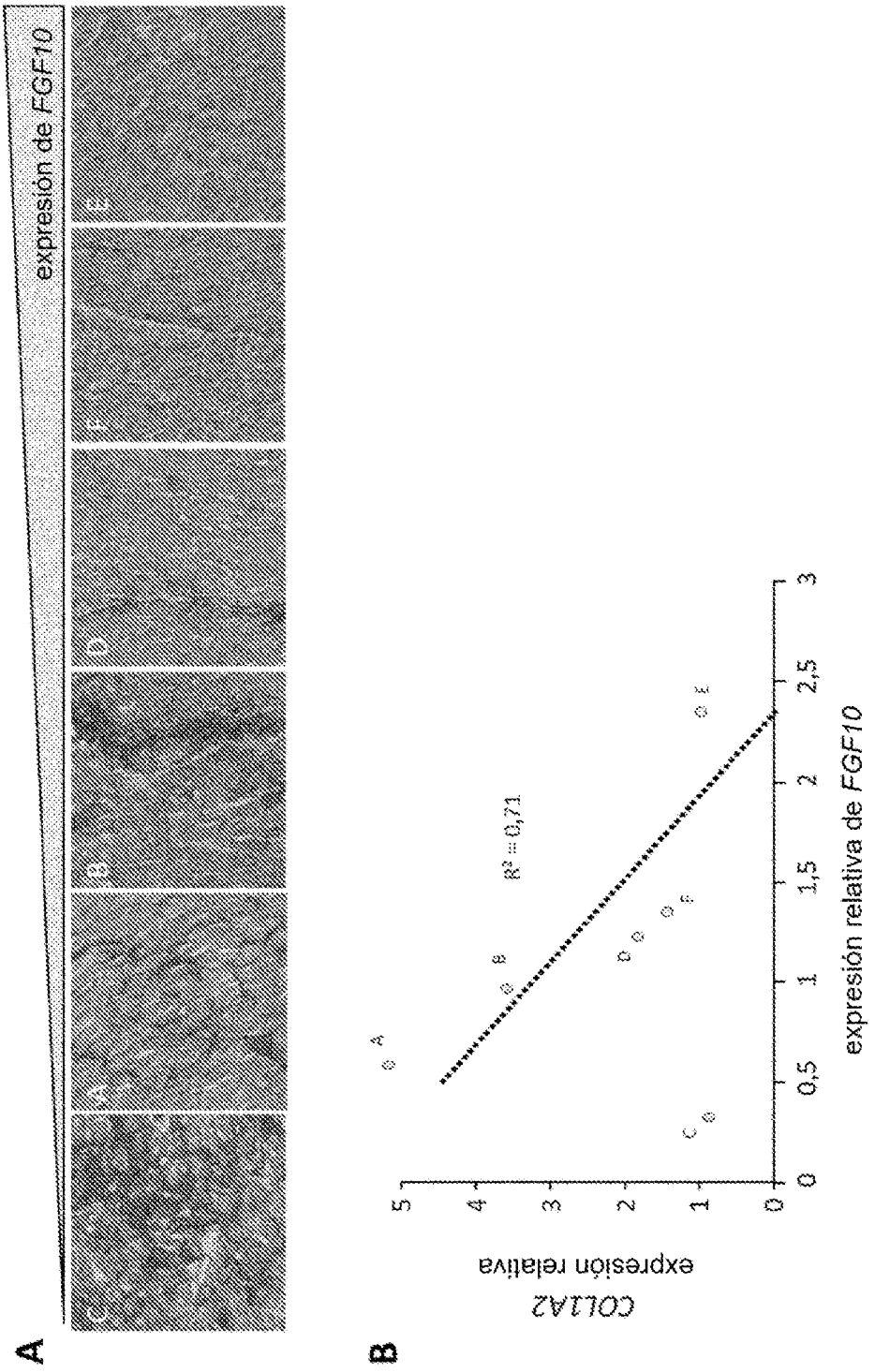
A
expresión de FGF10
C
A
B
D
F
E
B
COL1A2
expresión relativa
$R^2 = 0,71$
expresión relativa de FGF10
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
0
1
2
3
4
5

FIGURA 18