

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 239**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 35/34 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04818986 .4**
96 Fecha de presentación: **19.11.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1693451**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE CULTIVO DE CÉLULAS MIOCÁRDICAS.**

30 Prioridad:
21.11.2003 JP 2003391708
26.08.2004 JP 2004246533

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.03.2012

73 Titular/es:
Daiichi Sankyo Company, Limited
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:
ADACHI, Mimi;
NAKAYAMA, Keiichi;
KITAJIMA, Shigetaka y
TAKAGI, Hiromitsu

74 Agente/Representante:
Illescas Taboada, Manuel

ES 2 376 239 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

Procedimiento de cultivo de células miocárdicas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para proliferar cardiomiocitos de mamífero.

Dado que los cardiomiocitos adultos pierden su capacidad para proliferar mediante división celular, los daños producidos en el corazón por exposición a varias agresiones, tales como isquemia e inflamación, conduce a necrosis o pérdida de cardiomiocitos sin compensación de los mismos. En consecuencia, los cardiomiocitos que sobreviven se hipertrofian de un modo compensatorio para conservar las funciones cardíacas. "El artículo de revisión de Li y Brooks (1999), European Heart Journal 20:406-420 proporciona una visión general de la maquinaria del ciclo celular y comenta cómo este controla el crecimiento de los cardiomiocitos." No obstante, cuando el estado se mantiene más allá de los límites aceptables para los cardiomiocitos, los cardiomiocitos quedan exhaustos y mueren. En última instancia, dicho estado produce deterioro de las funciones del músculo cardíaco, es decir insuficiencia cardíaca.

15 Las enfermedades cardíacas, que incluyen principalmente insuficiencia cardíaca, ocupan la segunda posición en las causas de mortalidad en Japón. Adicionalmente, el pronóstico de pacientes con enfermedades cardíacas es tan extremadamente malo que la supervivencia a 5 años es de justo aproximadamente el 50 %. Por tanto, se cree que el desarrollo de un procedimiento terapéutico eficaz de la insuficiencia cardíaca es considerablemente ventajoso desde los puntos de vista del bienestar médico y de la economía médica. Fármacos terapéuticos convencionales para la insuficiencia cardíaca incluyen preparaciones con digitalina que incrementan la fuerza de la contracción del miocardio y preparaciones de xantina y otros estimuladores cardíacos, pero se sabe que la administración a largo plazo de estos fármacos empeora la afección. En los últimos años, las terapéuticas con agentes farmacéuticos 1 para reducir el exceso de cargas en el corazón debido a la elevación del sistema nervioso simpático y el sistema de renina-angiotensina, tales como los β -bloqueantes y los inhibidores de la ECA, son la corriente dominante. Sin embargo, estos procedimientos terapéuticos son simples tratamientos sintomáticos y nunca pueden recuperar los mismos tejidos cardíacos dañados. Como alternativa, el trasplante cardíaco es un procedimiento terapéutico esencial para la insuficiencia cardíaca grave. Debido a problemas como la falta de donantes de órganos, ética médica y cargas corporales y económicas para los pacientes, todavía es muy difícil emplear el trasplante cardíaco como procedimiento terapéutico general.

Recientemente se ha estudiado un procedimiento de injerto complementario de cardiomiocitos en el corazón dañado. Se sabe que algunos experimentos que usan animales en los que se injertó en tejido cardíaco adulto cardiomiocitos obtenidos de fetos, los cardiomiocitos pudieron funcionar de forma eficaz como cardiomiocitos (por ejemplo, véase la referencia documento no patente 1). Se han realizado trabajos de investigación para preparar cardiomiocitos a partir de células pluripotenciales con potencia para diferenciarse en una amplia variedad de células, incluidos cardiomiocitos, es decir las denominadas células madre embrionarias (células ME) para usar como células para injerto. No obstante, estos procedimientos se enfrentarían con muchas dificultades en la aplicación de los mismos a la medicina clínica desde un punto de vista ético. Recientemente se han realizado otros intentos para injertar las células madre derivadas de médula ósea y permitir que las células madre se diferencien en cardiomiocitos en el tejido cardíaco. Sin embargo, la eficiencia de la diferenciación es extremadamente baja. Por tanto, el procedimiento no es tan práctico como un procedimiento para regenerar y compensar cardiomiocitos (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 2, 3 y 4, como revisiones).

45 Por consiguiente, los presentes inventores de la invención han realizado trabajos de investigación sobre el mecanismo de regulación del ciclo celular de los cardiomiocitos, en particular el papel del sistema de quinasa dependiente de ciclina-ciclina (CDK). En consecuencia, los inventores han descubierto que, aunque la expresión de la ciclina de tipo D y de la CDK4 se induce mediante la estimulación de, por ejemplo, factores séricos y de crecimiento en los cardiomiocitos, estas moléculas proteicas se localizan en el citoplasma pero no se transfieren al núcleo, por lo que la fosforilación de la proteína RB como molécula diana en el núcleo de la ciclina D-CDK4 o la activación de la ciclina E-CDK2 rara vez se produce. Cuando los inventores prepararon un vector adenovirus en el que se integraron un gen para ciclina D1 marcada con la señal de localización nuclear (NLC) (en lo sucesivo en el presente documento denominada D1NLS) y el gen que codifica CDK4 para permitir que el vector infecte los cardiomiocitos cultivados, la proteína ciclina D1 y la proteína CDK4 se expresaron en el núcleo y produjeron la proliferación y división de los cardiomiocitos a través de la fosforilación de RB. En consecuencia, los inventores consiguieron con éxito la proliferación de cardiomiocitos que rara vez proliferan (se dividen mitóticamente) en las condiciones de cultivo generales. Adicionalmente, los inventores introdujeron el gen de D1NLS y de CDK4 en el tejido muscular cardíaco de un animal adulto para permitir la expresión del mismo, de modo que los inventores progresaron con éxito el ciclo celular de los cardiomiocitos del animal adulto (véase, por ejemplo, la patente de referencia 1, la no patente de referencia 5). El procedimiento para proliferar cardiomiocitos de acuerdo con la invención se denomina más adelante en el presente documento procedimiento DNLS/CDK.

Se han realizado un gran número de otros intentos para hacer progresar el ciclo celular de los cardiomiocitos para inducir la división de las células (véase, por ejemplo, la referencia no patente 6 como revisión sobre la progresión del ciclo celular de los cardiomiocitos). Por ejemplo, un informe indica que cuando se expresaron el gen E1A/E1B (véase la referencia no patente 7) o el gen E2F (véase la referencia no patente 8) derivados de adenovirus en cardiomiocitos

5 citos cultivados aislados de una rata neonata se produjo la inducción de la síntesis de ADN en los cardiomiocitos. En un ratón transgénico en el que se indujo la expresión excesiva del gen de la ciclina D1 del tipo intacto sin ninguna señal de localización nuclear, se observó elevación del nivel de expresión de CDK4 en los cardiomiocitos, junto con la inducción de la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, la referencia no patente 9). Más recientemente se ha indica-
 10 do que, en un ratón deficiente en el gen jumonji que suprime la expresión del gen de la ciclina D1, se observa que se prolonga la duración de la detención de la proliferación celular en los cardiomiocitos fetales (véase, por ejemplo, la referencia no patente 10). Como se ha descrito anteriormente, se ha demostrado que la inducción de la síntesis de ADN y la progresión del ciclo celular puede ser posible, incluso en cardiomiocitos. Sin embargo, en los ejemplos experimentales, en los cardiomiocitos se ha observado con frecuencia inducción de apoptosis y aparición de células polinucleares anormales. A excepción del procedimiento DNLS/CDK, no existe ningún procedimiento para estimular la división celular de cardiomiocitos después del nacimiento para incrementar en la práctica el número de células.

15 Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento DNLS/CDK es un procedimiento innovador mediante el cual se puede incrementar los cardiomiocitos que generalmente "rara vez proliferan". Por tanto, el procedimiento es sumamente aplicable en términos industriales.

20 Se sabe que varios factores de regulación por incremento y por disminución regulan la progresión de los ciclos celulares en células eucariotas generales. Los factores de regulación por incremento incluyen los tipos individuales de ciclina y CDK, mientras que los factores de regulación por disminución incluyen una serie de grupos proteicos denominados inhibidores de CDK. Se han identificado dos familias de inhibidores de CDK que tienen diferentes modos de acción (véase, por ejemplo, la referencia no patente 11, como revisión). Un primer grupo se denomina proteína de la familia Ink4 e incluye p16 (también conocida como Ink4A, Mts1, Cdkn2 y Cdkn4i), p15 (también conocida como Ink4B y Mts2), p18 (también conocida como Ink4C y Ink6A), y p19 (también conocida como p20, Ink4D y Ink6B). El primer grupo se une de forma selectiva a CDK4 o CDK6 para inhibir la función del complejo ciclina D-CDK4 (o CDK6) (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 12, 13 y 14) Un segundo grupo de proteínas inhibidoras de CDK se denomina proteína de la familia Cip/Kip e incluye p21 (también conocida como Cip1, Pic1, Sdi1, mda6 y Waf1; denominada a continuación en el presente documento p21^{Cip1}), p27 (también conocida como Ick, Kip1 y Pic2; denominada a continuación en el presente documento p27^{Kip1}) y p57 (también conocida como Kip2; denominada a continuación en el presente documento p57^{Kip2}). Se demuestra que, al contrario que la familia Ink4, la segunda familia inhibe la progresión del ciclo celular inhibiendo las funciones de varios complejos de ciclina-CDK (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 15, 16, 17 y 18).

35 En cuanto a cómo estas proteínas inhibidoras de CDK están implicadas en la supresión de la proliferación de cardiomiocitos, varios informes tratan las moléculas de la familia Cip/Kip. Específicamente, se sabe que los niveles de expresión de la proteína p21^{Cip1} y la proteína p27^{Kip1} están elevados, tras el deterioro de la potencia de proliferación de los cardiomiocitos durante la etapa fetal tardía a la etapa posnatal, de modo que disminuye la activación de CDK2 y CDK4 como moléculas diana (véase, por ejemplo, la referencia no patente 19). Cuando se añade IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1) a cardiomiocitos con un exceso de expresión del gen E2F-1, disminuyen los niveles de expresión de la proteína p21^{Cip1} y de la proteína p27^{Kip1}, lo que implica el incremento de la proporción de cardiomiocitos en la fase de síntesis de ADN (fase S) (véase, por ejemplo, la referencia no patente 20). También se ha comunicado que en un ratón deficiente en p27^{Kip1}, el momento de la detención de la proliferación de los cardiomiocitos está retrasado con respecto al ratón normal y que el número de cardiomiocitos en el ratón deficiente está aumentado (véase, por ejemplo, la referencia no patente 21). Como se ha descrito anteriormente, se sugiere que las proteínas de la familia Cip/Kip, particularmente la proteína p27^{Kip1}, posiblemente estén implicadas en la supresión de la proliferación de los cardiomiocitos. No se conocen ejemplos, a excepción de la delección del gen, para suprimir la expresión y la función de las proteínas de la familia Cip/Kip de inducir la división y proliferación de cardiomiocitos.

50 Se sabe que el nivel de expresión intracelular de las proteínas de la familia Cip/Kip está regulado principalmente por un sistema de degradación a través de la vía de la ubiquitina (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 22, 23 y 24). La ubiquitina es un polipéptido que comprende 76 aminoácidos altamente conservados y es abundante en todas las células eucariotas. En la vía de la ubiquitina, la cadena de poliubiquitina se une covalentemente a un sustrato diana y posteriormente se degrada con un complejo de proteasoma polifuncional. Las moléculas proteicas degradadas con dicho sistema ubiquitina-proteasoma incluyen una amplia variedad de moléculas, tales como ciclina, p53, p300, E2F, STAT-1, c-Myc, c-Jun, receptor del EGF, I.Ba, NF.B y β-catenina, además de las proteínas de la familia Cip/Kip. Actualmente se están llevando a cabo intensos trabajos de investigación sobre el mecanismo de ubiquitinilación de moléculas proteicas. En general, las moléculas proteicas se ubiquitinizan mediante una serie de grupos de enzimas, es decir encima de activación de ubiquitina (E1), enzima de formación de complejos con ubiquitina (E2) y ubiquitina quinasa (E3), y las proteínas ubiquitiniladas se degradan al final con el proteasoma 26S (véase, por ejemplo, las referencias no patente 25, 26, 27 y 28, como revisiones).

60 Se cree que la ubiquitina ligasa (E3) es responsable de la especificidad de la ubiquitinilación de las proteínas diana específicas entre ellas. Se conocen muchos ejemplos, como el complejo del complejo estimulador de la anafase/ciclosoma (APC/C), el complejo VHL (von Hippel-proteína Lindau-B/C elongación, Nedd4, Ufd4, Rad5, Rad18 y Parkin. Recientemente, mediante trabajos de investigación se ha identificado un tipo nuevo de complejo ubiquitina ligasa denominada SCF en organismos biológicos mejores, tal como levaduras. La ubiquitina ligasa del tipo de complejo SCF (en ocasiones denominada complejo ubiquitina ligasa SCF en el presente documento más adelante) es
 65

una molécula proteica de un trímero compuesto por tres subunidades denominadas Skp1, Cull (un nombre diferente de Cdc53), y proteína F-box. La ligasa se denomina SCF como acrónimo de las subunidades individuales (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 29 y 30, como revisiones).

5 La proteína F-box, como uno de los componentes del complejo SCF, contiene un motivo F-box identificado primero en la ciclina F.

La región motivo es necesaria para la interacción con Skp1. Adicionalmente, la proteína F-box contiene una región motivo de repetición de aproximadamente 40 secuencias de aminoácidos denominada repetición WD-40 o una región motivo enriquecida en leucina denominada repetición rica en leucina. En el complejo SCF, Skp1 y Cull/Cdc53 nunca son variables contra ningún sustrato diana, mientras que las especies moleculares de la proteína F-box varían, en función del sustrato diana como una ubiquitinilación diana. Mediante el reconocimiento y unión a un sustrato diana en la repetición WD-40 o la repetición rica en leucina, la proteína F-box determina la especificidad de sustrato del complejo SCF (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 31, 32 y 33). Como se ha descrito anteriormente, el complejo SCF incluye varios tipos de SCF^{TRCP}, SCF^{Cdc4}, SCF^{Met30} and SCF^{Grr1}, dependiendo de la diferencia de la proteína F-box contenida como componente (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 29 y 30).

En el caso de la proteína de la familia Cip/Kip, un complejo SCF que contiene Skp2 (SCF^{Skp2}) como proteína F-box está implicado en la degradación con ubiquitina-proteasoma del mismo. Skp2 se identificó primero como factor de unión al complejo ciclina A-CDK2. Dado que la acumulación de Skp2 se produce desde la fase G1 tardía del ciclo celular y el nivel de expresión alcanza el máximo desde la fase S a la fase G2, la Skp2 se denomina proteína asociada con la quinasa de fase S (véase, por ejemplo, la referencia no patente 38). Un informe indica que aparte de la proteína de la familia Cip/Kip, la Skp2 reconoce moléculas proteicas tales como E2F-1 (véase, por ejemplo, la referencia no patente 39), ciclina E (véase, por ejemplo, la referencia no patente 40), CDK9 (véase, por ejemplo, la referencia no patente 41) y c-Myc (véase, por ejemplo, las referencias no patentes 42 y 43), como sustratos diana y la Skp2 está implicada en la degradación de las mismas.

Como se ha descrito anteriormente, se sabe que los inhibidores de CDK, incluida la proteína de la familia Cip/Kip, están implicados en la supresión de la proliferación de las células proliferativas generales, de modo que el sistema ubiquitina-proteasoma a través del complejo SCF^{Skp2} es responsable de la regulación del nivel de expresión intracelular. No obstante, no se sabe casi nada sobre cómo el sistema ubiquitina-proteasoma está implicado en el mecanismo de regulación de la proliferación de los cardiomiocitos.

El procedimiento DNLS/CDK es un procedimiento para proliferar cardiomiocitos como el procedimiento único que se conoce actualmente. El procedimiento es muy útil y sumamente aplicable en términos industriales. Para promocionar la aplicación práctica de dicha terapia de regeneración del músculo cardíaco y la aplicabilidad industrial de la misma, todavía más, es deseable conseguir el efecto de proliferar cardiomiocitos y la eficiencia del mismo.

- Referencia patente 1: Folleto de publicación internacional WO 02/095026
- Referencia no patente 1: Soonpaa, y col., *Science* 264:98, (1994)
- Referencia no patente 2: Murry, y col., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67:519, (2002)
- Referencia no patente 3: Menasche, *Ann. Thorac. Surg.* 75:S20, (2003)
- Referencia no patente 4: Nir, y col., *Cardiovasc. Res.* 58:313, (2003)
- Referencia no patente 5: Tamamori-Adachi, y col., *Circ. Res.* 92:e12, (2003)
- Referencia no patente 6: Kishore, y col., *Circ. Res.* 90:1044, (2002)
- Referencia no patente 7: Kirshenbaum, y col., *J. Biol. Chem.* 270: 7791, (1995)
- Referencia no patente 8: Kirshenbaum, y col., *Dev. Biol.* 179:402, (1996)
- Referencia no patente 9: Soonpaa, y col., *Clin. Invest.* 99: 2644, (1997)
- Referencia no patente 10: Toyoda, y col., *Dev. Cell* 5: 85, (2003)
- Referencia no patente 11: Sherr y Roberts, *Genes Dev.* 9:1149, (1995)
- Referencia no patente 12: Hannon y Beach, *Nature* 371: 257, (1993)
- Referencia no patente 13: Serrano, y col., *Nature* 366: 704, (1993)
- Referencia no patente 14: Hirai, y col., *Mol. Cell. Biol.* 15:2672, (1995)
- Referencia no patente 15: Harper, y col., *Cell* 75:805, (1993)
- Referencia no patente 16: Polyak, y col., *Cell* 78:59, (1994)
- Referencia no patente 17: Toyoshima y Hunter *Cell* 78:67, (1994)
- Referencia no patente 18: Matsuoka, y col., *Genes Dev.* 9:650, (1995)
- Referencia no patente 19: Flink, y col., *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30:563, (1998)
- Referencia no patente 20: von Harsdorf, y col., *Circ. Res.* 85:128, (1999)
- Referencia no patente 21: Poolman, y col., *Circ. Res.* 85:117, (1999)
- Referencia no patente 22: Pagano, y col., *Science* 269: 682 (1995)
- Referencia no patente 23: Maki y Howley, *Mol. Cell Biol.* 17:355, (1997)
- Referencia no patente 24: Urano, y col., *J. Biol. Chem.* 274:12197, (1999)
- Referencia no patente 25: Coux, y col., *Annu. Rev. Biochem.* 65:801, (1996)
- Referencia no patente 26: Hochstrasser, *Annu. Rev. Genet.* 30:405, (1996)
- Referencia no patente 27: Pagano, *FASEV J.* 11:1067, (1997)
- Referencia no patente 28: Hershko, y col., *Annu. Rev. Biochem.* 67:425, (1998)

Referencia no patente 29: Patton, y col., Trends Genet. 14:236, (1998)
Referencia no patente 30: Jackson y Eldridge, Mol. Cell 9:923,(2002)
Referencia no patente 31: Bai, y col., Cell 86:263, (1996)
Referencia no patente 32: Slowrya, y col., Cell 91:209, (1997)
5 Referencia no patente 33: Kobe, y col., Curr. Opin. Struct. Biol. 11725, (2001)
Referencia no patente 34: Carrano, y col., Nature Cell Biol. 1:193, (1999)
Referencia no patente 35: Tsverkov, y col., Curr. Biol. 9:661, (1999)
Referencia no patente 36: Bornstein, y col., J. Biol . Chem. 278:26752, (2003)
10 Referencia no patente 37: Kamura, y col., Proc. Natl . Acad. Sci. USA 100:10231, (2003)
Referencia no patente 38: Zhang, y col., Cell 82:915, (1995)
Referencia no patente 39: Marti, y col., Nat. Cell Biol. 1:14, (1999)
Referencia no patente 40: Nakayama, y col., EMBO J. 19:2069, (2000)
Referencia no patente 41: Kiernan, y col., Mol. Cell. Biol. 21:7956, (2001)
Referencia no patente 42: Kim, y col., Mol. Cell 11:1177,(2003)
15 Referencia no patente 43: von der Lehr, y col., Mol. Cell 11:1189,(2003)

En un procedimiento para proliferar cardiomiocitos, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para potenciar la eficiencia de la proliferación de los cardiomiocitos y proporcionar un vector recombinante y similar para usar en el procedimiento.

Por tanto, para resolver los problemas, los inventores analizaron el mecanismo de la regulación del ciclo celular en cardiomiocitos. Específicamente, los inventores examinaron el mecanismo con la atención centrada en el rendimiento de factores individuales para la regulación del ciclo celular en cardiomiocitos con expresión impuesta de los genes de ciclina y CDK, particularmente los inhibidores de CDK. En consecuencia, los inventores han encontrado que una de las proteínas de la familia Cip/Kip, como el inhibidor de CDK, es decir p27^{Kip1}, inesperadamente se acumulaba en exceso en el núcleo de los cardiomiocitos cuando estaban en condiciones de estimulación con ciclina y CDK.

Se sabe que la proteína de la familia Cip/Kip, incluida principalmente la p27^{Kip1}, se ubiquitinila con ubiquitina ligasa en las células en proliferación en general, de modo que la proteína de la familia Cip/Kip se degradan con proteasoma. Por tanto, el gen que codifica un componente de la ubiquitina ligasa se coexpresaba con los genes de ciclina y CDK en los cardiomiocitos. A continuación se observó que la proteína p27^{Kip1} se reducía significativamente en el núcleo de los cardiomiocitos. Además, se descubrió que la potencia de la proliferación celular de los cardiomiocitos estaba considerablemente activada, hallazgos que han llevado a la realización de la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento tal como se define en las reivindicaciones, para incrementar la eficiencia de la proliferación de cardiomiocitos a través de la inhibición de la producción, función y acción (efecto) de la proteína de la familia Cip/Kip expresada en cardiomiocitos tras estimulación con ciclina y CDK. La proteína de la familia Cip/Kip cuya acción se va a suprimir es, preferentemente p27^{Kip1}, aunque no está limitado a ella.

De acuerdo con la invención, el término "cardiomiocitos" significa cualquier célula del músculo cardíaco que expresa varios marcadores específicos e los cardiomiocitos que son reconocidos como características morfológicas, fisiológicas y/o inmunológicas de los cardiomiocitos intactos. El término incluye, no solo cardiomiocitos obtenidos directamente de tejidos cardíacos de mamíferos y células primarias cultivadas de los mismos sino también cardiomiocitos diferenciados y derivados de células madre, tales como células madre embrionarias, células madre mesenquimatosas de médula ósea y células CMG.

Cualquier procedimiento para inhibir la producción, función y acción de la proteína de la familia Cip/Kip puede ser satisfactorio sin limitaciones específicas. El procedimiento funciona para suprimir la expresión del gen que codifica la proteína, suprimiendo la producción de la proteína, inhibiendo la actividad de la proteína o estimulando la degradación de la proteína.

En particular, el procedimiento para estimular la degradación de la proteína es, preferentemente, un procedimiento para estimular la ubiquitinilación de la proteína. La ubiquitinilación se puede realizar introduciendo, por ejemplo, fármacos, proteínas, péptidos, compuestos de bajo peso molecular y genes en una célula diana.

Adicionalmente, el gen que estimula la ubiquitinilación de la proteína de la familia Cip/Kip es, preferentemente, un gen que codifica un componente de la ubiquitina ligasa, más preferentemente, un gen que codifica el factor F-box capaz de unirse a la proteína de la familia Cip/Kip, incluido, por ejemplo, el gen de Skp2.

Al realizar la invención, además, también se puede usar un procedimiento para inhibir la expresión (transcripción del ARNm) del gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip o inhibir la traducción y producción del producto génico. Por ejemplo, preferentemente se usa un siARN específico del gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip.

Adicionalmente, al llevar a cano la invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la señal de localización nuclear se marca, preferentemente, a al menos uno del gen de ciclina y el gen de CDK, para introducir el gen resul-

tante en las células diana. De acuerdo con la invención, la ciclina es una ciclina capaz de activar las CDK4 o CDK6, es decir las ciclinas D2, D3 y D3 de mamíferos. También de acuerdo con la invención, la CDK es activada por la ciclina de tipo D, es decir CDK4 y CDK6 de mamíferos.

5 En otra realización, la invención se refiere a un vector, tal como se define en las reivindicaciones, portador del gen de ciclina, el gen de CDK y el gen de un factor de inhibición de la acción de la proteína de la familia Cip/Kip. En caso de pretender la introducción del gen en cardiomiocitos, preferentemente la introducción se realiza usando un vector viral o liposoma o similar. Como vector viral por ejemplo, preferentemente se usa el vector adenovirus.

10 En un modo adicional para llevar a cabo la invención, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un vector portador del gen de ciclina, el gen de CDK y el gen de un factor de inhibición de la acción de la proteína de la familia Cip/Kip.

15 En otro modo adicional para llevar a cabo la invención, la invención se refiere a cardiomiocitos obtenidos mediante el procedimiento de proliferar cardiomiocitos.

20 En el presente procedimiento también se describe un procedimiento de detección selectiva usando una célula obtenida mediante el procedimiento de proliferar cardiomiocitos, con el fin de identificar un factor nuevo que mantenga y estimule la viabilidad y la función de los cardiomiocitos y similares, o un agente quimioterapéutico con una posibilidad de lo mismo.

25 En un modo adicional para llevar a cabo la invención, la invención se refiere a un uso terapéutico de tratar enfermedades cardíacas, en el que la composición farmacéutica tal como se define en las reivindicaciones se tiene que administrar en un lugar en un paciente en el que los cardiomiocitos están debilitados, con la función detenida o muertos, para conservar y proliferar las células.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere a las materias siguientes.

(1) Una composición farmacéutica que comprende:

30 (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

35 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción de estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip;

40 en el que al menos uno del gen que codifica dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

(2) Un procedimiento para proliferar cardiomiocitos que comprende una etapa de introducir

45 (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

50 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción de estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip

55 en cardiomiocitos in vitro; y
 una etapa de cultivar después dichas células; en el que al menos uno del gen que codifica dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

(3) Uso de

65 (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y

(c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción de estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip

para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno cardíaco, en el que al menos uno del gen que codifica dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

(4) La composición farmacéutica de (1), el procedimiento de (2) o el uso de (3), en el que la proteína de la familia cip/Kip es p27^{Kip1}.

(5) El procedimiento de (2), que comprende introducir los genes en cardiomiocitos usando un vector viral o un liposoma.

(6) Un vector que comprende

- (a) un gen de ciclina, seleccionándose la ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) un gen de la quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose la quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción de estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip,

en el que al menos uno del gen que codifica dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

(7) La composición farmacéutica de (1) o (4), el procedimiento de uno cualquiera de (2), (4) o (5), el uso de (3) o (4) o el vector de (6), en la que el componente de ubiquitina ligasa es un factor F-box capaz de unirse a la proteína de la familia Cip/Kip.

(8) La composición farmacéutica, el procedimiento, el uso o el vector de (7), en la que el factor F-box es capaz de unirse a la proteína de la familia Cip/Kip es Skp2.

(9) La composición farmacéutica de (1) o (4), el procedimiento de uno cualquiera de (2), (4) o (5), el uso de (3) o (4) o el vector de uno cualquiera de (6) a (8), en la que el ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip es un siARN que es específico del gen de p27^{Kip1}.

(10) Una composición farmacéutica que comprende el vector de una cualquiera de (6) a (9).

(11) El uso del vector de una cualquiera de (6) a (9) para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno cardíaco.

(12) El uso de uno cualquiera de (3), (4), (7) a (9) u (11), en el que el trastorno cardíaco es infarto de miocardio, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia congestiva cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocarditis o insuficiencia cardíaca crónica.

El uso del procedimiento de acuerdo con la invención permite la inhibición de la acción de la proteína de la familia Cip/Kip en el núcleo de los cardiomiocitos, para estimular la proliferación de cardiomiocitos. Además, las ventajas y rasgos característicos de la invención se describen suficientemente más adelante en la Sección Descripción detallada del modo preferible de realizar la invención.

Breve descripción de las figuras

[Fig. 1]
 Expresión de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS y CDK4. Al preparar de la proteína nuclear, la expresión de la proteína p27^{Kip1} se examinó mediante transferencia Western. CM: Cardiomiocitos de rata; REF: Línea celular de fibroblastos de rata (células REF52).
 [Fig.2]

Localización de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS y CDK4. Infectando los cardiomiocitos con un adenovirus recombinante portador del gen LacZ (columna superior; Cont) o el gen de D1NLS y el gen de CDK (columna inferior) se examinó la expresión intracelular de la proteína p27^{Kip1} mediante el procedimiento de tinción con inmunofluorescencia. En la figura, el color verde expresa la p27^{Kip1} y el color rojo expresa la actina sarcomérica. Además, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI.

[Fig. 3]

Regulación de la expresión de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos en estimulación con FBS o estimulación con D1NLS + CDK4 se trataron con un inhibidor del proteasoma lactostatina (LC) para comparación en términos de la expresión de la proteína p27^{Kip1}.

[Fig. 4]

Ubiquitinilación de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos. Se usó un extracto celular de cardiomiocitos (CM) o de fibroblastos (REF) en estimulación con FBS estimulación con D1NLS + CDK4 para la ubiquitinilación in vitro, para, después, detectar la proteína p27^{Kip1} mediante transferencia Western. En la figura, IB expresa el anticuerpo usado para el análisis de transferencia Western. Una banda observada en una posición con un peso molecular mayor es la proteína p27^{Kip1} ubiquitinilada (p27-GST-Ub).

[Fig. 5]

Expresión de la proteína Skp2 en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos en estimulación con FBS o estimulación con D1NLS + CDK4 se trataron con un inhibidor del proteasoma lactostatina (LC) para comparación en términos de la expresión de la proteína Skp2.

[Fig. 6]

Regulación de la proteína p27^{Kip1} mediante la coexpresión del gen de Skp2. Se examinó la expresión de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS, CDK4 y Skp2.

[Fig. 7]

Localización de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos con los genes de D1NLS, CDK4 y Skp2 coexpresados en ellos. Infectando los cardiomiocitos con un adenovirus recombinante portador de los genes de D1NLS + CDK4 (columna superior; Cont) o portador de los genes de D1NLS, CDK + Skp2 (columnas del medio e inferior) y tratando una parte de los cardiomiocitos con un inhibidor del proteasoma lactostatina (LC) (columna inferior), se examinó la expresión intracelular de la proteína p27^{Kip1} mediante el procedimiento de tinción con inmunofluorescencia. En la figura, el color verde expresa la p27^{Kip1} y el color rojo expresa la actina sarcomérica. Además, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI.

[Fig. 8]

Efecto de la expresión impuesta del gen de Skp2 sobre la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos. Infectando cardiomiocitos con un virus recombinante portador del gen LacZ (Cont.), los genes de D1NLS + CDK4, los genes de D1NLS + CDK4 + Skp2 o el gen de Skp2 solo, el número de cardiomiocitos se contó los días indicados.

[Fig. 9]

Reducción de la proteína p27^{Kip1} mediante la coexpresión del siARN específico del gen de p27^{Kip1}. En cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS, CDK4 y el siARN específico del gen de p27^{Kip1}, se examinó la expresión de la proteína p27^{Kip1}.

[Fig. 10]

Efecto de la expresión impuesta del siARN específico del gen de p27^{Kip1} sobre la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos. Infectando cardiomiocitos con un virus recombinante portador del gen LacZ (Cont.), los genes de D1NLS + CDK4, los genes de D1NLS + CDK4 + siARN específico de p27^{Kip1} sobre (siARN de p27) o portador del siARN específico del gen de p27^{Kip1} solo, el número de cardiomiocitos se contó los días indicados.

[Fig. 11]

Análisis del efecto de la expresión impuesta del gen de Skp2 sobre la reducción del peso del pulmón. El peso de pulmón de una rata de 6 semanas con isquemia poscardiaca y se midió la reperfusión para calcular la proporción con el peso corporal:

p < 0,05 vs. Grupo simulado. #: p < 0,05 vs. Grupo control.

[Fig. 12]

Cambio de la curva ventrículo izquierdo pasivo-volumen mediante la expresión impuesta del gen de Skp2. Usando un corazón de rata de 6 semanas tras isquemia cardíaca y reperusión, se preparó una curva ventrículo izquierdo pasivo-volumen. : p < 0,05 vs. Grupo simulado. # p < 0,05 vs. Grupo control. † : p < 0,05 vs. Grupo D1NLS.

[Fig. 13]

Análisis del efecto de la expresión impuesta del gen de Skp2 sobre la reducción del área con infarto cardíaco. El área con infarto cardíaco en una rata de 6 semanas tras isquemia cardíaca y se midió la reperfusión para calcular la proporción de ocupación de ventrículo izquierdo. #: p < 0,05 vs. Grupo control.

+: Que expresa adición de FBS y agentes farmacéuticos o infección con varios tipos de adenovirus recombinantes.

-: Que no expresa adición de FBS y agentes farmacéuticos ni infección con varios tipos de adenovirus recombinantes.

p27: Que expresa la proteína p27^{Kip1}.

Al realizar la invención, las personas que pretenden practicar la invención pueden consultar libros de texto de refe-

rencia convencionales en el campo de la técnica de biología molecular, microbiología, biología celular y procedimientos generales tales como tecnología de ADN recombinante y la tecnología de técnicas relacionadas, a menos que se indique lo contrario. Estos incluyen, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Sambrook & Russel, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Current Protocols in Molecular biology (editado por Ausubel, y col., John Wiley & Sons, 1987); Methods in Enzymology in series (Academic Press); PCR Protocols: Methods in Molecular Biology (editado por Barlett & Striling, Humana Press, 2003); Animal Cell Culture: A Practical Approach, 3ª edición (editado por Masters, Oxford University Press, 2000); Antibodies: A Laboratory Manual (editado por Harlow, y col. & Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987). Los reactivos y kit para los experimentos de cultivo celular y de biología celular a los se hace referencia en la presente memoria descriptiva pueden estar disponibles comercialmente en fabricantes tales como Sigma, Aldrich, Invitrogen/GIBCO, Clontech y Stratagene.

(Preparación de cardiomiocitos)

Los cardiomiocitos como diana para proliferar usando el procedimiento de la invención incluyen todas las células en el estadio de desarrollo, tales como cardiomiocitos de tipo fetal, tipo neonatal, y tipo adulto, y se definen como células con al menos uno, preferentemente varios, marcadores o patrones, verificados mediante al menos uno, preferentemente una pluralidad de los procedimientos que se describen a continuación.

La expresión de varios marcadores específicos de los cardiomiocitos se puede detectar mediante procedimientos bioquímicos o inmunoquímicos convencionales. Los procedimientos no están específicamente limitados. Preferentemente, se usan procedimientos inmunoquímicos, tales como el procedimiento de tinción inmunohistoquímica e inmunolectroforesis. Para estos procedimientos, se pueden usar anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales específicos del marcador que han reaccionado con células precursoras de cardiomiocitos o cardiomiocitos. Los anticuerpos dirigidos a marcadores específicos individuales están comercialmente disponibles y se pueden usar con facilidad. Los marcadores específicos de células precursoras de cardiomiocitos o cardiomiocitos incluyen, por ejemplo, la cadena pesada/cadena ligera de miosina, α -actinina, troponina I, ANP, GATA-4, Nkx2.5y MEF-2c.

De lo contrario, la expresión de marcadores específicos de células precursoras de cardiomiocitos o cardiomiocitos se puede verificar mediante procedimientos de biología molecular de uso habitual en la técnica relacionada para amplificar, detectar y analizar ARNm que codifica una proteína marcadora adecuada, incluida, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa mediada por transcriptasa inversa (RT-PCR) y análisis de hibridación. Se conocen las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas marcadoras (por ejemplo, cadena pesada/cadena ligera de la miosina, α -actinina, troponina I, ANP, GATA-4, Nkx2.5, and MEF-2c) específicas de precursoras de cardiomiocitos o cardiomiocitos y se pueden usar de bases de datos públicas tales como GenBank en el National Center for Biotechnology information. Las secuencias específicas de marcadores requeridas para usar como cebadores o sondas se pueden determinar con facilidad.

Además, adicionalmente se pueden usar índices fisiológicos. Específicamente, la pulsación autónoma de los cardiomiocitos y la expresión de varios canales iónicos en cardiomiocitos de modo que los cardiomiocitos puedan reaccionar con estímulos electrofisiológicos son los indicadores útiles de los mismos.

De acuerdo con el procedimiento divulgado de acuerdo con la invención, los cardiomiocitos existentes en tejidos cardíacos de mamíferos se pueden usar directamente como sujeto. Adicionalmente, también se pueden usar cardiomiocitos separados de tejidos cardíacos frescos mediante varios procedimientos, tales como un procedimiento enzimático o un cultivo celular primario de los mismos, que se obtiene cultivando los cardiomiocitos en las condiciones de cultivo adecuadas durante aproximadamente uno a 5 días. Procedimientos de cultivo específicos de cardiomiocitos se describen en numerosos libros de texto de referencia. En el presente documento, procedimientos típicos del mismo incluyen el método de Chien y procedimientos modificados del método de Chien (Chien, y col., J. Clin. Invest. 75: 1770, 1985; Meidell, y col., Am. J. Physiol. 251: H1076, 1986; Tamamori, y col., Am. J. Physiol. 275: H2036, 1998).

Adicionalmente, los cardiomiocitos cultivados incluyen cardiomiocitos obtenidos mediante la inducción de la diferenciación de células madre, sin limitaciones al ejemplo descrito con anterioridad. Con células madre para usar en la realización de la invención se quiere decir células con una propiedad de posible diferenciación en una célula con fenotipos de tipo cardiomiocito en cultivo in vitro. Específicamente, las células madre incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias (células ME) y células germinales embrionarias (células FE) derivadas de mamíferos, tal como ratones, monos y seres humanos, para su extenso uso actualmente como células de cultivo, y células madre pluripotenciales, tales como células progenitoras adultas pluripotenciales de tipo adulto (MAPC). Los protocolos estándar para los procedimientos para preparar, subcultivar y almacenar estas células se han establecido. Con referencia a, por ejemplo, muchos libros de texto de referencia, tales como Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory manual (editado por Hogan, y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994), Embryonic Stem Cells (editado por Turkesen, Humana Press, 2002) y varios libros de texto (Matsui, y col., Cell 70:841, 1992; Shambloott, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998; USP nº 6.090.622; Jiang, y col., Nature 418:41, 2002; publicación internacional N° 01/11011), estas células madre pluripotenciales se pueden usar fácilmente.

Las células madre utilizables de acuerdo con la invención no están limitadas a los tres tipos descritos anteriormente.

Se puede usar cualquier célula madre con características similares a las de las células ME. En este caso, las características similares a las de las células ME se pueden definir como propiedades biológicas celulares específicas de las células ME, tal como la existencia del marcador de superficie (antígeno) específico de células ME, la expresión del gen específico de células ME y la potencia de formación de teratoma y la potencia de formación de ratón quimera. Ejemplos específicos de las mismas incluyen células madre con características similares a las de las células ME, tales como células madre obtenidas tratando la células de la vaina de la raíz y las células epidérmicas con agentes químicos, tales como 5-azacitidina (Sharda & Zahner, publicación internacional nº 02/051980), células madre obtenidas tratando células mononucleares con el anticuerpo CR3/43 (Abuljadayel, Curr. Med. Res. Opinion 19:355. 2003) y células madre derivadas de células del oído interno de adultos (Li, y col., Nature Med., publicación online previa).

El procedimiento de la invención se puede usar para cualquier célula sin características similares a las de las células ME o cualquier célula no pluripotencial, siempre que la célula tenga al menos una propiedad de diferenciación en células con fenotipos similares a los cardiomiocitos al menos en cultivo in vitro. Ejemplos de dichas células incluyen células madre mesenquimatosas derivadas de células de médula ósea (Bruder, y col., USP 5.736.396; Pittenger, y col., Science 284:143, 1999), células CMG (Makino, y col. J. Clin. Invest. 103:697, 1999; publicación internacional WO 01/048151) y células Spoc derivadas de tejido muscular (publicación internacional WO 03/035382).

Como procedimiento de cultivo para preparar cardiomiocitos de células madre de acuerdo con la invención se puede usar cualquier procedimiento adecuado para inducir la diferenciación de los cardiomiocitos. En caso de usar, por ejemplo, las células ME, el procedimiento de cultivo incluye, por ejemplo, el procedimiento de cultivo en suspensión, procedimiento de cultivo de gota colgante, procedimiento de co-cultivo con células auxiliares, procedimiento de cultivo en rotación, procedimiento de cultivo en agar blando y procedimiento de cultivo con microtransportador. Se han establecido varios procedimientos para el procedimiento específico de inducción de la diferenciación. Las personas que pretenden la práctica de la invención pueden consultar libros de texto de referencia, tales como Embryonic Stem Cells (editado por Turksen, Human Press, 2002), y varios libros de texto de referencia (Klug, y col., J. Clin. Invest. 98:216, 1996; Wobus, y col., J. Mol. Cell. Cardiol. 29:1525, 1997; Kehat, y col., J. Clin. Invest. 108:407, 2001; Xu, y col., Circ. Res. 91:501, 2002; Takahashi, y col., Circulation 107:1912, 2003; Field, y col., USP 6.015.671; Xu, y col., publicación internacional WO 03/06950).

(Procedimiento para proliferar cardiomiocitos)

Un modo de llevar a cabo la invención es un procedimiento tal como se define en las reivindicaciones para proliferar cardiomiocitos, incluida una etapa de introducir y expresar ciclina y CDK en los cardiomiocitos y una etapa de inhibir la producción, función y acción de la proteína Cip/Kip. Como los cardiomiocitos, las células separadas de tejidos cardíacos vivos mediante varios procedimientos, tales como un tratamiento enzimático, un cultivo celular primario obtenido cultivando los cardiomiocitos mencionados anteriormente en las condiciones de cultivo adecuadas durante de uno a 5 día y cardiomiocitos diferenciados e inducidos a partir de varias células madre se pueden usar como se ha descrito anteriormente. Los cardiomiocitos existentes en el tejido cardíaco de un mamífero se pueden proliferar tratando directamente los cardiomiocitos mediante varios procedimientos que se describen a continuación y manteniendo las células in vivo. El término "manteniendo" en el presente documento significa dejar que la célula sobreviva sin ningún deterioro de las funciones fisiológicas en un ambiente fisiológico en un organismo vivo, tal como una temperatura corporal y un flujo sanguíneo adecuados a un volumen requerido para mantener la célula.

Uno de los procedimientos más preferibles para introducir y/o expresar ciclina y CDK en cardiomiocitos es el procedimiento de DNLS/CDK previamente dado a conocer por los inventores (véase la referencia patente 1 y la referencia no patente 5). Específicamente, primer se preparan dos tipos de vectores adenovirus con el gen de D1NLS (ciclina D1 marcada con NLS) o el gen de CDK4 integrada en el mismo; después, los dos tipos de virus se infectaron en cardiomiocitos para localizar la proteína ciclina D1 y la proteína CDK4 en el núcleo, de modo que se puede estimular la división y la proliferación de cardiomiocitos que generalmente apenas se dividen o proliferan. El contenido de la memoria descriptiva de la patente y el artículo también se incluyen en la presente memoria descriptiva.

Al llevar a cabo la invención, el procedimiento para introducir y/o expresar ciclina y CDK en cardiomiocitos puede ser cualquier procedimiento siempre que el procedimiento sea capaz de inducir el mismo efecto que el procedimiento de DNLS/CDK, sin limitaciones específicas. Por ejemplo, la ciclina que se va a introducir y expresar en cardiomiocitos puede ser cualquier ciclina capaz de activar CDK4 o CDK6. Aparte del de la ciclina D1 se puede usar el gen de la ciclina D2 o la ciclina D3.

Mientras tanto, la CDK puede activarse satisfactoriamente por tipo de ciclina D. Como tal CDK, no solo se puede usar la CDK4 sino también la CDK6 de acuerdo con la invención. Dicho gen de ciclina o de CDK se ha aislado e identificado a partir de varios organismos, incluidos seres humanos. Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos se pueden usar procedentes de bases de datos públicas de ADN, tal como GenBank. Por tanto, un experto en la técnica puede obtener fácilmente dichos genes previstos diseñando cebadores o sondas específicos y usando procedimientos generales de biología molecular.

Como procedimiento para introducir ciclina y CDK en los cardiomiocitos, se pueden usar procedimientos físicos, tales como inyección microscópica. Desde el punto de vista de la eficiencia de la introducción, preferentemente se

usa el procedimiento de transfección génica. Adicionalmente, una molécula proteica producida en el citoplasma de los cardiomiocitos mediante la expresión del gen transfeccionado se transfiere, preferentemente, al núcleo. El procedimiento para ello puede ser cualquier procedimiento sin limitaciones específicas. El procedimiento incluye, por ejemplo, un procedimiento para marcar una secuencia de nucleótidos que codifica la NLS a cada uno de los genes. Dos tipos de proteínas generadas por estos genes, es decir ciclina y CDK forman un complejo en el citoplasma. Cuando una cualquiera de las proteínas, preferentemente la ciclina, tiene la secuencia de NLS, en consecuencia, el complejo resultante se puede transferir al núcleo. Actualmente se conocen tres tipos de las secuencias de NLS. Específicamente, un primer ejemplo es un tipo con casi ningún aminoácido básico, tal como lisina y arginina, y es, por ejemplo, la NLS en la nucleoproteína del virus de la gripe (Davy, y col., Cell 40:667, 1985). Un segundo ejemplo es un tipo a un contenido más alto de aminoácidos básicos y es, por ejemplo, la secuencia de la NLS (N-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-C; SEC ID N° 1) del antígeno T del SV40 (Kalderon, y col., Nature 311:33, 1984). Un tercer ejemplo es un tipo en el que los aminoácidos básicos forman un grupo a un intervalo de aproximadamente 10 aminoácidos y se denomina la NLS del tipo bipartito (Robbin, y col., Cell 64:615, 1991). La NLS para usar en la presente invención puede ser cualquiera de los tres tipos. También se pueden otras NLS además de los tres tipos. En vista de la longitud de la secuencia de NLS, preferentemente se usa la potencia de transferir una molécula proteica deseada al núcleo y la fácil disponibilidad del gen de la secuencia de NLS, la secuencia de NSL del antígeno t de SV40. Por ejemplo, en Invitrogen hay comercialmente disponible un plásmido que contiene la secuencia de NLS del antígeno T del SV40, es decir pEF/myc/nus.

De acuerdo con la invención, la proteína de la familia Cip/Kip es una serie de grupos de proteína que componen una familia de los inhibidores de CDK que regulan negativamente la progresión del ciclo celular e incluye tres moléculas de p21^{cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Se sabe que la proteína de la familia Cip/Kip inhibe las funciones de varios complejos de ciclina-CDK, por ejemplo ciclina D-CDK4/CDK6 y ciclina A/E-CDK2 (véase una revisión de Sherr y Roberts, Genes Dev. 9:1149, 1995).

Entre las proteínas de la familia Cip/Kip, actualmente se está analizando la función y los rasgos característicos de p27^{Kip1} en concreto. La p27^{Kip1} se identificó primero como factor de unión al complejo ciclina E-CDK2 en una célula con el ciclo celular detenido mediante estímulo con TGF-β (Koff, y col., Cell 66:1217, 1991). Se sabe que la p27^{Kip1} es un regulador negativo del ciclo celular responsable de la detención de la fase G1. Por ejemplo, el exceso de expresión de la proteína p27^{Kip1} en células de mamífero induce detención del ciclo celular en la fase G1 (Polyak, y col., Cell 79:59, 1994; Toyoshima & Hunter Cell 78: 67, 1994). Se ha sugerido que la p27^{Kip1} desempeña un papel significativo en la retención de la fase G0 en células en la fase estática, ya que p27^{Kip1} se expresa considerablemente en este estado de las células (Nourse, y col., Nature 372:570, 1994) Los investigadores siguientes indican que las proteínas p27^{cip1} y p57^{K2} tienen estructuras, funciones y rasgos característicos muy similares a los de p27^{Kip1} (Mainprize, y col., J. Neurooncol. 51:205, 2001; Conqueret, Trends. Cell Biol. 13 : 65, 2003). A menos que se indique lo contrario, la expresión proteína (de la familia) Cip/Kip quiere decir los tres tipos, p27^{cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, más preferentemente p27^{Kip1} de la que se trata más adelante en el presente documento.

Al llevar a cabo la invención, el procedimiento para inhibir las funciones y acciones de la proteína de la familia Cip/Kip no tiene limitaciones específicas. Un ejemplo del mismo es un procedimiento para suprimir la actividad de la proteína Cip/Kip que incluye un procedimiento de introducir en las células anticuerpos neutralizantes que inhiben las funciones y acciones de la proteína o compuestos de bajo peso molecular o similares. Adicionalmente, un procedimiento por el cual la estimulación de la degradación de la proteína Cip/kip se induce no tiene limitaciones específicas. No obstante, preferentemente, el procedimiento es un procedimiento de estimula la ubiquitinilación de la proteína.

La ubiquitina es un polipéptido muy abundante en todas las células eucarióticas. El nivel de expresión de la proteína de la familia Cip/Kip en las células está regulado principalmente con un sistema de degradación mediante la ruta de la ubiquitina (Pagano, y col., Science 269: 682, 1995; Maki & Howley, Mol. Cell Biol. 17:355, 1997; Urano, y col., J. Biol. Chem. 274:12197, 1999). Específicamente, la cadena de poliubiquitina está unido covalentemente a la proteína Cip/Kip (ubiquitinilada) mediante las funciones y acciones de la enzima activadora de ubiquitina (E1), la encima que forma complejo con la ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3). Posteriormente, la proteína Cip/Kip ubiquitinilada se degrada finalmente con el proteasoma 26S. Por tanto, el procedimiento para introducir una molécula que estimula la ubiquitinilación de la proteína de la familia Cip/Kip en cardiomiocitos es preferible al llevar a cabo la invención. Cualquier con una acción de estimulación de la ubiquitinilación de la proteína Cip/Kip es satisfactoria como sustancia que se va a introducir en cardiomiocitos. Específicamente, la sustancia incluye, por ejemplo, agentes farmacéuticos, proteínas, péptidos y compuestos de bajo peso molecular. Preferentemente se usa ácido nucleico, es decir el gen. Dicho gen incluye genes que codifican proteínas que componen enzima de activación de ubiquitina, enzima de formación de complejo con ubiquitina y ubiquitina ligasa. Dado que se considera que la ubiquitina ligasa que es responsable de la especificidad de la ubiquitinilación de una proteína diana específicamente se usan, preferentemente, se usan los genes que codifican las proteínas que componen la ubiquitina ligasa (complejo).

Actualmente, como la ubiquitina ligasa, se conocen numerosas especies moleculares, incluido el complejo APC/C, el complejo VBC, el complejo SCF, Nedd4, Ufd4, Rad5, Rad18 y Parkin. Adicionalmente, existen varios tipos del complejo SCF, en función de la diferencia en las proteínas F-box contenidas en el mismo como componente y son, por ejemplo, SCF^{βTrCP}, SCF^{cdc4}, SCF^{Met30} y SCF^{Grr1} (Patton, y col., Trends Genet. 14:236, 1998; Jackson y Eldridge, Mol.

Cell 9:923, 2002). Como la ubiquitina ligasa (complejo) implicada en la ubiquitinilación de la proteína Cip/Kip, se conoce la ubiquitina ligasa SCF^{skp2}. El gen que codifica el componente del complejo se usa preferentemente, sin limitaciones específicas. También se puede usar el gen que codifica el componente de la ubiquitina ligasa con una acción para estimular la ubiquitinilación de la proteína Cip/Kip. Se sabe que en las moléculas que componen SCF^{skp2}, la proteína F-box denominada Skp2 en particular reconoce Cip/Kip a la que se une, para añadir la cadena de poliubiquitina a la proteína (Carrano, y col., Nature Cell Biol. 1:193, 1999; Tsvetkov, y col., Curr. Biol. 9:661, 1999; Bornstein, y col., J. Biol. Chem. 278:26752, 2003; Kamura, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10231, 2003). Por tanto, al llevar a cabo la invención, el gen que codifica la proteína Skp2 (en ocasiones denominado gen Skp2 en lo sucesivo en el presente documento) se usa preferentemente como el gen que se va a introducir en los cardiomiocitos.

El gen Skp2 se aisló e identificó en seres humanos (Zhang, y col., Cell. 82: 915, 1995), y en animales, tal como ratones (Nakayama, y col., EMBO J. 19:2069, 2000; Nakayama, y col., JP-A-2001-224380) y ratas. También se indica la secuencia de nucleótidos del mismo. Adicionalmente, la información sobre la secuencia del mismo está disponible en bases de datos públicas de ADN, tal como GenBank (skp2 humana: U33761, AY029177; Skp2 de ratón: AF083215, BC003468). Por tanto, un experto en la técnica puede obtener y usar el gen Skp2 diseñando cebadores o sondas específicos del gen skp2 y usando procedimientos generales de biología molecular. Los genes Skp2 derivados de mamíferos, tales como seres humanos, ratones o ratas, pueden producir los mismos resultados que el gen Skp2 que se va a usar para llevar a cabo la invención.

Adicionalmente, al llevar a cabo la invención, también se puede usar no solo el gen Skp2 sino también los genes que codifican factores que estimulan la ubiquitinilación y/o degradación de la proteína Cip/Kip (denominados genes que estimulan la degradación de la proteína Cip/Kip, más adelante en el presente documento), como el gen Skp2, como genes para introducir en cardiomiocitos. Por ejemplo, también se pueden usar genes que codifican la proteína F-box que reconoce y se une a la proteína Cip/Kip, una proteína F-box con una homología del 80 % o mayor, preferentemente una homología del 90 % o mayor, con la secuencia de aminoácidos de una región motivo denominada repetición WD-40 o repetición rica en leucina considerada como el sitio de reconocimiento/unión al sustrato de Skp2, y los componentes de la ubiquitina ligasa con la propiedad de estimular la ubiquitinilación de la proteína Cip/Kip.

También se pueden usar genes que codifican las proteínas de cualquier factor con una acción de unirse específicamente y/o interactuar con la proteína p27^{Kip1} para estimular la degradación de la misma sin ninguna implicación directa en la ubiquitinilación de la proteína Cip/Kip para el procedimiento de la invención. Los informes hablan de, por ejemplo, la nucleoporina 50 como proteína de unión a poros de la membrana nuclear (también denominada Nup50, NPAP60 y p163) (Buergin, y col., EP NO. 926, 236; Mueller, y col., EMBO J. 19:2168, 2000; Smitherman, y col., Mol. Cell. Biol. 20: 5631, 2000; Buergin, y col., USP 6,265,562), and Jab1/CSN5 as Cop9 signalosome' (Tomoda, y col., J. Biol. Chem. 277: 23022002), como tales genes. Se sabe que cuando se fosforila el residuo de serina en la posición 10 de p27^{Kip1}, la p27^{Kip1} se une a la proteína CRM1 como transportador de localización extranuclear, de modo que la p27^{Kip1} es exportada fuera del núcleo y, después, se degrada (Ishida, y col., J Biol. Chem. 277: 14355, 2002; Connor, y col., Mol. Biol. Cell 14:201, 2003). Como fosforilasa específica del residuo de serina en la posición 10 de la proteína se ha identificado la proteína KIS (estamina de interacción por quinasa) (Boehm, y col., EMBO J. 21:3390, 2002). También entra dentro del alcance de la realización de la invención un procedimiento que usa el gen que codifica la proteína KIS. De acuerdo con la invención, los factores o los genes asociados con los factores se pueden usar solos o en combinación con una pluralidad de los mismos para el fin de estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip.

Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento de llevar a cabo la invención incluye característicamente una etapa de introducir genes que codifican ciclina y CDK, al menos uno de los cuales se marcó con NLS, y el gen de estimulación de la degradación de la proteína Cip/Kip en cardiomiocitos y expresar dichos genes en ellos. Preferentemente, estos genes están unidos con una secuencia de ácido nucleico que permite la transcripción y la expresión de genes en células de mamífero, incluidos preferentemente cardiomiocitos, la secuencia del denominado promotor, de un modo que la transcripción y la expresión de los mismos puedan realizarse bajo la regulación del promotor. Además, el gen que se va a transcribir y expresar está unido, preferentemente, a una señal de poliadenilación (poliA). Preferentemente, el promotor incluye, por ejemplo, promotores derivados de virus, tal como el virus SV 40 (virus de simio), virus citomegalovirus (CMV) y virus del sarcoma de Rous; y el promotor de la β-actina y el promotor de Ef1a (factor de elongación). Adicionalmente, es particularmente preferible el promotor CAG (Niwa, y col., Gene 108:193, 1991) como promotor híbrido preparado mediante la integración de un potenciador de CMV y la secuencia señal de poliA del gen de la p-globina de conejo en el promotor de la β-actina de pollo.

En otro modo de realizar la invención, el promotor para usar en la transcripción y la expresión del gen es un promotor específico de cardiomiocitos. Incluso en este caso, el gen que se va a transcribir y expresar está unido, preferentemente, a una señal de poliA. El promotor específico de cardiomiocitos incluye, por ejemplo, la cadena ligera de la miosina específica de cardiomiocitos (Lee, y col., J. Biol. Chem. 267:15876, 1992), el promotor de la cadena pesada de la miosina específica de cardiomiocitos y el promotor de la proteína de repetición de la anquirina cardíaca específica de cardiomiocitos (CARP) (Cuo, y col., Development 126:4223, 1999; publicación internacional WO 00/15821). Las secuencias de nucleótidos de estos promotores están disponibles en las bases de datos de ADN públicas, tal como GenBank. Usando procedimientos generales de biología molecular se pueden preparar vectores génicos usando la secuencia génica deseada.

De acuerdo con la invención, también se puede usar un procedimiento para suprimir la expresión del gen que codifica la proteína (transcripción de ARNm) o un procedimiento para inhibir la traducción y la producción del producto génico, en lugar del procedimiento para estimular la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip. Específicamente, se puede introducir intracelularmente un ácido oligonucleico o un derivado del mismo o similar que suprime o termina el gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip o el gen que codifica un factor capaz de inducir la expresión de la proteína. De acuerdo con la invención, el término derivado de ácido oligonucleico quiere decir un compuesto preparado llevando a cabo modificación, adición o sustitución química en un sitio adecuado de un ácido nucleico con el fin de elevar la estabilidad intracelular y la eficiencia de incorporación del ácido nucleico. El derivado del mismo incluye, por ejemplo, ácido oligonucleico fosforotioado o ácido oligonucleico preparado sustituyendo uridina o citidina con 2'-fluorouridina o 2'-fluorocitidina.

Como ácido oligonucleico disponible para el fin, se conocen, por ejemplo, ADN antisentido, ADN que codifica ARN con actividad de ribozima y ADN señuelo. Recientemente se ha establecido un ARN de interferencia (denominado ARNi) usando ARN bicatenario. El ARNi es un fenómeno de degradación específica de ARNm endógeno en un gen diana cuando se introduce intracelularmente ARN bicatenario con la misma secuencia que la del gen diana o una secuencia similar a la del gen diana. En una etapa temprana se creía que la aplicación de ARNi como procedimiento de supresión génica específica en animales mamíferos implicaba muchas dificultades. Se demostró que usando un ARN bicatenario corto como producto intermedio del ARNi (denominado ARN de interferencia corto/pequeño; siARN), el ARNi también era aplicable a células de mamífero (Hammond, y col., Nat. Rev. Genet. 2:110, 2001; El-bashir, y col., Nature 411-494, 2002). En cuanto a las revisiones sobre el siARN y los procedimientos de preparación y procedimientos de uso del mismo, véase, por ejemplo, varios libros de texto de referencia, por ejemplo RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology (editado por Engelke, DNA Press, 2004) y RNA Interference, Editing, and Modification; Methods and Protocols (editado por Gott, Humana Press, 2004).

El siARN se puede preparar fácilmente mediante el procedimiento general de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o síntesis química. Se sabe que el efecto del siARN depende de la característica de la secuencia. El siARN específico del gen de la proteína Cip/Kip se puede preparar en base a la secuencia génica del gen, preferentemente la secuencia de 300 pb a partir del codón de iniciación. EL gen para usar en el ARNi no necesariamente es absolutamente el mismo que el gen diana. El gen para usar en el ARNi es con una homología de al menos 70 % o más, preferentemente 80 % o más, más preferentemente 90 % o más, más preferentemente 95 % o más, con el gen diana. La información sobre la secuencia de nucleótidos del gen está disponible en bases de datos de ADN públicas, tal como GenBank. Las proteínas p27^{Kip1} de seres humanos, ratones y ratas están registradas con los n° de registro U10906, U10440 y D83792, respectivamente. Se han dado a conocer varios procedimientos y programas para diseñar un siARN más eficaz (Chalk, y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 319:264, 2004; Ti-Tei, y col., Nucl. Acids Res. 32:936, 2004; Reynolds, y col., Nat. Biotechnol. 22:326, 2004). Un experto en la técnica puede preparar, de acuerdo con esto, y usar un siARN específico del gen de la proteína Cip/Kip, tal como el gen de p27^{Kip1}.

El siARN preparado mediante el procedimiento se puede usar en forma de un ácido oligonucleico o un derivado del mismo. En vista de, por ejemplo, la eficiencia de la expresión y la duración del efecto, el siARN se usa, preferentemente, en una forma del mismo integrado en un vector de expresión de ARN. El vector de expresión de ARN incluye, por ejemplo, cualquier vector de expresión con un promotor capaz de permitir la expresión de un siARN, sin limitaciones específicas. Preferentemente se usan los promotores Pol III adecuados para la expresión de ARN corto, particularmente los promotores U6 y H1. Adicionalmente, preferentemente se usa el promotor de ARNt que permite de forma activa la localización del producto de transcripción en el citoplasma. El vector de expresión siARN capaz de usar estos promotores están disponibles comercialmente en Ambion, Invitrogen, TAKARA BIO y iGene.

Como procedimiento para introducir el gen o el vector génico, se pueden usar todos los procedimientos conocidos. El procedimiento incluye, por ejemplo, procedimientos de transfección usando fosfato cálcico, cualquier pulso eléctrico, un procedimiento que incluye sellar un gen previsto en un liposoma y, después, transfeccionar el gen en una célula y un procedimiento que incluye integrar un gen previsto en vectores virales, tales como retrovirus y adenovirus, e infectar los virus recombinantes resultantes en una célula. En este caso, la expresión vector viral significa una construcción en la que un gen previsto está integrado en una secuencia de ácido nucleico con deficiencia o mutación de toda la longitud o parte del ADN o ARN del virus para permitir su expresión.

El vector viral incluye vectores derivados de, por ejemplo, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), retrovirus, virus de hemaglutinación Nippon (HVJ; virus Sendai como otro nombre), lentivirus, virus vaccinia, virus de la varicela y papovavirus, incluido el SV40. Usando un vector de adenovirus, un vector de AAV, un vector de HVJ o un vector de lentivirus, preferentemente, se puede conseguir una transferencia génica eficiente y niveles altos de expresión del transgen. La transferencia génica mediante estos vectores víricos es uno de los procedimientos más potentes para introducir genes en células de mamífero. En la prácticamente, el procedimiento es aplicable para introducir genes en todos los tipos de células humanas y un gran número de células no humanas. Dado que la infección con estos virus nunca depende del ciclo celular, los genes se pueden expresar en varias series de cultivo celular primario y series de células transformadas. Los genes se pueden introducir de una forma muy eficiente, incluso en una célula que no tiene síntesis de ADN o división celular como los cardiomiocitos. Dado que un gran número de células reciben muchas copias de ADN (ARN) recombinante tras la infección, el gen introducido se expresa de forma transitoria a nive-

les elevados. En caso del vector de adenovirus y del vector de HVJ, por ejemplo, el ADN/ARN se retienen generalmente en el citoplasma, pero rara vez se incorpora en el núcleo. Por tanto, cuando se usan estos virus, de forma ventajosa apenas aparecen errores mutagénicos aleatorios cuando los genes extraños se incorporan en los genomas de la célula huésped.

5 El vector adenovirus para uso como una de las realizaciones preferibles de acuerdo con la invención se puede preparar mediante un procedimiento usando recombinación homóloga en huéspedes tales como células renales embrionarias humanas 293 o *Escherichia coli* (Miyake, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1320, 1996) y un simple procedimiento de unión *in vitro* (Mizuguchi, y col., Hum. Gene Ther. 9:2577, 1998). El vector adenovirus es uno de los virus de ADN con un genoma de ADN bicatenario. Los adenovirus humanos del tipo 5 y el tipo 2 se han sometido a una intensa investigación. Eliminando la mayoría de los genes E1 y E3 de estos adenovirus de cepa silvestre, se pueden preparar vectores víricos sin potencia de replicación de modo que el ADN extraño de varias kb se puede insertar sin efectos adversos sobre la formación de partículas víricas. El adenovirus recombinante carece del gen E1 como factor de regulación de la transcripción. No obstante, el vector adenovirus puede expresar el gen previsto insertado solo mediante una unidad de transcripción específica del gen insertado, sin dependencia de la proliferación de una célula diana o la presencia o ausencia de otro gen viral.

Las personas que pretenden practicar la invención pueden consultar varios libros de texto de referencia relativos a revisiones de vectores adenovirus y otros vectores virales, y procedimientos para preparar y usar dichos vectores. Los libros de texto de referencia incluyen, por ejemplo, *Gene Therapy Protocols: Methods in Molecular Medicine* (editado por Robbins, Humana Press, 1997), *Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications* (editado por March, Kluwer Academic Publishers, 1997), *Adenoviral Vectors for Gene Therapy* (editado por Curiel & Douglas, Academic Press, 2002). Los kits para preparar vectores adenovirus están disponibles comercialmente. Por ejemplo, el kit del vector de expresión de adenovirus (nº 6170) disponible comercialmente en Takara Bio es aplicable a la práctica de la invención. En realidad, los inventores han dado a conocer un ejemplo con éxito (véase Nakayama, y col., EMBO J. 19: 2069, 2000; la referencia patente 1 y la referencia no patente 5 descritas con anterioridad).

En el caso de desear la expresión de varios genes, tal como una combinación del gen de la ciclina y el gen de CDK y la combinación con otro gen que estimula la degradación de la proteína Cip/Kip, de acuerdo con la invención, estos dos tipos o tres tipos de genes se pueden integrar en un vector viral para infección o se pueden infectar en forma de vectores recombinantes individuales. En el caso de infección concurrente con varios virus recombinantes, de forma satisfactoria éstos se pueden infectar de forma simultánea o se pueden infectar por separado a un intervalo dado. Como nivel de los virus que se van a infectar de acuerdo con la invención se usa una solución madre del virus a, por ejemplo, 10^7 a 10^{13} ufp/ml, más preferentemente de 10^9 a 10^{12} ufp/ml. Para una célula en cultivo, la solución madre del virus se ajusta, preferentemente, a aproximadamente 100 virus por célula (moi= 100) para infección. El título del virus se puede realizar fácilmente mediante ensayo en placas.

En el presente documento también se describe que en lugar del (1) gen de la ciclina, (2) el gen de CDK y (3) uno cualquiera de una pluralidad de genes que estimulan la degradación de la proteína Cip/Kip o ácidos nucleicos que inhiben la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, se puede usar un compuesto de bajo peso molecular con el efecto de expresar el gen y la misma acción que la del gen, incluido, específicamente, un compuesto con una acción similar a la de la proteína ciclina, un compuesto con una acción similar a la de la proteína CDK, un compuesto con una acción de estimulación de la degradación de la proteína Cip/Kip o un compuesto con una acción de inhibición de la producción de la proteína Cip/Kip. En este caso, el procedimiento para introducir el compuesto en cardiomiocitos no tiene limitaciones específicas. En general, el compuesto se disuelve en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución fisiológica salina tamponada y soluciones diluyentes, para formas de dosificación tales como administración oral, inyecciones intravenosas, inyecciones intraperitoneales, administración transcutánea, inyecciones subcutáneas e inyecciones directas en tejido cardíaco. En el caso de que los cardiomiocitos sean células de cultivo, el compuesto puede también añadirse directamente al medio de cultivo para ello.

En una realización adicional de la invención se puede proporcionar una composición farmacéutica para terapia génica, conteniendo la composición el vector génico para uso en la práctica de la invención, preferentemente un vector viral, más preferentemente vector adenovirus o vector HVJ, vector AAV y vector lentivirus. Dicha composición farmacéutica para terapia génica se puede usar como agente farmacéutico para regenerar cardiomiocitos o como agente terapéutico para enfermedades cardíacas. Cualquier enfermedad cardíaca puede ser sujeto para ello, siempre que la enfermedad cardíaca implique deterioro de cardiomiocitos, detención de la función o muerte. Ejemplos específicos de las mismas incluyen infarto cardíaco, enfermedades cardíacas isquémicas, insuficiencia congestiva cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocarditis e insuficiencia cardíaca crónica.

Cualquier forma de la composición farmacéutica es satisfactoria. La composición farmacéutica se puede formular mediante procedimientos de rutina. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar en forma de una preparación inyectable que contenga el vector de expresión génica de la invención en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como agua estéril y solución salina fisiológica tamponada y soluciones diluyentes. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener adicionalmente estabilizantes adecuados (por ejemplo inhibidores de la nucleasa), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA) y/u otros agentes auxiliares. La composición farmacéutica

que contiene los componentes se puede esterilizar mediante filtración y similares si es necesario y, después, se puede cargar en una ampolla aséptica. Usando, por ejemplo, una bomba osmótica o un tubo osmótico, la formulación se puede liberar de forma constante en un sitio dañado. En el presente documento, la dosis de la composición farmacéutica de la invención necesariamente se aumenta o reduce adecuadamente, en función de condiciones como la edad, el sexo, el peso corporal y los síntomas del paciente y la vía de administración. Un experto en la técnica puede determinar adecuadamente la dosis requerida. En general, una dosis única para adultos está dentro de un intervalo de aproximadamente 1,0 µg/kg a 1,0 g/kg, preferentemente dentro de un intervalo de aproximadamente 10 µg/kg a 100 mg/kg. En caso de usar vectores virales, tales como vector adenovirus, adicionalmente, el título final del virus es, preferentemente, de 10^7 a 10^{13} ufp/ml, más preferentemente de 10^9 a 10^{12} ufp/ml.

En caso de que el vector de expresión génica sea un vector no viral, en particular, la composición farmacéutica de la invención puede suministrarse en un complejo con un liposoma. Mediante esta forma, la composición farmacéutica puede, posiblemente, efectuar una eficiencia de transfección elevada en particular en cardiomiocitos. Como ejemplos específicos de liposoma se ha desarrollado un gran número de formulaciones lipídicas, incluidas, por ejemplo, cloruro de N-[2,3-(dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamono (DOTMA) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Se han realizado experimentos sobre transfección usando varios sistemas celulares (Banerjee, J. Biomater. Appl. 16:3, 2001; Maurer, y col., Expert Opin. Biol. Ther. 1:923, 2001). Adicionalmente, también es eficaz un procedimiento usando liposomas víricos formadores de fusión con una cubierta formadora de fusión derivada del HVJ, el denominado procedimiento HVJ-liposoma (Yonemitsu, y col., Int. J. Oncol. 12:1277, 1998; Kaneda, y col., Mol. Med. Today 5:298, 1999)

El vector de expresión génica o una composición farmacéutica que contiene el vector puede introducirse de forma satisfactoria en el corazón de un paciente con enfermedad cardíaca. No obstante, preferentemente, el vector de expresión génica de una composición farmacéutica se puede introducir de un modo limitado en un lugar enfermo. De acuerdo con la invención, la expresión lugar enfermo quiere decir un lugar con cardiomiocitos deteriorados, con la función detenida o muertos, o en su proximidad, en individuos (seres humanos o animales no humanos: lo mismo es cierto a continuación en el presente documento) o un lugar con una progresión prevista del deterioro o deterioro funcional de los cardiomiocitos o la muerte de los mismos. En este caso, el procedimiento para introducir el vector de expresión génica o una composición farmacéutica que contiene el vector de expresión génica en un lugar dañado incluye un procedimiento de inyectar directamente el vector de expresión génica o una composición farmacéutica que contenga el mismo en el corazón después de una toracotomía, usando una jeringuilla de inyección, y un procedimiento para inyectar el vector o la composición farmacéutica a través de un tubo de sangre con guía de diafanoscopia de rayos X. El procedimiento a través del tubo de sangre es preferible porque la introducción del gen se puede localizar justo en el corazón mediante el procedimiento. En este caso, el vector de expresión génica o una composición farmacéutica que contiene el vector se puede inyectar en el tubo de sangre para liberar el vector o la composición mediante flujo de sangre en los cardiomiocitos. El vector o la composición farmacéutica pueden también inyectarse directamente en la capa de músculo cardíaco que está en contacto con los cardiomiocitos. Dichos procedimientos quirúrgicos usando un catéter y similares se conocen en la técnica. Los libros de texto de referencia para ello incluyen, por ejemplo, Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications (editado por March, Kluwer Academic Publishers, 1997), Vascular Surgery, 5ª Edición (Rutherford, W.B.Saunders, 2000) y Textbook of Interventional Cardiology, 4ª edición (editado por Topol, W.B.Saunders, 2002). El catéter para usar al realizar la invención está disponible comercialmente en Boston Scientific, Edwards Life Sciences Corporation y similares.

A partir de los cardiomiocitos proliferados mediante el procedimiento de la invención se pueden obtener a gran escala, con eficiencia, usando de forma continua procedimientos de recuperación, separación y purificación celular de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos. Los cardiomiocitos obtenidos de este modo se denominan cardiomiocitos preparados de acuerdo con la invención que se indican más adelante en el presente documento.

Se puede usar cualquier procedimiento de purificación de cardiomiocitos, siempre que el procedimiento esté entre los procedimientos conocidos para separación y purificación celular. Ejemplos específicos de los mismos incluyen procedimientos de acuerdo con reacciones de antígeno-anticuerpo, por ejemplo procedimientos con citómetro de flujo y perlas magnéticas y método de cribado, y procedimientos de fraccionamiento celular mediante centrifugación por gradiente de densidad, usando vehículos tales como sacarosa y Percol. Otro procedimiento de detección selectiva de cardiomiocitos es un procedimiento para recuperar de forma selectiva cardiomiocitos, dando, preliminarmente, dicha modificación artificial para proporcionar tolerancia química y potencia de expresión de la proteína ectópica, a un gen de un animal o una célula madre, tal como una célula ME, como fuente de cardiomiocitos y, después, usando las modificaciones resultantes como indicador para la detección selectiva. Por ejemplo, Field y col. construyeron un sistema preparado introduciendo un casete génico capaz de expresar un gen resistente a neomicina (G418) en una célula ME murina bajo el control del promotor de la cadena α pesada de la miosina, para diferenciar las células ME en cardiomiocitos para permitir la expresión del gen de la cadena α pesada de la miosina tras la diferenciación, justo cuando la célula resultante puede sobrevivir en un medio de cultivo suplementado con G418. A continuación, los investigadores dan a conocer que la célula cribada como célula resistente a G415 es un cardiomiocito con una probabilidad del 99 % o mayor (documento 6.015.671; J. Clin. Invest. 98:216, 1996).

En una realización adicional de la invención, los cardiomiocitos preparados de acuerdo con la invención son útiles

para la evaluación farmacológica y evaluación de la actividad de varias sustancias fisiológicamente activas (por ejemplo, fármacos) y nuevos productos génicos funcionalmente no identificados. Por ejemplo, los cardiomiocitos se pueden usar para la detección selectiva de una sustancia o un agente farmacéutico asociado con la regulación funcional de los cardiomiocitos y de una sustancia y un agente farmacéutico con toxicidad y una propiedad de daño contra cardiomiocitos. En una realización más adicional, un kit de evaluación que contiene los cardiomiocitos preparados de acuerdo con la invención es útil para la detección selectiva.

Cualquier tipo de sustancias de ensayo para usar en la detección selectiva pueden ser satisfactorias siempre que las sustancias de ensayo se puedan añadir al sistema de cultivo e incluye, por ejemplo, compuestos de bajo peso molecular, compuestos de alto peso molecular, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, proteínas, péptidos, genes, virus, células, cultivo celular líquido y cultivo microbiano líquido. El procedimiento para introducir con eficiencia el gen al sistema de cultivo incluye un procedimiento de añadir vectores virales, tales como retrovirus y adenovirus, al sistema de cultivo, o un procedimiento de sellado de dichos vectores virales en un liposoma y similar, por añadir los vectores al sistema de cultivo.

La evaluación de las sustancias de ensayo se puede realizar analizando el cambio cualitativo o cuantitativo de las funciones de los cardiomiocitos. Un ejemplo de análisis de la viabilidad de los cardiomiocitos es el que se expone a continuación. Los cardiomiocitos preparados de acuerdo con la invención se inoculan en una placa de cultivo a una densidad celular adecuada para inducir muerte celular (apoptosis) cuando se cultivan en un medio de cultivo sin suero o para analizar la supervivencia o la mortalidad de los cardiomiocitos en un medio de cultivo con una cantidad adecuada de una sustancia de ensayo añadida al mismo. El procedimiento para analizar la supervivencia o la mortalidad de los cardiomiocitos se realiza bajo observación visual o usando la incorporación de un pigmento, como azul tripan, como indicador. Como procedimiento, de otro modo, también se puede usar un procedimiento que usa actividad deshidrogenasa (actividad de reducción) como indicadores o un procedimiento que usa la actividad caspasa específica de células apoptóticas o la expresión de anexina V como indicador. Los kits que usan el mecanismo están disponibles comercialmente en un gran número de fabricantes, tales como Sigma, Clontech y Promega preparados para usar.

Dado que las sustancias y los agentes farmacéuticos obtenidos mediante el procedimiento de detección selectiva tienen una acción para inducir la diferenciación de cardiomiocitos y una acción de regular la función, las sustancias y los agentes farmacéuticos se pueden usar como agentes profilácticos o agentes terapéuticos de enfermedades cardíacas, tales como infarto de miocardio, enfermedades cardíacas isquémicas, insuficiencia congestiva cardíaca, miocardiopatía hipertrofica, miocardiopatía dilatada, miocarditis e insuficiencia cardíaca crónica. Estos compuestos pueden ser compuestos nuevos o compuestos conocidos.

Adicionalmente, los cardiomiocitos preparados de acuerdo con la invención también se pueden usar como célula de injerto para regenerar músculo cardíaco o para tratar terapéuticamente enfermedades cardíacas. Las enfermedades cardíacas incluyen, por ejemplo, infarto de miocardio, enfermedades cardíacas isquémicas, insuficiencia congestiva cardíaca, miocardiopatía hipertrofica, miocardiopatía dilatada, miocarditis e insuficiencia cardíaca crónica. Como célula de injerto, las células que contienen los cardiomiocitos altamente puros preparados de acuerdo con la invención se pueden usar en cualquier forma, tal como las células suspendidas en vehículos acuosos, tales como medios de cultivo, las células incluidas en vehículos sólidos, tales como sustratos biodegradables, o las células procesadas en láminas de cardiomiocitos en una capa o en múltiples capas (Shimizu, y col., *Circ. Res.* 90: e40, 2002).

El procedimiento de injertar los cardiomiocitos como, injertar un cardiomiocito en un lugar dañado, incluye un procedimiento de inyectar directamente el cardiomiocito de injerto en el corazón tras una toracotomía, usando una jeringuilla de inyección, un procedimiento para realizar una incisión quirúrgica en una parte del corazón para injertar los cardiomiocitos, y un procedimiento para inyectar los cardiomiocitos a través de un tubo de sangre usando un catéter (Murry, y col., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67:519, 2002; Menasche, *Ann. Thorac. Surg.* 75:S20, 2003; Dowell, y col., *Cardiovasc. Res.* 58:336, 2003). No obstante, el procedimiento no está limitado a los descritos anteriormente. Cuando los cardiomiocitos recuperados del corazón fetal se injertan en el corazón de un animal con trastornos cardíacos, se ejerce un efecto terapéutico extremadamente excelente, tal como se ha dado a conocer (Menasche, *Ann. Thorac. Surg.* 75 : S20, 2003; Reffelmann, y col., *Heart Fail. Rev.* 8:201, 2003). Los cardiomiocitos derivados de células ME tienen fenotipos muy similares a los de los cardiomiocitos derivados de corazón fetal (Maltsev, y col., *Mech. Dev.* 44:41, 1993; *Circ. Res.* 75:233, 1994). Se ha confirmado que, en un ejemplo experimental con animales en los que realmente se transplantaron cardiomiocitos derivados de células ME en un corazón adulto, se ejercía una biocompatibilidad muy alta (Klug, y col., *J. Clin. Invest.* 98:216, 1996). Injertando los cardiomiocitos preparados mediante el procedimiento de la invención en un tejido cardíaco enfermo en las enfermedades cardíacas debidas al deterioro o disociación de cardiomiocitos de un modo compensatorio, se espera que se pueda estimular la mejora de las funciones cardíacas.

Ejemplos

A continuación, la invención se describe específicamente en los ejemplos siguientes. No obstante, los ejemplos siguientes muestran simples ilustraciones de la invención, pero nunca limitan el alcance de la invención.

[Ejemplo 1: Preparación de adenovirus recombinantes]

Se prepararon vectores adenovirus, cada uno portador del gen de CDK4, el gen de la ciclina D1 con la secuencia de nucleótidos que codifica la seña de localización nuclear (NLS) como marca (D1NLS) o el gen de Skp2 usando un kit de preparación de adenovirus recombinante (Adenovirus Expression Vector Kit; TaKaRa Bio).

En el caso de un vector adenovirus portador del gen de CDK4, es decir Ad-CDK4, un plásmido pCMV-CDK4 (suministrado por el Dr. Sander van den Heuvel [Massachusetts General Hospital Cancer Center; EE.UU.]; van den Heuvel, y col., Science 262:2050, 1993) se fragmentó con BamHI para preparar un fragmento de ADNc de CDK4, cuyos extremos se rompieron usando la ADN polimerasa de T4. Siguiendo un protocolo adjunto al kit del vector de expresión en adenovirus, el fragmento romo se insertó en el sitio Swal de un cósmido pAxCAwt, para preparar un cósmido pAd-CDK4. De un modo continuo, la transfección del cósmido junto con el ADN-TPC (complejo de péptido terminal) tratado enzimáticamente derivado del ADN del genoma del adenovirus humano de tipo 5 en las células 293 derivadas de células renales embrionarias humanas permitió la preparación de un adenovirus recombinante, Ad-CDK4.

Un plásmido portador del gen de D1NLS se construyó conjugando el fragmento de ADNc de la ciclina D1 murina derivado de pRSV-ciclina D1 (Matsushime, y col., Cell 65:701, 1991) con NLS derivada de pEF/myc/nus (Invitrogen). Específicamente, el plásmido pEF/myc/nuc se digirió con las enzimas de restricción NcoI y Soy, para preparar un primer fragmento de ADN que contiene la secuencia NLS. Después, el plásmido pRSV-ciclina D1 se escindió con una enzima de restricción NcoI, para preparar un segundo fragmento de ADN que contiene la secuencia de ciclina D1. A continuación, se realizó la PCR usando el plásmido pRSV-ciclina D1 como molde y, también, usando los dos siguientes tipos de cebadores, para preparar un tercer fragmento de ADN que codifica el extremo C del ADNc de la ciclina D1.

5'-cebador: 5'-ACCCTCCATGGTAGCTGCTGGGA3' (SEC ID N° 2)
3'-cebador: 5'-TGATCTCGAGGTCGATGTCCACATCTCGCACGT-3' (SEC ID N° 3)

Usando la ADN ligasa de T4, estos tres tipos de fragmentos de ADN se ligaron para construir un plásmido portador de una secuencia de nucleótidos que codifica la NLS derivada del antígeno T del SV40 por triplicado en el lado del extremo C del ADNc de la ciclina D1 murina. Un fragmento de ADN se cortó del plásmido con las enzimas de restricción PmaCI y SmaI se insertó en el sitio Swal del cósmido pAxCAwt. El cósmido resultante (pAd-D1NLS) y el ADN TPC tratado con la enzima de restricción se transfeccionaron en las células 293 para preparar un adenovirus recombinante, Ad-D1NLS.

Un vector adenovirus Ad-Skp2 portador de Skp2 se preparó en base al ADN de Skp2 murino. El ADNc de Skp2 murino se aisló de una biblioteca de ADNc de timo murino (Stratagene), usando el clon de EST murino (marca de secuencia expresada) (n1 de registro AA511897) registrado en GenBank como sonda (Nakayama, y col., la memoria descriptiva del documento JP-A-2001-224380). Específicamente, de acuerdo con procedimientos generales se preparó una sonda marcada con ³²P a partir del clon de EST. Después, la sonda se hibridó con un filtro de réplica preparado en base a la biblioteca de ADNc en un tampón a 68 °C durante 24 horas. El híbrido resultante se lavó con un tampón que contenía 0,1 % de SDS a 68 °C. El clon positivo resultante se subclonó en el plásmido pBluescript SK (Stratagene), para la secuenciación de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos del ADNc de Skp2 murino determinado de este modo está registrada en GenBank (n° de registro AF083215) (Nakayama, y col., EMBO J. 19:2069, 2000; Nakayama, y col., la memoria descriptiva del documento JP-A-2001-224380). Usando el ADNc de Spk2 murino como molde y los siguientes dos tipos de cebadores se realizó la PCR para preparar un fragmento de ADNc de Skp2 murino con una secuencia marcadora Flag [N-Asp-Tyr-Lys-Arp-Asp-ASp-Asp-Lys-C; SEC ID N° 4] en el extremo N, que después se insertó en el sitio Soy del vector pcDNA-3 (Invitrogen) para preparar un vector pcDNA3-Flag-Skp2.

5'-cebador:

5'-cebador:

**5' - ATACTCGAGGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGCATAGGAAGCACC
TTCAGGAGATT - 3' (SEC ID N° 5)**

3'-cebador: 5'-ATACTCGAGTCATAGACAACCTGGGCTTTTGCAG-3' (SEC ID N° 6)

Un fragmento que contiene ADNc de Skp2 como se obtuvo mediante la escisión del vector pcDNA3-Flag-Skp2 con XhoI se insertó en el sitio Swal del cósmido pAxCAwt. El cósmido resultante el ADN del TPC (complejo de péptido terminal) derivado del ADN del genoma del adenovirus humano de tipo 5 se transfeccionaron en las células 293 para preparar un adenovirus recombinante, Ad-Skp2.

Los tres tipos de adenovirus recombinante preparados mediante el procedimiento descrito anteriormente (Ad-CDK4,

Ad-D1NLS, y Ad-Skp2) se construyó de tal modo que los genes individuales insertados se pueden expresar bajo la regulación de los promotores CAG (potenciador de CMV, promotor de la β -actina de pollo y la secuencia poliA del gen de la β -globina de conejo). Por tanto, los genes insertados se pueden expresar considerablemente en células de mamífero.

5 De forma continua se pretendía recuperar soluciones virales de los virus recombinantes individuales a títulos elevados. 4 μ g de cada uno de los tres tipos de cósmidos (pAd-CDK4, pAd-D1NLS and pAd-Skp2) se mezclaron con 2,5 5 μ l del TPC del ADN tratado con enzimas de restricción unido al kit de preparación del adenovirus recombinante. Las mezclas individuales se transfeccionaron por separado en las células 293 cultivadas en una placa de cultivo (diámetro de 60 mm) mediante el procedimiento de lipofección usando FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche). Al día siguiente, las células se soltaron y las suspensiones celulares recuperadas se inocularon por separado de nuevo en una placa de cultivo (96 pocillos) revestida con colágeno. Después de 7 a 15 días, el virus creció y las células murieron en varios pocillos. A partir de cada pocillo en el que las células habían muerto completamente, el medio de cultivo se recogió asépticamente en un tubo esterilizado, se congeló y descongeló 6 veces, y se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron como solución madre de virus primario a -80 °C. Las células 293 cultivadas en una placa de cultivo (24 pocillos) revestida con colágeno se infectaron con 10 μ l de la solución madre de virus primario. El medio de cultivo en un pocillo que contiene células muertas en de 3 a 4 días se transfirió en condiciones asépticas en un tubo estéril, congelación y descongelación se repitieron 6 veces, y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para recuperar el sobrenadante resultante y se almacenó como solución madre de virus secundario a -80 °C. Las células 293 cultivadas en un matraz de cultivo (25 cm²) revestido con colágeno se infectaron con 15 μ l de la solución madre de virus secundario. El medio de cultivo tras 3 o 4 días se transfirió en condiciones asépticas en un tubo estéril y el virus se liberó de las células congelando y descongelando u homogenizando las células con un sonicador sellado. El sobrenadante resultante de la centrifugación (3000 rpm, 10 minutos, 4 °C) se almacenó como una tercera solución madre de virus a -80 °C. Las células 293 cultivadas en un matraz de cultivo (75 cm²) revestido con colágeno se infectaron con 50 μ l de la tercera solución madre de virus. El medio de cultivo se transfirió en condiciones asépticas a un tubo estéril y el virus se liberó de las células congelando y descongelando u homogenizando las células con un sonicador sellado. El sobrenadante resultante de la centrifugación (3000 rpm, 10 minutos, 4 °C) se almacenó como una cuarta solución madre de virus a -80 °C. El título de la cuarta solución de virus se determinó mediante ensayo en placa usando células 293. El título estaba de forma constante dentro de un intervalo de 10⁹ a 10¹¹ ufp/ml sin excepción. En esta divulgación, el número de virus fresco que va a infectar cada célula se expresa como multiplicidad de infección (moi), más adelante en el presente documento. En otras palabras, una partícula infectada por virus por célula se expresa como moi -1.

[Ejemplo 2: Acumulación de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos tratados con DNLS/CDK]

35 Los cardiomiocitos se aislaron de una rata (Sprague-Dawley) del día 2 al día 4 desde la liberación, de la cual se recuperó una fracción de cardiomiocito mediante centrifugación en un gradiente de concentración de Percol (Tamura, y col., Am. J. Physiol. 275: H2036, 1998). Mediante inmunotinción usando el anticuerpo anti-sarcómero de actina se confirmó que el 95 % o más de las células recuperadas de este modo eran cardiomiocitos. Los cardiomiocitos de rata neonata se suspendieron en un medio de cultivo esencial mínimo de Eagle (Flow Laboratories) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS; Flow Laboratories) y después se inocularon en una placa de cultivo para cultivar a 37 °C en un incubador de dióxido de carbono durante 24 horas. Al día siguiente, el medio de cultivo se intercambió con medio de cultivo mínimo esencial de Eagle sin suero durante otro cultivo de 24 horas. Posteriormente, el virus recombinante Ad-D1NLS (moi = 10 a 100) y Ad-CDK4 (moi = 100) como se preparó en el ejemplo 1 se añadieron al medio de cultivo, durante un cultivo de 48 horas. El procedimiento para la infección y transfección de cardiomiocitos con los virus recombinantes Ad-D1NLS y Ad-CDK4 para expresar la proteína ciclina D1 y la proteína CDK4 en el núcleo de los cardiomiocitos en ocasiones se denomina estimulación con D1NLS+CDK4 o tratamiento con D1NLS+CDK4, más adelante en el presente documento. Como control se realizó el mismo experimento usando células REF52 como línea celular de fibroblastos.

50 Se examinó la expresión de la proteína p27^{Kip1} en los cardiomiocitos transfeccionados con los genes de D1NLS y CDK4 mediante transferencia Western. Las células transfeccionadas con los virus Ad-D1NLS y Ad-CDK4 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se rasparon con un raspador celular para centrifugar y desechar el sobrenadante resultante. El precipitado resultante se lavó de nuevo con un volumen pequeño de PBS y después se transfirió a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml, al que se añadió tampón A helado (HEPES 10 mM, pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM). Después, la mezcla resultante se agitó y dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se añadió NONIDET P-40 a la mezcla hasta una concentración final de 0,2 % para agitar y, después, dejar la mezcla reposar en hielo durante 5 minutos. A un precipitado resultante de otra centrifugación (5.000 rpm, 5 minutos) se añadió un volumen igual de tampón C (HEPES 20 mM, pH 7,9, 25 % glicerol, NaCl 0,42 M, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM) La mezcla resultante se dejó reposar sola en hielo durante 30 minutos para centrifugar (15.000 rpm, 10 minutos) para recuperar el sobrenadante, que se usó como fracción de proteína nuclear. Inmediatamente antes de usar, además, se añadieron DTT 1 mM, PMSF 1 mM, 1 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml de leupeptina y 1 μ g/ml de pepstatina (todos de Sigma) al tampón A y al tampón C descritos anteriormente.

65 La proteína nuclear obtenida de este modo se ajustó hasta un volumen que contiene 1 x 10⁶ células por una mues-

tra, se sometió a electroforesis en un gel para SDS-PAGE, se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa y se analizaron mediante transferencia Western. Específicamente, la proteína nuclear reaccionó con un anticuerpo anti-ciclina D1 (Oncogene Science: Ab-3) o anticuerpo anti-p27^{Kip1} (Santa Cruz; sc-528) como anticuerpo primario y después reaccionó con anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Amersham Life Science; NA931) o anticuerpo anti-Ig de conejo (Amersham Life Science; NA934) como segundo anticuerpo para detectar la presencia del antígeno unido al anticuerpo usando un kit de quimioluminiscencia (Amersham Life Science; RPN2109).

Los resultados se muestran en la figura 1. Como los informes previos (Nakayama, y col., EMBO J. 19: 2069, 2000; la referencia patente 1 y la referencia no patente 5), se confirmó que la transfección de cardiomiocitos con los genes D1NLS y CDK genes aumentaba los niveles de expresión de la proteína ciclina D1 y la proteína CDK4 en el núcleo de los cardiomiocitos. Después, la expresión de la proteína p27^{Kip1} se indujo con más intensidad, ya que el nivel de expresión de la proteína ciclina D1 aumentó. Entretanto, en los fibroblastos (células REF52), el incremento de la expresión de la proteína ciclina D1 redujo el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1}. La diferencia en el rendimiento de la proteína p27^{Kip1} bajo la estimulación con D1NLS + CDK4 se observó en los dos tipos de células.

De forma continua se examinó la expresión y localización de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos mediante el procedimiento de tinción inmunohistoquímica. Como el procedimiento descrito con anterioridad, los cardiomiocitos transfeccionados con los virus Ad-D1NLS y Ad-CDk4 (moi= 100) se fijaron con 70 % de etanol 48 horas después de la infección con el virus. Después, el anticuerpo anti-p27^{Kip1} (el mismo que se ha descrito anteriormente) (diluido a 1:1000) y un anticuerpo anti-actina sarcomérica (DAKO; M0874) (diluido a 1:100) reaccionó con los cardiomiocitos resultantes para teñir los cardiomiocitos usando anticuerpos marcados con Alexa Fluor™ (Alexa-488 and Alexa-568; Molecular Probes) (ambos diluidos a 1:200). Además, el núcleo celular se tiñó con una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1µg/ml). Las imágenes teñidas con estos anticuerpos y el pigmento se observaron con un microscopio de fluorescencia (sistema de escaneo con láser co-enfoque; Zeiss LSM510).

Los resultados se muestran en la figura 2. La expresión de p27^{Kip1} se observó en el núcleo de cardiomiocitos intactos (células positivas con actina sarcomérica en la figura), pero no era tan intensa. La expresión intensa y la acumulación nuclear de p27^{Kip1} se confirmaron en los cardiomiocitos transfeccionados con los genes de D1NLS y CDK4 para expresión. Los resultados de las Figuras 1 y 2 sugirieron que la expresión impuesta de los genes D1NLS y CDK4 en cardiomiocitos permitía la acumulación de la proteína p27^{Kip1} suprimiendo la progresión del ciclo celular en el núcleo de los cardiomiocitos, de modo que las potencias de división y proliferación de los cardiomiocitos inducidas por la estimulación con D1NLS + CDK4 posiblemente podrían suprimirse.

Para examinar si el incremento del nivel de expresión de p27^{Kip1} en estimulación con D1NLS + CDK4 estaba regulado al nivel de transcripción se realizó un análisis de transferencia Northern. No obstante, incluso en cualquiera de cardiomiocitos y fibroblastos, la expresión impuesta de los genes D1NLS y CDK4 no tuvo influencia sobre el nivel de expresión del ARNm de p27^{Kip1}. Se sabe que el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} en las células en proliferación se suprime con el sistema de degradación ubiquitina-proteasoma (Carrano, y col., Nature Cell Biol 1:193, 1999; Tsvetkov, y col., Curr. Biol. 9: 661, 1999) . Por tanto, se examinó si el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} se ajustaba de forma homogénea o no en cardiomiocitos con el sistema de degradación del proteasoma. Después de cultivar los cardiomiocitos preparados mediante el procedimiento en un estado sin suero durante 24 horas se añadieron Ad-D1NLS y Ad-CDK4 (moi = 100) al medio de cultivo durante 48 horas de cultivo. En grupos diferentes, los cardiomiocitos se cultivaron en un estado sin suero durante 48 horas. Después, se añadió FBS al medio de cultivo en un volumen hasta 11 0 %, durante 24 horas de cultivo. Después, simultáneamente se añadió lactastatina (20 µM) (Santa Cruz) como inhibidor del proteasoma de forma simultánea a uno de los grupos, mientras que no se añadió inhibidor al otro grupo. El nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} en cada uno de los grupos se examinó mediante transferencia Western.

En consecuencia, se confirmó una elevación clara del nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} (Fig.3) como en la Fig.1. Como alternativa, el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} se redujo en estimulación con FBS. Los inventores indicaron en los informes previos que la proteína ciclina D1 y la proteína CDK2 rara vez se encontraban en el núcleo de los cardiomiocitos, aunque estas moléculas se expresaban cada vez más con estimulación con FBS, de modo que no se activaba el ciclo celular (véase la referencia patente 1 y la referencia no patente 5). Se sugirió que el incremento de la cantidad de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos era específico de la estimulación para la transferencia nuclear de la proteína ciclina D1 y/o la proteína CDK4. En el caso en el que la función y la acción del proteasoma se suprimiera con tratamiento con lactastatina, como alternativa no se observaron diferencias en el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} entre el grupo en el que no se añadió nada, el grupo tratado con FBS y el grupo tratado con D1NLS + CDK4. Los resultados significan que la función y la acción de proteína p27^{Kip1} están inhibidas en el grupo tratado con D1NLS + CDK4, aunque la proteína p27^{Kip1} se degrada de forma constante en el grupo en el que no se añadió nada o el grupo tratado con FBS.

Por tanto, para examinar la potencia de ubiquitinilación de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos se realizó de forma continua un ensayo de ubiquitinilación in vitro. Los detalles del procedimiento experimental están de acuerdo con el procedimiento descrito en los artículos por los inventores (Nakayama, y col., EMBO J. 19: 2069, 2000; Nakayama, y col., JP-A-2001-224380; Hara, y col., J. Biol. Chem. 276:48937, 2001; Ishida, y col., J. Biol. Chem. 277:14355,

2002). Los cardiomiocitos preparados mediante el procedimiento mencionado anteriormente se cultivaron en un estado sin suero durante 24 horas, que después se cultivaron durante 48 horas en el medio de cultivo suplementado con Ad-D1NLS y Ad-CDK4 (moi = 100). En un grupo diferente, los cardiomiocitos se cultivaron en un estado sin suero durante 48 horas, que después se cultivaron durante 24 horas en el medio de cultivo suplementado con FBS hasta una cantidad del 10 %. Como control, se usaron células REF52 se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS. Después, estas células se aclararon con PBS helado, las células se rasparon con un raspador celular y, después, se centrifugaron para desechar el sobrenadante. Al precipitado resultante se añadió un volumen por 2 del tampón C (descrito anteriormente) suplementado con 0,5 % de NONIDET F-40. Después, la mezcla resultante se agitó y dejó reposar en hielo durante 30 minutos, para la rotura ultrasónica. Posteriormente, la mezcla resultante se centrifugó (15.000 rpm, 20 minutos) para recuperar el sobrenadante, que se usó como extracto celular.

La proteína p27^{Kip1} recombinante para usar como sustrato para ubiquitinilación se preparó mediante un sistema de traducción *in vitro* usando lisado de reticulocitos de conejo. Específicamente, la transcripción y traducción *in vitro* se realizaron usando un kit comercialmente disponible para transcripción y traducción *in vitro* (TnT coupled Reticulocyte Lysate System; Promega) y usando ADNc de p27^{Kip1} de ratón con una secuencia marcadora FLAG unida al mismo como molde de acuerdo con el protocolo adjunto. La proteína p27^{Kip1} recombinante preparada de este modo y cada muestra de lisado de reticulocitos (20 a 40 µg como cantidad de proteína) se prepararon junto con la proteína E1 de ratón (50 µg/ml), proteína E2/Ubs5 (100 µg/ml) de ratón y proteína GST-Ub (4 mg/ml) (todas de Calbiochem) en una solución de reacción de un volumen final de 10 µl (Tris-HCl 4 mM (pH 7,5), NaCl 6 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 0,1 mM, 0,1 mg/ml de creatina fosfoquinasa, fosfocreatina 10 mM, ATP 1,5 mM) para hacerlos reaccionar juntos a 26 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la muestra se sometió a electroforesis en un gel para SDS-PAGE y se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa para análisis de transferencia Western. Específicamente, la reacción con un primer anticuerpo, anticuerpo anti-Flag (Sigma; F-3165) o anticuerpo anti-GST (Santa Cruz; sc-138) (ambos diluidos a 1:1000) y la reacción con un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con peroxidasa de rábano (como se ha mencionado anteriormente) (diluido a 1:1000) permitió la detección de la presencia del antígeno unido a dicho anticuerpo, usando un kit quimioluminiscente (como se ha descrito anteriormente).

Los resultados se muestran en la figura 4. En la proteína p27^{Kip1} ubiquitinilada *in vitro* usando un extracto celular de fibroblastos durante la proliferación (con estimulación con FBS) (REF en la figura) como control positivo, la presencia de la proteína p27^{Kip1} ubiquitinilada *in vitro* pudo identificarse claramente usando el anticuerpo que reconoce el péptido Flag unido a la proteína p27^{Kip1} recombinante (IB: Flag en la figura) y un anticuerpo específico (IB: GST en la figura) que reconoce la proteína GST añadida a la proteína ubiquitina recombinante. Cuando se usó un extracto celular preparado a partir de cardiomiocitos estimulados con FBS se observó la proteína p27^{Kip1} solo débilmente ubiquitinilada y una banda muy leve de la proteína p27^{Kip1} ubiquitinilada sólo se detectó en cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS y CDK4. Los resultados mostrados en las Figuras 3 y 4 sugieren firmemente que la ubiquitinilación de la proteína p27^{Kip1} estaba significativamente suprimida en los cardiomiocitos en estimulación con D1NLS + CDK4, de modo que la degradación por proteasoma apenas se producía, en consecuencia, está implicada la acumulación nuclear de la proteína p27^{Kip1}.

[Ejemplo 3: Disminución de la proteína p27^{Kip1} acumulada en cardiomiocitos por la expresión impuesta de Skp2]

Se sabe que la proteína p27^{Kip1} está ubiquitinilada en las células en proliferación en general con una ubiquitina ligasa que contiene Skp2 como proteína F-box, es decir el complejo SCF-Skp2 de modo que la proteína p27^{Kip1} es degradada por el proteasoma (Carrano, y col., Nature Cell Biol. 1:193, 1999; Tsvetkov, y col., Curr. Biol. 9:661, 1999). Por tanto, la expresión de la proteína Skp2 en cardiomiocitos se examinó mediante transferencia Western. Los procedimientos para preparación de cardiomiocitos, transfección con Ad-D1NLS y Ad-CDK4, preparación de la proteína nuclear, transferencia Western y similares fueron los mismos procedimientos descritos anteriormente. En lo que respecta a detectar la proteína Skp2 se usó en el anticuerpo anti-Skp2.

Los resultados se muestran en la figura 5. La expresión de la proteína Skp2 en fibroblastos (células REF52) usados como células control se activó significativamente con estimulación con DBS y estimulación con D1NLS and CDK4 para estimular la proliferación. No obstante, en los cardiomiocitos no se observó apenas inducción de la expresión de la proteína Skp2, mientras que en los cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS and CDK4 sólo se pudo detectar una pequeña cantidad de la proteína Skp2. Los resultados sugieren una posibilidad de la supresión de la degradación de la proteína p27^{Kip1} acumulada en estimulación con D1NLS + CDK4 por ausencia de la inducción de la expresión de Skp2 en cardiomiocitos.

De acuerdo con esto se examinó el efecto del gen de Skp2 sobre la expresión de la proteína p27^{Kip1} mediante la co-expresión del gen de Skp2 en cardiomiocitos transfectados con los genes de D1NLS y CDK4. Los cardiomiocitos se transfectaron con Ad-D1NLS (moi - 100), Ad-CDK4 (moi = 100) and Ad-Skp2 (moi = 50, 100) preparados en el Ejemplo1 en cultivo durante 48 horas, para analizar la expresión de ciclina D1 y las proteínas Skp2 y p27^{Kip1} mediante transferencia Western. Los procedimientos para preparación de cardiomiocitos, preparación de la proteína nuclear, análisis de transferencia Western y similares fueron los mismos procedimientos descritos anteriormente.

Tres genes para D1NLS, CDK4 y Skp2 se expresaron de forma concurrente en los cardiomiocitos. Los resultados se muestran en la figura 6. Cuando los genes D1NLS y CDK4 se transfectaron en los cardiomiocitos, se produjo una

fuerte inducción de la expresión de la proteína p27^{Kip1} como en los experimentos anteriores (Fig 1 y 3). En este caso, la transfección de Ad-Skp2 en cardiomiocitos para permitir después la expresión concurrente del gen de Skp2 redujo significativamente el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1}. En los cardiomiocitos infectados con una concentración elevada (moi = 100) de Ad-Skp2, casi no se observó expresión de la proteína p27^{Kip1}.

Además, usando un procedimiento de inmunocitotinción como se muestra en la Fig. 7 se confirmó que la acumulación de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos transfeccionados con los genes de D1NLS y CDK4 se redujo mediante la coexpresión del gen de Skp2. El procedimiento de inmunocitotinción es el mismo procedimiento que en el experimento descrito anteriormente (Fig. 2). Como se muestra en la figura 2 se observó una expresión intensa de p27^{Kip1} y su acumulación nuclear en cardiomiocitos transfeccionados con los genes de D1NLS y CDK4. Cuando el gen de Skp2 se co-expresó, alternativamente se observó una reducción significativa de la proteína p27^{Kip1} en el núcleo de la célula. Cuando los cardiomiocitos con los genes de D1NLS, CDK4 and Skp2 expresados a la vez en los mismos se trataron con lactastatina, el nivel de expresión de la proteína p27^{Kip1} retornó a casi el mismo nivel que el nivel observado durante la estimulación con D1NLS y CDK4. Por tanto, se confirmó que la reducción de la proteína p27^{Kip1} por la expresión impuesta de la proteína Skp2 estaba mediada por el sistema de degradación de la ubiquitina-proteasoma.

[Ejemplo 4: Efecto de la expresión impuesta de Skp2 sobre la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos]

Permitiendo la transfección con Ad-D1NLS, Ad-CDK4 y Ad-Skp2 (moi individual= 100) de los cardiomiocitos y contando después el número de células periódicamente, se examinó la influencia de la introducción del gen de Skp2 sobre la potencia de proliferación de los cardiomiocitos. Como los resultados de los informes previos (véase la referencia de patente 1 y la referencia no patente 5), el número celular de los cardiomiocitos con los genes de D1NLS and CDK4 expresados en los mismos se multiplicó por aproximadamente 3 al séptimo día del cultivo (Fig. 8). Alternativamente se confirmó que el número celular de cardiomiocitos con los tres genes, es decir los genes de D1NLS, CDK4 y Skp2, expresados en los mismos se multiplicó por 5 o más. No se observó apenas incremento del número celular de los cardiomiocitos infectados con el vector control y los cardiomiocitos infectados con Ad-Skp2 como controles negativos. Los resultados mencionados anteriormente aparentemente indican que Skp2 puede estimular más significativamente la potencia de proliferación de los cardiomiocitos estimulados en estimulación con D1NLS + CDK4.

[Ejemplo 5: Efecto del tratamiento con un siARN de p27 sobre la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos]

Por tanto, para demostrar con mayor claridad la influencia de la proteína p27^{Kip1} en cardiomiocitos tratados con D1NLS and CDK4, se expresó un siARN específico del gen de p27^{Kip1} (denominado en adelante en el presente documento "siARN de p27") en cardiomiocitos para examinar el efecto.

Por tanto, para construir un vector para expresar un siARN de p27, se determinaron las secuencias diana en base a la información de la secuencia de nucleótidos del ADNc de p27^{Kip1} de rata (nº de registro D83792 en GenBank), y se diseñó y preparó un oligo ADN para usar en la construcción de un vector que exprese el siARN correspondiente a la secuencia. Como secuencias diana se seleccionaron los siguientes tres tipos de ADNc de p27^{Kip1} de rata:

Nucleótidos nº: 830-847 (5'-GGCAGAAGATTCTTCTTC-3': SEC ID Nº 7);

Nucleótidos nº: 532-550 (5'-AGCGCAAGTGGAAATTCGA-3': SEC ID Nº 8); y

Nucleótidos nº: 372-390 (5'-GTGAGAGTGTCTAACGGGA-3': SEC ID Nº 9), de aquí en adelante en el presente documento, los siARN basados en las SEC ID Nº 7 a 9 se denominan siARN nº 1, nº 4 y nº 6, respectivamente. Las secuencias de oligo ADN insertados en la construcción de vectores que expresa siARN nº 1, nº 4 y nº 6 son las siguientes:

siARN nº 1: 5'-CACCGGTAGGAGTTCTTCTTCAACGTGTGCTGTCCGTTGAAGAAGAATCTTCTGCCTTTTT-3' (SEC ID Nº 10) y 5'-GCATAAAAAGGCAGAAGATTCTTCTTCAACGGACAGCACACGTTGAAGAAGAAC-CTCCTACC-3' (SEC ID Nº 11).

siARN nº 4: 5'-CACCAAGTGTA AGTGGAGTTTCGAACGTGTGCTGTCCGTTGAAATCCACTTGCGCTTTTT-3'(SEC ID Nº 12) y 5'-GCATAAAAAGCGCAAGTGGAAATTCGAACGGACAGCACACGTTGAAACTCCACTTACT-3'(SEC ID Nº 13).

siARN nº 6: 5'-CACCGTGGGA GTGTTAATGGGAACGTGTGCTGTCCGTTCCGTTAGACTCTCACTTTTT-3' (SEC ID Nº 14) y 5'-GCATAAAAAGTGAGAGTGTCTAACGGGAACGGACAGCACACGTTCCATTAAACTCCAC-3' (SEC ID Nº 15).

Tres grupos de oligo-ADN, cada uno con la secuencia diana del siARN, se hibridaron y después se insertaron en el sitio de BsmMI de un vector de expresión con ARN (pcPURU6 β icassette, iGENE). El vector está en una construc-

ción tal que la transcripción de ARN correspondiente a los genes insertados puede iniciarse bajo el control del promotor U6 humano para expresar altos niveles del ARN objetivo en células de mamífero. Después, el vector se escindió con EcoRI y HindIII, para purificar el fragmento resultante que contiene el promotor U6 y las secuencias génicas insertadas. Después de cortar el extremo usando la ADN polimerasa T4, el fragmento se insertó en el sitio Swal del cósmido pAxcwit (TAKARA BIO). La transfección continua de las células 293 con el cósmido y el ADN de TPC tratado con enzimas de restricción derivado del ADN del genoma del adenovirus humano de tipo 5 permitió la preparación de adenovirus recombinantes que expresan siARN de p27^{Kip1} (siARN nº 1, nº 4, nº 6 de Ad-p27). De forma continua, del vector viral se recuperó una solución viral con un título elevado mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1.

Primero se co-expresó siARN de p27 en cardiomiocitos transfeccionados con los genes de D1NLS y CDK4 para examinar el efecto sobre la expresión de la proteína p27^{Kip1} mediante transferencia Western. Específicamente, el siARN de Ad-D1NLS, Ad-CDK4 y Ad-p27 (moi individual = 100) se transfeccionó a cardiomiocitos durante un cultivo de 48 horas, para analizar la expresión de la proteína p27^{Kip1} mediante transferencia Western. Los procedimientos para la preparación de cardiomiocitos, la preparación de proteína nuclear, el análisis de transferencia Western y similares son los mismos que los procedimientos descritos anteriormente (Ejemplos 1 y 3).

Los resultados se muestran en la figura 9. Cuando los genes D1NLS y CDK4 se transfeccionaron en los cardiomiocitos, se produjo una fuerte inducción de la expresión de la proteína p27^{Kip1} como en los experimentos descritos anteriores (Fig 1. 3 y 7). Mediante la expresión de siARN de p27 (nº 1, nº 4, nº 6) en cardiomiocitos se redujo considerablemente la producción de la proteína p27^{Kip1}. Con el siARN nº 6 en concreto casi no se observó expresión de la proteína p27^{Kip1}. La expresión de siARN de p27 ejerce un efecto supresor específico de la proteína p27^{Kip1}, pero nunca influye sobre el contenido intracelular de la proteína p21^{Kip1}, la proteína ciclina D1 o la actina sarcomérica. Incluso en los resultados de la inmunocitotinción, casi no se observó acumulación de la proteína p27^{Kip1} en el núcleo de cardiomiocitos mediante la expresión de siARN de p27.

De forma continua, el siARN nº 6 de Ad-D1NLS, Ad-CDK4 y Ad-p27 (moi individual= 100) se transfeccionó a cardiomiocitos, para contar después el número celular periódicamente. Como los resultados en el ejemplo 4, el número celular de cardiomiocitos con los genes de D1NLS y CDK4 expresados en los mismos se multiplicó por aproximadamente 2 al séptimo día del cultivo (Fig. 10). Entretanto, se verificó que el número celular de cardiomiocitos con los tres genes, es decir los genes de D1NLS, CDK4 y Skp2, expresados en los mismos se incrementó significativamente. No se observó apenas incremento del número celular de los cardiomiocitos infectados con el virus de expresión LacZ y de los cardiomiocitos infectados con siARN de Ad-p27 solo como controles negativos. Los resultados mencionados anteriormente aparentemente indican que la expresión del siARN de p27 Skp2 puede estimular más significativamente la potencia de proliferación de los cardiomiocitos estimulados en estimulación con D1NLS + CDK4.

[Ejemplo 6: Efecto de la expresión impuesta del gen de Skp2 sobre la terapia cardíaca]

Por tanto, para confirmar que el efecto de la expresión impuesta de los genes de D1NLS + CDK4 + Skp2 sobre la proliferación de los cardiomiocitos tenía un efecto terapéutico sobre los cardiomiocitos dañadas, se realizó un análisis usando un modelo de isquemia y repercusión miocárdica de ratas. El modelo se preparó de acuerdo con el procedimiento de Dairaku, y col. (Circ. J. 66:411, 2002). Una rata macho Wistar (de 8 semanas de edad) se anestesió mediante administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Nembutal: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) (55 mg/kg). Posteriormente, se sometió a la rata a una toracotomía con respiración artificial para exponer el corazón. De forma continua, se ligó la arteria coronaria izquierda con un hilo de sutura con una aguja del nº 5-0. Después, se dejó reposar a la rata durante 30 minutos. Se soltó la atadura para permitir la reperfusión del flujo sanguíneo. Como control, se usó un animal tratado únicamente con la ligadura de la arteria coronaria como grupo de operación simulada (en adelante en el presente documento grupo simulado).

El vector adenovirus se introdujo en el corazón durante un periodo de 25 a 30 minutos después de la isquemia. Una solución con un título elevado de adenovirus (1×10^9 ufp/ml) del mismo lote preparado y usado como en el ejemplo anterior se inyectó en la capa de músculo cardíaco en el centro isquémico y en la periferia del mismo a 50 μ l cada uno por sitio en un total de 5 sitios (volumen total 250 μ l) usando una aguja de inyección de 30G.

Por tanto, para examinar el efecto del tratamiento con D1NLS + CDK4, un grupo de animales en los que se inyectó una solución de mezcla de los tres tipos de adenovirus, es decir Ad-D1NLS (1×10^9 ufp), Ad-CDK4 (1×10^8 ufp) y Ad-LacZ (1×10^9 ufp) de denomina en adelante en el presente documento "grupo D1NSL". Por tanto, para examinar el efecto del tratamiento con D1NLS + CDK4 + Skp2, un grupo de animales en los que se inyectó una solución de mezcla de los tres tipos de adenovirus, es decir Ad-D1NLS (1×10^9 ufp), Ad-CDK4 (1×10^8 ufp) y Ad-Skp2 (1×10^9 ufp) de denomina en adelante en el presente documento "grupo Skp2". Como control negativo, se usó un grupo de animales en los que se inyectó Ad-LacZ (2×10^9 ufp) (en adelante en el presente documento "grupo control"). En el grupo simulado no se realizó ninguna inyección de solución de adenovirus. Después de cerrar el pecho, se despertó a la rata de la anestesia y se le alimentó en condiciones generales de alimentación durante 6 semanas.

Como indicador de la necrosis del músculo cardíaco tras la isquemia y la reperfusión alterada se analizó el valor de troponina T en el músculo cardíaco (cTnT) en plasma (O'Brien, y col., Lab. Anim. Sci. 47:486, 1997; Morimoto, y col.,

J.Pharmacol. Sci. 91:151 [Suppl. 1], 2003). Dos horas después de la reperfusión se extrajo sangre del fondo del órgano y se centrifugó para recuperar el plasma. El valor de cTnT se analizó usando un lector cardíaco (Roche Diagnostics). Después se observó que el valor de cTnT tras la isquemia y reperfusión aumentaba considerablemente en el grupo Control, el grupo D1NLS y el grupo Skp2, en comparación con el grupo Simulado (grupo Simulado: $0,2 \pm 0,0$ ng/ml, grupo Control: $8,8 \pm 0,5$ ng/ml, grupo D1NLS: $9,1 \pm 0,7$ ng/ml, grupo Skp2: $9,9 \pm 1,3$ ng/ml). No se observaron diferencias en el valor de cTnT entre los tres grupos a excepción del grupo Simulado, lo que sugiere que se había inducido un nivel similar de la necrosis del músculo cardíaco.

Seis semanas después de la repercusión se midieron las funciones cardíacas mediante tomografía (procedimiento en modo B) y el procedimiento en modo M mostrando la tomografía en el tiempo, usando un aparato de ultrasonografía (power Vision 8000: Toshiba Medical). Para anestesiarse a la rata se administró ketamina (Ketalar: Sankyo) y xilazina (Sigma) por vía intraperitoneal. Usando una sonda lineal de 15 MHz, se midió el músculo papilar del eje corto ventricular mediante el procedimiento en modo M, para medir la dimensión telediastólica del ventrículo izquierdo y la dimensión telesistólica del ventrículo izquierdo para calcular el acortamiento fraccional del diámetro interno del ventrículo izquierdo (FS).

$$\text{Acortamiento fraccional del diámetro interno del ventrículo izquierdo} \\ = (\text{dimensión telediastólica} - \text{dimensión telesistólica}) / \\ \text{dimensión telediastólica} \times 100 (\%)$$

Midiendo el eje longitudinal del ventrículo izquierdo mediante el procedimiento en modo B se midieron el área telediastólica y el área telesistólica del ventrículo izquierdo, para calcular el cambio de área fraccional del ventrículo izquierdo (FAC), que se usó como indicador de la función sistólica.

$$\text{Cambio de área fraccional del ventrículo izquierdo (FAC)} \\ = (\text{área telediastólica} - \text{área telesistólica}) / \text{área telediastólica} \\ \times 100 \%$$

Usando una sonda sector de 10 MHz, adicionalmente se midió la entrada de flujo sanguíneo al ventrículo izquierdo al principio de la etapa diastólica (E) y la etapa sistólica auricular (A) mediante procedimiento Doppler, para calcular el valor E/A, que se usó como indicador de la función diastólica. Las mediciones mencionadas anteriormente se realizaron mediante un ensayo ciego, de modo que el técnico del ensayo no pudiera conocer el contenido del tratamiento de cada animal.

Seis semanas después de la isquemia y reperfusión miocárdica se midieron las funciones cardíacas mediante los procedimientos descritos anteriormente. En el grupo Control comparado con el grupo Simulado, el acortamiento fraccional (FS) y el cambio de área fraccional (FAC) tenían unos valores muy pequeños, mientras que la proporción de la entrada de flujo sanguíneo en el ventrículo izquierdo al principio de la etapa diastólica y en la etapa sistólica auricular (E/A) tenía un valor grande. Por tanto, se observó que la función sistólica y la función diastólica aparentemente se habían deteriorado. Por el contrario, en el grupo D1NLS o el grupo Skp2, la FS y el FAC tenían valores mayores que en el grupo Control. En términos del valor E/A se observó un efecto de mejora aparente mayor. En comparación con el grupo Control, el valor de E/A del grupo Skp2 tenía un valor significativamente pequeño. El valor de E/A en el grupo D1NLS fue menor que en el grupo Control, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (grupo Simulado: $2,30 \pm 0,25$, Grupo control: $5,49 \pm 0,86$, grupo D1NLS: $3,69 \pm 0,68$, grupo Skp2: $3,44 \pm 0,57$; $n = 9$ a 12).

De modo continuo se analizó la hemodinámica cardíaca al día siguiente del ensayo de ultrasonografía cardíaca. Después de administrar por vía intraperitoneal pentobarbital sódico para anestesiarse a una rata, se insertó un catéter equipado con un transductor de presión con microcircuito integrado (SPC-320: Millar Instruments) en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha, para medir el índice diferencial máximo (dP/dt máx) de la presión ventricular izquierda (PVI) como indicador de la potencia sistólica del ventrículo izquierdo y para medir el dp/dt/P máx obtenida dividiendo el dP/dt máx con la PVI medida simultáneamente como indicador de la potencia diastólica del ventrículo izquierdo. Adicionalmente, el índice diferencial mínimo (dP/dt mín) de la PVI como indicador de la potencia diastólica del ventrículo izquierdo y se midió la presión telediastólica ventricular izquierda (PTDVI). Las mediciones mencionadas anteriormente se realizaron mediante un ensayo ciego, de modo que una persona no pudiera conocer el contenido del tratamiento de cada animal. Los resultados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Grupo experimental	Simulado	Control	D1NLS	Skp2
Número	9	10	12	10
PTDVI (mmHg)	3,4 ± 1,2	13,3 ± 2,5 [✖]	9,5 ± 2,3	8,5 ± 1,7
dP/dt máx del VI (mmHg/s)	7457 ± 308	5572 ± 230 [✖]	6022 ± 264 [✖]	6183 ± 250 [✖]
dP/dt mín del VI (-mmHg/s)	6492 ± 312	3631 ± 182 [✖]	4047 ± 270 [✖]	4449 ± 248 [✖] #
dP/dt/P del VI máx (1/s)	75 ± 5	40 ± 3 [✖]	51 ± 5 [✖]	54 ± 4 [✖] #

[✖] : p< 0,05 vs grupo simulado
[#]: p< 0,05 vs grupo control

5 En comparación con el grupo Simulado, la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTDVI) en el grupo Control tenía un valor significativamente alto. Adicionalmente, el índice diferencial máximo (dP/dt máx), el índice diferencial mínimo (dP/dt mín) o el dP/dt/P máx de la presión del ventrículo izquierdo (PVI) tenían un valor significativamente pequeño. Los resultados indican que la función sistólica y la función diastólica aparentemente del ventrículo izquierdo en el animal se habían deteriorado. En el grupo D1NLS, los tres indicadores de dP/dt máx, dp/dt mín y dP/dt/P máx, tenían valores mayores que en el grupo Control. Los indicadores individuales tenían valores mayores en el grupo Skp2 que en el grupo D1NLS, mientras que los índices dp/dt mín y dP/dt/P máx tenían valores significativamente mayores que en el grupo control.

15 Después de contar la hemodinámica cardíaca, se extirparon los pulmones para pesar el peso húmedo (Fig. 11). En comparación con el grupo Simulado, el peso del pulmón en el grupo Control fue significativamente mayor. Esto sugiere una posible existencia de congestión pulmonar. En comparación con el grupo Control, el peso del pulmón fue menor en el grupo D1NLS, mientras que el peso del pulmón en el grupo Skp2 tenía un valor significativamente pequeño, lo que sugiere la mejora de la congestión pulmonar.

20 Usando el corazón extirpado después de medir las funciones cardíacas se preparó una curva de presión pasiva-volumen (ventrículo izquierdo). El procedimiento fundamental era de acuerdo con el informe de Pfeffer, y col. (Circ. Res. 57:84, 1985). Específicamente, se administró heparina (Novo-heparin: Aventis Pharma) y cloruro potásico saturado en la vena de la cola de la rata, para inducir parada cardíaca en la etapa diastólica. Inmediatamente después se extirpó el corazón. A través de la aorta se insertó un catéter de doble luz (DP-8: Natsume Seisakusho) en el ventrículo izquierdo. Conectando uno de los tubos al transductor de presión para medir la presión del ventrículo izquierdo se inyectó solución salina fisiológica del otro tubo una velocidad de 0,72 ml/min, para registrar una curva presión-volumen en el gráfico. Un corazón extirpado se analizó por triplicado para calcular la media. EN base a la curva presión-volumen de un animal individual, se calculó el volumen correspondiente a la presión telediastólica ventricular izquierda medida con el catéter equipado con transductor de presión con microcircuito integrado y, después, se corrigió en base al peso, para calcular el índice del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (IVTDVI).

30 Los resultados se muestran en la figura 12. En comparación con el grupo Simulado, la curva pasiva presión-volumen en el grupo control se desplazó significativamente sobre el lado derecho, según las observaciones. Los resultados indican una posibilidad de la progresión del remodelado ventricular izquierdo, tal como el incremento del volumen del ventrículo izquierdo y el adelgazamiento del área infartada tras isquemia cardíaca y reperfusión. En comparación con el grupo Control, el desplazamiento hacia la derecha de la curva pasiva de presión-volumen se redujo en el grupo D1NLS. En comparación con el grupo Control, el desplazamiento hacia la derecha de la curva pasiva de presión-volumen se redujo en el grupo D1NLS. Mientras que el índice del volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (IVTDVI) tenía un volumen grande en el Grupo Control, el índice tenía un valor menos en el grupo D1NLS que en el grupo Control. En el grupo Skp2, además, el índice tenía un valor menor que en el grupo D1NLS y tenía un valor significativamente menor que en el grupo Control (grupo Simulado: 0,80 ± 0,12 ml/kg, grupo LacZ. 2,18 ± 0,16 ml/kg, grupo D1NLS/CDK4: 1,72 ± 0,19 ml/kg, grupo Skp2: 1,54 ± 0,17 ml/kg; n= 9 a 12).

45 Por último, se examinó el nivel de infarto cardíaco en el corazón 6 meses después de la isquemia y repercusión. El corazón extirpado se fijó en una solución al 10 % de formalina tamponada hasta neutralidad, se incluyó en parafina, se preparó en 6 secciones con un intervalo de 2 mm en cada muestra a lo largo de la dirección transversal y se tiñeron con Masso Trichrome para visualizar el área con infarto cardíaco. Después, el área del infarto se midió usando un software de análisis de imágenes (Lumina vision: Mitsuya Shoji). Con referencia al informe de Jain, y col. (Circulation 103:1920, 2001), el área infartada se midió midiendo la longitud periférica completa de la membrana interna del ventrículo izquierdo, la longitud periférica completa de la membrana externa del mismo, la longitud periférica de la cicatrización del lateral de la membrana interna del ventrículo izquierdo y la longitud periférica de la cicatrización del lateral de la membrana externa del mismo, para calcular el área infartada de acuerdo con la fórmula siguiente.

55 **Área infartada= [(longitud periférica de la cicatrización del lateral de la membrana interna del ventrículo izquierdo + longitud periférica de la cicatrización del lateral de la membrana externa del mismo)/(longitud periférica completa de la membrana interna + longitud periférica completa de la membrana externa)] x 100 %**

Los resultados se muestran en la figura 13. En comparación con el grupo Control, el área infartada en el grupo

D1NLS se redujo considerablemente. Se observó más reducción del área infartada en el grupo Skp2 que en el grupo D1NLS. En comparación con el grupo Control, el área infartada en el grupo Skp2 tenía un valor más pequeño.

5 En base a los resultados anteriores se confirmó que la introducción de los genes D1NLS + CDK4 + Skp2 mejoró el deterioro de las funciones cardíacas tras el inicio del infarto cardíaco y la exacerbación de la hemodinámica para suprimir la congestión pulmonar y el remodelado ventricular izquierdo y para proporcionar adicionalmente un efecto sobre la reducción del área de infarto cardíaco.

10 De acuerdo con el procedimiento de la invención, la división celular de los cardiomiocitos puede inducirse con más eficiencia que mediante los procedimientos de la técnica relacionada, para inducir la proliferación celular. Los cardiomiocitos preparados de este modo se pueden usar como célula para la detección selectiva de varios fármacos y para terapia de injerto. Adicionalmente, la aplicación del procedimiento a la terapia génica puede conducir de la forma prevista a la aplicación de terapia médica regeneradora de enfermedades cardíacas con etiologías subyacentes, tal como deficiencia de cardiomiocitos.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Daiichi Asubio Pharma Co., Ltd.
 Mimi, Adachi
 5 Keiichi, Nakayama
 Shigetaka, Kitajima
 Hiromitsu, Takagi
- <120> Procedimiento para proliferar cardiomiocitos
 10 <130> M 1833 EP
- <150> JP P2003-391708
 <151> 2003-11-21
 15 <150> JP P2004-246533
 <151> 2004-08-26
- <150> PCT/JP2004/017274
 20 <151> 2004-11-19
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.1
 25 <210> 1
 <211> 8 .
 <212> PRT
- 30 <213> Virus 40 de simio
 <400> 1
- Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val**
1 5
- 35 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador 5' del extremo C-terminal de la ciclina D1
- <400> 2
 accctccatg gtagctgctg gga 23
 45
- <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
- <220>
 <223> Cebador 3' del extremo C-terminal de la ciclina D1
- <400> 3
 tgatctcgag gtcgatgtcc acatctcgca cgt 33
 55
- <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Secuencia marcador Flag

ES 2 376 239 T3

<400> 4

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

5 <210> 5
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador 5' del ADNc de Skp2

<400> 5

atactcgagg ccacatgga ctacaaggac gacgatgaca agcataggaa gcaccttcag 60

15 **gagatt 66**

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador 3' del ADNc de Skp2

25 <400> 6
atactcgagt catagacaac tgggctttg cag 33

<210> 7
<211> 18
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia diana 1 del siARN de p27/Kip1 de rata

35 <400> 7
ggcagaagat tctcttc 18

<210> 8
<211> 19
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Secuencia diana 2 del siARN de p27/Kip1 de rata

<400> 8
agcgaagtg gaattcga 19

50 <210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia diana 3 del siARN de p27/Kip1 de rata

<400> 9
60 gtgagagtgt ctaacggga 19

<210> 10
<211> 62
<212> ADN

ES 2 376 239 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligo 1 para la expresión del siARN nº 1 de p27

5 <400> 10

caccggtagg aggttcttct tcaacgtgtg ctgtccgttg aagaagaatc ttctgccttt 60

tt 62

10 <210> 11

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligo 2 para la expresión del siARN nº 1 de p27

<400> 11

gcataaaaaag gcagaagatt cttcttcaac ggacagcaca cgttgaagaa gaacctccta 60

cc 62

20 <210> 12

<211> 62

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligo 1 para la expresión del siARN nº 4 de p27

30 <400> 12

caccagtgtg agtggagttt cgaacgtgtg ctgtccgttc gaaattccac ttgcgctttt 60

tt 62

35 <210> 13

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Oligo 2 para la expresión del siARN nº 4 de p27

<400> 13

gcataaaaaa gcgcaagtgg aatttcgaac ggacagcaca cgttcgaaac tccacttaca 60

ct 62

45 <210> 14

<211> 62

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Oligo 1 para la expresión del siARN nº 6 de p27

<400> 14

55 **caccgtggga gtgtttaatg ggaacgtgtg ctgtccgttc cgttagaca ctctcacttt 60**

tt 62

ES 2 376 239 T3

<210> 15
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Oligo 2 para la expresión del siARN nº 6 de p27

<400> 15

gcataaaaag tgagagtgtc taacgggaac ggacagcaca cgttccatt aaactccc 60

ac 62

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre la ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- 10 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción promotora de la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip;

15 en el que al menos uno de los genes que codifican dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

2. Un procedimiento para proliferar cardiomiocitos que comprende una etapa de introducir

- 20 (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre la ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- 25 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción promotora de la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip

30 en cardiomiocitos in vitro y una etapa de cultivar después dichas células;
 en el que al menos uno de los genes que codifican dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia nucleotídica que codifica una señal de localización nuclear.

35 3. Uso de

- (a) una ciclina, seleccionándose dicha ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) una quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose dicha quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- 45 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción promotora de la degradación de la proteína de la familia Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y
 (ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip, para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno cardíaco, en el que al menos uno de los genes que codifican dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de localización nuclear.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, el procedimiento de de la reivindicación 2 o el uso de de la reivindicación 3, en el que la proteína de la familia Cip/Kip es p27^{Kip1}.

55 5. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende introducir los genes en cardiomiocitos usando un vector viral o un liposoma.

6. Un vector que comprende

- 60 (a) un gen de ciclina, seleccionándose la ciclina de entre las ciclina D1, ciclina D2 y ciclina D3,
 (b) un gen de la quinasa dependiente de ciclina, seleccionándose la quinasa dependiente de ciclina de entre CDK4 y CDK6, y
 (c) uno o una pluralidad seleccionada del grupo constituido por

- 65 (i) un gen que codifica un factor que inhibe la producción, función o acción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho factor es un factor con una acción promotora de la degradación de la proteína de la familia

Cip/Kip y es un componente de la ubiquitina ligasa; y

(ii) un ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip, en el que dicho ácido nucleico es un siARN específico de un gen que codifica la proteína de la familia Cip/Kip, en el que al menos uno de los genes que codifican dicha ciclina y el gen que codifica dicha quinasa dependiente de ciclina está marcado con una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de localización nuclear.

5
10 7. La composición farmacéutica de de la reivindicación 1 o 4, el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, el uso de de la reivindicación 3 o 4 o el vector de la reivindicación 6, en la que el componente de ubiquitina ligasa es un factor F-box capaz de unirse a la proteína de la familia Cip/Kip.

10 8. La composición farmacéutica, el procedimiento, el uso o el vector de la reivindicación 7, en la que el factor F-box capaz de unirse a la proteína de la familia Cip/Kip es Skp2.

15 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 4, el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 o 5, el uso de la reivindicación 3 o 4 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que el ácido nucleico que inhibe la producción de la proteína de la familia Cip/Kip es un siARN que es específico del gen de p27^{Kip1}.

20 10. Una composición farmacéutica que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.

11. Uso del vector de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno cardíaco.

25 12. El uso de uno cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 7 a 9 u 11, en el que el trastorno cardíaco es infarto de miocardio, enfermedad cardíaca isquémica, insuficiencia congestiva cardíaca, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada, miocarditis o insuficiencia cardíaca crónica.

Fig. 1

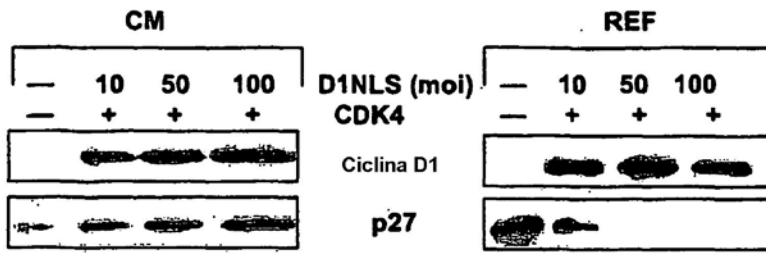


Fig. 2

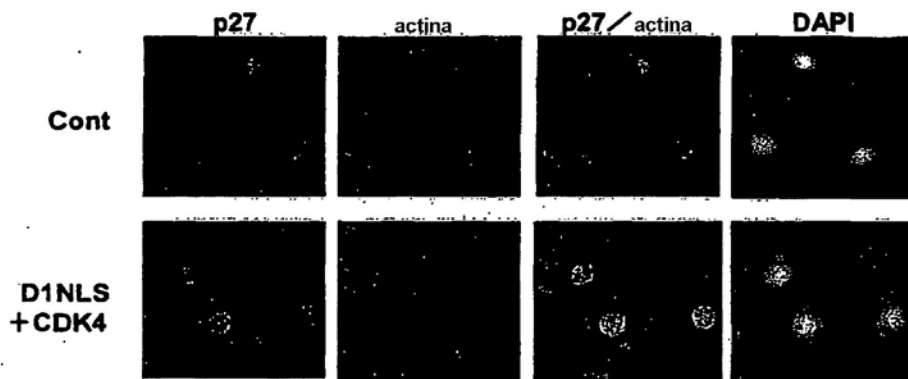


Fig. 3

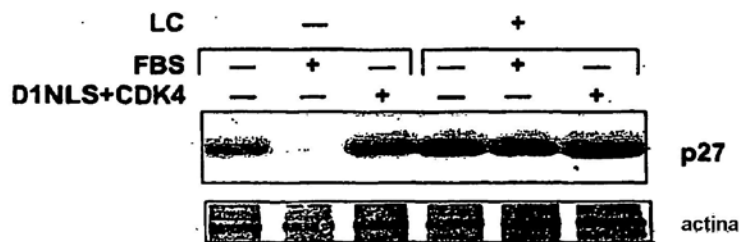


Fig. 4

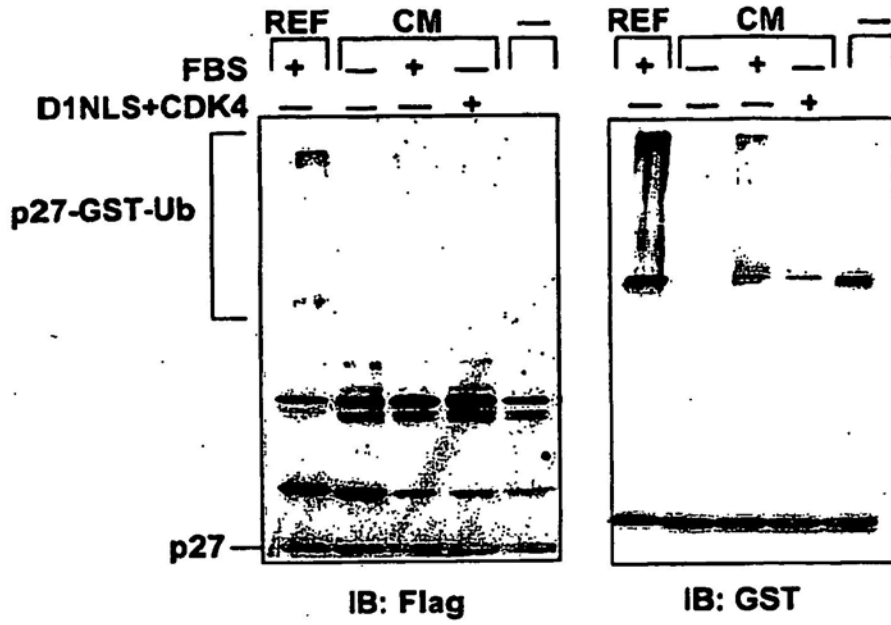


Fig. 5

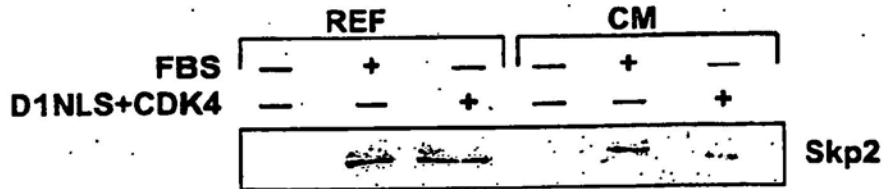


Fig. 6

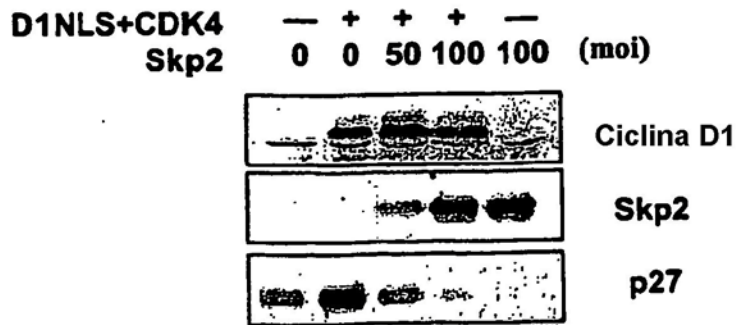


Fig. 7

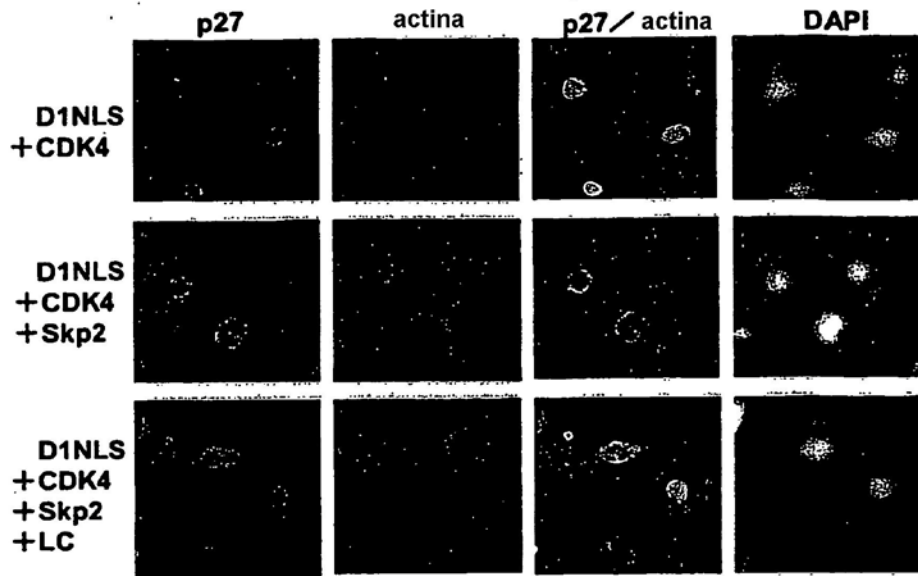


Fig. 8

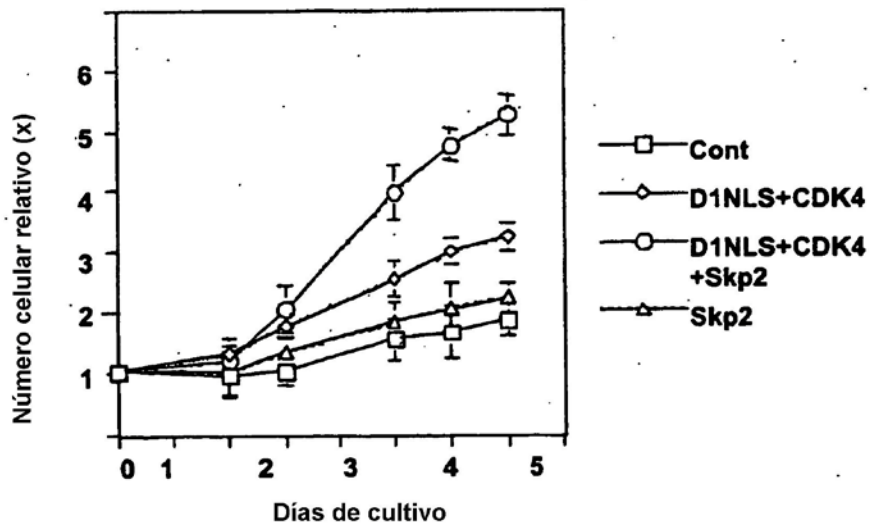


Fig. 9

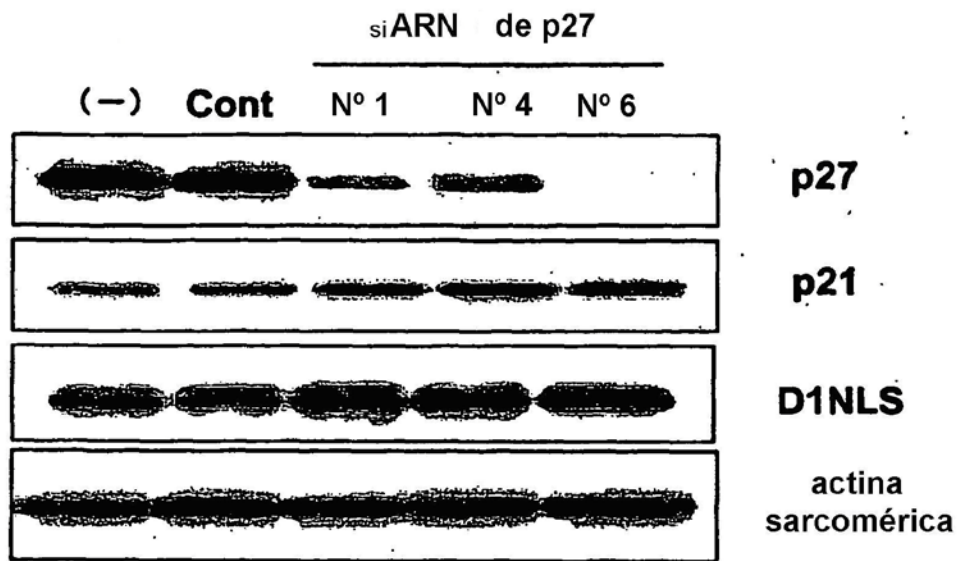


Fig. 10

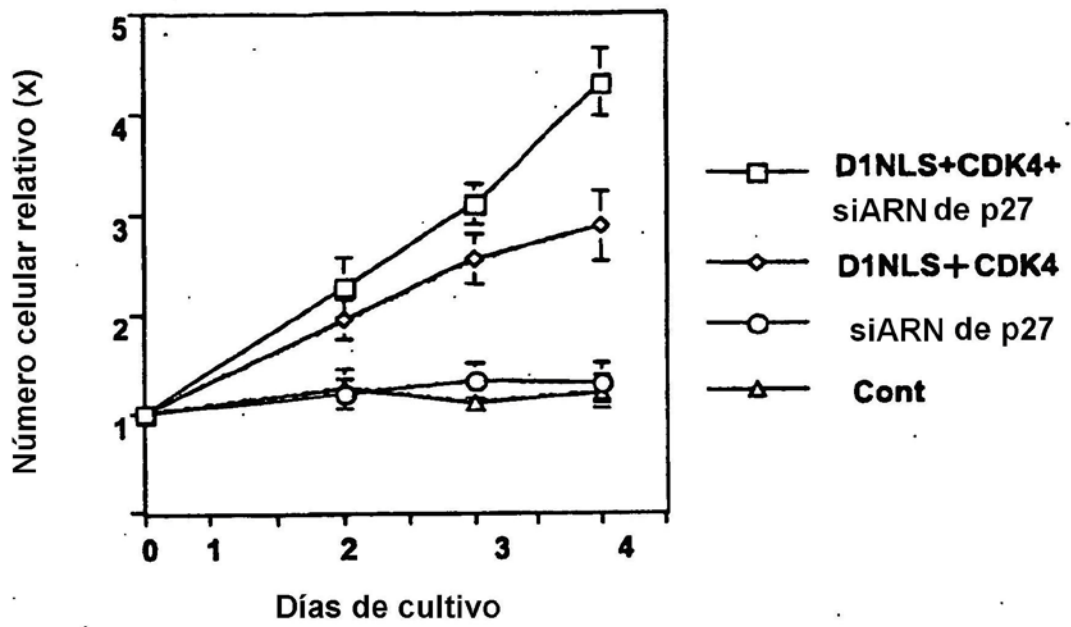


Fig. 11

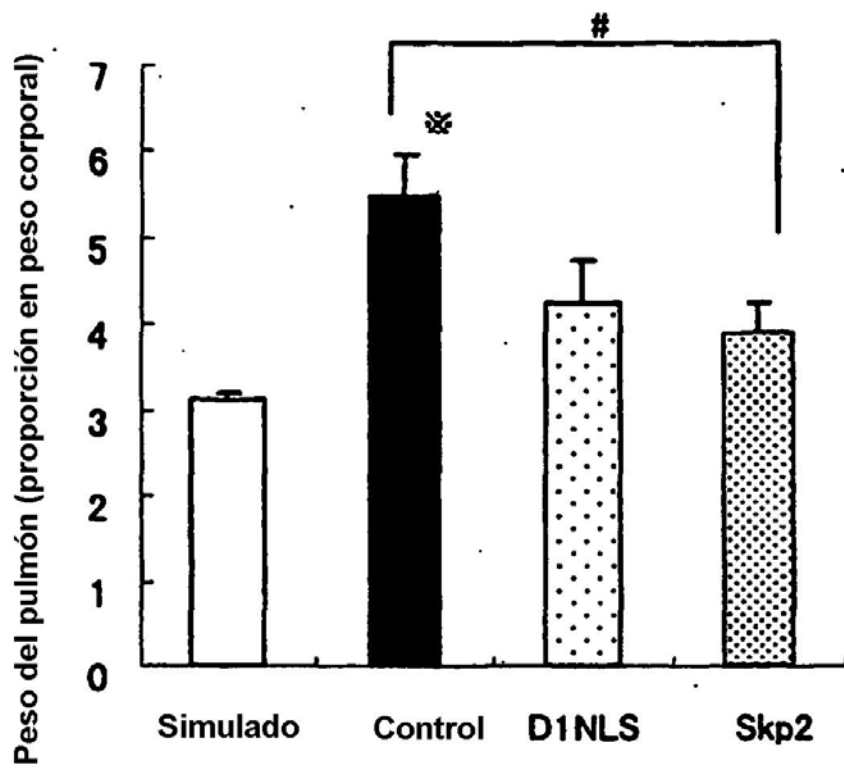


Fig. 12

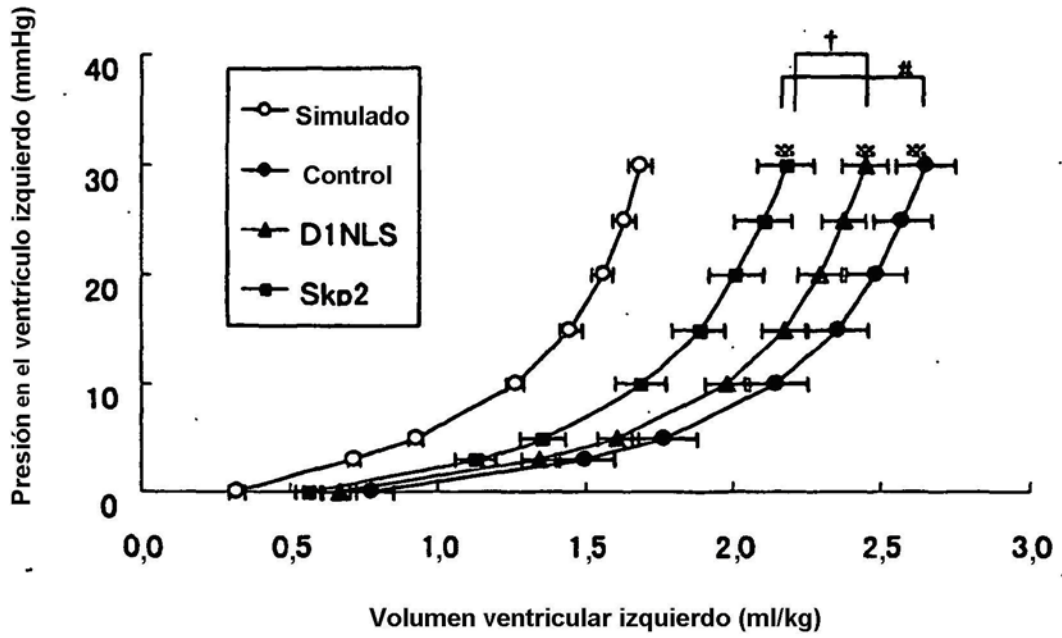
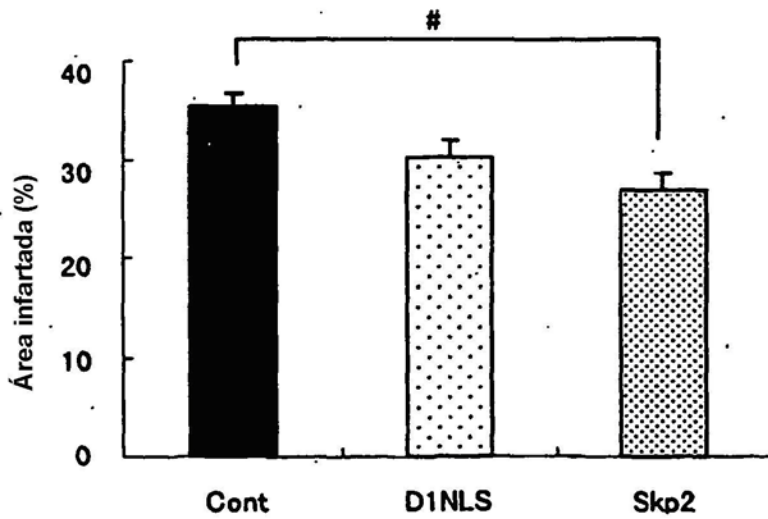


Fig. 13



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02095026 A [0016]
- US 6090622 A [0042]
- US 0111011 A [0042]
- US 02051980 A [0043]
- US P5736396 A, Bruder [0044]
- WO 01048151 A [0044]
- WO 03035382 A [0044]
- US P6015671 A, Field [0045]
- WO 0306950 A, Xu [0045]
- JP 2001224380 A, Nakayama [0056] [0089] [0102]
- EP 926236 A, Buergin [0058]
- US P6265562 A, Buergin [0058]
- WO 0015821 A [0060]
- US 6015671 A [0076]
- JP P2003391708 B [0138]
- JP P2004246533 B [0138]
- JP 2004017274 W [0138]

Literatura no patente citada en la descripción

- Li ; Brooks. *European Heart Journal*, 1999, vol. 20, 406-420 [0002]
- Soonpaa et al. *Science*, 1994, vol. 264, 98 [0016]
- Murry et al. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2002, vol. 67, 519 [0016] [0082]
- Menasche. *Ann. Thorac. Surg.*, 2003, vol. 75, 20 [0016] [0082]
- Nir et al. *Cardiovasc. Res.*, 2003, vol. 58, 313 [0016]
- Tamamori-Adachi et al. *Circ. Res.*, 2003, vol. 92, e12 [0016]
- Kishore et al. *Circ. Res.*, 2002, vol. 90, 1044 [0016]
- Kirshenbaum et al. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, 7791 [0016]
- Kirshenbaum et al. *Dev. Biol.*, 1996, vol. 179, 402 [0016]
- Soonpaa et al. *Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 2644 [0016]
- Toyoda et al. *Dev. Cell*, 2003, vol. 5, 85 [0016]
- Sherr ; Roberts. *Genes Dev.*, 1995, vol. 9, 1149 [0016] [0051]
- Hannon ; Beach. *Nature*, 1993, vol. 371, 257 [0016]
- Serrano et al. *Nature*, 1993, vol. 366, 704 [0016]
- Hirai et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, vol. 15, 2672 [0016]
- Harper et al. *Cell*, vol. 75, 805 [0016]
- Polyak et al. *Cell*, 1994, vol. 78, 59 [0016]
- Toyoshima ; Hunter. *Cell*, 1994, vol. 78, 67 [0016] [0052]
- Matsuoka et al. *Genes Dev.*, 1995, vol. 9, 650 [0016]
- Flink et al. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1998, vol. 30, 563 [0016]
- von Harsdorf et al. *Circ. Res.*, 1999, vol. 85, 128 [0016]
- Poolman et al. *Circ. Res.*, 1999, vol. 85, 117 [0016]
- Pagano et al. *Science*, 1995, vol. 269, 682 [0016]
- Maki ; Howley. *Mol. Cell Biol.*, 1997, vol. 17, 355 [0016] [0054]
- Urano et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 12197 [0016] [0054]
- Coux et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, vol. 65, 801 [0016]
- Hochstrasser. *Annu. Rev. Genet.*, 1996, vol. 30, 405 [0016]
- Pagano. *FASEB J.*, 1997, vol. 11, 1067 [0016]
- Hershko et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, vol. 67, 425 [0016]
- Patton et al. *Trends Genet.*, 1998, vol. 14, 236 [0016] [0055]
- Jackson ; Eldridge. *Mol. Cell*, 2002, vol. 9, 923 [0016] [0055]
- Bai et al. *Cell*, 1996, vol. 86, 263 [0016]
- Slowrya et al. *Cell*, 1997, vol. 91, 209 [0016]
- Kobe et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, 11725 [0016]
- Carrano et al. *Nature Cell Biol.*, 1999, vol. 1, 193 [0016] [0100] [0105]
- Tsverkov et al. *Curr. Biol.*, 1999, vol. 9, 661 [0016]
- Bornstein et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 26752 [0016]
- Kamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 10231 [0016]
- Zhang et al. *Cell*, 1995, vol. 82, 915 [0016] [0056]
- Marti et al. *Nat. Cell Biol.*, 1999, vol. 1, 14 [0016]
- Nakayama et al. *EMBO J.*, 2000, vol. 19, 2069 [0016] [0056] [0068] [0089] [0097] [0102]
- Kiernan et al. *Mol. Cell. Biol.*, 2001, vol. 21, 7956 [0016]
- Kim et al. *Cell*, 2003, vol. 11, 1177 [0016]
- von der Lehr et al. *Mol. Cell*, 2003, vol. 11, 1189 [0016]
- Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0036]

- Current Protocols in Molecular biology. John Wiley & Sons, 1987 [0036]
- Methods in Enzymology in series. Academic Press [0036]
- PCR Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2003 [0036]
- Animal Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press, 2000 [0036]
- Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987 [0036]
- Chien et al. *J. Clin. Invest.*, 1985, vol. 75, 1770 [0041]
- Meidell et al. *Am. J. Physiol.*, 1986, vol. 251, H1076 [0041]
- Tamamori et al. *Am. J. Physiol.*, 1998, vol. 275, H2036 [0041] [0094]
- Mouse Embryo: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994 [0042]
- Embryonic Stem Cells. Humana Press, 2002 [0042]
- Matsui et al. *Cell*, 1992, vol. 70, 841 [0042]
- Shamblott et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 13726 [0042]
- Jiang et al. *Nature*, 2002, vol. 418, 41 [0042]
- Abuljadayel. *Curr. Med. Res. Opinion*, 2003, vol. 19, 355 [0043]
- Li et al. *Nature Med.* [0043]
- Pittenger et al. *Science*, 1999, vol. 284, 143 [0044]
- Makino et al. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 697 [0044]
- Embryonic Stem Cells. Human Press, 2002 [0045]
- Klug et al. *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 216 [0045] [0082]
- Wobus et al. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1997, vol. 29, 1525 [0045]
- Kehat et al. *J. Clin. Invest.*, 2001, vol. 108, 407 [0045]
- Xu et al. *Circ. Res.*, 2002, vol. 91, 501 [0045]
- Takahashi et al. *Circulation*, 2003, vol. 107, 1912 [0045]
- Davy et al. *Cell*, 1985, vol. 40, 667 [0050]
- Kalderon et al. *Nature*, 1984, vol. 311, 33 [0050]
- Robbin et al. *Cell*, 1991, vol. 64, 615 [0050]
- Koff et al. *Cell*, 1991, vol. 66, 1217 [0052]
- Polyak et al. *Cell*, 1994, vol. 79, 59 [0052]
- Nourse et al. *Nature*, 1994, vol. 372, 570 [0052]
- Mainprize et al. *J. Neurooncol.*, 2001, vol. 51, 205 [0052]
- Conqueret. *Trends. Cell Biol.*, 2003, vol. 13, 65 [0052]
- Pagono et al. *Science*, 1995, vol. 269, 682 [0054]
- Carrano et al. *Nature Cell Biol.*, 1999, vol. 1, 193 [0055]
- Tsvetkov et al. *Curr. Biol.*, 1999, vol. 9, 661 [0055] [0100]
- Bornstein et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 26752 [0055]
- Kamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 100, 10231 [0055]
- Mueller et al. *EMBO J.*, 2000, vol. 19, 2168 [0058]
- Smitherman et al. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, vol. 20, 5631 [0058]
- Tomoda et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 2302 [0058]
- Ishida et al. *J Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 14355 [0058]
- Connor et al. *Mol. Biol. Cell*, 2003, vol. 14, 201 [0058]
- Boehm et al. *EMBO J.*, 2002, vol. 21, 3390 [0058]
- Niwa et al. *Gene*, 1991, vol. 108, 193 [0059]
- Lee et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 15876 [0060]
- Cuo et al. *Development*, 1999, vol. 126, 4223 [0060]
- Hammond et al. *Nat. Rev. Genet.*, 2001, vol. 2, 110 [0062]
- Elbashir et al. *Nature*, 2002, 411-494 [0062]
- RNA Interference (RNAi) : The Nuts & Bolts of siRNA Technology. DNA Press, 2004 [0062]
- RNA Interference, Editing, and Modification; Methods and Protocols. Humana Press, 2004 [0062]
- Chalk et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 319, 264 [0063]
- Ti-Tei et al. *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32, 936 [0063]
- Reynolds et al. *Nat. Biotechnol.*, 2004, vol. 22, 326 [0063]
- Miyake et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 1320 [0067]
- Mizuguchi et al. *Hum. Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 2577 [0067]
- Gene Therapy Protocols: Methods in Molecular Medicine. Humana Press, 1997 [0068]
- Gene Transfer in Cardiovascular System: Experimental Approaches & Therapeutic Implications. Kluwer Academic Publishers, 1997 [0068] [0074]
- Adenoviral Vectors for Gene Therapy. Academic Press, 2002 [0068]
- Banerjee, J. *Biomater. Appl.*, 2001, vol. 16, 3 [0073]
- Maurer et al. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2001, vol. 1, 923 [0073]
- Yonemitsu et al. *Int. J. Oncol.*, 1998, vol. 12, 1277 [0073]
- Kaneda et al. *Mol. Med. Today*, 1999, vol. 5, 298 [0073]
- Vascular Surgery. W.B.Saunders, 2000 [0074]
- Textbook of Interventional Cardiology. W.B.Saunders, 2002 [0074]
- *J. Clin. Invest.*, 1996, vol. 98, 216 [0076]
- Shimizu et al. *Circ. Res.*, 2002, vol. 90, e40 [0081]
- Dowell et al. *Cardiovasc. Res.*, 2003, vol. 58, 336 [0082]
- Reffelmann et al. *Heart Fail. Rev.*, 2003, vol. 8, 201 [0082]
- Maltsev et al. *Mech. Dev.*, 1993, vol. 44, 41 [0082]
- *Circ. Res.*, 1994, vol. 75, 233 [0082]
- Dr. Sander van den Heuvel. *Massachusetts General Hospital Cancer Center* [0085]

- **van den Heuvel et al.** *Science*, 1993, vol. 262, 2050 [0085]
- **Matsushime et al.** *Cell*, 1991, vol. 65, 701 [0086]
- **Hara et al.** *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 48937 [0102]
- **Ishida et al.** *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 14355 [0102]
- **Tsvetkov et al.** *Curr. Biol.*, 1999, vol. 9, 661 [0105]
- **Dairaku et al.** *Circ. J.*, 2002, vol. 66, 411 [0120]
- **O'brien et al.** *Lab. Anim. Sci.*, 1997, vol. 47, 486 [0123]
- **Morimoto et al.** *J. Pharmacol. Sci.*, 2003, vol. 91 (1), 151 [0123]
- **Pfeffer et al.** *Circ. Res.*, 1985, vol. 57, 84 [0132]
- **Jain et al.** *Circulation*, 2002, vol. 103, 1920 [0134]