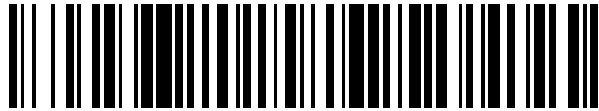


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 044**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2008 E 08732933 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2142206**

54 Título: **SDF-1 para su uso en el tratamiento de trastornos vasculares periféricos isquémicos**

30 Prioridad:

**30.03.2007 US 921044 P**

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

**11.11.2014**

73 Titular/es:

**THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (100.0%)  
9500 EUCLID AVENUE  
CLEVELAND OH 44195, US**

72 Inventor/es:

**PENN, MARC S.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 520 044 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).

**SDF-1 para su uso en el tratamiento de trastornos vasculares periféricos isquémicos****Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para tratar trastornos asociados a isquemia, como se indica en las reivindicaciones 1-3.

**10 Antecedentes de la invención**

La isquemia es una afección en la que la circulación sanguínea se obstruye completamente o se reduce considerablemente en partes localizadas del cuerpo, produciendo anoxia, suministro reducido de sustratos y acumulación de metabolitos. Aunque el grado de la isquemia depende de la fuerza de la obstrucción vascular, su duración, sensibilidad del tejido a ella y grado del desarrollo de vasos colaterales, la disfunción se produce normalmente en órganos o tejidos isquémicos, y la isquemia prolongada produce atrofia, desnaturalización, apoptosis y necrosis de tejidos afectados.

Los mecanismos de desarrollo de la lesión cerebrovascular isquémica se clasifican en tres tipos, trombóticos, embólicos y hemodinámicos. La principal afección patológica para los tres tipos es, sin embargo, la isquemia cerebral, cuya gravedad y duración definen el grado de lesiones de tejido cerebral. En el sitio de isquemia grave, las células nerviosas y endoteliales sufren rápidamente lesiones irreversibles, formando nidos de infarto debidos a necrosis. Aunque la circulación sanguínea disminuye moderadamente y se suspenden las funciones de neurocitos en la penumbra isquémica, su capacidad de supervivencia no se pierde y el sistema cerebrovascular restante puede recuperar sus funciones cuando la circulación se reanuda mediante vasos colaterales.

En cardiopatía isquémica, que son enfermedades que afectan la arteria coronaria y producen isquemia miocárdica, el grado de lesión de células miocárdicas isquémicas avanza de lesión de células reversibles a lesión de células irreversibles con tiempo creciente de la obstrucción de la arteria coronaria.

**30 Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1) para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno vascular periférico isquémico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar SDF-1 a células apoptóticas que expresan un receptor de SDF-1 del tejido isquémico del sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la apoptosis de las células apoptóticas, en el que el SDF-1 se administra expresando o promoviendo la expresión de SDF-1 de una célula del tejido isquémico o una célula alrededor de la periferia del tejido isquémico.

40 El SDF-1 puede administrarse a una cantidad eficaz para aumentar la fosforilación de Akt de las células apoptóticas.

La célula que expresa SDF-1 puede modificarse genéticamente por al menos uno de un vector, ADN de plásmido, electroporación y nanopartículas para expresar SDF-1.

45 La presente invención puede usarse conjuntamente con la administración de MCP-3 al tejido isquémico en cantidad eficaz para reclutar citoblastos y/o células progenitoras al tejido isquémico.

50 La MCP-3 puede administrarse administrando una composición farmacéutica que comprende MCP-3 al tejido que está tratándose o que expresa MCP-3 en el tejido que está tratándose. La MCP-3 puede expresarse en el tejido que está tratándose de una célula que es biocompatible con el tejido isquémico que está tratándose.

55 La MCP-3 también puede expresarse de una célula del tejido isquémico o una célula alrededor de la periferia del tejido isquémico. La MCP-3 puede expresarse de la célula del tejido que está tratándose modificando genéticamente la célula por al menos uno de un vector, ADN de plásmido, electroporación y nanopartículas para expresar MCP-3.

La célula que expresa el SDF-1 también puede expresar MCP-3. La célula que expresa SDF-1 y MCP-3 puede transfectarse por una construcción de expresión bicistrónica que expresa SDF-1 y MCP-3.

60 Una composición farmacéutica puede incluir al menos un vector de expresión para expresar SDF-1 y MCP-3 de una célula del tejido isquémico. El al menos un vector puede incluir un vector bicistrónico que comprende ADN para expresar SDF-1 y ADN para expresar MCP-3. La composición farmacéutica puede incluir al menos una célula biocompatible con el tejido isquémico que expresa SDF-1 y/o MCP-3 en el tejido isquémico cuando se administra al tejido isquémico.

65 La invención proporciona SDF-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno isquémico de un sujeto mamífero, como se define en las reivindicaciones 1-3. En el procedimiento, SDF-1 y MCP-3 pueden

administrarse localmente al tejido isquémico y/o áreas próximas al tejido isquémico. La concentración (o número) de citoblastos en la sangre periférica del tejido isquémico puede aumentarse de la primera concentración a una segunda concentración mientras que SDF-1 y MCP-3 se proporcionan en el tejido isquémico.

5 El número de citoblastos y/o células progenitoras en la sangre periférica pueden aumentarse inyectando citoblastos y/o células progenitoras en la sangre periférica y/o arterial o infusión venosa de los citoblastos en el sujeto mamífero que está tratándose. Un ejemplo de un tipo particular de citoblasto que puede inyectarse o infundirse es un citoblasto mesenquimatoso (MSC) autólogo. Un ejemplo de una célula progenitora que puede ser posiblemente inyectada o infundida es una célula progenitora adulta multipotente derivada de médula ósea autóloga, singénica o alógena.

10

### **Breve descripción de los dibujos**

Otras características de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a la que la presente invención se refiere a partir de la lectura de la siguiente descripción de la invención con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

15

La Fig. 1 ilustra a.) Transferencia Western en MSC de control y que expresan SDF-1 y b.) Tinción por inmunofluorescencia para CXCR4 en MSC de control. c.) Diez mil MSC de control y que expresan SDF-1 se sembraron por separado por pocillo en una placa de 12 pocillos en DMEM sin suero. Se obtuvieron 100  $\mu$ l de medio 1, 6 y 24 h después. Los niveles de SDF-1 en el medio se cuantificaron usando ELISA (R&D Systems). Se verificó un número igual de células cuantificando la proteína total por capa de células al final del experimento. Los datos se expresan como picogramos de SDF-1 por ml de medio total. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos representan media  $\pm$  DE. d.) Análisis de transferencia Western para Akt y Akt fosforilado en MSC de control y que expresan SDF-1. Las transferencias Western se realizaron con 50  $\mu$ g de proteína de células totales separadas sobre un gel al 10 % de SDS-PAGE.

20

25

La Fig. 2 ilustra a.) Análisis de FACS representativos para células positivas para anexina V en cultivos de MSC o células que expresan SDF-1 después de 72 h de cultivarse bajo condición hipóxica (0,1 % de oxígeno) en medio de cultivo privado de suero (1 % de SBF). b.) Tinción inmunofluorescente representativa para BrdU (FITC, Green) en la zona de infarto 96 h después de la ligadura de LAD de ratas que recibieron 2 millones de MSC de control (izquierda) o que expresan SDF-1 (derecha) 24 h después de la ligadura de LAD. c.) Número de MSC por milímetro cuadrado dentro de la zona de infarto 4 d y 5 semanas después de la ligadura de LAD. Los animales recibieron 2 millones de MSC de control o que expresan SDF-1 24 h después de la ligadura de LAD. Se cuantificó MSC por milímetro cuadrado tras la tinción inmunofluorescente para BrdU. Dos observadores independientes cegados al grupo de tratamiento cuantificaron el número de núcleos positivos para BrdU en la zona de infarto en 10 campos aleatorios de 5 secciones diferentes (total 50 campos) obtenidos del ventrículo izquierdo medio. Los datos representan media + DE. \* representa  $p < 0,01$  en comparación con la infusión de MSC de control.

30

35

La Fig. 3 ilustra a.) Imagen confocal de tinción inmunofluorescente representativa para CXCR4 (Alexa Fluor 488, verde) y troponina I (Alexa Fluor 594, roja) en la zona límite de infarto 12-72 h después de la ligadura de LAD. b.) y c.) Imagen confocal de tinción inmunofluorescente representativa para (izquierda) miosina cardíaca (Alexa Fluor 594, roja) y (Centro) TUNEL (Alexa Fluor 488, verde) y (Derecha) imagen fusionada de un animal 96 h después de la ligadura de LAD y 72 h después de la infusión de b. MSC de control y c. que expresan SDF-1. Las flechas identifican los mismos núcleos en cada cuadro de una serie dada. d.) Número de núcleos positivos para TUNEL en la zona límite de infarto 96 h después de la ligadura de LAD en animales que recibieron MSC de control o que expresan en exceso SDF-1 24 h después del IAM. Dos observadores independientes cegados al grupo de tratamiento cuantificaron el número de núcleos positivos para TUNEL en 1000 núcleos dentro de 4-5 células de la zona límite de infarto de 5 secciones diferentes (total 5000 núcleos totales) obtenidos del ventrículo izquierdo medio. Los datos representan el porcentaje medio de células positivas para TUNEL  $\pm$  DE. \* representa  $p < 0,0001$  en comparación con la infusión de MSC de control. e.) Porcentaje de área positiva para miosina cardíaca dentro de la zona de infarto 5 semanas después de la ligadura de LAD en animales que recibieron solución salina o MSC de control o que expresan en exceso SDF-1 24 h después del IAM. El porcentaje de área positiva para miosina cardíaca se obtuvo segmentando la imagen basada en el valor de la escala de grises usando NIH Imagen por un observador cegado al grupo de tratamiento. Se cuantificaron cinco secciones por animal. Los datos representan media  $\pm$  DE. & representa  $p < 0,01$  y \* representa  $p < 0,0001$  en comparación con la infusión de solución salina. f.) Secciones representativas obtenidas 5 semanas después del IAM teñido para miosina cardíaca (FITC, verde) de animales que recibieron solución salina, MSC de control o que expresan en exceso SDF-1.

40

45

50

55

60

La Fig. 4 ilustra a.) Función cardíaca y b. Tamaño ventricular izquierdo como se cuantificó por los parámetros ecocardiográficos fracción de acortamiento y dimensión diastólica final ventricular izquierda (LVEDD), respectivamente. Se realizó ecocardiografía 2D y en modo M en el nivel inicial, 2 y 5 semanas después de la ligadura de LAD en animales que recibieron solución salina (diamante,  $n=7$ ), soporte de SDF-1 de miocardio isquémico Zhang y col. 23 ó 1 millón de fibroblastos cardíacos (triángulo,  $n=5$ ), MSC de control (cuadrado blanco,  $n=6$ ) o MSC que expresan en exceso SDF-1 (círculo relleno,  $n=8$ ). Para los animales que recibieron

65

solución salina y fibroblastos cardíacos los datos representan media  $\pm$  DE. Para los animales que recibieron MSC se presentan puntos de datos individuales y la media para ese grupo se representa por una línea horizontal. & representa  $p < 0,01$  y \* representa  $p < 0,0001$  en comparación con la infusión de solución salina.

5 La Fig. 5 ilustra imágenes representativas de tejido 5 semanas después del IAM e infusión de 2 millones de MSC de control o que expresan SDF-1 1 día después del IAM. a.) Tinción inmunofluorescente para  $\alpha$ -actina de células de músculo liso (Cy3, rojo) y núcleos celulares (DAPI, azul) de animales que recibieron MSC de control (izquierda) o que expresan SDF-1 (derecha). b.) Imagen confocal de tinción inmunofluorescente para  $\alpha$ -actina (Cy3, rojo), núcleos celulares (DAPI, azul) y b. BrdU (FITC, verde) y c.) Connexin 45 (Alexa Fluor 488, verde) de un animal que recibió MSC que expresan SDF-1. d.) Imagen confocal de baja potencia de tinción inmunofluorescente como en c.

15 La Fig. 6 ilustra imágenes representativas de tejido 5 semanas después del IAM e infusión de 2 millones de MSC de control o positivas para GFP que expresan SDF-1 1 día después del IAM. Todos los animales recibieron BrdU dos veces al día durante 14 días empezando en el día después del trasplante de células a. Imágenes confocales de tinción inmunofluorescente en la zona límite de infarto para miosina cardíaca (rojo), BrdU (verde) y núcleos celulares (DAPI, azul) de animales que recibieron PBS o MSC de control o que expresan SDF-1. La columna de imágenes a la derecha son imágenes de alta potencia de las áreas delineadas en las imágenes en transparencia de baja potencia.

20 La Fig. 7 ilustra que MSC se recirculan transitoriamente al miocardio tras IM agudo. Dos millones de MSC marcados con BrdU se infundieron mediante la vena de la cola 1 d o 14 d después de la ligadura de LAD. El número de células positivas para BrdU se cuantificó por milímetro cuadrado por inmunohistoquímica 3 d después de la infusión de MSC. Los datos representan media  $\pm$  DE,  $n=5$  por grupo.

25 La Fig. 8 ilustra que MCP-3 es un candidato a factor de recirculación de MSC. (a) Representación esquemática de la estrategia y hallazgos de análisis en matriz que identifica quimiocinas (cursiva, gris claro a la izquierda) expresadas en el miocardio tras la ligadura de LAD y receptores de quimiocinas (subrayados, círculo gris oscuro a la derecha) expresados por MSC y no expresados por fibroblastos cardíacos. Pares de interés de quimiocinas y receptores de quimiocinas coincidentes se delinean en el área de solapamiento representada por el área en el área abierta. (b) Gel de agarosa representativo de productos de PCR (40 ciclos) para receptores de quimiocinas identificados en MSC en el pase 6 y 20, fibroblastos cardíacos y bazo (control positivo). GAPDH se usó como control de carga. El estudio de PCR se repitió con al menos 5 muestras por tipo de célula/pase por receptor diana.

35 La Fig. 9 ilustra que MCP-3 produce la quimiotaxia de MSC *in vitro*. MSC migraron en respuesta a MCP-3 en un modo dependiente de la concentración en un ensayo de quimiotaxia *in vitro*. Los datos representan media  $\pm$  DE,  $n=10$  por concentración de MCP-3.

40 La Fig. 10 ilustra que la expresión de MCP-3 conduce a la recirculación de MSC al miocardio *in vivo*. Un mes después de la ligadura de LAD, 1 millón de fibroblastos cardíacos (CF) de control ( $\square$ ) o que expresan MCP-3 ( $\blacksquare$ ) se trasplantaron en la zona límite de infarto. Tres días después los animales recibieron tanto solución salina, una dosis (infusión única) como 6 dosis (múltiples infusiones) 20 Schenk y col. MCP-3 and MSC homing SC-06-0293/R1 durante 12 días de 1 millón de MSC marcados con BrdU. Los animales con una única infusión se sacrificaron 1 semana después de la infusión de MSC y los animales con múltiples infusiones se sacrificaron 1 mes después de las infusiones de MSC (10 semanas después de la ligadura de LAD). (a) El número de MSC injertados en cada grupo de tratamiento se cuantificó por milímetro cuadrado por inmunofluorescencia usando un anticuerpo contra BrdU. Los datos representan media  $\pm$  DE.  $n = 7-10$  animales por grupo. (b) Fotomicrografías representativas de la zona de infarto tras la tinción para BrdU (verde, imágenes del centro) y contratinción para núcleos (DAPI, azul, imágenes de la izquierda). Imágenes fusionadas de BrdU y núcleos están a la derecha. \* $p < 0,05$ , # $p < 0,001$  en comparación con el grupo de fibroblastos cardíacos de control de la misma infusión.

55 La Fig. 11 ilustra que la expresión de MCP-3 combinada con infusiones de MSC produce función cardíaca mejorada y remodelación. Un mes después de la ligadura de LAD, la función cardíaca (fracción de acortamiento (%), a, c) y la dimensión diastólica final ventricular izquierda (LVEDD, b, d) se cuantificaron por ecocardiografía ( $\circ$ ,  $\square$ ). Después de la ecocardiografía, 1 millón de fibroblastos cardíacos de control ( $\bullet$ ) o que expresan MCP-3 ( $\blacksquare$ ) se trasplantaron en la zona límite del infarto. Empezando tres días después de las inyecciones de fibroblastos cardíacos, los animales recibieron la primera dosis de 6 dosis de 1 millón de MSC marcadas con BrdU (a, b) o solución salina (c, d). Se administraron dosis sucesivas cada dos días durante los siguientes 12 días. La ecocardiografía se repitió 6 semanas después del trasplante de fibroblastos cardíacos (10 semanas después de la ligadura de LAD,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ). Los datos representan animales individuales. Líneas continuas representan la media para el grupo.  $n=7-10$  por grupo. \* $p < 0,05$ , # $p < 0,001$  en comparación con el parámetro inicial medido 1 mes después del infarto de miocardio.

65 La Fig. 12 ilustra que la expresión de MCP combinada con infusiones de MSC produce remodelación

ventricular y reclutamiento de miofibroblastos. Fotomicrografías representativas de 21 Schenk y col. MCP-3 and MSC homing SC-06-0293/R1 secciones transversales teñidas con tri-cromo de Masson de los segmentos medioventriculares de animales que recibieron (a) fibroblastos cardíacos que expresan MCP-3 o (b) de control 4 semanas después de la ligadura de LAD seguido de infusiones en serie de MSC. (c) El área en porcentaje del ventrículo que contiene fibrillas de colágeno o (d) el porcentaje del perímetro endocárdico en el que hubo fibrillas de colágeno se cuantificó en 5 animales por grupo. Los datos representan media  $\pm$  DE, n=5 por grupo \*p<0,05. Micrografías confocales representativas de miofibroblastos en la zona límite de infarto en animales que recibieron infusiones en serie de MSC tras el trasplante de (e) fibroblastos cardíacos que expresan MCP-3 o (f) de control. Se teñió tejido 10 semanas después de la ligadura de LAD usando inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce vimentina (verde). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul) y los miocitos cardíacos se identificaron usando un anticuerpo que reconoce la cadena pesada de miosina ventricular (rojo).

### **Descripción detallada**

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Definiciones comúnmente entendidas de términos de biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Rieger y col., *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5ª edición, Springer-Verlag: New York, 1991; y Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: New York, 1994.

Procedimientos que implican técnicas de biología molecular convencionales se describen en el presente documento. Tales técnicas son generalmente conocidas en la técnica y se describen en detalle en los tratados de metodología, tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel y col., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (con actualizaciones periódicas). Procedimientos para la síntesis química de ácidos nucleicos se tratan, por ejemplo, en Beaucage y Carruthers, *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, 1981, y Matteucci y col., *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185, 1981. La síntesis química de ácidos nucleicos puede realizarse, por ejemplo, en sintetizadores de oligonucleótidos automáticos comerciales. Procedimientos inmunológicos (por ejemplo, preparación de antígeno-anticuerpos específicos, inmunoprecipitación e inmunotransferencia) se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Immunology*, ed. Coligan y col., John Wiley & Sons, New York, 1991; y *Methods of Immunological Analysis*, ed. Masseyeff y col., John Wiley & Sons, New York, 1992. Procedimientos convencionales de transferencia génica y terapia génica también pueden adaptarse para su uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, *Gene Therapy: Principles and Applications*, ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; *Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine)*, ed. P. D. Robbins, Humana Press, 1997; y *Retro-vectors for Human Gene Therapy*, ed. C. P. Hodgson, Springer Verlag, 1996.

Se encontró que la administración localizada sostenida de SDF-1 a células que expresan receptores de SDF-1 o células con receptores de SDF-1 reguladas por incremento como resultado de trastornos isquémicos y/o lesión de tejido aumenta la fosforilación de Akt en las células, que puede a su vez mitigar la apoptosis de las células. Adicionalmente, la administración localizada a largo plazo de SDF-1 a tejido isquémico facilita el reclutamiento de citoblastos y/o células progenitoras que expresan CXCR4 y/o CXCR7 al tejido que está tratándose, que puede facilitar la revascularización del tejido isquémico.

Sujetos mamíferos, que se tratarán mediante procedimientos y composiciones de la presente invención, pueden incluir cualquier mamífero, tal como seres humanos, ratas, ratones, gatos, perros, cabras, ovejas, caballos, simios inferiores, simios superiores, conejos, ganado vacuno, etc. El sujeto mamífero puede estar en cualquier etapa de desarrollo que incluye adultos, animales jóvenes y neonatos. Los sujetos mamíferos también pueden incluir aquellos en una etapa fetal de desarrollo.

Se encontró que inmediatamente después de la aparición de un trastorno isquémico o lesión de tejido, las células en el tejido isquémico o alrededor de la periferia o el límite del tejido isquémico pueden regular por incremento la expresión de SDF-1. Después de aproximadamente 24 horas, la expresión de SDF-1 por las células se reduce. El SDF-1 puede administrarse a las células apoptóticas después de aproximadamente la aparición de la regulación por disminución de SDF-1 por las células del tejido isquémico tras la lesión de tejido en aproximadamente días, semanas o meses después de la aparición de la regulación por disminución de SDF-1. El periodo de tiempo que el SDF-1 se administra a las células puede comprender de aproximadamente inmediatamente después de la aparición del trastorno isquémico o lesión de tejido a aproximadamente días, semanas o meses después de la aparición del trastorno isquémico o lesión de tejido.

El SDF-1 puede administrarse a células o tejido antes del trasplante o la administración de las células o tejido a un sujeto que está tratándose. La administración de SDF-1 a células o tejido que van a trasplantarse puede mitigar potencialmente la apoptosis de las células trasplantadas o tejido y promover la supervivencia a largo plazo de las células o tejido. El SDF-1 puede administrarse a las células o tejido que van a trasplantarse proporcionando el SDF-1 en un medio de cultivo con las células o tejido. Por ejemplo, citoblastos hematopoyéticos, citoblastos mesenquimatosos, citoblastos neurales, otros citoblastos y/u otras células progenitoras, que expresan receptores de SDF-1, pueden cultivarse en un medio con SDF-1 antes del trasplante para una aplicación terapéutica. El SDF-1

puede promover la supervivencia de citoblastos y/o células progenitoras cultivadas de manera que las células tengan supervivencia potenciada cuando se administran o trasplantan a un sujeto que está tratándose. En otro aspecto, el SDF-1 puede co-trasplantarse con las células o tejido que va a trasplantarse para mitigar la posible apoptosis de las células o tejido.

SDF-1 pueden tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a una secuencia de aminoácidos de SDF-1 de mamífero nativa. Se conoce la secuencia de aminoácidos de varias proteínas SDF-1 de mamífero diferentes que incluyen humano, ratón y rata. Las secuencias de aminoácidos de SDF-1 humano y de rata son aproximadamente el 92 % idénticas. El SDF-1 puede comprender dos isoformas, SDF-1 alfa y SDF-1 beta, ambas de las cuales se denominan en el presente documento SDF-1, a menos que se identifiquen de otro modo.

El SDF-1 pueden tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a SEC ID N°: 1. El SDF-1 que se expresa en exceso también puede tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a una de las anteriores proteínas SDF-1 de mamífero. Por ejemplo, el SDF-1 que se expresa en exceso puede tener una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a SEC ID N°: 2. SEC ID N°: 2, que comprende sustancialmente SEC ID N°: 1, es la secuencia amino para SDF-1 humano y se identifica por n° de acceso de GenBank NP954637. El SDF-1 que se expresa en exceso también puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a SEC ID N°: 3. SEC ID N°: 3, que también comprende sustancialmente SEC ID N°: 2, incluye las secuencias de aminoácidos para SDF de rata y se identifica por n° de acceso de GenBank AAF01066.

El SDF-1 también puede ser una variante de SDF-1 de mamífero, tal como un fragmento, análogo y derivado de SDF-1 de mamífero. Tales variantes incluyen, por ejemplo, un polipéptido codificado por una variante alélica que se produce naturalmente del gen SDF-1 nativo (es decir, un ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica un polipéptido de SDF-1 de mamífero que se produce naturalmente), un polipéptido codificado por una forma de corte y empalme alternativa de un gen SDF-1 nativo, un polipéptido codificado por un homólogo u ortólogo de un gen SDF-1 nativo y un polipéptido codificado por una variante que no se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo.

Las variantes de SDF-1 tienen una secuencia de péptidos que se diferencia de un polipéptido SDF-1 nativo en uno o más aminoácidos. La secuencia de péptidos de tales variantes puede caracterizar una delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos de una variante de SDF-1. Las inserciones de aminoácidos son preferentemente de aproximadamente 1 a 4 aminoácidos contiguos, y las delecciones son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos contiguos. Los polipéptidos SDF-1 de variante mantienen sustancialmente una actividad funcional de SDF-1 nativo. Ejemplos de variantes de polipéptido de SDF-1 pueden prepararse expresando moléculas de ácidos nucleicos dentro de la invención que caracterizan cambios silenciosos o conservativos.

Las variantes de SDF-1 pueden incluir formas agonistas de la proteína que expresan constitutivamente las actividades funcionales de SDF-1 nativo. Otras variantes de SDF-1 pueden incluir aquellas que son resistentes a escisión proteolítica como, por ejemplo, debido a mutaciones, que alteran las secuencias diana de proteasa. Por ejemplo, el SDF-1 puede incluir SDF-1 resistente a escisión de MMP-2, tal como S-SDF-1(S4V), que se describe en *Circulation*, 2007, 1006. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido produce una variante que tiene una o más actividades funcionales de un SDF-1 nativo, puede determinarse fácilmente probando la variante para una actividad funcional de SDF-1 nativo.

El ácido nucleico de SDF-1 que codifica la proteína SDF-1 puede ser un ácido nucleico nativo o no nativo y estar en forma de ARN o en forma de ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico y ADN sintético). El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante (sentido) o hebra no codificante (antisentido). La secuencia codificante de ácidos nucleicos que codifica SDF-1 puede ser sustancialmente similar a una secuencia de nucleótidos del gen SDF-1, tal como la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5. La SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 5 comprenden, respectivamente, las secuencias de ácidos nucleicos para SDF-1 humano y SDF-1 de rata y son sustancialmente similares a las secuencias nucleicas de n° de acceso de GenBank NM199168 y n° de acceso de GenBank AF189724. La secuencia codificante de ácidos nucleicos para SDF-1 también puede ser una secuencia codificante diferente que, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3.

Otras moléculas de ácidos nucleicos que codifican SDF-1 son variantes de un SDF-1 nativo, tales como aquellas que codifican fragmentos, análogos y derivados de SDF-1 nativo. Tales variantes pueden ser, por ejemplo, una variante alélica que se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo, un homólogo u ortólogo de un gen SDF-1 nativo, o una variante que no se produce naturalmente de un gen SDF-1 nativo. Estas variantes tienen una secuencia de nucleótidos que se diferencia de un gen SDF-1 nativo en una o más bases. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de tales variantes puede caracterizar una delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos de un gen SDF-1 nativo. Las inserciones de ácidos nucleicos son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 nucleótidos contiguos, y las delecciones son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 nucleótidos contiguos.

En otras aplicaciones, SDF-1 de variante que muestra cambios sustanciales en la estructura puede generarse haciendo sustituciones de nucleótidos que producen menos de un cambio conservativo en el polipéptido codificado. Ejemplos de tales sustituciones de nucleótidos son aquellas que producen cambios en (a) la estructura del esqueleto

de polipéptido; (b) la carga o hidrofobia del polipéptido; o (c) el volumen de una cadena lateral de aminoácido. Se espera generalmente que las sustituciones de nucleótidos que producen los mayores cambios en las propiedades de las proteínas sean aquellas que producen cambios no conservativos en codones. Ejemplos de cambios de codones que es probable que produzcan cambios importantes en la estructura de proteínas son aquellos que producen sustitución de (a) un residuo hidrófilo (por ejemplo, serina o treonina), con (o por) un residuo hidrófobo (por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina); (b) una cisteína o prolina con (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, lisina, arginina o histidina), con (o por) un residuo electronegativo (por ejemplo, glutamina o asparagina); o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa (por ejemplo, fenilalanina), con (o por) uno que no tiene una cadena lateral (por ejemplo, glicina).

Variantes alélicas que se producen naturalmente de un gen SDF-1 nativo son ácidos nucleicos aislados de tejido de mamífero que tienen al menos el 70 % de identidad de secuencias con un gen SDF-1 nativo, y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con un polipéptido de SDF-1 nativo. Homólogos de un gen SDF-1 nativo son ácidos nucleicos aislados de otras especies que tienen al menos el 70 % de identidad de secuencias con el gen nativo, y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con un polipéptido SDF-1 nativo. Puede buscarse en bases de datos de ácidos nucleicos públicas y/o patentadas para identificar otras moléculas de ácidos nucleicos que tienen un alto porcentaje (por ejemplo, 70 % o más) de identidad de secuencias con un gen SDF-1 nativo.

Variantes del gen SDF-1 que no se producen naturalmente son ácidos nucleicos que no se producen en la naturaleza (por ejemplo, se preparan por la mano del hombre), tienen al menos el 70 % de identidad de secuencias con un gen SDF-1 nativo y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con un polipéptido SDF-1 nativo. Ejemplos de variantes del gen SDF-1 que no se producen naturalmente son aquellas que codifican un fragmento de una proteína SDF-1 nativa, aquellas que se hibridan con un gen SDF-1 nativo o un complemento de un gen SDF-1 nativo bajo condiciones rigurosas, y aquellas que comparten al menos el 65 % de identidad de secuencias con un gen SDF-1 nativo o un complemento de un gen SDF-1 nativo.

Ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un gen SDF-1 nativo son aquellos que codifican residuos de aminoácidos de SDF-1 nativo. Oligonucleótidos más cortos que codifican o se hibridan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de SDF-1 nativo pueden usarse como sondas, cebadores o moléculas antisentido. También pueden usarse polinucleótidos más largos que codifican o se hibridan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un SDF-1 nativo. Pueden prepararse ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un SDF-1 nativo por digestión enzimática (por ejemplo, usando una enzima de restricción) o degradación química del gen SDF-1 nativo de longitud completa o variantes del mismo.

También pueden usarse ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con uno de los ácidos nucleicos anteriores. Por ejemplo, tales ácidos nucleicos pueden ser aquellos que se hibridan con uno de los ácidos nucleicos anteriores bajo condiciones de baja rigurosidad, condiciones de rigurosidad reducida o condiciones de alta rigurosidad.

También pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión de SDF-1. Tales ácidos nucleicos pueden prepararse preparando una construcción (por ejemplo, un vector de expresión) que expresa una proteína de fusión de SDF-1 cuando se introduce en una célula diana adecuada. Por ejemplo, puede prepararse una construcción tal ligando un primer polinucleótido que codifica una proteína SDF-1 fusionada en marco con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de forma que la expresión de la construcción en un sistema de expresión adecuado proporcione una proteína de fusión.

En otro aspecto, el SDF-1 puede administrarse directamente a o alrededor de la periferia del tejido isquémico introduciendo un agente en células diana que produce, aumenta y/o regula por incremento la expresión de SDF-1 en o alrededor de la periferia del tejido isquémico. La proteína SDF-1 que se expresa en o alrededor de la periferia del tejido isquémico puede ser un producto de expresión de una célula genéticamente modificada. Las células diana pueden incluir células dentro de o alrededor de la periferia del tejido isquémico o células *ex vivo* que son biocompatibles con el tejido isquémico que está tratándose. Las células biocompatibles también pueden incluir células autólogas que se recogen del sujeto que está tratándose y/o células alogénicas o singénicas biocompatibles, tales como citoblastos autólogos, alogénicos o singénicos (por ejemplo, citoblastos mesenquimatosos), células progenitoras (por ejemplo, células progenitoras adultas multipotentes) y/u otras células que se diferencian adicionalmente y son biocompatibles con el tejido isquémico que está tratándose.

El agente puede comprender ácidos nucleicos naturales o sintéticos, que se incorporan en construcciones de ácidos nucleicos recombinantes, normalmente construcciones de ADN, capaces de introducción en y replicación en la célula. Una construcción tal incluye preferentemente un sistema de replicación y secuencias capaces de transcripción y traducción de una secuencia codificante de polipéptidos en una célula diana dada.

También pueden introducirse otros agentes en las células para promover la expresión de SDF-1 de los citoblastos. Tales agentes pueden incluir, por ejemplo, proteínas Sonic Hedgehog (Shh) humanas, Desert Hedgehog (Dhh) humanas e Indian Hedgehog (Ihh) humanas, que se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 20060105950 y 20070173471. Otros ejemplos, agentes que aumentan la transcripción de un gen que

codifica SDF-1, aumentan la traducción de un ARNm que codifica SDF-1, y/o aquellos que disminuyen la degradación de un ARNm que codifica SDF-1 podrían usarse para aumentar los niveles de proteína SDF-1. El aumentar la tasa de transcripción de un gen dentro de una célula puede llevarse a cabo introduciendo un promotor exógeno en la dirección 5' del gen que codifica SDF-1. También pueden emplearse elementos potenciadores, que facilitan la expresión de un gen heterólogo.

Un procedimiento de introducción del agente en una célula diana implica usar terapia génica. Terapia génica se refiere a la transferencia génica para expresar un producto terapéutico de una célula *in vivo* o *in vitro*. La terapia génica según la presente invención puede usarse para expresar proteína SDF-1 de una célula diana *in vivo* o *in vitro*.

En un aspecto de la invención, la terapia génica pueden usar ADN desnudo o un vector que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína SDF-1. Un "vector" (algunas veces denominado "vehículo" de administración de genes o de transferencia génica) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido que va a administrarse a una célula diana, tanto *in vitro* como *in vivo*. El polinucleótido que va a administrarse puede comprender una secuencia codificante de interés en terapia génica. Vectores incluyen, por ejemplo, vectores virales (tales como adenovirus ('Ad'), virus adeno-asociados (AAV) y retrovirus), liposomas y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares que pueden mediar en la administración de un polinucleótido a una célula diana.

Los vectores también pueden comprender otros componentes o funcionalidades que modulan adicionalmente la administración génica y/o expresión génica, o que proporcionan de otro modo propiedades beneficiosas a las células elegidas como diana. Tales otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión o dirigidos a células (incluyendo componentes que median en la unión específica de tipo de célula o de tejido); componentes que influyen en la captación del ácido nucleico de vector por la célula; componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula después de la captación (tales como agentes que median en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido. Tales componentes también podrían incluir marcadores, tales como marcadores detectables y/o de selección que pueden usarse para detectar o seleccionar células que han sido captadas y están expresando el ácido nucleico administrado por el vector. Tales componentes pueden proporcionarse como característica natural del vector (tal como el uso de ciertos vectores virales que tienen componentes o funcionalidades que median en la unión y captación), o los vectores pueden modificarse para proporcionar tales funcionalidades.

Los marcadores de selección pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores de selección positivos permiten la selección de células que llevan el marcador, mientras que los marcadores de selección negativos permiten eliminar selectivamente células que llevan el marcador. Se ha descrito una variedad de tales genes marcadores, que incluyen marcadores bifuncionales (es decir, positivos/negativos) (véase, por ejemplo, Lupton, S., documento WO 92/08796, publicado el 29 de mayo de 1992; y Lupton, S., documento WO 94/28143, publicado el 8 de diciembre de 1994). Tales genes marcadores pueden proporcionar una medida añadida de control que puede ser ventajosa en contextos de terapia génica. Se conoce una gran variedad de tales vectores en la técnica y están generalmente disponibles.

Vectores para su uso en la presente invención incluyen vectores virales, vectores basados en lípidos y otros vectores no virales que pueden administrar un nucleótido según la presente invención a las células diana. El vector puede ser un vector dirigido, especialmente un vector dirigido que se une preferencialmente a células del tejido isquémico. Vectores virales para su uso en la invención pueden incluir aquellos que presentan baja toxicidad para una célula diana e inducen la producción de cantidades terapéuticamente útiles de proteína SDF-1 de una manera específica de tejido.

Ejemplos de vectores virales son aquellos derivados de adenovirus (Ad) o virus adeno-asociados (AAV). Pueden usarse tanto vectores virales humanos como no humanos y el vector viral recombinante puede ser defectuoso en la replicación en seres humanos. Si el vector es un adenovirus, el vector puede comprender un polinucleótido que tiene un promotor operativamente ligado a un gen que codifica la proteína SDF-1 y es defectuoso en la replicación en seres humanos.

Otros vectores virales que pueden usarse según la presente invención incluyen vectores basados en el virus del herpes simple (VHS). Los vectores de VHS delecionados de uno o más genes tempranos inmediatos (IE) son ventajosos debido a que son generalmente no citotóxicos, persisten en un estado similar a latencia en la célula diana y proporcionan transducción eficiente de células diana. Los vectores de VHS recombinante pueden incorporar aproximadamente 30 kb de ácido nucleico heterólogo. Un ejemplo de un vector de VHS es uno que: (1) se manipula de VHS tipo I, (2) tiene sus genes IE delecionados, y (3) contiene un promotor específico de tejido operativamente ligado a un ácido nucleico de SDF-1. Los vectores de amplicón de VHS también pueden ser útiles en diversos procedimientos de la invención. Normalmente, los vectores de amplicón de VHS tienen aproximadamente 15 kb de longitud, y poseen un origen viral de replicación y secuencias de encapsidación.

También podrían usarse retrovirus, tales como retrovirus y lentivirus tipo C, en la invención. Por ejemplo, los vectores retrovirales pueden basarse en virus de la leucemia murina (VLM). Véase, por ejemplo, Hu y Pathak,



Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 y Fong y col., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17:1-60, 2000. Los vectores basados en el VLM pueden contener hasta 8 kb de ADN heterólogo (terapéutico) en lugar de los genes virales. El ADN heterólogo puede incluir un promotor específico de tejido y un ácido nucleico de SDF-1. En procedimientos de administración a tejido isquémico, también puede codificar un ligando para un receptor específico de tejido.

5 Vectores retrovirales adicionales que podrían usarse son vectores basados en lentivirus defectuosos en la replicación, que incluyen vectores basados en inmunodeficiencia humana (VIH). Véase, por ejemplo, Vigna y Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 y Miyoshi y col., J. Virol. 72:8150-8157, 1998. Los vectores lentivirales son ventajosos porque pueden infectar tanto células que se dividen activamente como que no se dividen. También son altamente eficaces en la transducción de células epiteliales humanas.

10 Los vectores lentivirales para su uso en la invención pueden derivarse de lentivirus humanos y no humanos (incluyendo VIS). Ejemplos de vectores lentivirales incluyen secuencias de ácidos nucleicos requeridas para la propagación de vectores, además de un promotor específico de tejido operativamente ligado a un gen SDF-1. Estos primeros pueden incluir los LTR virales, un primer sitio de unión, un tracto de polipurina, sitios att y un sitio de encapsidación.

15 Un vector lentiviral puede encapsidarse en cualquier cápside lentiviral adecuada. La sustitución de una proteína de partícula con otra de un virus diferente se denomina "pseudotipado". La cápside del vector puede contener proteínas de la envuelta vírica de otros virus, que incluyen virus de la leucemia murina (VLM) o virus de la estomatitis vesicular (VEV). El uso de la proteína G de VEV da un alto título de vector y produce mayor estabilidad de las partículas de virus de vector.

20 Los vectores basados en alfavirus, tales como aquellos preparados a partir del virus del bosque Semliki (VBS) y virus de Sindbis (SIN), podrían también usarse en la invención. El uso de alfavirus se describe en Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 y Perri y col., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000. Los vectores de alfavirus normalmente se construyen en una forma conocida como un replicón. Un replicón puede contener (1) elementos genéticos de alfavirus requeridos para la replicación de ARN, y (2) un ácido nucleico heterólogo tal como uno que codifica un ácido nucleico de SDF-1. Dentro de un replicón de alfavirus, el ácido nucleico heterólogo puede estar operativamente ligado a un promotor o potenciador específico de tejido (por ejemplo, miocardio).

25 Los vectores de alfavirus defectuosos en la replicación recombinantes son ventajosos debido a que son capaces de alta expresión génica (terapéutica) heteróloga de alto nivel, y pueden infectar una amplia gama de células diana. Los replicones de alfavirus pueden ser elegidos como diana para tipos específicos de células mostrando sobre su superficie de virión un ligando heterólogo funcional o dominio de unión que permitiría la unión selectiva a células diana que expresan un componente de unión relacionado. Los replicones de alfavirus pueden establecer latencia y, por tanto, expresión de ácidos nucleicos heterólogos a largo plazo en una célula diana. Los replicones también pueden presentar expresión de ácidos nucleicos heterólogos transitoria en la célula diana.

30 En muchos de los vectores virales compatibles con los procedimientos de la invención, más de un promotor puede incluirse en el vector para permitir que más de un gen heterólogo se exprese por el vector. Además, el vector puede comprender una secuencia que codifica un péptido señal u otro resto que facilita la secreción de un producto génico de SDF-1 de la célula diana.

35 Para combinar propiedades ventajosas de dos sistemas de vector viral, pueden usarse vectores virales híbridos para administrar un ácido nucleico de SDF-1 a un tejido diana. Técnicas convencionales para la construcción de vectores híbridos son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales técnicas pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, y col., en Molecular Cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. o cualquier número de manuales de laboratorio que tratan la tecnología de ADN recombinante. Pueden usarse genomas de AAV bicatenario en cápsides adenovirales que contienen una combinación de AAV y ITR adenovirales para transducir células. En otra variación, un vector AAV puede ponerse en un vector adenoviral "cobarde", "dependiente de colaborador" o de "alta capacidad". Los vectores híbridos de adenovirus/AAV se tratan en Lieber y col., J. Virol. 73:9314-9324, 1999. Los vectores híbridos de retrovirus/adenovirus se tratan en Zheng y col., Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000. Los genomas retrovirales contenidos dentro de un adenovirus pueden integrarse dentro del genoma de la célula diana y efectuar la expresión génica de SDF-1 estable.

40 Se contemplan adicionalmente otros elementos de la secuencia de nucleótidos que facilitan la expresión del gen SDF-1 y la clonación del vector. Por ejemplo, la presencia de potenciadores en la dirección 5' de un promotor o terminadores en la dirección 3' de la región codificante, por ejemplo, puede facilitar la expresión.

45 Según otro aspecto de la presente invención, un promotor específico de tejido puede fusionarse con un gen SDF-1. Fusionando tal promotor específico de tejido dentro de la construcción adenoviral, la expresión transgénica se limita a un tejido particular. La eficacia de la expresión génica y el grado de especificidad proporcionados por promotores específicos de tejido pueden determinarse usando el sistema adenoviral recombinante de la presente invención.

50 A modo de ejemplo, el uso de promotores específicos de tejido, tales como secuencias de control de la transcripción

específicas de tejido de la cadena ligera 2 de miosina ventricular izquierda (MLC<sub>2v</sub>) o cadena pesada de miosina (MHC), dirigidos a cardiomiocitos solos (es decir, sin expresión concomitante en células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos dentro del corazón), cuando administran el gen SDF-1 *in vivo* proporciona la expresión adecuada de la proteína SDF-1 para el tratamiento terapéutico. El limitar la expresión a los cardiomiocitos también

5 tiene ventajas con respecto a la utilidad de la transferencia génica para el tratamiento de CHF. Además, los cardiomiocitos proporcionarían probablemente la expresión transgénica más larga ya que las células no experimentarían reposición rápida; por tanto, la expresión no disminuiría por la división y muerte celular como se produciría con células endoteliales. Los promotores específicos de endotelio ya están disponibles para este fin (Lee y col., J. Biol. Chem., 265:10446-10450, 1990).

10 Además de procedimientos basados en vectores virales, también pueden usarse procedimientos no virales para introducir un ácido nucleico de SDF-1 en una célula diana. Una revisión de procedimientos no virales de administración génica se proporciona en Nishikawa y Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001. Un ejemplo de un procedimiento de administración de genes no virales según la invención emplea ADN de plásmido para introducir

15 un ácido nucleico de SDF-1 en una célula. Los procedimientos de administración de genes basados en plásmidos son generalmente conocidos en la técnica.

Pueden diseñarse moléculas de transferencia génica sintéticas para formar agregados multimoleculares con ADN de plásmido. Estos agregados pueden diseñarse para unirse a una célula diana. Pueden usarse anfilios catiónicos, que incluyen lipopoliaminas y lípidos catiónicos, para proporcionar transferencia de ácido nucleico de SDF-1 independiente de receptor en células diana (por ejemplo, cardiomiocitos). Además, los liposomas catiónicos o lípidos catiónicos preformados pueden mezclarse con ADN de plásmido para generar complejos de transfección de células. Procedimientos que implican formulaciones de lípidos catiónicos se revisan en Felgner y col., Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995 y Lasic y Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996. Para la administración génica, el

20 ADN también puede acoplarse a un péptido catiónico anfipático (Fominaya y col., J. Gene Med. 2:455-464, 2000).

Pueden usarse procedimientos que implican tanto componentes basados en virales como no virales según la invención. Por ejemplo, un plásmido basado en el virus de Epstein Barr (VEB) para la administración génica terapéutica se describe en Cui y col., Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Adicionalmente, un procedimiento que implica un ADN/ligando/auxiliar policatiónico acoplado a un adenovirus se describe en Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994.

30

Adicionalmente, el ácido nucleico de SDF-1 puede introducirse en la célula diana transfectando las células diana usando técnicas de electroporación. Las técnicas de electroporación son muy conocidas y pueden usarse para facilitar la transfección de células usando ADN de plásmido.

35

Los vectores que codifican la expresión de SDF-1 pueden administrarse a la célula diana en forma de una preparación inyectable que contiene vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, según sea necesario. Otros vehículos farmacéuticos, formulación y dosificaciones también pueden usarse según la presente invención.

40

Si la célula diana comprende una célula apoptósica, una célula de tejido isquémico o alrededor de la periferia del tejido isquémico, el vector puede administrarse por inyección directa, por ejemplo, usando una jeringa de tuberculina bajo orientación fluoroscópica, en una cantidad suficiente para que la proteína SDF-1 se exprese a un grado que permite terapia altamente eficaz. El inyectar el vector directamente a, en o alrededor de la célula apoptósica o la periferia del tejido isquémico es posible para dirigir la transfección de vector más eficazmente, y para minimizar la pérdida de los vectores recombinantes.

45

Este tipo de inyección permite la transfección local de un número deseado de células, especialmente en o alrededor del tejido isquémico, minimizando así la eficacia terapéutica de la transferencia génica, y minimizando la posibilidad de una respuesta inflamatoria a proteínas virales. Opcionalmente, el vector puede administrarse al tejido isquémico uniendo un resto dirigido a célula específica de tejido al vector e introduciendo sistémicamente (por ejemplo, infusión intravenosa) el vector dirigido a célula específica en el sujeto. Tras la introducción en el sujeto, la expresión dirigida específica de tejido se localizará en el tejido elegido como diana y facilitará la expresión localizada de SDF-1 del tejido elegido como diana.

50

Si la célula diana es una célula cultivada que se trasplanta después en tejido isquémico, los vectores pueden administrarse por inyección directa en el medio de cultivo. Un ácido nucleico de SDF-1 transfectado en células puede ligarse operativamente a una secuencia reguladora.

60

Las células diana transfectadas pueden entonces trasplantarse a un sujeto o al tejido isquémico por técnicas de trasplante muy conocidas, tales como por inyección directa. Transfectando primero las células diana *in vitro* y trasplantando luego las células diana transfectadas al tejido isquémico, la posibilidad de respuesta inflamatoria en el tejido isquémico se minimiza en comparación con la inyección directa del vector en el tejido isquémico. Opcionalmente, las células transfectadas pueden administrarse al tejido isquémico uniendo un resto dirigido a célula específica de tejido a las células transfectadas e introduciendo las células sistémicamente (por ejemplo, infusión

65

intravenosa) en el sujeto. Tras la introducción en el sujeto, las células dirigidas específicas de tejido se localizarán en el tejido elegido como diana y facilitarán la expresión localizada de SDF-1 del tejido elegido como diana.

5 SDF-1 puede expresarse durante cualquier longitud de tiempo adecuada dentro de la célula diana, que incluye expresión transitoria y expresión a largo plazo estable. En un aspecto de la invención, el ácido nucleico de SDF-1 se expresará en cantidades terapéuticas durante una longitud de tiempo definida eficaz para mitigar la apoptosis de las células apoptósicas.

10 Una cantidad terapéutica es una cantidad, que puede producir un resultado médicamente deseable, a animal o ser humano tratado. Como es muy conocido en las artes médicas, la dosificación para un animal o ser humano cualquiera depende de muchos factores, que incluyen el tamaño del sujeto, área superficial del cuerpo, edad, la composición particular que va a administrarse, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Dosificaciones específicas de proteínas, ácidos nucleicos o moléculas pequeñas puede determinarse fácilmente por un experto en la materia usando los procedimientos experimentales descritos más adelante.

15 La expresión de SDF-1 a largo plazo es ventajosa debido a que permite aumentar la concentración de citoblastos en el tejido isquémico. La regulación por incremento crónica en la expresión de proteínas SDF-1 produce recirculación a largo plazo de citoblastos en el tejido isquémico de la sangre periférica sin la necesidad de movilización de citoblastos.

20 La invención puede usarse en un procedimiento para tratar trastornos isquémicos en un sujeto administrando proteína-3 quimiotáctica de monocitos (MCP-3) al tejido isquémico en cantidad eficaz para reclutar citoblastos y/o células progenitoras al tejido isquémico conjuntamente con la administración de SDF-1 a tejido isquémico descrito anteriormente para inhibir la apoptosis de células del tejido.

25 La MCP-3 puede administrarse en o alrededor del tejido isquémico de un sujeto mamífero para inducir la movilización de citoblastos y/o células progenitoras del sujeto al tejido para aplicaciones terapéuticas y/o terapia celular. Los citoblastos y/o células progenitoras, que se inducen, pueden diferenciarse en células especializadas y/o parcialmente especializadas que pueden repoblar (es decir, injertar), revascularizar y restaurar parcialmente o completamente la función normal del tejido que está tratándose.

30 Los citoblastos incluyen células autólogas, singénicas o alogénas no especializadas que pueden auto-renovarse indefinidamente y que pueden diferenciarse en células más maduras con funciones especializadas. En seres humanos, los citoblastos se han identificado en la masa celular interna del embrión temprano, en algunos tejidos del feto, el cordón umbilical y placenta, y en varios órganos adultos. En algunos órganos adultos, los citoblastos pueden dar lugar a más de un tipo de célula especializada dentro de ese órgano. Los citoblastos, que pueden diferenciarse en tipos de células más allá de aquellos en los que normalmente residen, presentan plasticidad. Si se encuentra que un citoblasto da lugar a múltiples tipos de tejido asociados a diferentes órganos, se denomina multipotente o pluripotente.

35 Un ejemplo de un tipo particular de citoblasto que puede inducirse por MCP-3 es un citoblasto mesenquimatoso (MSC). Los MSC incluyen las células blásticas o embrionarias pluripotentes formativas que se diferencian en los tipos específicos de tejidos conjuntivos (es decir, el tejido del cuerpo que soporta elementos especializados, particularmente que incluye tejidos conjuntivos adiposos, óseos, cartilagosos, elásticos, musculares y fibrosos dependiendo de diversas influencias medioambientales *in vivo* o *in vitro*. Estas células pueden estar presentes en médula ósea, sangre, dermis y periostio y pueden aislarse y purificarse usando diversos procedimientos muy conocidos, tales como aquellos procedimientos desvelados en la patente de EE.UU. nº 5.197.985 a Caplan y Haynesworth, además de otras numerosas referencias de la bibliografía.

40 Un ejemplo de una célula progenitora que puede ser potencialmente inducida por MCP-3 según la presente es una célula progenitora adulta multipotente (MAPC) (por ejemplo, MAPC derivada de esquelética). Las MAPS comprenden células progenitoras adultas o citoblastos que pueden diferenciarse en tipos de células más allá de aquellos de los tejidos en los que normalmente residen (es decir, presentan plasticidad). Ejemplos de MAPC pueden incluir MSC adultas y células progenitoras hematopoyéticas. Fuentes de MAPC pueden incluir médula ósea, sangre, tejido ocular, dermis, hígado y músculo esquelético. A modo de ejemplo, las MAPC que comprenden células progenitoras hematopoyéticas pueden aislarse y purificarse usando los procedimientos desvelados en la patente de EE.UU. nº 5.061.620, además de otras numerosas fuentes de la bibliografía.

45 Los citoblastos, tales como MSC, MAPC y/u otros citoblastos, pueden expresar naturalmente diversos receptores de quimiocinas CXC y CC, que incluyen CXCR5, CCR-1, Cmkbr1L2, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CCR8, CCR9, CMKOR1 y CX3CR1. Se encontró que MCP-3 puede servir de quimioatrayente para MSC y/o MAPC en un sujeto mamífero.

50 MCP-3 pueden tener secuencia amino sustancialmente similares a MCP-3 de mamífero nativa. Por ejemplo, MCP-3 puede tener secuencias de amino sustancialmente similares a, respectivamente, SEC ID N°: 6, que es

sustancialmente similar a las secuencias nucleicas de, respectivamente, nº de acceso de GenBank CAA50407.

MCP-3 también puede ser una variante de MCP-3 nativa, tal como un fragmento, análogo y derivado de MCP-3 de mamífero. Tales variantes pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido codificado por una variante alélica que se produce naturalmente de un gen MCP-3 nativo (es decir, un ácido nucleico que se produce naturalmente que codifica una MCP-3 de mamífero que se produce naturalmente), un polipéptido codificado por una forma de corte y empalme alternativa de un gen MCP-3 nativo, un polipéptido codificado por un homólogo u ortólogo de un gen MCP-3 nativo y un polipéptido codificado por una variante que no se produce naturalmente de un gen MCP-3 nativo.

Las variantes de MCP-3 pueden tener una secuencia de péptidos (o aminoácidos) que se diferencia de MCP-3 nativa en uno o más aminoácidos. La secuencia de péptidos de tales variantes puede caracterizar una delección, adición o sustitución de uno o más aminoácidos de la proteína MCP-3. Las inserciones de aminoácidos son preferentemente de aproximadamente 1 a 4 aminoácidos contiguos, y las delecciones son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos contiguos. Las proteínas MCP-3 de variante mantienen sustancialmente una actividad funcional de la proteína MCP-3 nativa. Ejemplos de variantes de la proteína MCP-3 pueden prepararse expresando moléculas de ácidos nucleicos que caracterizan cambios silenciosos o conservativos.

Los fragmentos de proteínas MCP-3 pueden corresponderse con uno o más motivos y/o dominios particulares o con tamaños arbitrarios. Pueden obtenerse porciones de peptidilo aisladas de proteínas MCP-3 seleccionando péptidos recombinantemente producidos a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica tales péptidos. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica tales como química de f-Moc o t-Boc en fase sólida de Merrifield convencional. Por ejemplo, una proteína MCP-3 puede dividirse arbitrariamente en fragmentos de longitud deseada sin solapamiento de los fragmentos, o preferentemente dividirse en fragmentos que se solapan de una longitud deseada. Los fragmentos pueden producirse recombinantemente y probarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que pueden servir de agonistas de una proteína MCP-3 nativa.

Las variantes de la proteína MCP-3 también pueden incluir formas recombinantes de las proteínas. Los polipéptidos recombinantes, además de una proteína MCP-3, están codificados por un ácido nucleico que puede tener al menos el 85 % de identidad de secuencias con la secuencia de ácidos nucleicos de un gen que codifica una proteína de mamífero.

Las variantes de la proteína MCP-3 pueden incluir formas agonistas de la proteína que expresan constitutivamente las actividades funcionales de una proteína MCP-3 nativa. Otras variantes de proteína pueden incluir aquellas que son resistentes a escisión proteolítica como, por ejemplo, debido a mutaciones, que alteran las secuencias diana de proteasa. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido produce una variante que tiene una o más actividades funcionales de una proteína MCP-3 nativa, puede determinarse fácilmente probando la variante para una actividad funcional de la proteína MCP-3 nativa.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la proteína MCP-3 pueden ser un ácido nucleico nativo o no nativo y estar en forma de ARN o en forma de ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico y ADN sintético). El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante (sentido) o la hebra no codificante (antisentido).

Por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican MCP-3 pueden tener secuencias sustancialmente similares a, respectivamente, SEC ID N°: 7. SEC ID N°: 7 es sustancialmente similar a las secuencias nucleicas de nº de acceso de GenBank NM006273.

Otras moléculas de ácidos nucleicos que codifican la proteína MCP-3 pueden ser variantes de un gen de la proteína MCP-3 nativa, tales como aquellas que codifican fragmentos, análogos y derivados de una proteína MCP-3 nativa. Tales variantes pueden ser, por ejemplo, una variante alélica que se produce naturalmente de un gen MCP-3 nativo, un homólogo de un gen MCP-3 nativo, o una variante que no se produce naturalmente de un gen MCP-3 nativo. Estas variantes tienen una secuencia de nucleótidos que se diferencia de un gen MCP-3 nativo en una o más bases. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de tales variantes puede caracterizar una delección, adición o sustitución de uno o más nucleótidos de un gen MCP-3 nativo. Las inserciones de ácidos nucleicos son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 nucleótidos contiguos, y las delecciones son preferentemente de aproximadamente 1 a 10 nucleótidos contiguos.

En otras aplicaciones, proteínas MCP-3 nativas de variante que muestran cambios sustanciales en la estructura pueden generarse haciendo sustituciones de nucleótidos que producen menos cambios conservativos en el polipéptido codificado. Ejemplos de tales sustituciones de nucleótidos son aquellas que producen cambios en (a) la estructura del esqueleto del polipéptido; (b) la carga o hidrofobia del polipéptido; o (c) el volumen de una cadena lateral de aminoácido. Las sustituciones de nucleótidos que generalmente se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de proteínas son aquellas que producen cambios no conservativos en codones. Ejemplos de cambios de codones que es probable que produzcan cambios importantes en la estructura de proteína son aquellos que producen la sustitución de (a) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serina o treonina, con (o por) un

residuo hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina; (b) una cisteína o prolina con (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, con (o por) un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamina o asparagina; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, con (o por) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Variantes alélicas que se producen naturalmente de un gen MCP-3 nativo son ácidos nucleicos aislados de tejido de mamífero que tienen al menos el 75 % de identidad de secuencias con un gen MCP-3 nativo, y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con una proteína MCP-3 nativa. Homólogos u ortólogos de un gen MCP-3 nativo son ácidos nucleicos aislados de otras especies que tienen al menos el 75 % de identidad de secuencias con el gen nativo, y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con una proteína MCP-3 nativa. Puede buscarse en bases de datos de ácidos nucleicos públicas y/o patentadas para identificar otras moléculas de ácidos nucleicos que tienen un alto porcentaje (por ejemplo, 70 % o más) de identidad de secuencias con un gen MCP-3 nativo.

Variantes del gen MCP-3 que no se producen naturalmente son ácidos nucleicos que no se producen en la naturaleza (por ejemplo, se preparan por la mano del hombre), tienen al menos el 75 % de identidad de secuencias con un gen MCP-3 nativo y codifican polipéptidos que tienen similitud estructural con una proteína MCP-3 nativa. Ejemplos de variantes del gen MCP-3 que no se producen naturalmente son aquellas que codifican un fragmento de una proteína MCP-3 nativa, aquellos que se hibridan con un gen MCP-3 nativo o un complemento de un gen MCP-3 nativo bajo condiciones rigurosas, aquellos que comparten al menos el 65 % de identidad de secuencias con un gen MCP-3 nativo o un complemento de un gen MCP-3 nativo, y aquellos que codifican una proteína de fusión de MCP-3.

Ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una proteína MCP-3 nativa son aquellos que codifican residuos de aminoácidos de una proteína MCP-3 nativa. Oligonucleótidos más cortos que codifican o se hibridan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una proteína MCP-3 nativa pueden usarse como sondas, cebadores o moléculas antisentido. También pueden usarse polinucleótidos más largos que codifican o se hibridan con ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una proteína MCP-3 nativa. Pueden prepararse ácidos nucleicos que codifican fragmentos de una MCP-3 por digestión enzimática (por ejemplo, usando una enzima de restricción) o degradación química del gen MCP-3 nativo de longitud completa o variantes del mismo.

También puede usarse ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con uno de los ácidos nucleicos anteriores. Por ejemplo, tales ácidos nucleicos pueden ser aquellos que se hibridan con uno de los ácidos nucleicos anteriores bajo condiciones de baja rigurosidad, condiciones de rigurosidad reducida o condiciones de alta rigurosidad.

También pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión de MCP-3. Tales ácidos nucleicos pueden prepararse preparando una construcción (por ejemplo, un vector de expresión) que expresa una proteína de fusión de MCP-3 cuando se introduce en una célula diana adecuada. Por ejemplo, puede prepararse una construcción tal ligando un primer polinucleótido que codifica una proteína MCP-3 fusionada en marco con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de forma que la expresión de la construcción en un sistema de expresión adecuado proporcione una proteína de fusión.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. Tales oligonucleótidos pueden modificarse en el resto de base, resto de azúcar o esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. Los oligonucleótidos pueden incluir adicionalmente otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para elegir como receptores diana de células diana *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular, escisión desencadenada por la hibridación. Para este fin, los oligonucleótidos pueden conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación desencadenada por la hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenada por la hibridación, etc.

La MCP-3 puede proporcionarse en o alrededor del tejido isquémico del sujeto mamífero que va a tratarse administrando la MCP-3 al tejido puro o en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender que la MCP-3 pueda administrarse por diversos procedimientos dependiendo del tejido que va a tratarse. En un aspecto, la composición farmacéutica puede administrarse mediante inyección.

Cuando se administra la MCP-3 parenteralmente, la MCP-3 se formulará generalmente en una forma inyectable de dosificación unitaria (por ejemplo, disolución, suspensión y/o emulsión). Ejemplos de formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. Vehículos

no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, también pueden usarse como sistemas de disolventes para composiciones de compuestos.

5 Adicionalmente, pueden añadirse diversos aditivos que potencian la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, que incluyen conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos puede garantizarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, se deseará incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con los compuestos.

10 Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando la MCP-3 en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros componentes, según se desee.

15 La MCP-3 también puede proporcionarse en cápsulas farmacéuticas de “liberación lenta” o composiciones o preparaciones “de liberación sostenida”, como se ha descrito anteriormente. Las formulaciones de liberación lenta normalmente se implantan en la vecindad del sitio de tejido isquémico, por ejemplo, en o alrededor del tejido isquémico.

20 Alternativamente, la MCP-3 puede proporcionarse en o alrededor del tejido isquémico del sujeto mamífero que va a tratarse introduciendo un agente en células diana que produce, aumenta, y/o regula por incremento la expresión de la MCP-3 de las células diana. Las células diana pueden incluir células dentro de o alrededor de la periferia del tejido isquémico o células *ex vivo* que son biocompatibles con el tejido isquémico que está tratándose. Las células biocompatibles pueden incluir células autólogas que se recogen del sujeto que está tratándose y/o células alogénicas o singénicas biocompatibles, tales como citoblastos autólogos, alogénicos o singénicos (por ejemplo, citoblastos mesenquimatosos), células progenitoras (por ejemplo, células progenitoras adultas multipotentes) y/u otras células que se diferencian adicionalmente y son biocompatibles con el tejido isquémico que está tratándose. Si las células diana son células que se trasplantan en el tejido que va a tratarse, la célula diana puede ser el mismo tipo de célula que las células del tejido que está tratándose o un tipo de célula diferente. Opcionalmente, la célula diana puede comprender las mismas células que se modifican genéticamente para expresar SDF-1.

25 A modo de ejemplo, si el tejido que va a tratarse es miocardio infartado, las células que se trasplantan en el tejido que va a tratarse pueden incluir células de corazón cultivadas, mioblastos esqueléticos, fibroblastos, células de músculo liso y células derivadas de médula ósea. Estas células pueden recogerse del sujeto que va a tratarse (es decir, células autólogas) y cultivarse antes del trasplante. Se prefieren células autólogas a células alogénicas y singénicas con el fin de aumentar la biocompatibilidad de las células tras el trasplante y minimizar la probabilidad de rechazo.

30 Las células cultivadas pueden trasplantarse en el tejido isquémico, por ejemplo, inyectando una suspensión de las células cultivadas usando una jeringa de tuberculina en el tejido isquémico.

35 El agente que se introduce en las células diana puede comprender ácidos nucleicos naturales o sintéticos (por ejemplo, ácidos nucleicos de MCP-3) que se incorporan en construcciones de ácidos nucleicos recombinantes, normalmente construcciones de ADN, capaces de introducción en y replicación en la célula. Una construcción tal incluye preferentemente un sistema de replicación y secuencias capaces de transcripción y traducción de una secuencia codificante de polipéptidos en una célula diana dada.

40 Otros agentes también pueden introducirse en las células diana para producir la expresión de los ligandos de quimiocina de las células diana. Por ejemplo, agentes que aumentan la transcripción de un gen que codifica MCP-3 aumentan la traducción de un ARNm que codifica MCP-3, y/ o aquellos que disminuyen la degradación de un ARNm que codifica MCP-3 podrían usarse para aumentar los niveles de MCP-3. El aumentar la tasa de transcripción de un gen dentro de una célula puede llevarse a cabo introduciendo un promotor exógeno en la dirección 5' del gen que codifica MCP. También pueden emplearse elementos potenciadores que facilitan la expresión de un gen heterólogo.

45 Un procedimiento de introducción del agente en una célula diana implica usar terapia génica. La terapia génica puede usarse para expresar la MCP-3 de una célula diana *in vivo* o *in vitro*.

50 Un procedimiento de terapia génica usa un vector que incluye un nucleótido que codifica una MCP-3. Los vectores pueden incluir, por ejemplo, vectores virales (tales como adenovirus ('Ad'), virus adeno-asociados (AAV) y retrovirus), liposomas y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares que pueden mediar en la administración de un polinucleótido a una célula diana.

55 Los vectores también pueden comprender otros componentes o funcionalidades que modulan adicionalmente la administración génica y/o expresión génica, o que proporcionan de otro modo propiedades beneficiosas a las células elegidas como diana, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a SDF-1.

Los vectores que codifican la expresión de la MCP-3 pueden administrarse a la célula diana en forma de una preparación inyectable que contiene vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, según sea necesario. También pueden usarse otros vehículos farmacéuticos, formulaciones y dosificaciones.

5 Si la célula diana comprende una célula del tejido que va a tratarse, el vector puede administrarse, por ejemplo, por inyección directa usando una jeringa de tuberculina bajo orientación fluoroscópica, en una cantidad suficiente para que la MCP-3 se exprese a un grado que permita terapia altamente eficaz. El inyectar el vector directamente en el tejido que va a tratarse es posible para elegir como diana el gen bastante eficazmente, y para minimizar la pérdida de los vectores recombinantes.

10 Este tipo de inyección permite la transfección local de un número deseado de células, en el tejido afectado, maximizando así la eficacia terapéutica de la transferencia génica, y minimizando la posibilidad de una respuesta inflamatoria a proteínas virales.

15 Si la célula diana es una célula cultivada que se trasplanta después en el tejido isquémico, los vectores pueden administrarse por inyección directa en el medio de cultivo. Los ácidos nucleicos de MCP-3 transfectados en células pueden ligarse operativamente a cualquier secuencia reguladora adecuada, que incluye un promotor y potenciador específico de tejido.

20 Las células diana transfectadas pueden entonces trasplantarse en tejido isquémico por técnicas de trasplante muy conocidas, tales como por inyección directa. Transfectando primero las células diana *in vitro* y trasplantando luego las células diana transfectadas en el tejido isquémico, la posibilidad de respuesta inflamatoria en el tejido isquémico se minimiza en comparación con la inyección directa del vector en el tejido isquémico.

25 La MCP-3 puede expresarse durante cualquier longitud de tiempo dentro de la célula diana, que incluye expresión transitoria y expresión a largo plazo estable. La expresión a largo plazo de la MCP-3 es ventajosa debido a que permite aumentar la concentración de citoblastos en un tiempo remoto desde la cirugía o un procedimiento que trasplanta células diana transfectadas. Adicionalmente, la regulación por incremento a largo plazo o crónica de MCP-3 permitiría múltiples intentos de aumentar la concentración de citoblastos en la sangre periférica. Además, la regulación por incremento crónica en la expresión de ligandos de quimiocina produce la recirculación a largo plazo de citoblastos en el tejido que va a tratarse de la sangre periférica sin la necesidad de agente de movilización de citoblastos.

35 La MCP-3 puede administrarse en o alrededor de la periferia del tejido isquémico antes, después o en sustancialmente el mismo tiempo que la administración de SDF-1. En otro aspecto, si SDF-1 y MCP-3 se expresan de una célula diana en el tejido isquémico a sustancialmente el mismo tiempo, la célula diana puede transfectarse con una construcción de expresión bicistrónica que expresa SDF-1 y MCP-3. Las construcciones de expresión bicistrónicas se conocen en la técnica y pueden emplearse fácilmente en el presente procedimiento terapéutico.

40 El procedimiento puede incluir una etapa de aumentar la concentración (es decir, número) de citoblastos y/o células progenitoras, tales como MSC, MAPC y/u otros citoblastos y/o células progenitoras, en la sangre periférica de una primera concentración a una segunda concentración sustancialmente superior a la primera concentración. La primera concentración de citoblastos y/o células progenitoras puede ser la concentración de citoblastos normalmente encontrada en la sangre periférica en un momento remoto desde la aparición del trastorno isquémico o lesión de tejido. La concentración de citoblastos y/o células progenitoras en la sangre periférica puede aumentarse mientras que aumenta la concentración de proteína SDF-1 y/o MCP-3 en o alrededor de la periferia del tejido isquémico. La concentración de citoblastos y/o células progenitoras en la sangre periférica puede aumentarse tanto antes como después de la administración de proteína SDF-1 y/o MCP-3 al tejido isquémico.

50 Los citoblastos y/o células progenitoras pueden proporcionarse en la sangre periférica del tejido que está tratándose inyectando directamente los citoblastos y/o células progenitoras en el tejido o tejido próximo al tejido que está tratándose usando, por ejemplo, una jeringa de tuberculina. Los citoblastos y/o células progenitoras también pueden proporcionarse en la sangre periférica por infusión venosa o arterial de los citoblastos en el sujeto mamífero que va a tratarse. Los citoblastos y/o células progenitoras infundidos pueden entonces inducirse a migrar al tejido que está tratándose por SDF-1 y/o MCP-3 proporcionado en o alrededor del tejido.

Los citoblastos y/o células progenitoras pueden inyectarse o infundirse en el sujeto mamífero después de proporcionar SDF-1 y/o MCP-3 en el tejido que está tratándose. Los citoblastos y/o células progenitoras, sin embargo, pueden administrarse antes de proporcionar SDF-1 y/o MCP-3 al tejido que está tratándose.

60 Alternativamente, los citoblastos y/o células progenitoras pueden proporcionarse en el tejido que va a tratarse administrando un agente para inducir la movilización de citoblastos, tales como MSC y/o MAPC, a la sangre periférica del sujeto. Los citoblastos y/o células progenitoras pueden movilizarse a la sangre periférica del sujeto para aumentar la concentración de citoblastos y/o células progenitoras en el sujeto periférico usando varios agentes. Por ejemplo, para aumentar el número de citoblastos en la sangre periférica de un sujeto mamífero, un agente que hace que los citoblastos pluripotentes y/o células progenitoras se movilicen de la médula ósea puede administrarse

al sujeto. Varios agentes tales son conocidos e incluyen citocinas, tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-7, IL-3, IL-12, factor de citoblastos (SCF) y ligando flt-3; quimiocinas tales como IL-8, Mip-1 $\alpha$  y Gro $\beta$ , y los agentes quimioterapéuticos de ciclofosfamida (Cy) y paclitaxel. Estos agentes se diferencian en su marco de tiempo para lograr la movilización de citoblastos, el tipo de citoblasto movilizados y la eficiencia.

El agente de movilización puede administrarse por inyección directa del agente de movilización en el sujeto. Preferentemente, el agente de movilización se administra después de que SDF-1 y/o MCP-3 se proporcionen al tejido isquémico que está tratándose. Sin embargo, el agente de movilización puede administrarse antes de que SDF-1 y/o MCP-3 se administren al tejido que está tratándose.

## **Ejemplos**

### **Ejemplo 1 (no es parte de la invención)**

#### **La expresión de SDF-1 por citoblastos mesenquimatosos produce soporte trófico de miocitos cardíacos tras el infarto de miocardio**

Se ha mostrado que el trasplante de múltiples tipos de citoblastos en el momento del infarto de miocardio mejora la perfusión ventricular izquierda y/o función en estudios preclínicos y clínicos. Aunque esta estrategia abre grandes posibilidades en la prevención y tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, una afección que afecta a más de 5 millones de estadounidenses, los mecanismos detrás de la mejora siguen sin estar claros. Una posibilidad es que los citoblastos trasplantados regeneren tejido miocárdico diferenciándose en miocitos cardíacos, células endoteliales y células de músculo liso. Otra posibilidad menos explorada es que la introducción de citoblastos en el miocardio en el momento del infarto agudo de miocardio (IAM) soporte el tejido lesionado como efectos tróficos todavía no definidos que conducen a la preservación de miocitos cardíacos y función cardíaca mejorada. Si los efectos tróficos de citoblastos demostraron ser importantes en la mejora del tejido cardíaco, entonces los presentes inventores tienen la capacidad de agravar los efectos mediante estrategias de terapia génica basadas en células. Los presentes inventores han demostrado recientemente que el factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1 o CXCL12) se expresa por el corazón inmediatamente después del IM y que el restablecimiento de la expresión de SDF-1 en un momento remoto desde el IM puede restablecer la recirculación de citoblastos a tejido cardíaco lesionado. CXCR4 es el receptor de la superficie celular para SDF-1, y se expresa en citoblastos hematopoyéticos tempranos (HSC) y células progenitoras endoteliales. Desafortunadamente, datos recientes indican que estos tipos de células no se diferencian en miocitos cardíacos. Aunque la expresión de SDF-1 produce la recirculación de HSC y células progenitoras endoteliales al miocardio lesionado, la evidencia sugiere que SDF-1 puede tener efectos de reclutamiento de no citoblastos adicionales que incluyen aumentar la supervivencia de los citoblastos. Recientemente, se ha mostrado que SDF-1 tienen beneficios de crecimiento y supervivencia en CXCR4 que expresa MSC. Las MSC normalmente expresan SDF-1; por tanto, en un intento por definir los efectos tróficos de la infusión de citoblastos MSC mediante SDF-1, los presentes inventores generaron MSC que expresan en exceso SDF-1. Los presentes inventores compararon entonces los efectos de solución salina, MSC y MSC que expresan en exceso SDF-1 sobre la supervivencia de MSC, supervivencia y regeneración de miocitos cardíacos y la función cardíaca. Los resultados de los presentes inventores demuestran una función significativa para los efectos tróficos de la recirculación de no citoblastos de SDF-1 sobre miocardio lesionado.

## **Materiales y procedimientos**

### **Ligadura de LAD:**

Todos los protocolos con animales fueron aprobados por el comité de investigación animal y todos los animales se alojaron en el animalario de AAALAC de la Fundación Clínica de Cleveland. La ligadura de la arteria descendente anterior izquierda en rata Lewis se realizó como se ha descrito previamente. Brevemente, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina intraperitoneal y se intubaron y ventilaron con aire ambiente a 75 respiraciones por minuto usando un ventilador para roedores con ciclos de presión (RSP1002, Kent Scientific Corp, Torrington, CT). Se indujo infarto de miocardio de la pared anterior por ligadura directa de la arteria descendente anterior (LAD) izquierda con la ayuda de un microscopio quirúrgico (M500, LEICA Microsystems, Bannockburn, IL).

### **Preparación y administración de células:**

Se aisló médula ósea de rata lavando los fémures con 0,6 ml de DMEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los grumos de médula ósea se picaron suavemente con una aguja de calibre 20. Las células se separaron por gradiente de densidad con Percoll. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 260 g y se lavaron con tres cambios de PBS con 100 U / ml de penicilina 100 g / ml de estreptomomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Entonces, las células lavadas se resuspendieron y se sembraron en DMEM-LG (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % de SBF y 1 % de antibiótico y antimicótico (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se incubaron a 37 °C. Las células no adherentes se eliminaron reemplazando el medio después de 3 días. Se volvieron a alimentar los cultivos cada 3-4 días. Cuando los cultivos llegaron al 70 % de confluencia, las células adherentes se desprendieron tras la incubación



con 0,05 % de tripsina y EDTA 2 mM (INVITROGEN, Carlsbad, CA) durante 5 minutos y posteriormente se sometieron a pases. En los experimentos precedentes, cultivos de MSC se agotaron en células CD45+, CD34+ por selección negativa usando 10 ul de cada uno de anticuerpos primarios de ratón anti-CD45 (BD Biosciences, San Diego, CA) y CD34 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) de rata conjugados con PE por 10<sup>6</sup> células. Las células positivas para PE se seleccionaron negativamente usando el kit de selección EasySep PE según las instrucciones del fabricante (Stem Cell technologies) para prevenir la selección no específica de monocitos y macrófagos. Células confluentes se sometieron a pases y se sembraron a diluciones 1:2 a 1:3 hasta el pase 11. Las células se ensayaron para su capacidad para inducirse en los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico, como se describe en. Las células se mantuvieron en medios de diferenciación durante 2 a 3 semanas. La diferenciación se validó por tinción de las células con aceite rojo (linaje adipogénico), azul alcian (linaje condrogénico) o fosfatasa alcalina (linaje osteogénico). Se recogieron dos millones células marcadas (fibroblastos cardíacos, MSC o MSC que expresan SDF-1) en 200 ml de PBS o 200 ml de PBS solo se infundieron mediante la vena de la cola 24 horas después del infarto de miocardio.

#### 15 **Marcado con BrdU:**

MSC *in vitro* antes del trasplante de células: MSC (pase 6) se transfectaron establemente con vector de expresión de SDF-1 de rata o pcDNA3.1 (vector de control). Dos días antes de la infusión, las células se sembraron recientemente a una relación 1:3 y se incubaron en medio completo con BrdU 10 µM (5-bromo-2-desoxiuridina) para marcar aquellas células en la fase S del ciclo celular durante el periodo de 48 h *antes* de la recogida para el trasplante de células.

#### 20 **Célula *in vivo* después del trasplante de células:**

25 En aquellos estudios en los que las células proliferantes se marcaron *in vivo*, BrdU (50 mg /kg) se inyectó ip cada 12 horas durante 14 días empezando el día *después* del trasplante de células.

#### 30 **Marcado con GFP de células:**

Los presentes inventores usaron un lentivirus pseudotipado VSV-G que expresa EGFP o SDF-1. El lentivirus se preparó usando el sistema de cuatro vectores plasmídicos por Viral Core en la Fundación Clínica de Cleveland. Los MSC se transdujeron dos veces durante 8 h con lentivirus purificado en presencia de 8 µg/ml de polibreno a una multiplicidad de infección (MOI) de 30. El medio se cambió 72 h después de la transfección y se sustituyó con medio regular que contenía zeocina (EGFP) o zeocina y blasticidina (hSDF1 y EGFP). Así, solo sobrevivieron las células que han incorporado el genoma viral, que incluyen el gen de resistencia a zeocina y/o blasticidina.

#### 35 **PCR en tiempo real:**

Se realizó RT-PCR tras el aislamiento de ARN de 6 millones de células usando un kit Rneasy Mini (Qiagen Inc., Valencia, CA) según instrucciones del fabricante. Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real usando el detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mezcla de reacción contuvo la mezcla maestra de PCR SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA), cada cebador a 300 nM y 10 ul de ADNc. Después de la activación de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) durante 10 minutos a 95 °C, los presentes inventores llevaron a cabo 45 ciclos consistiendo cada ciclo en 15 segundos a 95 °C, seguido de 1 minuto a 60 °C. La curva de disociación para cada amplificación se analizó para confirmar que no hubo productos de PCR no específicos. Secuencias de cebadores de CXCR4: Directo: ATCATCTCCAAGCTGTCACTCC (SEC ID N°: 8); Inverso: GTGATGGAGATCCACTTGTGCAC (SEC ID N°: 9)

#### 40 **Inmunotinción:**

Los animales se sacrificaron 96 h o 5 semanas tras el infarto de miocardio. Los tejidos se fijaron en formalina y se incorporaron en bloques de parafina según protocolos establecidos. La recuperación de antígeno se realizó usando tampón citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) y calor a 95 °C durante 5 minutos. El tampón se sustituyó con tampón nuevo y se volvió a calentar durante 5 minutos adicionales y luego se enfrió durante aproximadamente 20 minutos. Entonces, los portaobjetos se lavaron en agua desionizada tres veces durante 2 minutos cada uno. Entonces, los especímenes se incubaron con 1 % de suero de bloqueo normal en PBS durante 60 minutos para suprimir la unión no específica de IgG. Entonces, los portaobjetos se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo primario de ratón anti-BrdU (BD Biosciences, San Jose, CA). La concentración óptima de anticuerpo se determinó por valoración. Entonces, los portaobjetos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se incubaron durante 45 minutos con anticuerpo secundario conjugado con FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) diluido a 1,5 µg/ml en PBS con suero y se incubaron en una cámara oscura. Después de lavar ampliamente con PBS, los cubreobjetos se montaron con medio de montaje acuoso (medio de montaje de Vectashield con DAPI, H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA).

#### 65 **Microscopía de inmunofluorescencia confocal:**

Se analizó tejido usando un microscopio confocal de barrido láser espectral vertical (modelo TCS-SP; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) equipado con láser de argón azul (para DAPI), argón verde (para Alexa Fluor 488) y criptón rojo (para Alexa Fluor 594). Los datos se recogieron por excitación secuencial para minimizar el "deseñido". El procesamiento de imágenes, análisis y el grado de co-localización se evaluó usando el software Leica Confocal. El seccionamiento óptico se promedió con respecto a cuatro marcos y el tamaño de la imagen se fijó a 1024 x 1024 píxeles. No se hicieron ajustes digitales a las imágenes.

#### **Análisis de citometría de flujo:**

Se prepararon cultivos de MSC por digestión con tripsina/EDTA. Lavar las células dos veces con (1X) D-PBS frío y luego resuspender las células en 1X tampón de unión (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, pH 7,4) a una concentración de 1X10<sup>6</sup> células/ml. Transferir 100 µl (1X10<sup>5</sup>) células a un tubo de 5 ml. Las suspensiones de una sola célula se incubaron entonces con tanto 1 µl de anexina V-PE-Cy5 (abcam, Cambridge, MA) como 5 µl de yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences, San Diego, CA) o anticuerpo de control del mismo isotipo. Las células se agitaron suavemente con vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad. Entonces se añadieron 400 ml de 1X tampón de unión a cada tubo y los datos de las muestras se adquirieron por un citómetro de flujo Guava EasyCyte (Guava Technologies Hayward, CA) y se analizaron con programas de análisis de citometría de flujo FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) en el plazo de una hora.

#### **Ensayo TUNEL para la evaluación de la muerte de células apoptóticas:**

Se realizó TUNEL para la detección de núcleos apoptóticos usando la técnica de marcado de extremos cortados por dUTP conjugado con fluoresceína *in situ* mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) según el protocolo del fabricante (Roche, Indianápolis, IN). Las secciones se incubaron de nuevo con anticuerpo monoclonal de ratón (Chemicon International, Inc.) que reconoce la cadena pesada α/β de miosina ventricular cardíaca para reconocer específicamente cardiomiocitos apoptóticos. La tinción con fluorescencia se visualizó con un microscopio de barrido láser confocal. Se contó el número de células apoptóticas y se expresó como el porcentaje de la población de miocitos total.

#### **Protocolo de Western:**

Se prepararon extractos de células en 4X tampón reductor de Lamellae (Tris HCl 200 mM (pH 6,8), 8 % de SDS, 0,1 % de azul de bromofenol, 40 % de glicerol). Se prepararon geles de dodecilsulfato de sodio (SDS) según los protocolos establecidos. Se separaron proteínas en un gel al 10 % de SDS-poliacrilamida. La membrana de transferencia se colocó en 5 % de leche en 1x TBST (base Tris - 2,42 g, NaCl - 8 g, HCl 1 M - 3,8 ml con pH a 7,5, agua - 1 l, Tween 20 - 2 ml) durante una hora y luego se sondó con anticuerpo primario (1:1000 en 5 % de leche en 1x TBST) contra Akt fosforilado (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) seguido de incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:5000 en 1x TBST). Se usó quimioluminiscencia (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra) para la visualización.

#### **Anticuerpos implementados en estos estudios: Anticuerpos primarios:**

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-cadena pesada alfa/beta ventricular de miosina (Chemicon International, Inc.); anticuerpo monoclonal de ratón IgM anti-actina alfa-sarcomérica (Sigma); anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b anti-troponina I (Chemicon International, Inc.); anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-GATA 4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo policlonal de cabra IgG anti-Nkx-2.5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo policlonal de conejo IgG anti-MEF-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo monoclonal de ratón conjugado anti-actina de músculo liso alfa-Cy3 (Sigma); anticuerpo policlonal de conejo anti-factor de von Willebrand humano; anticuerpo policlonal de conejo IgG anti-Connexin 43 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo policlonal de conejo IgG anti-Connexin 45 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo policlonal de cabra IgG anti-Connexin 40 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-Akt1 (Cell Signaling Technology); anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b anti-fosfo-Akt (ser473) (Cell Signaling Technology); anticuerpo policlonal de conejo IgG anti-CXCR4 (abcam); anticuerpo monoclonal de rata anti-BrdU conjugado con FITC (abcam).

#### **Anticuerpos secundarios:**

De cabra anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes); De cabra anti-IgG de ratón-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes); de burro anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes); de burro anti-IgG de conejo-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes); anticuerpo policlonal de cabra IgG anti-fluoresceína (Molecular Probes); anticuerpo de burro anti-IgG de cabra-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes); anticuerpo de burro anti-IgG de cabra-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes); de cabra anti-IgM de ratón-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

#### **Ecocardiografía:**

Se realizó ecocardiografía 2D 2 y 5 semanas tras la ligadura de LAD y el trasplante de MSC usando un transductor de matriz lineal de 15 MHz conectado con Sequoia C256 y GE Vision 7 como se ha descrito previamente (9;11). Las

dimensiones de LV y el espesor de pared se cuantificaron por clips 2D digitalmente grabados e imágenes en modo M en una vista de eje corto del VL medio justo por debajo de los músculos papilares para permitir mediciones coherentes de la misma localización anatómica en diferentes ratas. El ultrasonógrafo se cegó al grupo de tratamiento. Las mediciones se hicieron por dos observadores cegados independientes fuera de línea usando el software de ecocardiografía ProSolv. Las mediciones en cada animal se hicieron 6 veces de 3 de los 5 clips en modo M aleatoriamente elegidos grabados por un observador cegado al brazo de tratamiento. La fracción de acortamiento se calculó a partir de las grabaciones en modo M. Fracción de acortamiento (%) =  $(LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$ , en la que LVEDD = dimensión diastólica final ventricular izquierda y LVESD = dimensión sistólica final ventricular izquierda.

### **Análisis estadísticos:**

Los datos se presentan como media + d.e. Las comparaciones entre grupos fueron por prueba de la t de Student para datos independientes (densidad vascular) o por ANOVA con corrección de Bonferroni (datos ecocardiográficos y datos de injerto funcionante de células) para múltiples comparaciones, cuando corresponda.

### **Resultados**

#### **Caracterización de MSC manipulados**

Los presentes inventores generaron MSC que se transfectaron establemente con un vector de expresión de SDF-1 accionado por un promotor del CMV (11). Los MSC usados en los estudios de los presentes inventores expresaron CXCR4 por RTPCR, transferencia Western (Fig. 1a) e inmunohistoquímica (Fig. 1b). La población de MSC establemente transfectados usados en los estudios de los presentes inventores expresaron  $5,29 \pm 1,25$  veces más ARNm de SDF-1 que los MSC transfectados con la construcción de control. La transfección con vector de expresión de SDF-1 no cambió la expresión de CXCR4 ( $0,81 \pm 0,24$ , expresión de ARNm de CXCR4 relativa en SDF-1 y MSC de control). Durante un periodo de 24 h en cultivo, los MSC que expresan en exceso SDF-1 secretaron significativamente mayores cantidades de SDF-1 en el medio que los MSC transfectados con vector de control (Fig. 1c). No se observó liberación significativa de SDF-1 en cultivos paralelos de fibroblastos cardíacos. De acuerdo con la regulación por incremento inductora de SDF-1 de la señalización de pro-supervivencia, como se observa en células progenitoras, los MSC que expresaron en exceso SDF-1 tuvieron mayor Akt fosforilado que las células de control (Fig. 1d).

#### **Efectos de SDF-1 sobre la supervivencia de MSC durante hipoxia**

Para determinar si el aumento en la fosforilación de Akt mejoró la supervivencia de MSC, los presentes inventores cultivaron control y SDF-1:MSC bajo condiciones hipóxicas (1 % de oxígeno) y cuantificaron la evidencia de lesión celular usando FACS. Los datos en la Fig. 2a demuestran que >25 % de MSC cultivadas bajo condiciones hipóxicas expresan anexina V en comparación con <10 % de MSC que expresan en exceso SDF-1. Se observaron resultados similares cuando se cuantificó el porcentaje de células positivas para yoduro de propidio, un marcador de muerte celular (datos no mostrados). Los presentes inventores evaluaron si se observarían resultados similares *in vivo* tras el infarto de miocardio. Se indujo infarto de miocardio agudo de la pared anterior por ligadura de LAD directa, veinticuatro horas después, 2 millones de fibroblastos cardíacos singénicos establemente transfectados con plásmido vacío, o 2 millones de MSC singénicos establemente transfectados con plásmido vacío o plásmido que codifica SDF-1, se infundieron por inyección en la vena de la cola. Se añadió BrdU al medio de cultivo de las células durante 2 días antes de la recogida con el fin de marcar el ADN celular. Las ratas de control recibieron una infusión intravenosa de solución salina. Setenta y dos horas y 5 semanas tras el tratamiento con fibroblastos cardíacos (CF), MSC de control o que expresan SDF-1 o infusión de solución salina, los animales se sacrificaron y los corazones se recogieron. La presencia de CF y MSC infundidos en el corazón se cuantificó como el número de células positivas para BrdU por área. Los presentes inventores encontraron que el número de MSC en el corazón aumentó significativamente por la expresión en exceso de SDF-1 (Fig. 2b) en ambos momentos de tiempo, aunque el aumento fue significativamente menos a las 5 semanas en comparación con 72 h después del tratamiento (Fig. 2c). Los presentes inventores no observaron muestras de recirculación significativa o injerto funcionante de fibroblastos cardíacos infundidos (4 días:  $3,6 \pm 2,7$  células / mm<sup>2</sup> y 5 semanas:  $2,9 \pm 2,1$  células / mm<sup>2</sup>).

#### **Efecto de la expresión en exceso de SDF-1 sobre miocardio isquémico**

La Fig. 3a (24 h) muestra que hay un aumento en la expresión de CXCR4 en la zona de infarto ya 24 h después del IAM. Estas células no son miocitos cardíacos; más bien, estas células positivas para CXCR4 son leucocitos y células endoteliales. La Fig. 3a (24-48h) demuestra que los miocitos cardíacos en la zona límite de infarto empiezan a expresar CXCR4 ya 48 h después del IAM, y que el nivel de expresión de CXCR4 en miocitos cardíacos en la zona límite de infarto aumenta 96 h después del IAM. La expresión en exceso de SDF-1 dentro de la zona de infarto mediante la infusión de MSC que expresan SDF-1 condujo a un aumento en el nivel de fosforilación de Akt en los miocitos cardíacos en el límite de infarto (datos no mostrados). Este aumento en la fosforilación de Akt estuvo acompañado de una disminución significativa en el número de núcleos de miocitos cardíacos positivos para TUNEL (Fig. 3b, c y d). La disminución en la apoptosis de miocitos cardíacos en animales que recibieron MSC que expresan

SDF-1 estuvo acompañada de un aumento significativo en el área de haces supervivientes de miocitos cardíacos dentro de la zona de infarto en comparación con controles de solución salina (Fig. 3e y f). Los miocitos cardíacos dentro de la zona de infarto en este momento de tiempo no fueron positivos para BrdU; por tanto, no se regeneraron a partir de los MSC injertados. Más bien, parecen ser miocitos cardíacos nativos que sobrevivieron al ataque isquémico.

### **Efectos de la expresión en exceso de SDF-1 sobre la remodelación y función cardíaca**

Los presentes inventores cuantificaron la función ventricular izquierda y las dimensiones 14 y 35 d tras la ligadura de LAD en animales infundidos con solución salina, fibroblastos cardíacos o MSC de control o que expresan en exceso SDF-1 1 d tras la ligadura de LAD. Los presentes inventores encontraron una atenuación estadísticamente significativa de la dilatación de LV y mejora en la fracción de acortamiento con infusión de MSC en comparación con controles de solución salina (Fig. 4a y b, respectivamente). En aquellos animales tratados con MSC de control y que expresan SDF-1, la fracción de acortamiento aumentó significativamente el 71 % y el 238 %, respectivamente, en comparación con controles de solución salina. No se observó diferencia significativa entre la infusión de solución salina y la infusión de fibroblastos cardíacos.

Se usó inmunofluorescencia usando anticuerpo para vWF para identificar y cuantificar la densidad vascular dentro de la zona de infarto tras cada tratamiento. Los presentes inventores observaron un aumento significativo en el número de capilares y pequeñas arteriolas en aquellos animales que recibieron MSC que expresan en exceso SDF-1 ( $18,2 \pm 4,0$  frente a  $7,6 \pm 2,3$  vasos/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ). Esta observación está de acuerdo con estudios previos que han demostrado que la expresión de SDF-1 local conduce a la recirculación de células progenitoras endoteliales (11; 14).

### **Regeneración frente a preservación de miocitos cardíacos**

Los datos en la Fig. 3 demuestran que los MSC y a un mayor grado los MSC que expresan SDF-1 aumentan el área y número de miocitos cardíacos dentro de la zona de infarto. Aunque los datos en las Fig. 1-3 soportan el concepto de que este aumento es debido a preservación cardíaca, los presentes inventores quisieron determinar el grado al que tanto los MSC injertados como los citoblastos cardíacos endógenos participaron en la regeneración de miocitos cardíacos. Para determinar el destino de los MSC injertados, los presentes inventores tiñeron secciones de tejido miocárdico para marcadores de miocitos cardíacos (miosina cardíaca, troponina I, GATA4 y Connexin 43), células de músculo liso ( $\alpha$ -actina de SMC y Connexin 45) y células endoteliales (vWF y Connexin 40). Los presentes inventores observaron que las células marcadas con BrdU o GFP injertadas en el miocardio fueron positivas para  $\alpha$ -actina (Fig. 5a). Las células positivas para BrdU o GFP nunca fueron positivas para vWF y raramente (<2 %) para miosina cardíaca, sugiriendo que con o sin transfección de SDF-1, los MSC parecen tanto no diferenciarse (MSC son  $\alpha$ -actina de SMC en cultivo, datos no mostrados) como diferenciarse en células de músculo liso.

Los presentes inventores también observaron un aumento significativo en las células de  $\alpha$ -actina dentro de la zona de infarto de aquellos animales que recibieron MSC que expresan SDF-1 que no fueron positivos para BrdU o GFP (Fig. 5b). Los presentes inventores tiñeron estas secciones para Connexin 40, 43 y 45 para determinar si estas células podrían acoplarse eléctricamente, y así contribuir a la función cardíaca mejorada que los presentes inventores observaron en animales que recibieron MSC que expresan SDF-1. Los presentes inventores encontraron que las células de  $\alpha$ -actina fueron positivas para Connexin 45 (Fig. 5c) y negativas para Connexin 40 y 43. Es de observar que los MSC en cultivo fueron positivos para  $\alpha$ -actina de SMC y Connexin 45 en cultivo; por tanto, no está claro si los MSC en los estudios de los presentes inventores se diferenciaron en absoluto. Estas células positivas para  $\alpha$ -actina y Connexin 45 formaron una banda a lo largo del centro de la zona de infarto en aquellos animales que recibieron MSC que expresan SDF-1, pero no MSC solos (Fig. 5d).

Para determinar si los citoblastos cardíacos condujeron a la regeneración de miocitos cardíacos, los presentes inventores repitieron sus estudios usando MSC marcados con GFP y MSC que expresan en exceso SDF-1 marcados con GFP, pero en estos estudios los presentes inventores administraron BrdU a los animales dos veces al día empezando el día después del trasplante de células. Los presentes inventores supusieron que si los citoblastos cardíacos se diferencian en miocitos cardíacos tras la ligadura de LAD y la infusión de MSC, proliferarían antes de la migración y/o diferenciación. Por tanto, si no hubo miocitos cardíacos positivos para BrdU, los presentes inventores podrían descartar una función para citoblastos cardíacos en la regeneración de miocitos cardíacos.

Los datos en la Fig. 6 muestran imágenes representativas de animales tratados con solución salina, MSC y SDF-1:MSC doblemente teñidos para BrdU y miosina cardíaca. Hay un mayor número de células positivas para BrdU en los animales tratados con SDF-1:MSC en comparación con los animales tratados con MSC y solución salina. De forma interesante, muchas de estas células positivas para BrdU en los animales tratados con SDF-1:MSC son positivas para miosina cardíaca, sugiriendo que podrían ser de origen de citoblasto cardíaco; sin embargo, estas células positivas para BrdU y miosina cardíaca no son miocitos cardíacos maduros. Estos datos están de acuerdo con la hipótesis de que los citoblastos cardíacos son movilizados por MSC solos, y a un mayor grado por MSC que expresan en exceso SDF-1, no forman miocitos cardíacos maduros, al menos 5 semanas después de la ligadura de LAD.

Para determinar si los MSC injertados proliferaron dentro del tejido miocárdico, los presentes inventores tiñeron doblemente con BrdU y GFP secciones de tejido de animales tratados con solución salina, MSC y MSC que expresan en exceso SDF-1. Los presentes inventores observaron la significativa proliferación de MSC con MSC de control y que expresan en exceso SDF-1; sin embargo, la mayoría de las células positivas para BrdU dentro de las secciones de tejido no se derivaron de los MSC infundidos (datos no mostrados).

### **Discusión**

El objetivo de las terapias basadas en citoblastos tras el IAM es (i) minimizar la muerte de células miocárdicas, (ii) optimizar la remodelación de LV y (iii) regenerar estructuras miocárdicas, que incluyen vasos sanguíneos y miocitos cardíacos. Estudios recientes han sugerido que el injerto funcionante de citoblastos en miocardio recientemente infartado puede conducir a mejorar la función cardíaca. No se entiende completamente si esto va guiado por un alijo de citoblastos cardíacos residentes que sustituyen el miocardio lesionado, citoblastos derivados de la médula ósea que se recirculan al miocardio lesionado, o células exógenas infundidas intravenosamente tras el IM. Además, la capacidad de citoblastos hematopoyéticos para transdiferenciarse en miocitos cardíacos sigue siendo una cuestión de debate continuo, sin embargo, parece poco probable dados los recientes resultados. A pesar de esta incertidumbre, es evidente que la introducción de una variedad de tipos de citoblastos de fuentes variadas puede conducir a mejorar la función cardíaca. Estos hallazgos sugieren por último lugar que parece existir un sistema de reparación cardíaco que se produce naturalmente, no obstante clínicamente ineficaz, a algún nivel basal que es posiblemente explotable.

### **Efectos de SDF-1 en tejido miocárdico después de IM**

El objetivo del estudio de los presentes inventores era determinar la posible función que tiene el SDF-1 en el proceso de reparación, y determinar si la expresión en exceso de SDF-1 en el periodo de peri-infarto conduciría a mejoras en la función ventricular izquierda.

Los presentes inventores eligieron usar MSC para administrar SDF-1 a la zona de infarto debido a que son fáciles de expandir en cultivo, pueden ser capaces de diferenciarse en miocitos cardíacos y recircularse al miocardio recientemente infartado. Los presentes inventores eligieron usar un enfoque basado en terapia celular para la administración de SDF-1 con el fin de inducir una liberación sostenida de SDF-1, similar a la que puede lograrse mediante el trasplante de citoblastos en el miocardio. Múltiples estudios recientes sugieren que algunas poblaciones de MSC expresan CXCR4; sin embargo, el grado al que los MSC que expresan CXCR4 recirculan SDF-1 *in vivo* sigue estando poco claro. Solo se ha mostrado que la inhibición de la unión SDF-1: CXCR4 bloquea parcialmente el reclutamiento de estos MSC a la médula ósea. Por tanto, los MSC producen SDF-1 (Fig. 1a) y hay poco precedente de una célula que exprese tanto receptor como ligando para recircular a ese ligando. Finalmente, la estrategia de administración de MSC empleada en estos estudios es una forma no invasiva de administrar genes al corazón recientemente lesionado. Los MSC que expresan CXCR4 responden a SDF-1. De acuerdo con los datos de los presentes inventores, se ha mostrado recientemente que SDF-1 conduce a aumentar la supervivencia y crecimiento de MSC que expresan CXCR4.

El injerto funcionante de MSC que expresan SDF-1 tuvo múltiples efectos positivos. Se ha mostrado previamente que los miocitos cardíacos y las células progenitoras de músculo expresaron CXCR4. Primero, los presentes inventores encontraron que los miocitos cardíacos empiezan naturalmente a expresar CXCR4 entre 24 y 48 h después del IAM (Fig. 3a). Esta observación sugiere que administrar SDF-1 a la superficie celular de miocitos cardíacos lesionados podría conducir a la inhibición de la apoptosis de miocitos como hizo para MSC cultivos bajo condiciones isquémicas (Fig. 2a). Los presentes inventores observaron una disminución de ~80 % en la apoptosis de miocitos cardíacos en la zona límite de infarto en aquellos animales que recibieron MSC que expresan en exceso SDF-1. Esto condujo a un aumento significativo en la supervivencia de haces de miocitos cardíacos dentro de la zona de infarto de aquellos animales que recibieron MSC que expresan SDF-1.

Segundo, la expresión en exceso de SDF-1 en la zona de infarto produjo neovascularización. Esto es probablemente debido al elevado reclutamiento de células progenitoras endoteliales, como los presentes inventores han mostrado previamente en un modelo de cardiomiopatía isquémico. No hubo evidencias patológicas macroscópicas de formación de hemangioma de la expresión sostenida de SDF-1 durante 5 semanas.

Tercero, la expresión en exceso de SDF-1 en la zona de infarto condujo inesperadamente a un marcado aumento en el número de células que expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso y Connexin 45 que parecieron formar una banda a lo largo del centro de la zona de infarto. Aunque algunas de estas células son de los MSC que se infundieron 1 día después del IM, la mayoría no. Además, la mayoría de estas células de músculo liso no se asociaron a vasos sanguíneos, como se demuestra por un vacío de expresión de vWF o Connexin en el área de los SMC. Aunque no está claro que estas células se contraigan al unísono, es intrigante observar que estos SMC expresan Connexin 45 y pueden contraerse en respuesta a estiramiento mecánico durante el ciclo cardíaco.

Cuarto, SDF-1 en el miocardio condujo al reclutamiento y proliferación de una población de células positivas para miosina cardíaca de acuerdo con citoblastos cardíacos. Aunque estas células no parecieron diferenciarse en

miocitos cardíacos maduros dentro del marco de tiempo de los estudios de los presentes inventores, la presencia de estas células puede sugerir una posibilidad de beneficio a largo plazo.

### **Vía de administración**

La vía de administración de las células en el estudio de los presentes inventores fue infusión en la vena de la cola. Otros estudios han buscado definir la vía ideal de administración de células, que incluye movilización de la médula ósea, infusión intracoronaria basada en catéter e inyección intramiocárdica. La administración intracoronaria basada en catéter de MSC en la arteria circunfleja izquierda de perros condujo a microinfarto, que puede no ser bien tolerado en pacientes con poca reserva cardíaca. Los resultados de los presentes inventores resaltan el hecho de que una simple infusión intravenosa puede ser altamente eficaz; mientras que se minimiza al mismo tiempo el riesgo mecánico para el miocardio recientemente lesionado.

### **Diferenciación de MSC**

Informes en la bibliografía sugieren que los MSC administrados durante el periodo de peri-infarto pueden diferenciarse en células que expresan miosina cardíaca. A pesar de ser capaz de aumentar significativamente la supervivencia de MSC en miocardio después de IM, los MSC tanto si se marcaron con BrdU como con GFP demuestran regeneración significativa de células con un fenotipo de miocito cardíaco. Así, aunque es posible que una pequeña población de los MSC injertados pueda haberse diferenciado a un fenotipo de miocito cardíaco, los datos de los presentes inventores están de acuerdo con la hipótesis de que los beneficios globales de la terapia con MSC no son debidos a la regeneración, sino más bien a la preservación de tejido cardíaco, y que al menos un factor que media en este efecto es SDF-1.

### **Conclusiones**

Los datos de los presentes inventores están de acuerdo con el concepto de que hay un proceso de reparación regenerativa que se produce naturalmente en miocardio infartado que puede potenciarse mediante la expresión en exceso de SDF-1 dentro del miocardio tras el infarto de miocardio. De forma interesante, los presentes inventores observaron múltiples efectos beneficiosos sobre el miocardio, aparentemente independientemente de los efectos de los propios citoblastos intravenosamente administrados. Más bien, estos efectos beneficiosos observados pueden ser debidos a efectos paracrinos locales; y podrían explicar la mejora en la función cardíaca que se observa con la introducción de preparaciones de médula ósea no fraccionada en el periodo de peri-infarto. Estos estudios demuestran que el trasplante de citoblastos puede tener efectos significativos sobre la función cardíaca independientemente de la regeneración de miocitos cardíacos, y que las estrategias diseñadas para explotar estos efectos pueden conducir a preservación significativa de la función cardíaca. Varios estudios han demostrado la utilidad y seguridad de la infusión de MSC alógenos y autólogos en poblaciones clínicas, así debería ser posible la traducción de una terapia basada en SDF-1 para la preservación de tejido miocárdico a pacientes con infarto agudo de miocardio.

### **Ejemplo 2 (no es parte de la invención)**

#### **MCP-3 es un factor de recirculación de citoblastos mesenquimatosos miocárdicos**

Los presentes inventores han demostrado previamente que hay recirculación transitoria de citoblastos hematopoyéticos (HSC) al corazón tras el infarto de miocardio (IM). La naturaleza transitoria de la recirculación de HSC es debida, al menos en parte, a la expresión transitoria de SDF-1. Mientras que los HSC parecen no transdiferenciarse en tejido cardíaco, los MSC pueden adquirir algunas propiedades de cardiomiocitos *in vitro*. Como también se ha mostrado que los MSC se recirculan al corazón poco después del IM, los presentes inventores supusieron que hay similarmente quimiocina(s) temporalmente secretada(s) por el miocardio que pueden atraer MSC. El presente estudio fue para identificar posibles factor(es) de recirculación de MSC y para probar su efecto sobre la función miocárdica si se expresan establemente dentro de la zona límite en un momento remoto desde el IM.

### **Materiales y procedimientos**

#### **Ligadura de LAD:**

El comité de investigación animal aprobó todos los protocolos con animales y todos los animales se alojaron en el animalario de AAALAC de la Fundación Clínica de Cleveland. La ligadura de la arteria descendente anterior (LAD) izquierda en una cepa endogámica de rata, rata Lewis, se realizó como se ha descrito previamente. Brevemente, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina intraperitoneal y se intubaron y ventilaron con aire ambiente a 80 respiraciones por minuto usando un ventilador para roedores con ciclos de presión (RSP1002, Kent Scientific Corp, Torrington, CT). Se logró infarto de miocardio de la pared anterior con la ayuda de un microscopio quirúrgico (M500, LEICA Microsystems, Bannockburn, IL).

**Preparación y administración de células:**

Se aisló médula ósea de rata lavando los fémures con 0,6 ml de DMEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los grumos de médula ósea se picaron suavemente con una aguja de calibre 20. Las células se separaron por gradiente de densidad con Percoll. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 260 g y se lavaron con tres cambios de PBS que contenía 100 U/ml de penicilina/100 g/ml de estreptomina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Entonces, las células lavadas se resuspendieron y se sembraron en DMEM-LG (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10 % de SBF y 1 % de antibiótico y antimicótico (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se incubaron a 37 °C. Las células no adherentes se eliminaron reemplazando el medio después de 3 días. Catorce días después (pase 4), las células se recogieron por incubación con 0,05 % de tripsina y EDTA 2 mM (INVITROGEN, Carlsbad, CA) durante 5 minutos. Los cultivos de MSC se agotaron en células CD45+ por selección negativa usando 10 µl de cada uno de anticuerpos primarios de ratón anti-CD45 de rata conjugados con PE por 10<sup>6</sup> células (proveedor: BD Biosciences; Número de cat: 554878). Las células positivas para PE se seleccionaron negativamente usando el kit de selección EasySep PE según las instrucciones del fabricante (Stem Cell technologies). Los MSC resultantes (pase 6-12) se usaron para los estudios de los presentes inventores. Tres días antes de la infusión, las células se sembraron frescas a una relación 1:3 y se incubaron en medio completo con BrdU 10 µM (5-bromo-2-desoxiuridina) para marcar aquellas células en la fase S del ciclo celular. Las células marcadas con BrdU se recogieron a 10<sup>6</sup> células / 100 ul de PBS.

El estado del fenotipo de MSC de los presentes inventores se validó tiñendo las células con rojo de aceite (linaje adipogénico), azul alcian (linaje condrogénico) o fosfatasa alcalina (linaje osteogénico) tras el cultivo bajo condiciones de diferenciación específicas. El marcado con BrdU no tuvo efecto sobre la capacidad de proliferación o diferenciación de MSC.

Se obtuvieron fibroblastos cardíacos de rata singénicos de un corazón de rata Lewis donante establemente transfectado con vector de expresión de MCP-3 de rata o pcDNA3.1 (vector de control) como se ha descrito previamente. La expresión de MCP-3 se confirmó por PCR en tiempo real. Células confluentes se sometieron a pases y se sembraron a diluciones de 1:2 a 1:3 hasta el pase 11.

**Análisis de matrices de genes:**

Los presentes inventores usaron un sistema de matrices de membrana de nailon de matrices de quimiocinas/receptores de quimiocina que contenía 67 dianas distintas (SuperArray Bioscience Corp). Se usó un microgramo de ARN total para preparar ADNc por transcripción inversa usando cebadores al azar. Se generó ARNc y se realizó hibridación usando protocolos suministrados por la empresa. Las señales quimioluminiscentes se midieron usando una cámara de CCD refrigerada con un tiempo de exposición de 20 s. Cada filtro se usó una vez. Se estudiaron tres animales individuales en cada momento de tiempo. Los momentos de tiempo estudiados fueron 1 hora y 1, 3, 7 y 10 d después de la ligadura de LAD. Los grupos de control no incluyeron cirugía y 1 hora y 7 días después la ligadura de LAD de referencia en la que se puso una sutura, pero no se apretó sobre la LAD.

**Expresión de quimiocinas miocárdicas en función del tiempo después del IAM:**

Un resultado positivo para una quimiocina específica en tejido miocárdico fue un aumento de 3 veces en la expresión de un animal experimental en comparación con todos los controles (referencia y sin cirugía) que también aumentó al menos 2 veces en los animales experimentales restantes en comparación con cada uno de los controles en ese momento de tiempo. Además, todos los otros momentos de tiempo tuvieron que aumentarse o no tuvieron cambio de los controles.

**Identificación de receptor diferencial sobre MSC en comparación con fibroblastos cardíacos:**

Debido a que hay menos variabilidad en los perfiles de expresión de células en cultivos en comparación con tejido, los presentes inventores aumentaron la rigurosidad de un resultado positivo en matrices realizadas sobre células en cultivo. En este caso, una diferencia significativa en los niveles de expresión de receptores se definió como un aumento de 10 veces en la expresión en MSC en comparación con fibroblastos cardíacos. Se estudiaron tres cultivos separados en cada tipo de células. Todos los resultados positivos se confirmaron por PCR o PCR en tiempo real.

**PCR en tiempo real:**

Se realizó RT-PCR tras el aislamiento de ARN de 6 millones de células usando un kit Rneasy Mini (Qiagen Inc., Valencia, CA) según instrucciones del fabricante. Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real usando el detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mezcla de reacción contuvo la mezcla maestra de PCR SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA), cada cebador a 300 nM y 10 ul de ADNc. Después de la activación de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) durante 10 minutos a 95 °C, los presentes inventores llevaron a cabo 45 ciclos consistiendo cada ciclo en 15 segundos a 95 °C, seguido de 1 minuto a 60 °C. La curva de disociación para cada amplificación se analizó para confirmar que no hubo productos de PCR no

específicos.

#### **Inmunotinción:**

5 Los animales se sacrificaron 72 horas o 4 semanas tras el infarto de miocardio. Los tejidos se fijaron en formalina y se incorporaron en bloques de parafina según protocolos establecidos. La recuperación de antígeno se realizó usando tampón citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) y calor a 95 °C durante 5 minutos. El tampón se sustituyó con tampón nuevo y se volvió a calentar durante 5 minutos adicionales y luego se enfrió durante aproximadamente 20 minutos. Entonces, los portaobjetos se lavaron en agua desionizada tres veces durante 2 minutos cada uno.  
10 Entonces, los especímenes se incubaron con 1 % de suero de bloqueo normal en PBS durante 60 minutos para suprimir la unión no específica de IgG. Entonces, los portaobjetos se incubaron durante 60 minutos con el anticuerpo primario de ratón anti-BrdU (BD Biosciences, San Jose, CA). La concentración óptima de anticuerpo se determinó por valoración. Entonces, los portaobjetos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se incubaron durante 45 minutos con anticuerpo secundario conjugado con FITC (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) diluido a 1,5 ug/ml en PBS con 1 % de suero y se incubaron en una cámara oscura. Después de lavar ampliamente con PBS, los cubreobjetos se montaron con medio de montaje acuoso (medio de montaje de Vectashield con DAPI, H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA).

#### **Microscopía de inmunofluorescencia confocal:**

20 Se analizó tejido usando un microscopio confocal de barrido láser espectral vertical (modelo TCS-SP; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) equipado con láser de argón azul (para DAPI), argón verde (para Alexa Fluor 488) y criptón rojo (para Alexa Fluor 594). Los datos se recogieron por excitación secuencial para minimizar el "desteñido". El procesamiento de imágenes, análisis y el grado de co-localización se evaluó usando el software Leica Confocal. El seccionamiento óptico se promedió con respecto a cuatro marcos y el tamaño de la imagen se fijó a 1024 x 1024 píxeles. No se hicieron ajustes digitales a las imágenes.

#### **Cuantificación del injerto funcionante de MSC y densidad vascular:**

30 Se cuantificaron MSC injertadas como el número de células positivas para BrdU por campo de alta potencia. El número de vasos se cuantificó como el número de vasos positivos para vWF por campo de alta potencia. Se contaron al azar al menos 8 campos de alta potencia a través de la zona de infarto por dos observadores cegados al tratamiento de los animales. Se promedió el número de células o vasos por campo de alta potencia y se normalizó por el área calibrada por campo de alta potencia.

#### **Ecocardiografía:**

40 Se realizó ecocardiografía 2D 2 y 5 semanas tras la ligadura de LAD y el trasplante de MSC usando un transductor de matriz lineal de 15 MHz conectado con Sequoia C256 y GE Vision 7 como se ha descrito previamente. Las dimensiones de LV y el espesor de pared se cuantificaron por clips 2D digitalmente grabados e imágenes en modo M en una vista de eje corto del VL central justo por debajo de los músculos papilares para permitir mediciones coherentes de la misma localización anatómica en diferentes ratas. El ultrasonógrafo se cegó al grupo de tratamiento. Las mediciones se hicieron por dos observadores cegados independientemente fuera de línea usando el software de ecocardiografía ProSolv. Las mediciones en cada animal se hicieron 6 veces de 3 de los 5 clips en modo M aleatoriamente elegidos grabados por un observador cegado al brazo de tratamiento. La fracción de acortamiento se calculó a partir de las grabaciones en modo M. Fracción de acortamiento (%) =  $(LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$ , en la que LVEDD = dimensión diastólica final ventricular izquierda y LVESD = dimensión sistólica final ventricular izquierda.

#### **Determinación del contenido de colágeno:**

50 Se prepararon secciones en parafina (5 µm) de tejido de corazón. Las secciones se tiñeron con tinción tricrómica de Masson específica de colágeno y se observaron por microscopía óptica. La estimación cuantitativa del contenido de colágeno se realizó para evaluar la acumulación de colágeno fibrilar (teñido de azul) usando el software de análisis de imágenes *Imagen-Pro Plus versión 5.1*. El tamaño de fibrosis se cuantificó por el % de área de LV que contiene colágeno tejido (azul). Debido a que los corazones tuvieron 8 semanas después del IM y la pared anterior se había adelgazado significativamente, también se cuantificó el % de perímetro de la cavidad de LV que tuvo tejido de colágeno como medida del tamaño de infarto tras la remodelación.

#### **Ensayo de migración *in vitro*:**

60 Se desprendieron MSC con tripsina-EDTA, se contaron y se resuspendieron en medio completo. Entonces, las células ( $1 \times 10^5$  en 400 µl) se sembraron en placa sobre insertos de cultivo Millicell (tamaño de poro de 8 µm; Millipore, Bedford, MA) en una placa de 24 pocillos y se dejó que se adhirieran durante la noche a 37 °C. Para iniciar la migración, DMEM que contiene 1 % de SBF (600 µl) sin o con el factor quimioatrayente MCP-3 (R&D Systems, Mineápolis, MN) se añadió a los pocillos inferiores (por triplicado). Se dejó que las células migraran a través de la



membrana del inserto durante 4 horas a 37 °C. Entonces, los insertos se lavaron con PBS y las células no migrantes restantes sobre la superficie superior del inserto se eliminaron con un hisopo de algodón. Las células migrantes se fijaron con 4 % de PFA, se tiñeron con 0,25 % de cristal violeta y se contaron usando un microscopio (10X). Se calculó el número medio de células ( $\pm$  EMM) de cuatro campos elegidos aleatoriamente para cada tratamiento.

### **Análisis estadístico:**

Los datos se presentan como media + d.e. Las comparaciones entre grupos fueron por prueba de la t de Student para datos independientes (injerto funcionante de células, contenido de colágeno) o por ANOVA con corrección de Bonferroni (datos ecocardiográficos) para múltiples comparaciones, cuando corresponda.

### **Resultados**

#### **MSC se recirculan transitoriamente al miocardio lesionado**

Se infundieron dos millones de MSC marcados con BrdU en la vena de la cola de la rata 1 ó 14 d después de la ligadura de LAD. Tres días tras la infusión de MSC, las ratas se sacrificaron y el corazón se recogió. Los MSC se cuantificaron como el número de células positivas para BrdU por  $\text{mm}^2$ . Los datos en la Fig. 7 demuestran que la preparación de MSC de los presentes inventores se recircula transitoriamente al miocardio tras el infarto agudo de miocardio. Un día después de la ligadura de LAD, se identificó un número significativo de MSC por unidad de área, considerando 14 d después de la ligadura de LAD; la infusión de MSC no produjo injerto funcionante de MSC significativo dentro de la zona de infarto.

#### **Identificación de candidatos a factores de recirculación de MSC**

La Fig. 8a representa la estrategia que implementaron los presentes inventores para identificar candidatos a factores de recirculación de MSC. Los presentes inventores usaron la matriz de quimiocinas y receptores de quimiocina para identificar dos listas distintas: la primera lista era la población de quimiocinas que se expresaron ya 1 h después de la ligadura de LAD, y cuya expresión se hizo 10 d después de la ligadura de LAD, con una expresión pico de al menos 3 veces con respecto a la de los animales operados de referencia (agrupación gris clara a la izquierda, Fig. 8a). La segunda lista representó los receptores de quimiocinas que se expresaron al menos 10 veces más en MSC en comparación con fibroblastos cardíacos (agrupación gris oscura a la derecha, Fig. 8a). La intersección de los candidatos a factores de recirculación de MSC que fueron aquellas quimiocinas que estuvieron contenidas en el círculo a la izquierda (gris claro) (transitoriamente expresadas por tejido miocárdico después de la ligadura de LAD) que se unieron a receptores que estuvieron contenidos en el círculo de la derecha (gris oscuro) (expresadas por MSC y no fibroblastos cardíacos) se presenta en el área no sombreada blanca. Como se representa en el área blanca de la Fig. 8a, solo se identificaron dos familias de quimiocinas, las proteínas quimiotácticas de monocitos (1 y 3) mediante los receptores CCR-1 y CCR-2 y MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  mediante el receptor CCR-5.

Con el fin de validar y refinar los hallazgos de los estudios de matrices de los presentes inventores, los presentes inventores realizaron PCR para evaluar adicionalmente la presencia de CCR1, CCR2 y CCR5. La Fig. 8b muestra productos de PCR de los pases 6 y 20 de MSC, CF y bazo de rata (control positivo). Estos resultados indican que la expresión de CCR1 y CCR5 es significativamente superior a CF en MSC jóvenes, y que la expresión de CCR5 por MSC se pierde con el pase.

#### **Efecto de la expresión de MCP-3 sobre la recirculación de MSC**

Basándose en la observación de que (i) la expresión de CCR1 parece ser mantenida en MSC y (ii) la capacidad de MSC para recircular con el tiempo no se pierde, los presentes inventores eligieron centrarse en MCP-3. Un criterio predefinido adicional para identificar un factor de recirculación de MSC es que los MSC no expresan la quimiocina de interés. Los presentes inventores realizaron análisis de PCR en tiempo real para la expresión de MCP-3 en MSC y CF que mostró que MSC no expresan niveles significativos de MCP-3 (datos no mostrados).

Para probar si MCP-3 puede inducir la recirculación de MSC, los presentes inventores realizaron estudios de migración celular *in vitro* para probar la capacidad de MSC para migrar en respuesta a concentraciones variables de MCP-3. Los datos en la Fig. 9 muestran que hubo un aumento en la migración de MSC de una manera dependiente de la concentración.

Para probar la capacidad de MCP-3 para reclutar MSC al miocardio remotamente lesionado, 1 mes después de la ligadura de LAD los presentes inventores trasplantaron CF de control o que expresan MCP-3 en la zona límite de infarto. Tres días después, los presentes inventores infundieron 1 millón de MSC marcados con BrdU mediante la vena de la cola, y cuantificaron el injerto funcionante de MSC 3 días después (6 días después del trasplante de CF). Los datos en la Fig. 10 (infusión única) demuestran que el restablecimiento de la expresión de MCP-3 en tejido miocárdico restaura la capacidad de MSC para recircular al tejido miocárdico. Aunque estos datos están de acuerdo con MCP-3 que tiene una función en la recirculación de MSC, el nivel de injerto funcionante de MSC fue bajo en comparación con el injerto funcionante de HSC en respuesta a la expresión de SDF-1 crónica en el mismo modelo.

Los presentes inventores razonaron que entre las causas del injerto funcionante relativamente bajo de MSC en respuesta a MCP-3 estaba el hecho de que, a diferencia de HSC, los MSC no son constitutivamente liberados por la médula ósea, algunos MSC son atrapados en el pulmón cuando se administran i.v., y que la semivida de MSC en la corriente sanguínea tras la infusión intravenosa es corta ( $< 1$  h). Los presentes inventores supusieron que las infusiones en serie de MSC en animales trasplantados con CF que expresan MCP-3 conducirían a mayor injerto funcionante de MSC. Los datos en la Figura 4 (múltiples infusiones) muestran que tras 6 infusiones intravenosas durante 12 días de 1 millón de MSC por infusión hubo significativamente más MSC injertados en el miocardio de animales que recibieron CF que expresan MCP-3 en comparación con CF de control (Figs. 10a y b).

#### 10 **Efecto del restablecimiento de la recirculación de MSC sobre la función cardíaca**

Los presentes inventores trasplantaron CF de control y que expresan MCP-3 1 mes después de la ligadura de LAD. Tras el trasplante de CF, los animales recibieron entonces 6 infusiones de 1 millón de MSC por infusión cada dos días durante 12 días o solución salina empezando 3 días después del trasplante de CF. La función cardíaca y las dimensiones se cuantificaron por ecocardiografía 1 mes después del IM antes del trasplante de CF (nivel inicial), y 1 mes después del trasplante de CF (2 meses después del IM). Los datos en la Fig. 11 a demuestran que la función cardíaca como se mide por la fracción de acortamiento aumentó significativamente en aquellos animales que recibieron infusiones de CF y MSC que expresan MCP-3. No se observó beneficio significativo cuando los animales recibieron infusiones de CF sin MSC que expresan MCP-3 (Fig. 11c). Hubo pruebas de remodelación inversa con una disminución en LVEDD 1 mes después de la infusión de MSC en animales que recibieron infusiones de CF y MSC que expresan MCP-3. Adicionalmente, se observó dilatación de la cavidad ventricular izquierda en aquellos animales que recibieron tanto CF de control a pesar de las infusiones en serie de MSC como CF que expresan MCP-3 sin infusiones en serie de MSC (Fig. 11b y d).

Los MSC injertados no se diferenciaron en miocitos cardíacos. La co-tinción para BrdU y miosina cardíaca, troponina I o Connexin 43 reveló que ninguno de los MSC injertados expresó marcadores cardíacos *in vivo* (datos no mostrados). Los presentes inventores supusieron que el injerto funcionante de MSC produjo remodelación de la zona de infarto que conduce a mejora en la función cardíaca. La tinción tricrómica de Masson reveló una diferencia significativa en el contenido de colágeno en la zona de infarto/límite de infarto entre animales que se trataron con fibroblasto cardíaco de control y que expresa MCP-3 antes de la infusión en serie de MSC (Fig. 12a y b, respectivamente). No se observaron cambios con la inyección de fibroblastos cardíacos que expresa MCP-3 sin la infusión de MSC (datos no mostrados). La inyección de CF con o sin expresión de MCP-3 y con o sin infusiones de MSC no tuvo efecto sobre la densidad vascular (datos no mostrados). El porcentaje de LV que fue positivo por tinción para colágeno disminuyó significativamente el 25,4 % ( $p < 0,02$ , Fig. 12c) en los animales que recibieron fibroblastos cardíacos que expresan MCP-3 e infusiones de MSC en serie. En estos animales, los presentes inventores observaron una disminución del 35,3 % ( $p < 0,01$ , Fig. 12d) en el perímetro de LV positivo por tinción para colágeno. Estos datos están de acuerdo con la observación de los presentes inventores de que hubo una disminución significativa en LVEDD (Fig. 11) en animales que recibieron fibroblastos cardíacos que expresan MCP-3 e infusiones de MSC en serie. Los miofibroblastos se han asociado a remodelación y función cardíaca mejorada; por tanto, los presentes inventores quisieron determinar si la remodelación de colágeno favorable se asoció a un mayor número de miofibroblastos en la zona de infarto. La tinción con un anticuerpo para vimentina y  $\alpha$ -actina de células de músculo liso demostró un mayor número de miofibroblastos en la zona límite de infarto de animales que recibieron MCP-3 e infusiones de MSC en serie en comparación con aquellos que recibieron CF de control e infusiones de MSC en serie (Fig. 12e y f). Las células vimentina+ fueron raramente positivas para BrdU, sugiriendo que la mayoría de estas células fueron reclutadas a la zona límite de infarto en respuesta a injerto funcionante de MSC, ya que la expresión de MCP-3 sola no produjo un aumento en miofibroblastos.

#### 15 **Discusión**

Los MSC están en investigación activa como fuente de citoblastos para la reparación de tejido. Los MSC son conocidos por recircularse al tejido lesionado de múltiples órganos; sin embargo, previamente no se han descrito las señales biológicas responsables de la recirculación de MSC. En este estudio, los presentes inventores identificaron MCP-3 como un factor de recirculación para MSC.

Algunos estudios han sugerido que los MSC se recirculan en respuesta a SDF-1. Además, parece que SDF-1 es importante para el crecimiento y la supervivencia de MSC, quizás debido a mecanismos autocrinos, ya que los propios MSC expresan SDF-1, pero estos efectos de SDF-1 son distintos de SDF-1 que son responsables de la recirculación de MSC. De acuerdo con la idea de que la expresión en exceso de SDF-1 en un momento remoto desde el IM no induce recirculación significativa de MSC, los presentes inventores solo encontraron reclutamiento e injerto funcionante de HSC en estudios previos que definieron SDF-1 como un factor de recirculación de citoblastos miocárdicos.

MCP-3 pertenece a la familia de las quimiocinas CC con potentes actividades quimiotácticas para varios tipos de células, que incluyen monocitos, leucocitos y células dendríticas. Estas quimiocinas ejercen sus efectos mediante la interacción con los receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR3 y CCR5. Se ha mostrado que MCP-3 se expresa en múltiples sitios de inflamación, aunque su función en la cicatrización no se ha elucidado completamente. En este

estudio, los presentes inventores muestran que MCP-3 se expresa transitoriamente por tejido miocárdico tras el infarto agudo de miocardio. Como los MSC no son conocidos por ser movilizados en respuesta a infarto de miocardio, la utilidad de la expresión de MCP-3 como un factor de recirculación de MSC para la reparación intrínseca del corazón en el momento del IM es poco clara. Sin embargo, como se muestra por el estudio de los presentes inventores que explotan los efectos de la recirculación de MSC de MCP-3, puede haber potencial terapéutico.

Los datos de los presentes inventores demuestran que tras el infarto de miocardio hay una regulación transitoria por incremento y liberación de múltiples quimiocinas que pueden afectar el tráfico de citoblastos a sitios de lesión. La identificación y re-expresión de estos factores de recirculación de citoblastos semanas a meses después del infarto de miocardio parece restablecer la capacidad de los citoblastos para transitar a e injertarse de forma funcional en la zona de infarto. Además, el inyectar el corazón con células que restablecen la recirculación de citoblastos en el tejido miocárdico podría ser una posible estrategia para aumentar el contenido de citoblastos en el corazón con el tiempo. Son necesarios estudios futuros para determinar si esta estrategia es igualmente o más eficaz que tanto las inyecciones invasivas múltiples con el tiempo como lo que puede lograrse con una única inyección de citoblastos.

El reclutamiento de MSC al corazón un mes después del infarto de miocardio no produjo la regeneración de miocitos cardíacos. Más bien, como se ha mostrado con inyecciones de MSC en el periodo de peri-infarto, el injerto funcional de MSC produce remodelación beneficiosa en la zona de infarto. La ausencia de nueva formación de miocitos cardíacos podría ser debida a la incapacidad de los MSC para diferenciarse en miocitos cardíacos o la ausencia de los mediadores críticos de la señalización de células requeridos para la diferenciación cardíaca que está presente en el tejido miocárdico más allá del periodo de peri-infarto. Se sabe que los MSC liberan múltiples factores que incluyen VEGF, SDF-1, FGF e IGF-1. Aunque más allá del alcance del presente estudio que demuestra que MCP-3 es un factor de recirculación de MSC, es interesante observar que los presentes inventores observaron función cardíaca mejorada en ausencia de vasculogénesis o angiogénesis. Así, los efectos de reclutar MSC mediante la expresión en exceso de MCP-3 parecen distintos de los observados tras la expresión en exceso de un factor de recirculación de HSC o inyección de los propios HSC. Esta observación sugiere que el mecanismo de beneficio tras el restablecimiento de la recirculación de MSC y el injerto funcional de MSC en un momento remoto desde el infarto de miocardio para trasplante de MSC en un momento remoto desde el infarto agudo de miocardio está relacionado con remodelación cardíaca mejorada, y quizás efectos tróficos sobre el miocardio superviviente; en vez de perfusión de tejido mejorada.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Penn, Marc

<120> Método de tratamiento de trastornos isquémicos

<130> PC/P16555EP

<150> PCT/US2008/068461

<151> 2008-03-27

<160> 9

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipeptido

<400> 1

ES 2 520 044 T3

1 Lys Pro Val Ser Leu Leu Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
 5 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
 10 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
 15 Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
 20 Ala Leu Asn Lys  
 25

<210> 2  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

25 Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu  
 30 Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys  
 35 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys  
 40 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys  
 45 Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln  
 50 Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys  
 55  
 60  
 65

<210> 3  
 <211> 89  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 3

ES 2 520 044 T3

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys  
 20 25 30  
 Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys  
 35 40 45  
 Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys  
 85

20 <210> 4  
 <211> 1940  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 4

gccgcacttt cactctccgt cagccgcatt gcccgctcgg cgctccggccc ccgacccgcg 60  
 ctctgcccgc cgcccgcccg cccgcccgcg ccatgaacgc caaggtcgtg gtcgtgctgg 120  
 30 tcctcgtgct gaccgcgctc tgcctcagcg acgggaagcc cgtcagcctg agctacagat 180  
 gcccatgccc attcttcgaa agccatgttg ccagagccaa cgtcaagcat ctcaaaattc 240  
 35 tcaacactcc aaactgtgcc ettcagattg tagccccgct gaagaacaac aacagacaag 300  
 tgtgcattga cccgaagcta aagtggattc aggagtacct ggagaaagct ttaaacaagt 360  
 aagcacaaca gccaaaaagg actttccgct agaccctc gaggaaaact aaaaccttgt 420  
 40 gagagatgaa agggcaaaga cgtgggggag ggggccttaa ccatgaggac caggtgtgtg 480  
 tgtgggggtg gcacattgat ctgggatcgg gcctgaggtt tgccagcatt tagaccctgc 540  
 45 atttatagca tacggtatga tattgcagct tatattcatc catgccctgt acctgtgcac 600  
 gttggaactt ttattactgg ggtttttcta agaaagaaat tgtattatca acagcatttt 660  
 caagcagtta gttccttcat gatcatcaca atcatcatca ttctcattct cattttttaa 720  
 50

55

60

65

ES 2 520 044 T3

atcaacgagt acttcaagat ctgaatttgg cttgtttgga gcatctcctc tgctcccctg 780  
 gggagtctgg gcacagtcag gtggtggctt aacagggagc tggaaaaagt gtcctttctt 840  
 5 cagacactga ggctcccga gcagcgcgcc tcccaagagg aaggcctctg tggcactcag 900  
 ataccgactg gggctgggcg ccgccactgc cttcacctcc tctttcaacc tcagtgattg - 960 -  
 gctctgtggg ctccatgtag aagccactat tactgggact gtgctcagag acccctctcc 1020  
 10 cagctattcc tactctctcc ccgactccga gagcatgctt aatcttgctt ctgcttctca 1080  
 tttctgtagc ctgatcagcg ccgcaccagc cgggaagagg gtgattgctg gggctcgtgc 1140  
 cctgcatccc tctcctccca gggcctgccc cacagctcgg gccctctgtg agatccgtct 1200  
 15 ttggcctcct ccagaatgga gctggccctc tcctggggat gtgtaatggt ccccctgctt 1260  
 acccgcaaaa gacaagtctt tacagaatca aatgcaattt taaatctgag agctcgcttt 1320  
 20 gagtgactgg gttttgtgat tgcctctgaa gcctatgcat gccatggagg cactaacaaa 1380  
 ctctgagggt tccgaaatca gaagcgaaaa aatcagtgaa taaaccatca tcttgccact 1440  
 accccctcct gaagccacag cagggtttca ggttccaatc agaactggtg gcaaggtgac 1500  
 25 atttccatgc ataatgcga tccacagaag gtcctggtgg tatttgtaac tttttgcaag 1560  
 gcattttttt atatatattt ttgtgcacat ttttttttac gtttctttag aaaacaaatg 1620  
 tatttcaaaa tatatttata gtcgaacaat tcatatattt gaagtggagc catatgaatg 1680  
 30 tcagtagttt atacttctct attatctcaa actactggca atttgtaaag aatatatat 1740  
 gatataaaa tgtgattgca gcttttcaat gttagccaca gtgtattttt tcacttgtag 1800  
 35 taaaattgta tcaaatgtga cattatatgc actagcaata aaatgcta at tgtttcatgg 1860  
 tataaacgtc ctactgtatg tgggaattta tttacctgaa ataaaattca ttagttgtta 1920  
 gtgatggagc ttaaaaaaaaa 1940

40 <210> 5  
 <211> 293  
 <212> DNA  
 <213> Rattus norvegicus  
 45 <400> 5

ccatggacgc caaggtcgtc gctgtgctgg ccctgggtgct ggccgcgctc tgcactcagtg 60  
 50 acggtaagcc agtcagcctg agctacagat gcccttgccg attctttgag agccatgtcg 120  
 ccagagccaa cgtcaaacat ctgaaaatcc tcaacactcc aaactgtgcc cttcagattg 180  
 ttgcaaggct gaaaagcaac aacagacaag tgtgcattga cccgaaatta aagtggatcc 240  
 55 aagagtacct ggacaaagcc ttaacaagat aagcacaaca gcccaaagga ctt 293

60 <210> 6  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

65

ES 2 520 044 T3

1 Met Lys Ala Ser Ala Ala Leu Leu Cys Leu Leu Leu Thr Ala Ala Ala  
 5 Phe Ser Pro Gln Gly Leu Ala Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr  
 10 Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu  
 15 Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val  
 20 Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln  
 25 Lys Trp Val Gln Asp Phe Met Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr  
 Pro Lys Leu

<210> 7  
 <211> 810  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

agcagagggg ctgagaccaa accagaaacc tccaattctc atgtggaagc ccatgccctc 60  
 35 accctccaac atgaaagcct ctgcagcact tctgtgtctg ctgctcacag cagctgcttt 120  
 cagccccag gggcttgctc agccagttgg gattaatact tcaactacct gctgctacag 180  
 atttatcaat aagaaaatcc ctaagcagag gctggagagc tacagaagga ccaccagtag 240  
 40 ccactgtccc cgggaagctg taatcttcaa gaccaaactg gacaaggaga tctgtgctga 300  
 cccacacag aagtgggtcc aggactttat gaagcacctg gacaagaaaa cccaaactcc 360  
 aaagcttga acattcatga ctgaactaaa aacaagccat gacttgagaa acaaataatt 420  
 45 tgtatacct gtcctttctc agagtgggtc tgagattatt ttaatctaat tctaaggaat 480  
 atgagcttta tgtaataatg tgaatcatgg tttttcttag tagattttaa aagttattaa 540  
 tattttaatt taatcttcca tggattttgg tgggttttga acataaagcc ttggatgtat 600  
 50 atgtcatctc agtgcgtgaa aaactgtggg atgctcctcc cttctctacc tcatgggggt 660  
 attgtataag tccttgcaag aatcagtgca aagatttgct ttaattgta agatgatgat 720  
 55 tcctatgga agcatattgt tattatataa ttacatattt gcatatgtat gactcccaaa 780  
 ttttcacata aaatagattt ttgtaaaaaa 810

<210> 8  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> DNA primer

ES 2 520 044 T3

<400> 8  
atcatctcca agctgtcaca ctcc 24

5 <210> 9  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> RNA primer

<400> 9  
gtgatggaga tccactgtg cac 23

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. SDF-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno vascular periférico isquémico en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar SDF-1 a células apoptóticas que expresan un receptor de SDF-1 del tejido isquémico del sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la apoptosis de las células apoptóticas, en el que SDF-1 se administra expresando o promoviendo la expresión de SDF-1 de una célula de tejido isquémico o una célula alrededor de la periferia del tejido isquémico.
- 10 2. SDF-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno vascular periférico isquémico según la reivindicación 1, en el que el SDF-1 se administra en una cantidad eficaz para aumentar la fosforilación de Akt de las células apoptóticas.
- 15 3. SDF-1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno vascular periférico isquémico según la reivindicación 1, expresando la célula SDF-1, siendo genéticamente modificada por al menos uno de un vector, ADN de plásmido, electroporación y nanopartículas para expresar SDF-1.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

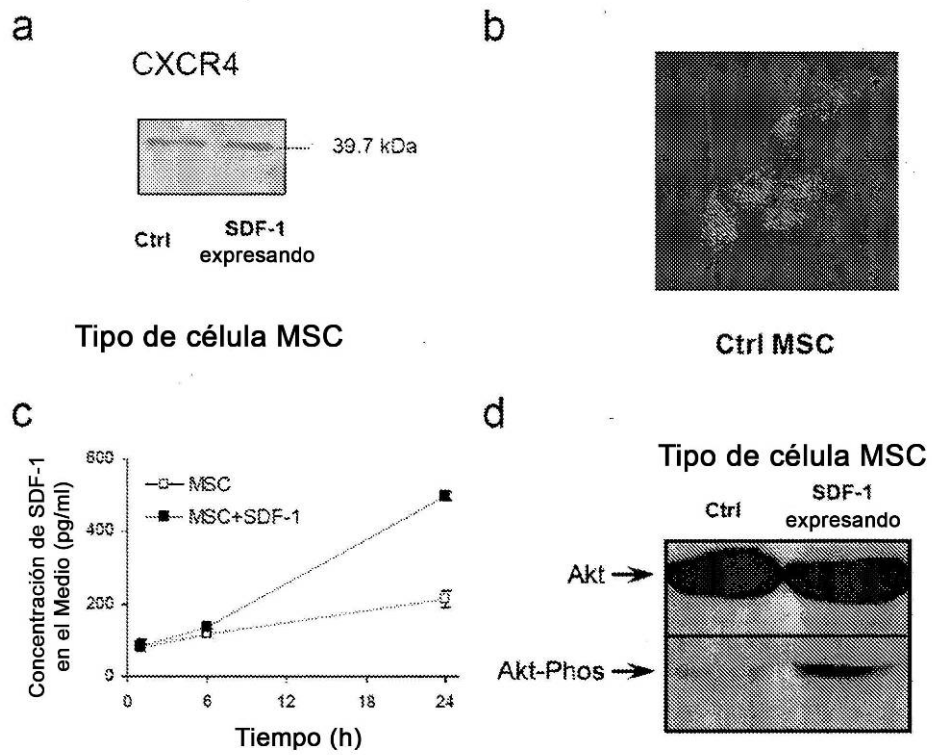


Fig. 1

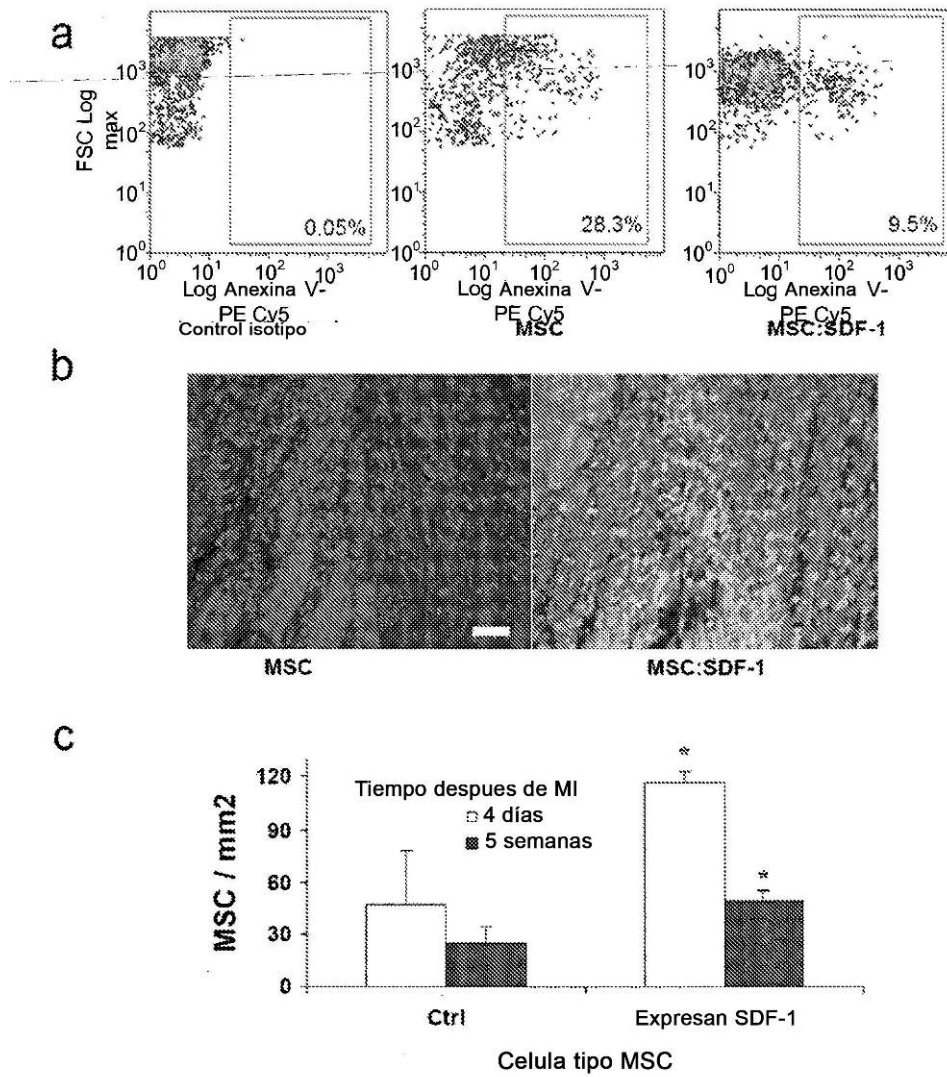


Fig. 2

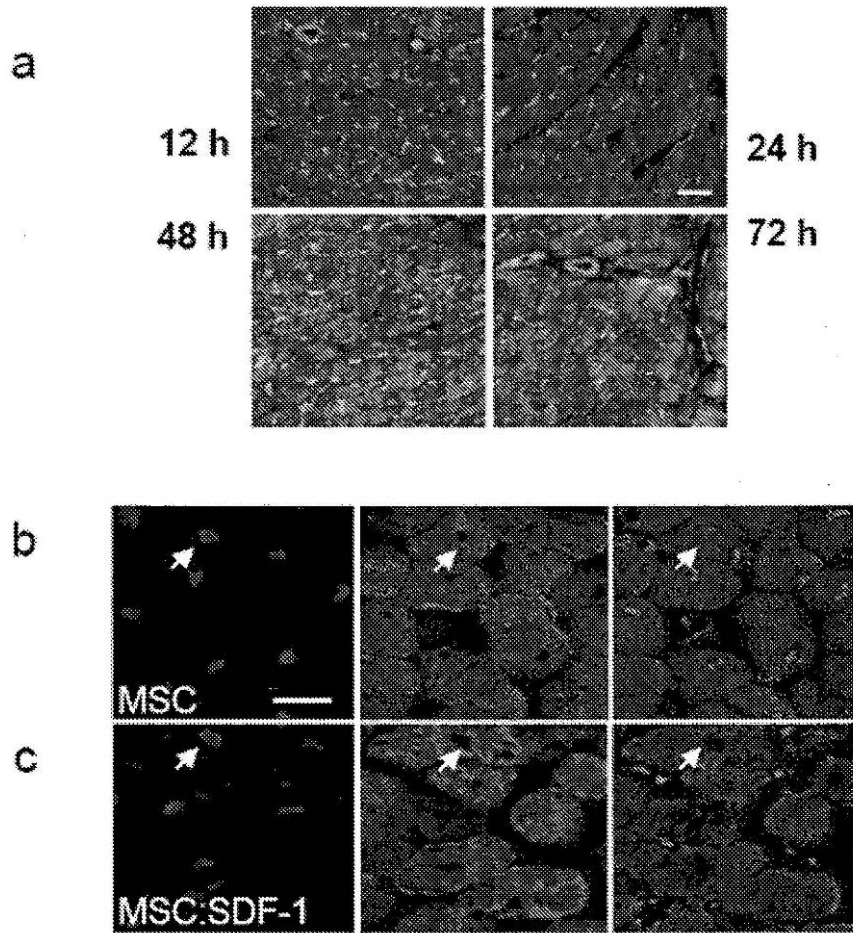


Fig. 3

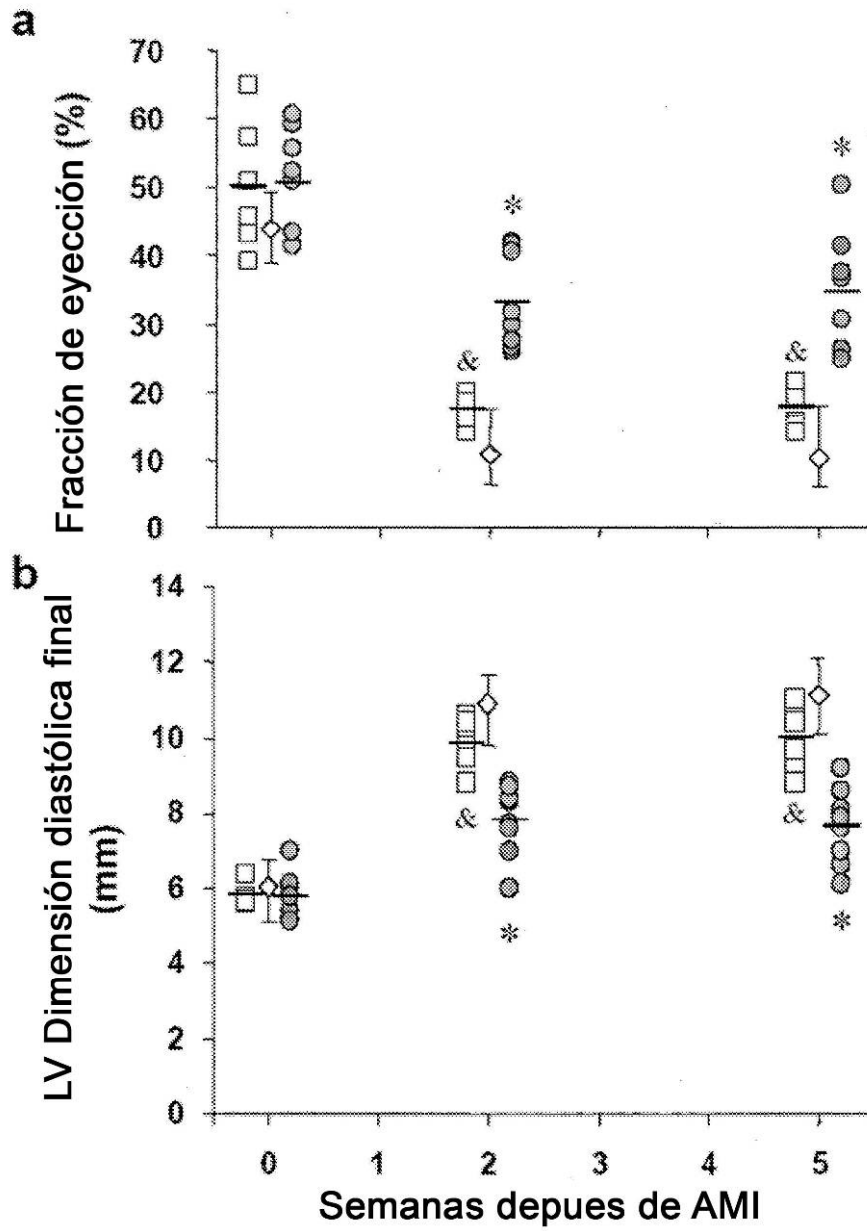


Fig. 4

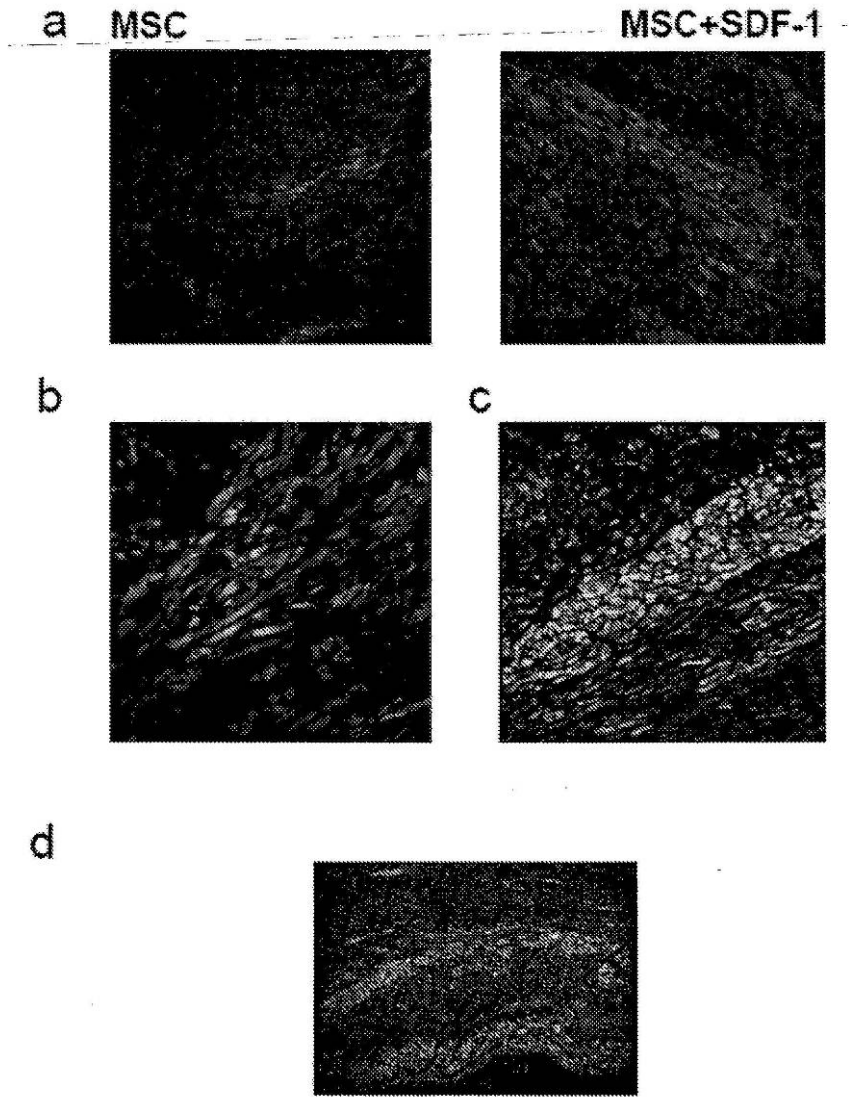


Fig. 5

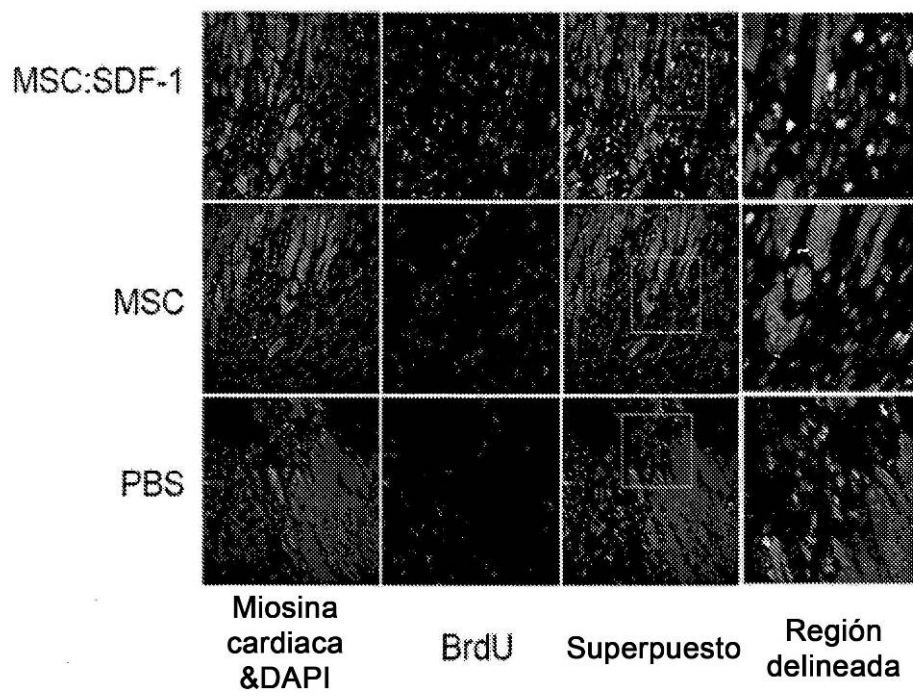


Fig. 6

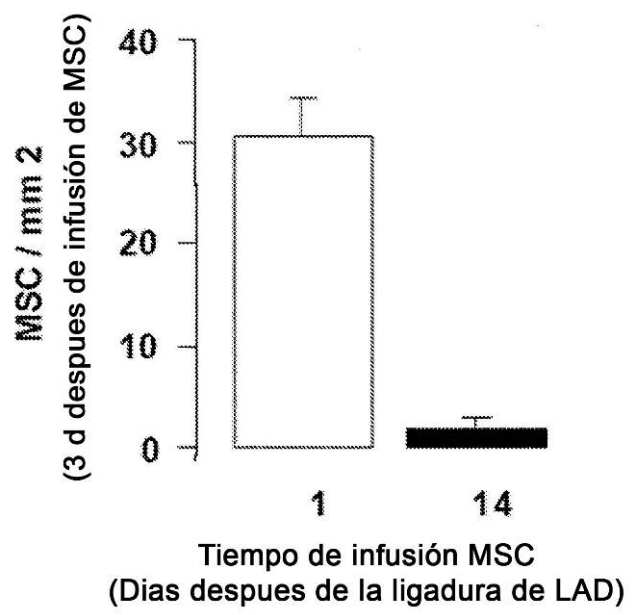
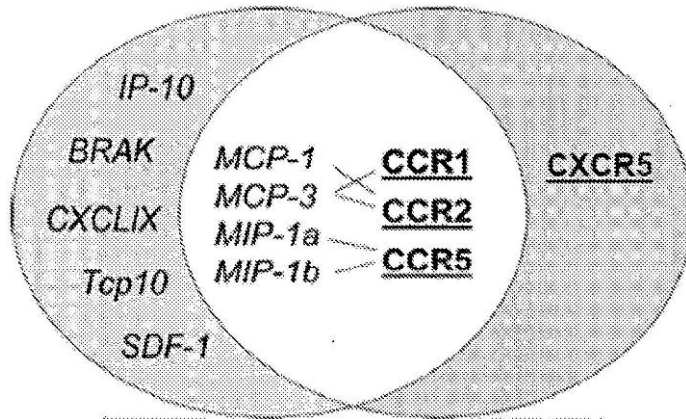


Fig. 7



a. Quimiocina transitoriamente expresada sin 10 post-MI



Receptores de quimiocina en MSC pero no CF

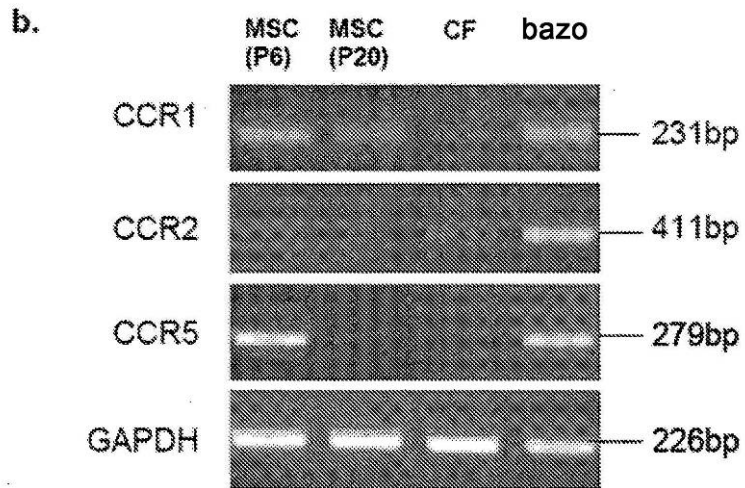


Fig. 8

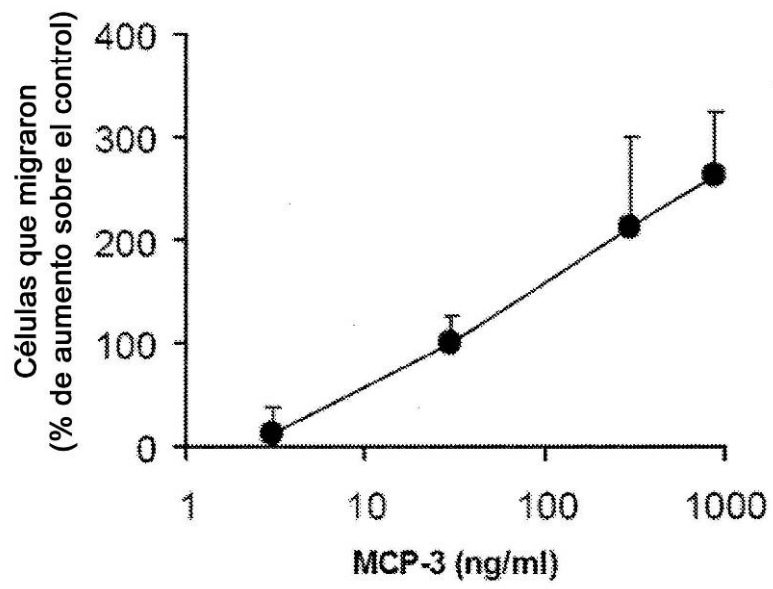
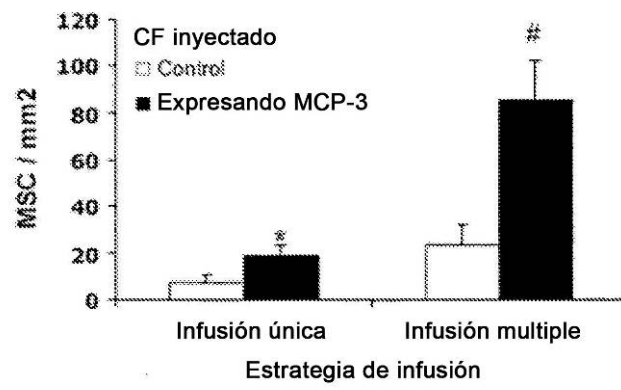


Fig. 9

a.



b.

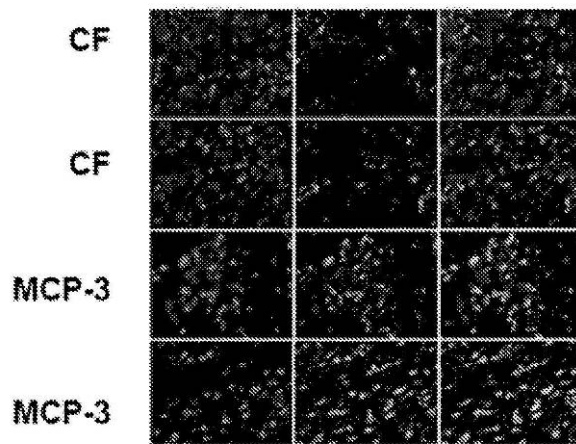


Fig. 10

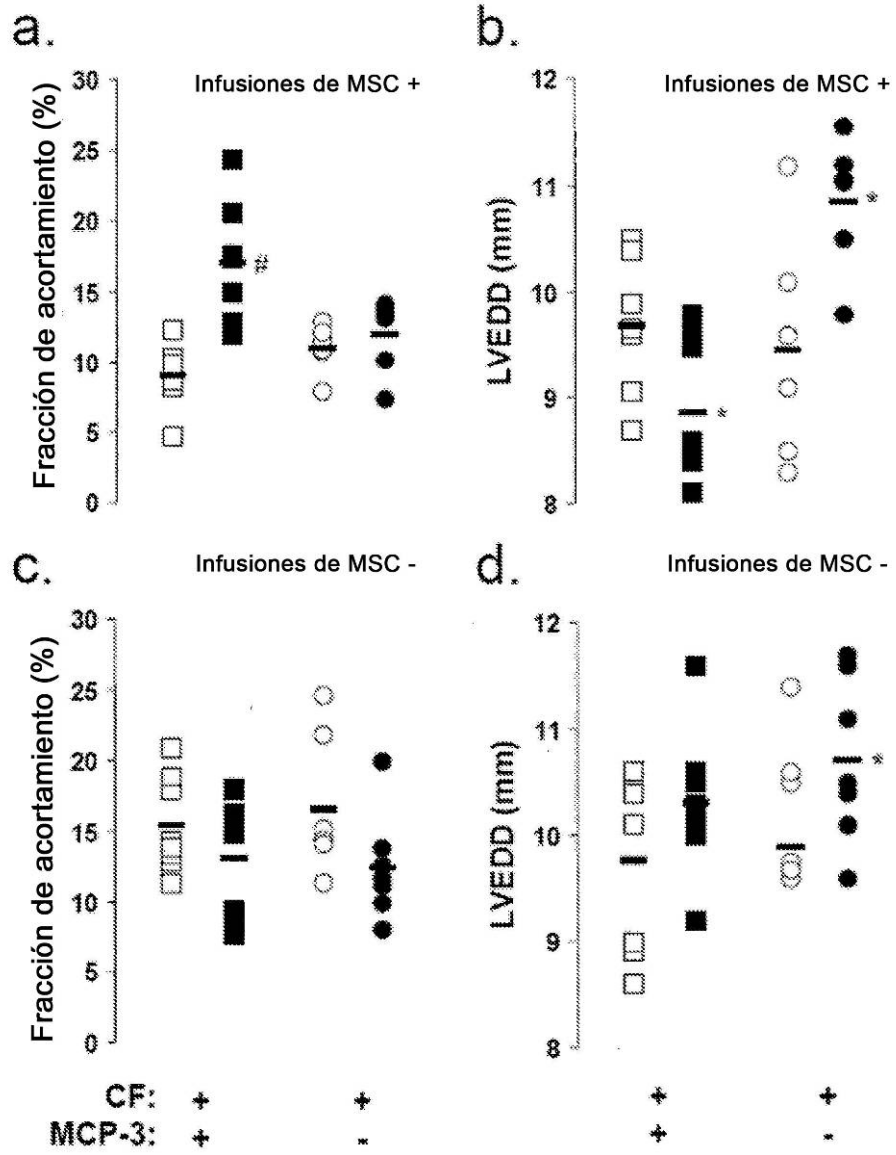


Fig. 11

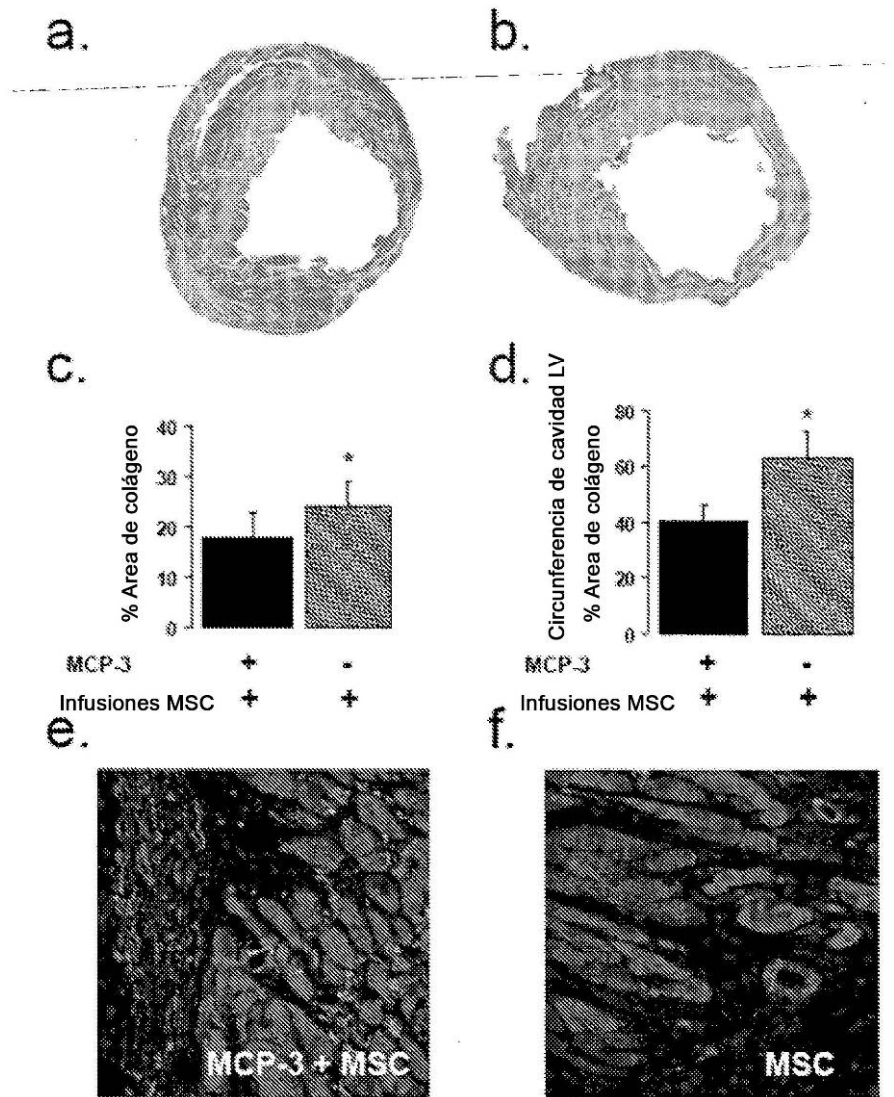


Fig. 12