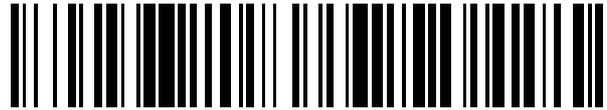


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 344**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2002 E 02729151 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1441682**

54 Título: **VEGF-A para inducir regeneración del tejido miocárdico**

30 Prioridad:

15.05.2001 AR 0102313

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

12.04.2016

73 Titular/es:

STERRENBELD BIOTECHNOLOGIE NORTH AMERICA, INC. (50.0%)
1209 Orange Street
Wilmington, DE 19801, US y
FUNDACION UNIVERSITARIA DR RENE G. FAVALORO (50.0%)

72 Inventor/es:

MELO, CARLOS ALBERTO;
JANAVEL, GUSTAVO VERA;
LAGUENS, RUBÉN;
CROTTOGINI, JOSÉ ALBERTO;
ARGUELLES, MARACELO LUIS;
PICHEL, RICARDO HORACIA y
CRISCUOLO, MARCELO EDUARDO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 566 344 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

VEGF-A para inducir regeneración del tejido miocárdico5 **Descripción técnica de la invención**

Método para inducir la formación neovascular y la regeneración tisular utilizando el Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar A (VEGF-A en sus siglas inglesas). Más concretamente, un método para inducción localizada de formación neovascular *in vivo* y la regeneración de tejidos en mamíferos que utilizan VEGF-A.

10

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un método de terapia génica para estimular la revascularización y la regeneración del tejido.

15

Antecedentes de la invención

La cardiopatía isquémica es la principal causa de morbilidad y mortalidad. El impacto epidemiológico y socio-económico de la enfermedad coronaria es notable. Esta enfermedad causa millones de muertes en todo el mundo. Véase Murray, et al., *Lancet*, 349:269-276 (1997). En los países desarrollados, se ha estimado que se produjeron 5,3 millones de muertes atribuibles a enfermedades cardiovasculares en 1990, mientras que la cifra correspondiente para los países en desarrollo osciló entre 8 y 9 millones (mostrando un exceso relativo de 70%). Véase Reddy, et al., *Circulation*, 97: 96-601 (1998). En Argentina, la cardiopatía isquémica es la primera causa de mortalidad mostrando una incidencia de alrededor de 30%, tendencia que tiende a mantenerse estable desde 1980. Para la población mayor de 65 años, esta tasa alcanza casi 40%. Véase el Programa Nacional de Estadísticas de Salud, Serie 5, Número 38, Ministerio de Salud y Acción Social, República Argentina (Diciembre de 1995).

A pesar de los recientes avances en la prevención y tratamiento de la enfermedad isquémica del corazón, hay muchos pacientes que todavía son sintomáticos y no pueden beneficiarse de la terapia convencional. La administración de factores de crecimiento que promueven la formación y el crecimiento neovascular, tales como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y VEGF, aparecen como una alternativa novedosa y prometedora para estos pacientes. Este modo de tratamiento se denomina angiogénesis terapéutica. Véase Henry, B. M. J., 318:1536-1539 (1999).

El VEGF es una proteína expresada por las células de músculo esquelético, las células de músculo liso, las células del cuerpo lúteo del ovario, las células tumorales, los fibroblastos y los cardiomiocitos. A diferencia de otros mitógenos, el VEGF es un factor de crecimiento secretado. Véanse Thomas, *J. Biol. Chem.*, 271:603-606 (1996); Leung, et al., *Science*, 246:1306-1309 (1989). El gen VEGF humano se expresa en diferentes isoformas, secundarias al corte y empalme alternativo post-transcripcional. En los tejidos humanos no malignos, se expresan cuatro isoformas de VEGF, con diferente número de aminoácidos (121, 165, 189, 206) y con un peso molecular que oscila de 34 a 46 kD. Véanse Tischer, et al., *J. Biol. Chem.*, 266: 11947-11954 (1991); Ferrara, et al., *J. Cell. Biochem.*, 47: 211-218(1991).

Los receptores específicos de VEGF son VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). Véanse De Vries, et al., *Science*, 254: 989-991(1992); Terman, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187:1579-1586 (1992); Gallant, et al., *Genomics*, 13: 475-478 (1992). Debido a la localización restringida y confinada aparente de los receptores de VEGF para las células endoteliales vasculares, este factor de crecimiento ha sido descrito como el mitógeno más específico para estas células. Se ha propuesto que el VEGF no es bioactivo en células no endoteliales. Véanse Jakeman, et al., *J. Clin. Invest.*, 89:244-253 (1992); Ferrara, et al., *Endocr. Rev.*, 18:4-25 (1997); Thomas, *et al., supra* (1996). Sin embargo, estudios recientes han informado de efectos mitogénicos de VEGF en algunos tipos de células no endoteliales, tales como las células del epitelio pigmentario de la retina, células de los conductos pancreáticos y células de Schwann. Véanse Guerring et al., *J. Cell. Physiol.*, 164:385-394 (1995); Oberg-Welsh et al., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 126:125-132 (1997); Sundell et al., *J. Neurosci.*, 19:5731-5740 (1999). Por otra parte, los receptores de VEGF se han encontrado en otras células, tales como células madre hematopoyéticas, células endocárdicas e incluso cardiomiocitos de rata cultivados, donde se ha demostrado que VEGF activa la cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno. Véanse Asahara et al., *Sciface*, 275:964-967 (1997); Partanen et al., *Circulation*, 100:583-586 (1999); Takahashi et al., *Circ. Res.*, 84:1194-1202 (1999).

La administración terapéutica de VEGF es un reto importante. VEGF se puede administrar como una proteína recombinante (terapia con proteína) o mediante transferencia génica de codificación de VEGF (terapia génica). Véanse Safi, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29: 2311-2325 (1997); Simons, et al., *Circulation*, 102: E73-E86 (2000).

La terapia con proteínas tiene desventajas importantes. La vida media extremadamente corta de las proteínas angiogénicas (por ejemplo, VEGF) condiciona la terapia para la administración de dosis altas o repetidas para lograr

un efecto notable. Véanse Simons, *et al.*, *supra* (2000); Takeshita, *et al.*, *Circulation*, 90:11228-234 (1994). Además, se sabe que la administración intravenosa de altas dosis de la proteína VEGF induce hipotensión grave o refractaria. Véanse Henry, *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31:65A (1998); Horowitz, *et al.*, *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:2793-2800 (1997); López, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 273: H1317-1323 (1997). Para evitar estos inconvenientes, se ha propuesto la terapia génica (p. ej., ADN que codifica VEGF). Véanse Mack, *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 115: 168-177 (1998); Tio, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 10:2953-2960 (1999).

La terapia génica puede ser comparada con un sistema de liberación lenta de fármaco. El gen que codifica el agente de interés es transportado a las células en vehículos denominados vectores (p. ej., plásmidos, virus, liposomas). Los mecanismos celulares especializados en la síntesis de proteínas llevan a cabo la producción y liberación localizada del producto final. Véase Crystal, *Science*, 270:404-410 (1995). Además, cabe señalar que en el caso de plásmidos el producto génico se sintetiza durante un período de tiempo discreto. Este tiempo es por lo general de aproximadamente dos semanas. De acuerdo con estudios experimentales, la expresión sostenida durante este período de tiempo limitado es necesaria y suficiente para activar el proceso angiogénico. Basándose en estas ventajas, varios grupos de investigación han estudiado los efectos terapéuticos de la terapia génica utilizando factores angiogénicos en modelos experimentales de isquemia del corazón y las extremidades. Estos enfoques han dado resultados prometedores. Véanse Magovem, *Ann. Thorac. Surg.*, 62:425-434 (1996); Mack, *et al.*, *supra* (1998); Tio, *et al.*, *supra* (1999); Walder, *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 27: 91-98 (1996); Takeshita, *et al.*, *Lab. Invest.*, 75:487-501 (1996); Mack, *et al.*, *Gen. Vasc. Surg.*, 27:699-709 (1998); Tsurumi, *et al.*, *Circulation*, 94: 3281-3290 (1996). La terapia génica ha logrado los efectos esperados sin los inconvenientes asociados con la terapia con proteínas. Sin embargo, la terapia génica adenoviral puede inducir reacciones inflamatorias o inmunitarias, especialmente después de dosis repetidas. Este tipo de terapia se ha relacionado también con el síndrome de respuesta inmunitaria sistémica de alto riesgo. Estas circunstancias limitan significativamente el uso clínico de esta terapia. Véanse Gilgenkrantz, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 6:1265-1274 (1995); Dewey, *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1256-1263 (1999); Werston, *et al.*, *J. Virol.*, 72:9491-9502 (1998); Hollon, *Nat. Med.*, 6:6 (2000), Chang, *et al.*, *Nat. Med.*, 5:1143-1149 (1999); Byrnes, *et al.*, *J. Neurosci.*, 16: 3045-3055 (1996). De acuerdo con estudios recientes, la terapia génica con plásmidos no tiene estas desventajas y puede ser administrada con seguridad en dosis repetidas. Véase Simons, *et al.*, *supra* (2000).

La administración sistémica de VEGF se ha asociado con la angiogénesis no deseada en los tejidos periféricos. Véanse Folkman, *Nat. Med.*, 1:27-31 (1995); Liotta, *et al.*, *Cell*, 64:327-336 (1991); Lazarous, *et al.*, *Circulation*, 94:1074-1082 (1996); Ferrara, *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137 (1995); Ferrara, *Lab. Invest.*, 72:615-618 (1995); Aiello, *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 331:1480-1485 (1994); Adams, *et al.*, *Am. J. Ophthalmol.*, 118:445-450 (1994); Inoue, *et al.*, *Circulation*, 98:2108-2116 (1998); Simons, *et al.*, *supra* (2000). El riesgo de exposición sistémica está probablemente más relacionado con la vía de administración que con la naturaleza de la terapia (gen o proteína) utilizada. En comparación con la liberación intravascular, (p. ej. intramiocárdica) la administración local reduce el riesgo de exposición sistémica y angiogénesis periférica no deseada. Véase Simons, *et al.*, *supra* (2000).

En la actualidad, se ha demostrado que el VEGF induce la angiogénesis *in vivo*. No se ha informado hasta ahora de que el VEGF induzca la formación de vasos sanguíneos con la capa de musculatura lisa. Véase Mack, *et al.*, *supra* (1998); Tio, *et al.*, *supra* (1999). Por otra parte, se ha postulado que el VEGF impide la neoformación de musculatura lisa vascular. Véase Asahara, *et al.*, *Circulation*, 91:2793-2801 (1995). La musculatura lisa juega un papel importante en la regulación de la función vascular. Su presencia en la capa media de los vasos sanguíneos representa una ventaja adaptativa, ya que está implicada en la regulación del tono vasomotor. La musculatura lisa vascular mantiene un tono vascular basal y permite la autorregulación de las variaciones del flujo y la presión sanguíneos. Se ha sugerido que la ausencia de capa de musculatura lisa está relacionada con el colapso del vaso. Véase "Angiogenesis and Cardiovascular Disease", Ware, Ed. (Oxford University Press Inc., Nueva York, USA., 1999), págs. 258-261.

El infarto de miocardio agudo es la consecuencia de la enfermedad coronaria con el peor pronóstico a corto y largo plazo. Véanse Bolognese, *et al.*, *Am. Heart J.*, 138:S79-83 (1999); Mehta, *et al.*, *Herz*, 25:47-60 (2000); Hesse, *et al.*, *Cardiovasc. Clin.*, 20:283-318 (1989); Jacoby, *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 20:736-744 (1992); Rosenthal, *et al.*, *Am. Heart J.*, 109:865-876 (1985). Esta afección da como resultado frecuentemente una pérdida significativa de las células del miocardio, reducción de la masa muscular contráctil. Es conocido en la técnica que los cardiomiocitos de seres humanos y de especies similares a la humana conservan su capacidad para replicar el ADN. Véase Pfizer, *et al.*, *Curr. Top. Pathol.*, 54: 125-168 (1971). Recientemente, se ha informado de que algunos cardiomiocitos humanos pueden entrar en la fase M (mitótica). Sin embargo, este fenómeno se produce en una proporción muy pequeña de la población total de cardiomiocitos y en ciertas condiciones patológicas. Hasta ahora, este fenómeno sólo se ha observado en el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca terminal. Véanse Beltrami *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 344: 1750-1757 (2001); Kajsutra, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8801-8805 (1998). No existe evidencia concluyente en todos estos casos de que los cardiomiocitos se dividan en células hijas.

La incapacidad de los cardiomiocitos para replicar adecuadamente se opone a la sustitución del tejido miocárdico después de una lesión en las especies animales superiores. En este escenario, la función del miocardio se ve

disminuida debido a que el área infartada es reemplazado por tejido fibrótico sin capacidad contráctil. Además, los cardiomiocitos restantes se convierten en hipertróficos y desarrollan núcleos poliploides. Véanse Herget, et al., *Cardiovasc. Res.* 36:45-51 (1997); "Textbook of Medical Physiology", 9ª Ed., Guyton et al., Eds. (W. B. Saunders Co, USA, 1997).

Se han realizado intentos para restaurar la pérdida de células del miocardio con otras células, tales como células satélite autólogas y mioblastos alogénicos. Los resultados de estos intentos no son concluyentes. Véase Dorfman, et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 116:744-751 (1998); Murry, et al., *J. Clin. Invest.*, 98: 2512-2523 (1996); Leor, et al., *Circulation*, 94 Suppl. II: II-332-II-336 (1996); Ren-Ke, et al., *Circ. Res.*, 78: 283-288 (1996.). Más recientemente, se ha sugerido que las células madre pluripotentes y angioblastos derivadas de médula de hueso pueden restaurar el tejido miocárdico infartado e inducir incluso formación neovascular. Sin embargo, la eficacia de estos métodos en los mamíferos superiores no se ha demostrado todavía. Véase Orlic, et al., *Nature*, 410: 701-705 (2001); Kocher, et al., *Nat. Med.*, 7: 430-436 (2001). Un método ideal debería inducir la división de las células hijas de los cardiomiocitos y la formación neovascular en el tejido del miocardio de origen. Este procedimiento restauraría la pérdida de tejido autólogo con el tejido miocárdico y aumentaría la perfusión miocárdica de forma simultánea. Un método como este podría reducir las tasas de morbilidad y mortalidad asociadas con la remodelación ventricular izquierda, el infarto de miocardio y la enfermedad isquémica del corazón. Véase Bolognese, et al., *supra* (1999).

Del mismo modo, el fracaso de los cardiomiocitos para replicar correctamente dificulta la hiperplasia (es decir, el aumento de número de células) adaptativa como respuesta a otras condiciones patológicas. En estos casos, la respuesta adaptativa de los cardiomiocitos humanos y porcinos consiste en aumentar el volumen celular y el contenido de ADN nuclear. Por lo tanto, en ciertas patologías (por ejemplo, enfermedad cardíaca hipertensiva, miocardiopatía dilatada) los cardiomiocitos también son marcadamente hipertróficos y poliploides. Véase Pfizer, *Curr. Parte superior. Pathol.*, 54:125-168 (1971); Adler, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18:39-53 (1986). En la mayoría de los casos, la adaptación de las células es insuficiente. Además, la demanda celular de oxígeno y nutrientes aumenta a medida que progresa la hipertrofia miocárdica. En consecuencia, el aumento de las demandas deteriora la perfusión subendocárdica incluso en ausencia de oclusión coronaria. Finalmente, la combinación de estos factores conduce al detrimento de la función miocárdica. Véase "Textbook of Medical Physiology", 9ª Ed, *supra*. Un método ideal debería inducir la mitosis en las células hipertróficas y poliploides. Este método debe dar lugar a células hijas más pequeños y mejor perfundidas, reduciendo de ese modo la progresión de la miocardiopatía a insuficiencia cardíaca.

Diagramas

La Fig. 1 ilustra el índice de tolerancia al estrés para la zona de riesgo. Se comparan los valores medios de pre- y post-tratamiento para el Grupo I-T (VEGF) y el Grupo I-P (placebo). El valor de post-tratamiento del Grupo I-T es superior al valor de pre-tratamiento de un mismo grupo. El valor de post-tratamiento del Grupo I-T es mayor que el valor de post-tratamiento del Grupo I-P. Las comparaciones pareadas intra-grupo muestran: 1) ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre índices de pre- y post-tratamiento para el Grupo I-P y 2) la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de pre- y post-tratamiento para el Grupo I-T. Las comparaciones no pareadas entre los grupos muestran: 1) la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de pre-tratamiento para el Grupo I-T y el Grupo I-P y 2) la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de post-tratamiento para el Grupo I-T y el Grupo I-P.

La Fig. 2 ilustra el índice de mejora de perfusión para la zona de riesgo. Se comparan los valores medios para el Grupo I-T (VEGF) y el Grupo I-P (placebo). El valor para el Grupo I-T es significativamente mayor que el valor para el Grupo I-P.

La Fig. 3 muestra la densidad lineal para la zona de riesgo. Se ilustran los valores medios para los vasos sanguíneos, oscilando la capa de musculatura lisa entre 8 y 50 μm . El valor para el Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor que el valor para el Grupo I-P (placebo).

La Fig. 4 muestra la densidad numérica para la zona de riesgo. Se ilustran los valores medios de los vasos sanguíneos, oscilando la capa de musculatura lisa entre 8 y 50 μm . El valor para el Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor que el valor para el Grupo I-P (placebo).

La Fig. 5 muestra la densidad lineal para la zona de riesgo. Se ilustran Los valores medios de los vasos sanguíneos oscilando la capa de musculatura lisa entre 8 a 30 μm . El valor para el Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor que el valor para el Grupo I-P (placebo).

La Fig. 6 ilustra el efecto de la isquemia y el tratamiento sobre núcleos de cardiomiocitos positivos para Ki67 y la mitosis. El panel (a) muestra el índice de núcleos de cardiomiocitos positivos para Ki67. No existen diferencias significativas entre individuos del Grupo I-T (VEGF) y del Grupo I-P (placebo). El panel (b) muestra individuos del Grupo I-T (VEGF) con un índice mitótico de cardiomiocitos significativamente superior para la zona de riesgo (zona isquémica) y el tejido miocárdico (zona no isquémica) circundante en comparación con los individuos del Grupo I-P. El valor para el Grupo I-T (VEGF) es significativamente mayor que el valor para el Grupo I-P (placebo).

La Fig. 7 representa la curva de transcripción de ARNm de VEGF de los individuos del Grupo II-T. La curva

muestra un pico el día 10 después de la inyección del plásmido pUVEK15.

La Fig. 8 ilustra la metafase de un cardiomiocito de un individuo del Grupo I-T. Los cromosomas metafásicos y el huso mitótico son claramente visibles.

5 La Fig. 9 ilustra la telofase de un cardiomiocito de un individuo del Grupo I-T. Son claramente visibles las estriaciones sarcoméricas.

La Fig. 10 ilustra el proceso mitótico de dos cardiomiocitos adyacentes. El límite entre los cardiomiocitos es distinguible. Se observa claramente la integridad de ambos cardiomiocitos.

10 La Fig. 11 muestra la citocinesis no convencional de un cardiomiocito de un individuo del Grupo I-T. Se observan placas cromosómicas opuestas en dos cardiomiocitos adyacentes. La flecha indica una posible división en células hijas. Barra = 10 µm.

Las Figs. 12 y 13 ilustran los vasos sanguíneos con capa de musculatura lisa en el tejido del miocardio de un individuo del Grupo I-T. La musculatura lisa vascular se identificó con tinción inmunohistoquímica de alfa-actina.

15 **Depósito**

El plásmido PUEK15 se depositó el 13 de Noviembre de 2000, bajo el número de acceso DSM 13833 en la DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania.

20 **Descripción de la invención**

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

25 Una ventaja de la presente invención es la inducción segura y eficiente de la formación neovascular en los tejidos hipoperfundidos y normoperfundidos. Mediante la utilización del método reivindicado, es posible estimular la neoformación, el desarrollo, la proliferación y crecimiento de los vasos. El método reivindicado es eficaz también para la neoformación, el desarrollo, la proliferación y crecimiento de las células musculares lisas y estriadas. El método es particularmente útil para inducir la revascularización en pacientes con enfermedad cardíaca isquémica.

30 La presente invención también se puede utilizar en el tratamiento de pacientes con enfermedad arterial periférica o isquemia grave de las extremidades. La presente invención se puede utilizar como terapia única de enfermedades isquémicas o asociada a procedimientos de revascularización convencionales. El procedimiento reivindicado se caracteriza por la ausencia de efectos secundarios adversos relacionados con la exposición sistémica a los factores angiogénicos en dosis altas.

35 Otra ventaja de la presente invención es la regeneración de tejido miocárdico (miocardiogenesis). El método reivindicado induce la mitosis de cardiomiocitos. De esta manera, el método reivindicado reemplaza el tejido infartado por músculo cardíaco autólogo. La presente invención también se revierte el desarrollo natural de miocardiopatías hipertróficas y dilatadas de cualquier etiología induciendo el proceso mitótico en cardiomiocitos hipertróficos poliploides y mediante la mejora de la perfusión del tejido (es decir, induciendo la formación neovascular). Esta circunstancia da como resultado un mayor número de células hijas normales. Estas células hijas tienen una mejor perfusión en comparación con las células hipertróficas. Todas estas ventajas indican que la presente invención mejora los resultados clínicos e histofisiológicos a corto, medio y largo plazo de las enfermedades del corazón.

45 Otra ventaja potencial de esta invención es su uso en la medicina de trasplantes. La invención reivindicada puede ser particularmente útil en pacientes trasplantados con rechazo crónico del injerto y enfermedad coronaria difusa. La revascularización miocárdica inducida por el método reivindicado restauraría la perfusión alterada y la función en estos pacientes. Estos pacientes a menudo no son elegibles para los métodos convencionales de revascularización (CABG, ACTP). La presente invención representa una estrategia de revascularización alternativa eficaz para estos pacientes.

50 Una ventaja potencial adicional de la presente invención es su uso para aumentar la perfusión en los tejidos isquémicos de pacientes con micro y macroangiopatía relacionada con la diabetes. El método reivindicado puede revertir o reducir las complicaciones crónicas asociadas con la diabetes tales como la neuropatía diabética, la enfermedad de vasa-vasorum, la enfermedad cardíaca isquémica, la enfermedad arterial periférica y la isquemia severa de las extremidades, entre otras. Véanse Schratzberger, et al., J. Clin. Invest., 107:1083-1092 (2001); Rivard, et al., Circulation 96 Suppl. I: 175 (1997); Rivard, et al., Am. J. Pathol 154:355-363 (1999).

60 Una de las ventajas del método reivindicado es su mayor seguridad cuando se utiliza junto con procedimientos mínimamente invasivos de administración intramiocárdica-transendocárdica percutánea. Esta administración se logra mediante el acceso a la cámara ventricular izquierda a través de un enfoque endovascular mediado por catéter. Este tipo de administración podrá estar asistido por un mapeo electromecánico del ventrículo izquierdo. De esta manera la morbilidad y la mortalidad asociadas a la cirugía a tórax abierto se reduce significativamente.

La presente invención se refiere a un método para inducir la formación neovascular y regeneración de los tejidos que se caracteriza por la administración de una secuencia de nucleótidos que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de VEGF-A. En una realización de la presente invención, se administra una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es el SEQ ID NO. 1. En otra realización de la presente invención, se administra el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO. 1. La secuencia de nucleótidos utilizada de acuerdo con la presente invención puede ser ADN genómico, ADNc y ARN mensajero. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es ADN genómico. El SEQ ID NO: 1 es

10

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn
His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val
Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu
Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro
Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser
Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys
Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro
Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His
Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn
Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg
Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys
Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln
Asp	Pro	Gln	Thr	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys
Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln
Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys
Asp	Lys	Pro	Arg	Arg					

De acuerdo con la presente invención, el agente inductor se administra al tejido compuesto de células eucariotas, tal como el tejido compuesto por células de mamíferos, a saber, cardiomiocitos. Preferiblemente, las células de mamífero son de origen porcino y humano. Más preferiblemente, las células son de origen humano.

De acuerdo con el procedimiento reivindicado, las células eucariotas son células musculares. Preferiblemente, las células musculares utilizadas de acuerdo con la presente invención son cardiomiocitos, células de la musculatura estriada esquelética de tipo I y tipo II, células de la musculatura lisa vascular y células de la musculatura lisa no vascular y células mioepiteliales. Más preferiblemente, las células musculares utilizadas son cardiomiocitos.

El método reivindicado se caracteriza por la inducción de la formación neovascular. Preferiblemente, la formación neovascular inducida se localiza en el sitio de administración del agente inductor. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio.

El método reivindicado se caracteriza por la inducción de la angiogénesis localizada tanto *in vivo* como *ex vivo*. Preferiblemente, la angiogénesis se localiza en el sitio de administración del agente inductor. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la angiogénesis se induce en el tejido normoperfundido, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la angiogénesis se induce en el tejido isquémico, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce la angiogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido, ya sea *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, infartado, no viable, fibrosado y necrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce angiogénesis *in vivo* en el tejido miocárdico hipoperfundido.

El método reivindicado también se caracteriza por la inducción de la arteriogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, la arteriogénesis se localiza en el sitio de administración. Más preferiblemente, el sitio de

administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la arteriogénesis es inducida en el tejido normoperfundido *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la arteriogénesis es inducida en el tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce arteriogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, infartado, no viable, fibrosado y necrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce arteriogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por la inducción de la vasculogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, la vasculogénesis está en el sitio de administración. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la vasculogénesis es inducida en el tejido normoperfundido *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la vasculogénesis es inducida en el tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce la vasculogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, no viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce vasculogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por la inducción de linfangiogénesis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, la linfangiogénesis se localiza en el sitio de administración. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la linfangiogénesis es inducida en el tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la linfangiogénesis es inducida en el tejido isquémico, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce linfangiogénesis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, no viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce linfangiogénesis en el tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por la inducción de mitosis *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, la mitosis es inducida localmente en el sitio de administración. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la mitosis es inducida en el tejido normoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la mitosis es inducida en el tejido isquémico *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce mitosis en tejido miocárdico hipoperfundido, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El tejido miocárdico hiperperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, no viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce mitosis en tejido miocárdico hipoperfundido *in vivo*.

El método reivindicado también se caracteriza por la inducción de regeneración de tejido *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, la regeneración de tejido es inducida a nivel local en el sitio de administración. Más preferiblemente, el sitio de administración es el miocardio. En una realización de la presente invención, la regeneración de tejido se induce en territorios normoperfundidos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. En otra realización de la presente invención, la regeneración de tejidos es inducida en territorios isquémicos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Preferiblemente, el método reivindicado induce la regeneración de tejidos en territorios de miocardio hipoperfundidos, *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. El territorio miocárdico hipoperfundido puede ser isquémico, viable, hibernado, aturdido, previamente acondicionado, lesionado, no viable, infartado, necrosado y fibrosado. Más preferiblemente, el método reivindicado induce la regeneración de tejidos en territorios miocárdicos hipoperfundidos *in vivo*.

En una realización de la presente invención, la secuencia de nucleótidos codificante está conectada operablemente a un vector. En una realización del método reivindicado, el vector es un vector viral, tal como adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus y lentivirus. En otra realización del presente método, el vector es un vector plasmídico. Más preferiblemente, el vector plasmídico es pUVEK15. En otra realización de la presente invención, la secuencia de nucleótidos es transportada por un liposoma. En una realización de la presente invención, el agente inductor está contenido en un compuesto farmacéutico adecuado. El compuesto farmacéutico que contiene el agente inductor se administra al receptor en dosis suficientes.

El compuesto farmacéutico utilizado de acuerdo con la presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intracoronaria, intra-aórtica, intrafemoral, intrapopliteal, intrapedialis, tibial intra-posterior, intracarotídea e intra-radial. El compuesto farmacéutico puede ser también administrado por vía, intrapericárdica, intra-saco amniótico, intrapleural, intramiocárdica-transepicárdica, intramiocárdica-transendocárdica, intra-muscular periférica, subcutánea, intramedular, e intracardiaca (intra-auricular e intraventricular). Además, el agente inductor puede ser administrado por vía sublingual, por inhalación, oral, rectal, periadventicia, perivascular, epicárdica tópica, epidérmica tópica, transdérmica, oftálmica o a través de las mucosas conjuntiva, nasofaríngea, bucofaríngea, laringofaríngea, vaginal, colónica, uretral y vesical. Preferiblemente, el agente inductor se administra por medio de inyecciones intramiocárdicas-transepicárdicas y intramiocárdicas-transendocárdicas. Más preferiblemente, el agente

inductor se administra por medio de inyección intramiocárdica-transepicárdica.

- 5 En una realización de la presente invención, el agente inductor se inyecta perpendicular al plano de la zona de inyección. En otra realización de la presente invención, el agente inductor se inyecta en paralelo al plano de la zona de inyección. En otra realización de la presente invención, el agente inductor se inyecta en un ángulo oblicuo en relación con el plano de la zona de inyección. Preferiblemente, el agente inductor se inyecta en un ángulo de 45 grados en relación al plano de la zona de inyección. Preferiblemente, las inyecciones se distribuyen homogéneamente en la zona de inyección.
- 10 Según se utiliza en la presente memoria, "zona de inyección" se define como el territorio de tejido que incluye la zona hipoperfundida, la zona de transición y la zona normoperfundida que rodea la zona de transición. La "zona de inyección" también se puede definir como tejido normal.
- 15 Según se utiliza en la presente memoria, "zona en riesgo", significa la zona del miocardio irrigada por la arteria coronaria circunfleja.
- Según se utiliza en la presente memoria, "arteriogénesis" se define como la formación, el crecimiento o el desarrollo de los vasos sanguíneos con la capa media de la musculatura lisa.
- 20 Según se utiliza en la presente memoria, "inducir", así como el término correlacionado "inducción", se refiere a la acción de generar, promover, formar, regular, activar, potenciar o acelerar un fenómeno biológico. Un ejemplo de la inducción es la acción de VEGF como estimulador proliferación vascular.
- 25 En la presente memoria, "agente inductor" se define como ADN genómico, ADNc o ARN mensajero que codifica el sitio activo de VEGF-A. "Agente inductor" también incluye cualquier vector que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el VEGF-A. "Agente inductor" también se define como cualquier polipéptido que incluye el sitio activo VEGF-A.
- 30 En la presente memoria, "índice de núcleos de cardiomiocitos positivos para Ki67" se refiere a un parámetro diseñado para evaluar la densidad de células en ciclo (no quiescentes) en una muestra de tejido. Este parámetro se refiere al número de células positivas para Ki67 por 10^6 núcleos de cardiomiocitos en una zona analizada.
- 35 Según se utiliza en la presente memoria, "índice de densidad lineal" se refiere a un parámetro calculado para evaluar una vascularización del tejido. Este parámetro fue diseñado para cuantificar los vasos dispuestos en cualquier variedad de orientación. El método de cálculo de este índice es conocido en la técnica. Véanse Anversa et al., Am. J. Physiol., 260: H1552-H1560 (1991); Adair et al., Am. J. Physiol., 266: H1434-H1438 (1994); Anversa et al., Am. J. Physiol., 267: H1062-H1073 (1994).
- 40 Según se utiliza en la presente memoria, "localizada" se define como una respuesta restringida a la zona o tejido de interés.
- Según se utiliza en la presente memoria, "linfangiogénesis" se define como la formación, crecimiento, desarrollo o proliferación de vasos linfáticos.
- 45 Según se utiliza en la presente memoria, "mamífero" se define como un animal vertebrado de sangre caliente cuya progenie se alimenta con leche secretada por sus glándulas mamarias. El término "mamífero" incluye, pero no se limita a, ratas, ratones, conejos, perros, gatos, cabras, ovejas, vacas, cerdos, primates y seres humanos.
- 50 Según se utiliza en la presente memoria, "mitosis" se refiere al proceso de división celular completo.
- Según se utiliza en la presente memoria, "índice mitótico" se refiere a un parámetro diseñado para evaluar la densidad de mitosis en una muestra de tejido. Este parámetro se refiere al número de mitosis por 10^6 núcleos de cardiomiocitos en una zona analizada.
- 55 Según se utiliza en la presente memoria, "formación neovascular" se define como la creación, crecimiento, desarrollo o proliferación de vasos sanguíneos. La proliferación neovascular incluye arteriogenesis, vasculogénesis y linfangiogénesis.
- 60 Según se utiliza en la presente memoria, "comparación no pareada" se refiere a la comparación estadística entre los dos grupos diferentes de individuos al mismo tiempo.
- Según se utiliza en la presente memoria, "comparación pareada" se refiere a la comparación estadística de un mismo grupo de individuos en diferentes momentos.

Según se utiliza en la presente memoria, "índice de mejora de la perfusión" se refiere a un parámetro diseñado para evaluar la mejora general de la perfusión miocárdica ventricular izquierda. Este índice se calcula por medio de la diferencia aritmética entre el índice de tolerancia al estrés post-tratamiento y el índice de tolerancia al estrés pre-tratamiento.

5 Según se utiliza en la presente memoria, "compuesto farmacéutico" se refiere a un disolvente, coadyuvante o excipiente utilizado para administrar un agente inductor. El "compuesto farmacéutico" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, soluciones acuosas, gaseosas, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, ya sea agentes aceleradores o retardadores de la absorción, o sustancias similares. El uso de dichas sustancias en la
10 administración de compuestos activos farmacéuticos se conoce en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios al compuesto farmacéutico utilizado en la presente invención. "Compuestos farmacéuticos" incluyen, pero no se limitan a, cargas sólidas inertes o disolventes, soluciones acuosas estériles y disolventes orgánicos no tóxicos. El "compuesto farmacéutico" no debería reaccionar con o reducir de cualquier otra
15 manera la eficacia o la estabilidad del agente inductor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, etanol, polietilenglicol, aceite mineral, vaselina, propilenglicol, lanolina y agentes similares. Los "compuestos farmacéuticos" para inyectables incluyen soluciones estériles acuosas (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la formulación debe ser estéril. La formulación puede ser fluida para facilitar la dispensación de la jeringa. La formulación también debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y de
20 almacenamiento y debe ser preservada de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias, virus y hongos.

Según se utiliza en la presente memoria, "índice de tolerancia al estrés post-tratamiento" se refiere a un parámetro diseñado para evaluar la perfusión miocárdica ventricular izquierda en condiciones de post-tratamiento. Este índice se calcula por la diferencia aritmética entre el valor porcentual de perfusión post-tratamiento durante la sensibilización farmacológica (estrés) y el valor porcentual de perfusión post-tratamiento en reposo.

En la presente memoria, "índice de tolerancia al estrés pre-tratamiento" se refiere a un parámetro diseñado para evaluar la perfusión miocárdica ventricular izquierda en condiciones de pre-tratamiento. Este índice se calcula por la diferencia aritmética entre el valor porcentual de perfusión pre-tratamiento durante la sensibilización farmacológica (estrés) y el valor porcentual de perfusión pre-tratamiento en reposo.

Según se utiliza en la presente memoria, "índice de tolerancia al estrés" se define como la diferencia aritmética entre el valor porcentual de perfusión durante la exposición farmacológica (estrés) y el valor porcentual de perfusión en reposo. Este índice se calcula en situaciones de post-tratamiento y pre-tratamiento.

Según se utiliza en la presente memoria, "dosis suficiente" se define como una cantidad del agente inductor, o del compuesto farmacéutico que incluye el agente inductor, adecuada para lograr la función especificada. En el contexto de la presente invención, "dosis suficiente" se refiere a una cantidad del agente inductor, o del compuesto farmacéutico que incluye el agente inductor, adecuada para producir uno o más de los siguientes resultados: 1) la inducción de la arteriogénesis, vasculogénesis, linfangiogénesis en células eucariotas, 2) la activación del ciclo celular en células eucariotas, o 3) la inducción o la aceleración del proceso mitótico en células eucariotas.

Según se utiliza en la presente memoria, "vasculogénesis" se define como la formación, crecimiento, desarrollo o proliferación de vasos sanguíneos derivados de células no diferenciadas o poco diferenciadas.

Según se utiliza en la presente memoria, "VEGF" define cualquier factor de crecimiento endotelial vascular. "VEGF" incluye VEGF A. Véanse Hamawy, et al., Curr. Opin. Cardiol., 14:515-522 (1999); Neufeld, et al., Prog. Growth Factor Res., 5:89-97 (1994); Olofsson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2576-2581 (1996); Chilov, et al., J. Biol. Chem., 272:25176-25183 (1997); Olofsson, et al., Curr. Opin. Biotechnol., 10:528-535 (1999). La variante de VEGF A incluye, pero no se limita a, las isoformas de VEGF₁₋₁₂₁, VEGF₁₋₁₄₅, VEGF₁₋₁₆₇, VEGF₁₋₁₆₅, VEGF₁₋₁₈₉ y VEGF₁₋₂₀₆. El SEQ ID NO. 1 ilustra un ejemplo de la isoforma CVB₁₋₁₆₅. Véanse Tischer, et al., J. Biol. Chem., 266:11947-11954 (1991); Poltorak, et al., J. Biol. Chem., 272:7151-7158 (1997). El término "VEGF" incluye también el factor de permeabilidad vascular o vasculotropina (VPF). Véase Keck, et al., Science 246:1309-1312 (1989); Senger, et al., Science, 219:983-985 (1983). El VPF se conoce actualmente en la técnica como VEGF A.

En la presente memoria, "células poco diferenciadas" se definen como células con un perfil fenotípico característico pero con la capacidad originar células con un perfil fenotípico diferente. Las "células poco diferenciadas" incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, mioblastos, osteoblastos, células precursoras endoteliales, células satélite de músculo esquelético, y células gliales de tejido neural.

La presente invención emplea un plásmido denominado pWEK15 de aproximadamente 3086 pares de bases (pb). El plásmido pJVEK15 se caracteriza por incluir un promotor de citomegalovirus (CMV), un intrón quimérico, un fragmento de ADN que contiene la secuencia que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y una

secuencia de ADN de aproximadamente 1290 pb, que confiere resistencia a kanamicina. El plásmido pUVEK15 se depositó bajo el número de acceso DSM 13833 en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, República Federal de Alemania.

- 5 Habiendo descrito la invención en términos generales, ésta se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se presentan como una ilustración y no están destinados a limitar la presente invención, excepto cuando se indique específicamente.

10 Ejemplo 1

Inducción de la isquemia

15 Ochenta cerdos Landrace un peso aproximado de 25 kg (aprox. 3 meses de edad) se sometieron al siguiente protocolo: 1) cada individuo se sometió a evaluación clínica y de laboratorio de buena salud; 2) se realizó una toracotomía estéril en el 4º espacio intercostal izquierdo bajo anestesia general (inducción: 20 mg/kg de tiopental sódico; mantenimiento: enflurano al 2%) y la arteria coronaria circunfleja se diseccionó libre del tejido circundante en su porción proximal; 3) se colocó un constrictor Ameroide abrazando el origen de la arteria coronaria circunfleja; y 4) se reparó la toracotomía.

20 Ejemplo 2

Estudios de pre-tratamiento basal

25 Tres semanas después de la primera cirugía indicada en el ejemplo anterior, se llevaron a cabo estudios basales (pre-tratamiento) de los individuos. Los estudios se realizaron bajo sedación con suficientes dosis de tiopental sódico por vía intravenosa y bajo control electrocardiográfico. Se llevaron a cabo estudios de perfusión miocárdica basales de cada individuo. La perfusión del ventrículo izquierdo se cuantificó mediante tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) utilizando un Sistema de Cámara Detectora Dual Vertex ADAC (ADAC Healthcare Information Systems Inc., EE.UU.). Como contraste se utilizó Sestamibi marcado con ^{99m}Tc.

30 Los estudios se realizaron en reposo y bajo sensibilización farmacológica con dosis progresivas de dobutamina intravenosa. La infusión de dobutamina fue interrumpida cuando la frecuencia cardíaca fue al menos 50% superior a los valores basales (reposo).

- 35 Se seleccionaron los individuos que cumplían el criterio de inclusión (hipoperfusión en un territorio compatible con el lecho de la arteria coronaria circunfleja). De los sujetos considerados, veintiséis individuos desarrollaron isquemia miocárdica crónica y fueron seleccionados por satisfacer el criterio de inclusión.

40 Ejemplo 3

Administración de plásmido de VEGF y plásmido placebo

45 Los veintiséis individuos del ejemplo anterior se distribuyeron en dos grupos: A primer grupo que consistió en 16 individuos (Grupo I) y un segundo grupo que consistió en 10 individuos (Grupo II). Los individuos del Grupo I se utilizaron para llevar a cabo estudios histopatológicos y fisiológicos. Los individuos del Grupo II se utilizaron para evaluar la presencia y la expresión del plásmido de VEGF.

50 Los individuos del Grupo I se distribuyeron aleatoriamente en dos subgrupos (Grupo I-T y Grupo I-P) con el mismo número de miembros (4 hembras y 4 machos por cada subgrupo). El grupo tratado se designó Grupo I-T. El grupo de placebo fue designado Grupo I-P.

55 Los individuos del Grupo II fueron divididos aleatoriamente en dos subgrupos (Grupo II-T y Grupo II-P). Ocho individuos se asignaron asignados al Grupo II-T. Dos individuos se asignaron al Grupo II-P. El grupo tratado se designó Grupo II-T. El grupo de placebo se designó Grupo II-P.

Se realizó una reapertura estéril de la toracotomía anterior a cada individuo tanto del Grupo I como del Grupo II (reoperación) bajo anestesia general (inducción: 20 mg/kg de tiopental sódico, mantenimiento: enflurano al 2%).

60 Cada individuo de los Grupos I-T y II-T recibió 10 inyecciones de una solución que contenía plásmido pUVEK15 que codificaba el factor de crecimiento endotelial vascular (1,9 mg de pUVEK15 en 1 ml de solución salina). Cada inyección contenía 200 µl de la solución de plásmido. Cada individuo recibió una dosis total de 3,8 mg del plásmido pUVEK15.

Cada individuo de los Grupos I-P y II-P recibió 10 inyecciones de una solución que contenía plásmido pUVEK15^{-VEGF} sin la región que codifica el factor de crecimiento endotelial vascular (1,9 mg de pUVEK15^{-VEGF} en 1 ml de solución

salina). Cada inyección contenía 200 µl de la solución de plásmido. Cada individuo recibió una dosis total de 3,8 mg del plásmido pUVEK15^{-VEGF}.

5 Cada alícuota se inyecta intramiocárdicamente, partiendo del territorio de la arteria descendente anterior izquierda normoperfundida (2-3 alícuotas) y abarcando las zonas basal y media de la pared anterolateral del ventrículo izquierdo. La zona de inyección incluye la zona hipoperfundida, la zona de transición y el tejido normoperfundido que rodea inmediatamente la zona de transición. Las inyecciones se administran en un ángulo de 45 grados en relación con el plano de la zona de miocardio, evitando la administración intraventricular de la solución. Las inyecciones se distribuyeron homogéneamente en la zona de inyección. La toracotomía fue reparada en cada individuo después de la administración.

Ejemplo 4

Estudios post-tratamiento

15 1. Estudios histopatológicos y fisiológicos

20 Cinco semanas después de la segunda cirugía (reoperación), se realizaron estudios de post-tratamiento en los individuos del Grupo I. Los individuos fueron sedados con suficientes dosis de tiopental sódico por vía intravenosa. Se evaluó para cada individuo la perfusión ventricular izquierda siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 2.

25 Los individuos se sometieron a eutanasia utilizando una sobredosis de tiopental sódico seguido de una inyección letal de cloruro de potasio. El corazón, los riñones, el hígado, los pulmones, los músculos esqueléticos, los ojos y las gónadas fueron extirpados para la evaluación histopatológica, incluyendo determinaciones de la neoangiogénesis y la mitosis. Se realizaron los estudios histopatológicos en tejidos de miocardio y periféricos de acuerdo con los siguientes protocolos.

30 Para los estudios miocárdicos, se retiraron el pericardio, la grasa adherente, las aurículas y la pared libre del ventrículo derecho. En cada animal, la arteria coronaria circunfleja izquierda se examinó en el sitio del Ameroide para evaluar la oclusión. Con posterioridad, el ventrículo izquierdo, incluyendo el septo, se cortó transversalmente a un tercio de la distancia entre el ápice y el anillo mitral. Posteriormente, una sección de 5 mm de espesor se cortó del extremo distal de la tercera parte superior, se enjuagó en solución de Ringer y se fijó plana durante 48 horas en una solución de formaldehído tamponado al 10%. Esta porción fue elegida con el fin de: 1) limitar el análisis a zonas claramente perfundidas por un solo vaso (arteria coronaria descendente anterior, arteria coronaria circunfleja izquierda o arteria coronaria derecha), sin alimentación mixta de más de una arteria, y 2) adaptar la histología a los datos de perfusión.

40 Después de la fijación, la sección se dividió en 6 bloques, correspondiendo, del 1 al 6 a: la mitad posterior del septum, la pared posterior, la pared posterolateral, la pared lateral, la pared anterior y la mitad anterior del septum. Estos 6 bloques se embebieron en Histowax™, y secciones de 5 µm de espesor se montaron en portaobjetos previamente humedecidos en una solución acuosa polilisina 0,01% (Sigma Chemical Co., EE.UU.) y se secó a 37°C. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina. La identificación de los vasos intramiocárdicos se realizó bajo un microscopio óptico. El endotelio fue identificado mediante inmunohistoquímica empleando la técnica de biotina-estreptavidina y un anticuerpo monoclonal contra el factor de von Willebrand. La capa de musculatura lisa fue identificada mediante inmunohistoquímica para evaluar la arteriogénesis. Para este propósito se utilizó un anticuerpo monoclonal contra alfa-actina (Biogenex Labs. Inc., U.S.A.).

50 Para el análisis cuantitativo de la circulación colateral se empleó un sistema de análisis digital (Vidas Kontron, Alemania). El análisis se centró en los vasos de las arteriolas (tamaño de entre 8 y 50 µm de diámetro máximo) con capa de musculatura lisa. El estudio morfométrico se realizó sobre la superficie total de la sección. Se determinó la densidad numérica y lineal de los vasos colaterales. La densidad numérica se calculó como el número de colaterales (n) por milímetro cuadrado (n/mm^2). La densidad lineal colateral (Lc) se calculó con la metodología conocida en la técnica para vasos dispuestos en cualquier variedad de orientación. Véanse Anversa et al., Am. J. Physiol., 260: H1552-H1560 (1991); Adair et al., Am. J. Physiol., 266: H1434-H1438 (1994); Anversa et al., Am. J. Physiol., 267: H1062-H1073 (1994). Para n vasos encontrados en un área A , Lc , expresada en milímetros por unidad de volumen de miocardio (mm/mm^3), es igual a la suma de la razón R del eje largo al corto de cada vaso.

$$Lc = 1 / A \sum_{i=1}^n R_i = (R_1 + R_2 + R_3 + K R_n) / A$$

60 Además, también se analizó la densidad lineal para los vasos intramiocárdicos que oscilan de 8 a 30 micras de diámetro máximo.

Ambos índices numéricos (densidad y longitud) se promediaron para las zonas isquémicas (paredes posterolateral, lateral y antero-lateral) y no isquémicas (pared septal, anterior y posterior).

Para evidenciar cardiomiocitos que experimentan ciclo celular y mitosis, se utilizaron dos técnicas inmunohistoquímicas dobles en las secciones de tejido de los individuos del Grupo I. Se realizaron los siguientes protocolos:

(a) Se incubaron secciones de tejido con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno Ki67 (Novocastra Labs., Reino Unido). El Ki67 es una proteína expresada exclusivamente en el ciclo celular que identifica núcleos que experimentan las fases G1, S y G2-M y decora cromosomas mitóticos condensados. El patrón de expresión de Ki67 no se ve afectado por el deterioro del ADN o por la apoptosis. Véanse Brown et al., *Histopathology.*, 17:489-503 (1990); Gerdes et al., *J. Immunol.*, 133:1710-1715 (1984); Ross et al., *J. Clin. Pathol.*, 48:M113-117 (1995). Con posterioridad, las secciones se post-trataron con un antisuero anti-inmunoglobulina de ratón biotinilado (Biogenex, EE.UU.), seguido de avidina marcada con peroxidasa y revelada con AEC como cromógeno. Después de eso, las secciones se incubaron con un anticuerpo anti- α -actina sarcomérica (Dako, EE.UU.) para identificar las células musculares estriadas. Posteriormente, las secciones se sometieron a post-tratamiento con el antisuero biotinilado seguido de estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (Biogenex, EE. UU.) y Fast Red como cromógeno.

(b) Las secciones de tejido se incubaron con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno Ki67 (Novocastra Labs., Reino Unido). Las secciones se sometieron a post-tratamiento con anticuerpos biotinilados y se revelaron con estreptavidina marcada con fluoresceína (Vector, EE. UU.). Posteriormente, las secciones se incubaron con faloidina marcada con rodamina (Sigma, EE. UU.), una proteína de unión a actina F, con el fin de identificar las células musculares estriadas.

Las secciones de tejido tratadas con avidina marcada con enzima se examinaron con microscopio óptico con óptica Nomarski. Las secciones de tejido teñidas con reaccionantes fluorescentes se examinaron con microscopio confocal (Zeiss, República Federal de Alemania).

La densidad de núcleos de cardiomiocitos (CMN) (CMN por mm^2) se determinó contando el número de CMN en las células orientadas longitudinalmente que contenían α -actina sarcomérica en un área de 5 mm^2 del mesocardio de la pared lateral. El número de CMN positivos para Ki67 y el número de mitosis de cardiomiocitos se determinaron en toda la zona de la sección de tejido ventricular de cada individuo (área escaneada total, "TSA en sus siglas inglesas). El TSA de los individuos del Grupo I promediaron $1345,7 \pm 289,7 \text{ mm}^2$.

El índice de CMN positivos para Ki67 se calculó como: $[\text{núcleos positivos para Ki67}/(\text{TSA} \times \text{densidad CMN})] \times 10^6$. El índice mitótico se calculó como: $[\text{mitosis}/(\text{TSA} \times \text{densidad CMN})] \times 10^6$. Los datos se expresaron como el número de núcleos positivos para Ki67 y el número de mitosis de cardiomiocitos por 10^6 CMN. Ambos índices se promediaron para las zonas isquémica (paredes posterolateral, lateral y antero-lateral) y no isquémica (paredes septal, anterior y posterior) para cada individuo.

Para los estudios periféricos, los tejidos se fijaron en una solución tamponada de formaldehído al 10%, se cortaron en bloques y se incluyeron en parafina Histowax™. Se obtuvieron cortes de tejido de $5 \mu\text{m}$ de espesor a partir de los bloques y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se realizó una evaluación histopatológica de los posibles efectos tóxicos en los tejidos remotos mediante microscopía óptica.

2. Presencia y transcripción de plásmido de VEGF en el tejido miocárdico

Después de la segunda cirugía (reoperación) los individuos del Grupo II fueron sacrificados utilizando una sobredosis de tiopental sódico seguido de una inyección letal de cloruro de potasio, de acuerdo con el siguiente cronograma: 2 individuos de Grupo II-T en el plazo de 3 días después de la reoperación, 2 individuos de Grupo II-T y 2 individuos de Grupo II-P en el plazo de 10 días después de la reoperación, 2 individuos del Grupo II-T en el plazo de 16 días después de la reoperación y 2 individuos del Grupo II-T en el plazo de 35 días después de la reoperación. Se realizaron necropsias en cada individuo sacrificado. El tejido miocárdico de la zona de riesgo se obtuvo de cada individuo.

La evaluación molecular se realizó para detectar la presencia de ADN plasmídico y su transcrito (ARNm). La presencia de ADN plasmídico y ARNm se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), respectivamente. Véanse Mullis, et al., *Meth. Enzymol.*, 55:335-350 (1987); Belyavsky, et al., *Nucleic. Acids Res.*, 17: 2919 (1989).

El ARN total fue aislado de las muestras de tejido utilizando el reactivo Trizol (Gibco BRL Life Technologies, EE.UU.) y se trató con ADNasa I (Promega, EE.UU.). El ARN se cuantificó mediante espectrofotometría a $A_{260/280} \text{ nm}$. Un μg de ARN total se sometió a transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios (Perkin Elmer, EE.UU.). A continuación se amplificó VEGF humano a partir de ADNc utilizando polimerasa Taq (Perkin Elmer, EE.UU.) con los

cebadores oligonucleotídicos 5'CAACATCACCATGCAGATT3' y 5'GCAGGAATTCATCGATTCA3' en condiciones del ciclo de 95°C durante 15 s, 52°C durante 30 segundos y 65°C durante 30 segundos, durante 35 ciclos. La amplificación no competitiva de GAPDH constitutiva se utilizó para demostrar la presencia de ARNm intacto en cada muestra de ARN total. Se realizó una RT-PCR en tejido miocárdico de individuos del Grupo I-T sin transcriptasa inversa para evaluar la posible contaminación con ADN plasmídico o ADN genómico. Los resultados de esta reacción de control fueron negativos, excluyendo la posibilidad de contaminación.

Resultados

1. Análisis histopatológico y fisiológico

Los estudios de perfusión e histopatológicos mostraron formación y el crecimiento vascular en el tejido miocárdico de los individuos tratados. El estudio histopatológico reveló también la inducción de la mitosis en cardiomiocitos, células endoteliales y células de la musculatura lisa de individuos del Grupo I-T.

El índice de tolerancia al estrés y el índice de mejora de la perfusión se determinaron para cada segmento de miocardio de todos los individuos del Grupo I con el fin de evaluar la perfusión del ventrículo izquierdo. Los valores medios de ambos índices se calcularon para la zona de riesgo y el tejido circundante para cada individuo. Por último, se calcularon los valores medios para cada grupo.

El análisis de la perfusión en la zona de riesgo reveló que:

(a) Grupo I-P: ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de tolerancia al estrés de pretratamiento y postratamiento (comparación pareada intra-grupo). Este resultado indica que la tolerancia a la perfusión y al estrés no mejoró en los individuos del Grupo I-P después del tratamiento con placebo.

(b) Grupo I-T: presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los índices de tolerancia al estrés pretratamiento y postratamiento (comparación pareada intra-grupo). El valor medio de post-tratamiento fue significativamente más alto que el valor medio de pre-tratamiento. Este resultado indica que la tolerancia a la perfusión y al estrés mejoró significativamente en los individuos del Grupo I-T después del tratamiento con pUVEK15.

(c) Índices de tolerancia al estrés pre-tratamiento: ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de pre-tratamiento de los individuos del Grupo I-T e individuos del Grupo I-P de (comparación no pareada inter-grupo). Este resultado demuestra que la perfusión fue homogénea para ambos subgrupos antes del tratamiento.

(d) Índices tolerancia al estrés post-tratamiento: presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de post-tratamiento de los individuos del Grupo I-T e individuos del Grupo I-P (comparación no pareada inter-grupo). El valor medio de post-tratamiento del Grupo I-T fue significativamente más alto que el valor medio de post-tratamiento del Grupo I-P. Este resultado indica que la tolerancia a la perfusión y al estrés de los individuos del Grupo I-T fue más alta que en los individuos del Grupo I-P después del tratamiento con pUVEK15.

(e) Índices de mejora de la perfusión: presencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos subgrupos. El valor medio para los individuos del Grupo I-T fue significativamente más alto que el valor medio para los individuos del Grupo I-P (comparación no pareada inter-grupo). Este resultado indica que la perfusión de los individuos del Grupo I-T mejoró notablemente en comparación con la perfusión de los individuos del Grupo I-P. Además, la perfusión en los individuos del grupo I-P mostró una tendencia al deterioro.

El estudio fisiológico demostró una mejora general de la perfusión y la tolerancia al estrés de los individuos del Grupo I-T cuando se trataron con pUVEK15. Véanse Las Tablas 1 y 2; Figs. 1 y 2.

El estudio histopatológico mostró diferencias estadísticamente significativas en la densidad numérica, la densidad lineal y el índice mitótico entre ambos subgrupos (comparaciones no pareadas inter-grupo). Los individuos del Grupo I-T presentaron valores medios más altos para estos índices en comparación con los individuos del Grupo I-P. Véanse las Tablas 3, 4, 5 y 6; Figs. 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

Estos resultados confirmaron la formación neovascular *in vivo* de tejido de miocardio en los individuos tratados con pUVEK15. La formación y el crecimiento vascular implica un aumento del número de células que toman parte de neovasos (células de músculo liso endoteliales y vasculares). Véanse las Figs. 12 y 13. La administración del agente de inducción reforzó la mitosis de las células vasculares en los individuos tratados. El subgrupo de individuos tratados con pUVEK15 también mostró una proporción de cardiomiocitos en proceso mitótico más de 5 veces mayor que en el subgrupo no tratado. Véanse las Figs. 6, 8, 9, 10 y 11; Tabla 6.

La angiogénesis u otros efectos secundarios adversos no se detectaron en los tejidos periféricos de los individuos

tratados con pUVEK15.

2. Presencia y transcripción del plásmido de VEGF

- 5 Los estudios moleculares mostraron la presencia de ADN del plásmido en el tejido miocárdico inyectado de todos los individuos del Grupo II (técnica de PCR). El ADN del plásmido que codifica el VEGF se encontró en el tejido del miocardio inyectado de individuos del Grupo II-T. El ADN del plásmido placebo se encontró en el tejido del miocardio inyectado de los individuos del Grupo II-P.
- 10 Se detectó un producto de RT-PCR positivo para pUVEK15 en el tejido miocárdico inyectado de los individuos del Grupo II-T a los 3 (n = 1/2), 10 (n = 2/2) y 16 (n = 1/2) días post-tratamiento. Véase la Fig. 7. No se detectó producto de RT-PCR para pUVEK15 en el tejido del miocardio inyectado a los 35 días (n = 2) de la inyección de pUVEK15 ni en el tejido de miocardio que recibió plásmido que carecía de gen (Grupo II-P).
- 15 Se obtuvo una curva de transcripción (presencia de ARNm) que mostraba un pico el día 10 después de la inyección de pUVEK15 en los individuos del Grupo II-T. Véase la Fig. 7. La presencia de ARNm en el Grupo II-P fue negativa.

Tabla 1

Índice de tolerancia al estrés					
Pre-tratamiento (1)			Post-tratamiento (2)		
	Media	σ	Media	σ	Valor P (1) vs (2)
Grupo I-P	-0,6	2,2	-1,2	1,3	0,9
Grupo I-T	-3,1	2,2	3,8	1,3	<0,01
Valor P I-T vs I-P	0,42		<0,02		

20

Tabla 2

	Índice de Mejora de la Perfusión	
	Media	σ
Grupo I-P	-0,6	2,6
Grupo I-T	6,9	2,6
Valor P I-T vs I-P	0,058	

Tabla 3

	Índice de Densidad Numérica (8-50 μm)	
	Media	σ
Grupo I-T	1	0,1
Grupo I-P	0,6	0,1
Valor P I-T vs I-P	<0,02	

Tabla 4

	Índice de Densidad Lineal (8-50 μm)	
	Media	σ
Grupo I-T	2,4	0,4
Grupo I-P	1,3	0,3
Valor P I-T vs I-P	<0,02	

25

Tabla 5

	Índice de Densidad Longitud (8-30 μm)	
	Media	σ
Grupo I-T	1	0,1
Grupo I-P	0,6	0,1
Valor <i>P</i> I-T vs I-P	<0,02	

Tabla 6

	Índice Mitótico	
	Media	σ
Grupo I-T	187,1	49,6
Grupo I-P	35,4	9,1
Valor <i>P</i> I-T vs I-P	<0,04	

5

La presente invención se ha descrito con cierto detalle e ilustrado para facilitar su comprensión y reproducibilidad. Cualquier experto en la técnica puede realizar ciertos cambios en la forma y el detalle sin apartarse de la presente invención.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *ex vivo* o *in vitro* para inducir miocardiogenesis que comprende administrar a los cardiomiocitos un vector plasmídico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A).

10 2. Un vector plasmídico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de VEGF-A para su uso en un método de regeneración de tejido miocárdico mediante la inducción de miocardiogenesis en un sujeto mediante la administración a los cardiomiocitos o al miocardio, en donde dicho vector es para la administración a una dosis suficiente para inducir la regeneración del tejido miocárdico por miocardiogenesis.

15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, o un vector plasmídico para uso de acuerdo con la reivindicación 2, para la inducción de mitosis de los cardiomiocitos.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, o un vector plasmídico para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es el SEQ ID NO: 1:

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn
His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val
Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu
Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro
Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser
Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys
Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro
Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His
Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn
Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg
Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys
Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln
Asp	Pro	Gln	Thr	Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys
Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln
Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys
Asp	Lys	Pro	Arg	Arg					

20 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, o un plásmido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la miocardiogenesis comprende la inducción localizada de la regeneración de tejidos.

25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, o un vector plasmídico para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la administración es a un tejido que comprende cardiomiocitos.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, o un vector plasmídico para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los cardiomiocitos son porcinos o humanos.

30 8. Un vector plasmídico para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la inducción es en territorios miocárdicos normoperfundidos, isquémicos o hipoperfundidos.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, o un vector plasmídico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en donde la secuencia de nucleótidos comprende ADN genómico, ADNc o ARN mensajero.
- 5 10. Un método según la reivindicación 1, o un vector plasmídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-9, en donde el vector plasmídico es transportado por un liposoma.
- 10 11. El uso de un vector plasmídico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de VEGF-A para la fabricación de un medicamento para la regeneración de tejido miocárdico mediante miocardiogénesis en un sujeto mediante la administración a los cardiomiocitos o al miocardio, en donde dicho medicamento es para administración en una dosis suficiente para inducir la regeneración de tejido miocárdico mediante miocardiogénesis.
- 15 12. Un uso de acuerdo con la reivindicación 11, o un vector plasmídico para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde el vector o el medicamento se administran mediante administración intracardiaca, que puede comprender administración intra-atrial o intraventricular, o mediante administración intramiocárdica, que puede comprender la administración transepicárdica o transendocárdica.
- 20 13. Un uso de acuerdo con la reivindicación 11 o un vector plasmídico para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el medicamento o vector plasmídico es para la administración mediante inyección intramiocárdica-transepicárdica bajo visualización directa o mediante inyección transendocárdica.
- 25 14. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, o un vector plasmídico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde un sujeto que va a recibir la administración tiene infarto de miocardio, isquemia miocárdica crónica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica o cardiopatía isquémica.
- 30 15. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el sujeto es un ser humano.
- 35 16. Un vector plasmídico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de VEGF-A para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con infarto de miocardio, isquemia miocárdica crónica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica o enfermedades cardíaca isquémica, mediante (induciendo) regeneración de tejido miocárdico por medio de miocardiogénesis mediante la administración a los cardiomiocitos o al miocardio en una dosis suficiente para inducir la regeneración de tejido miocárdico mediante miocardiogénesis.
- 40 17. El uso de un vector plasmídico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el sitio activo de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de VEGF-A en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto con infarto de miocardio, isquemia miocárdica crónica, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica o cardiopatía isquémica mediante la inducción de la regeneración de tejido del miocardio por medio de la administración a los cardiomiocitos o al miocardio en una dosis suficiente para inducir la regeneración de tejido miocárdico mediante miocardiogénesis.

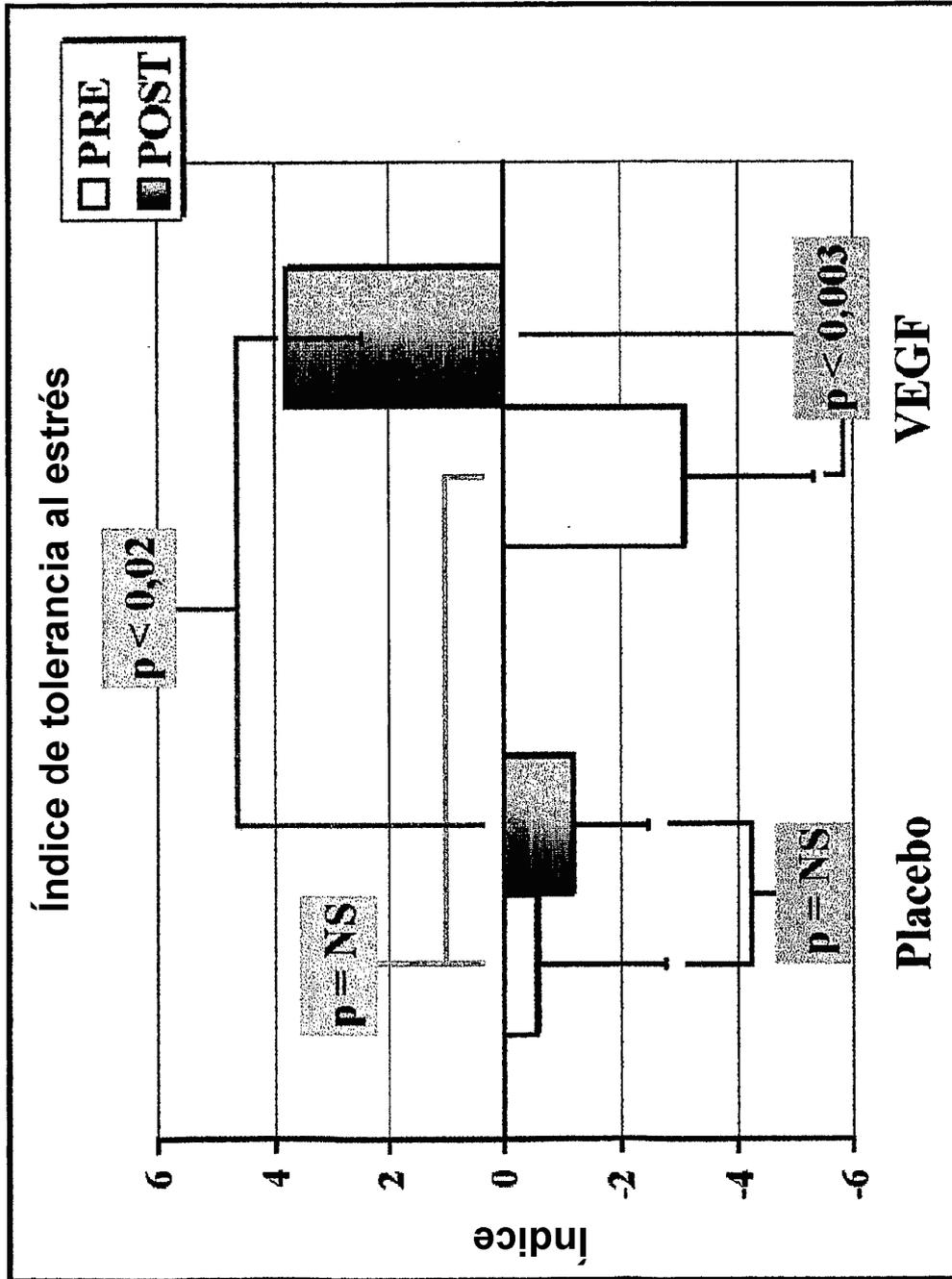


Fig. 1

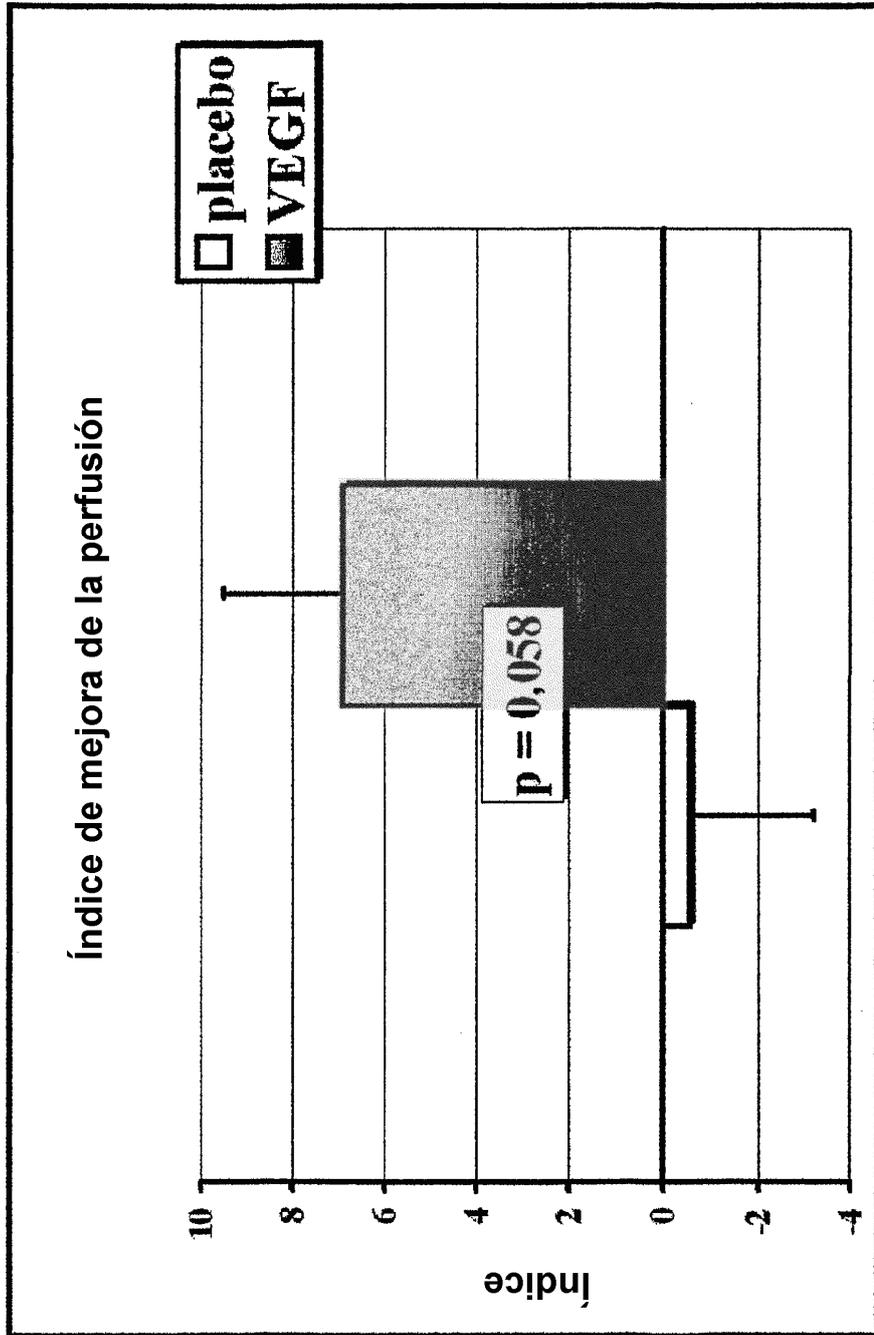


Fig. 2

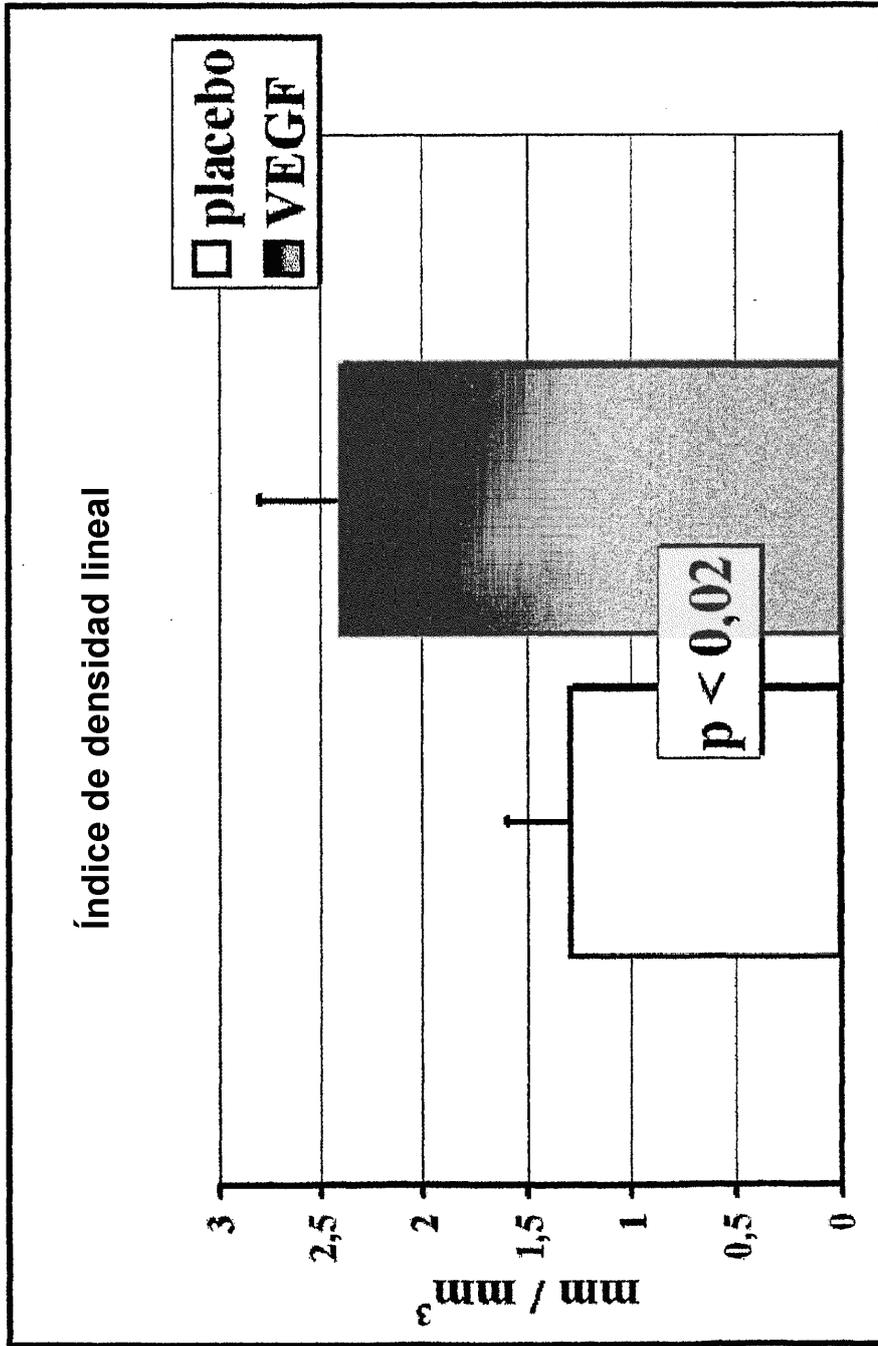


Fig. 3

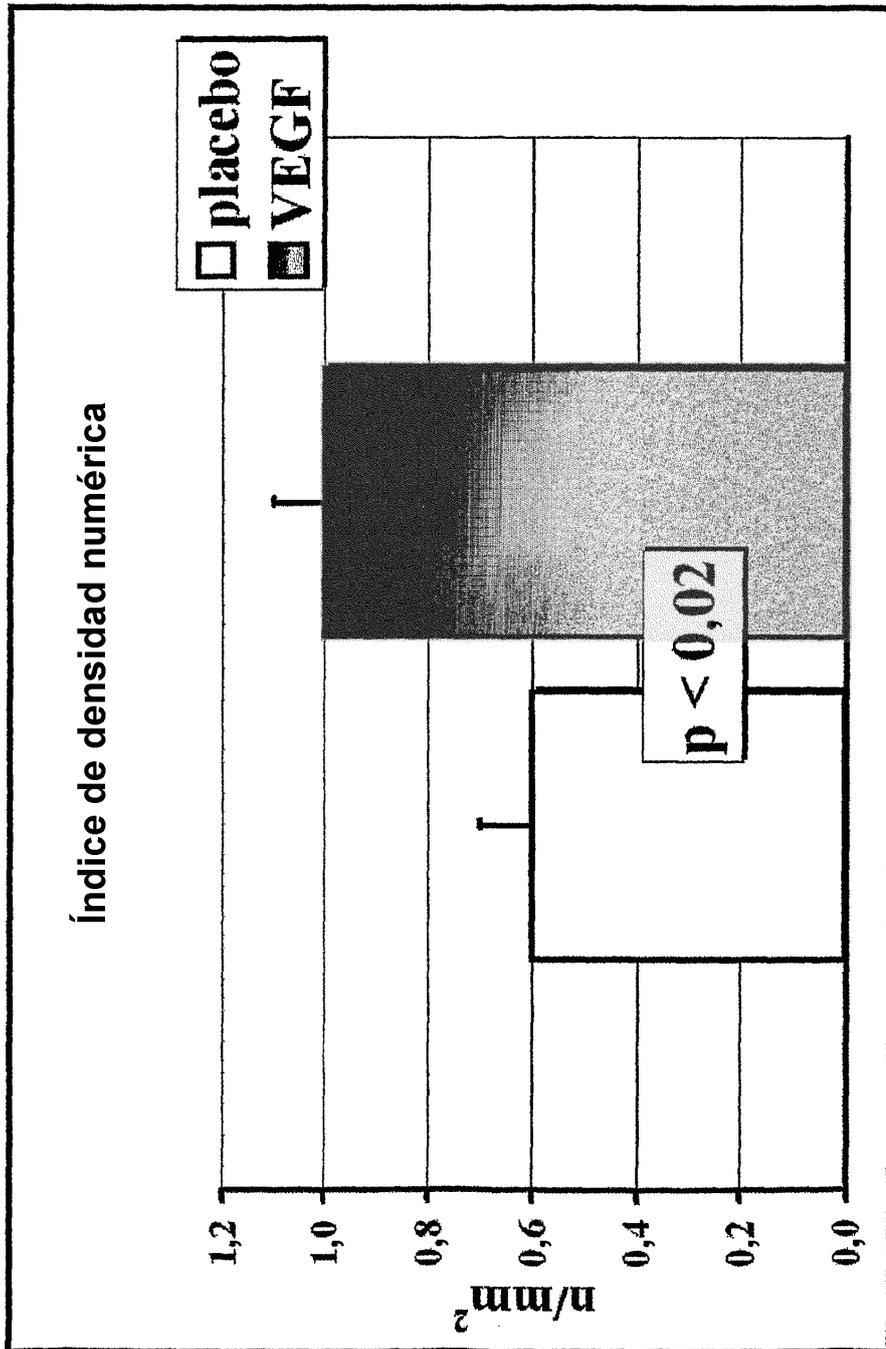


Fig. 4

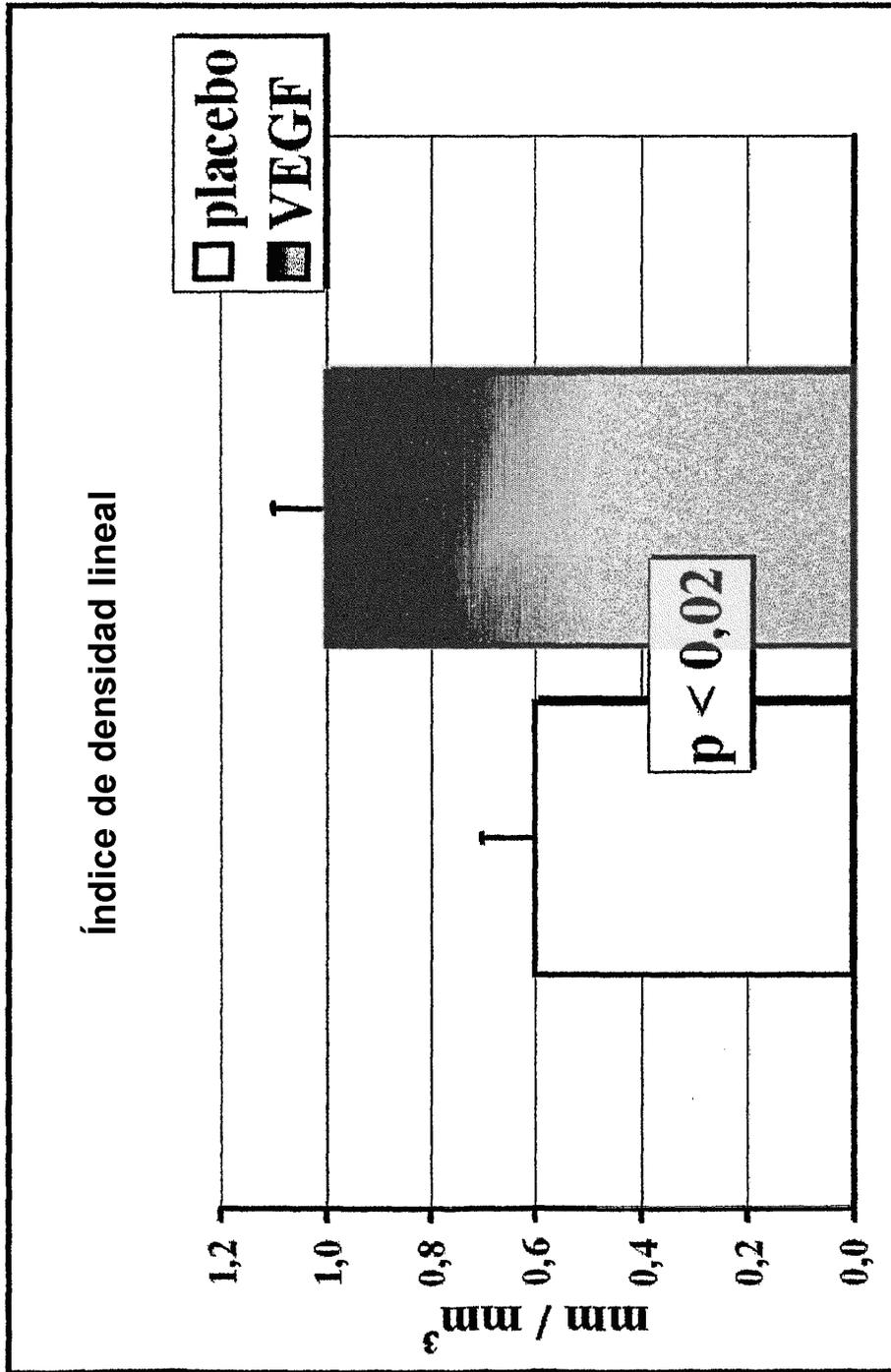


Fig. 5

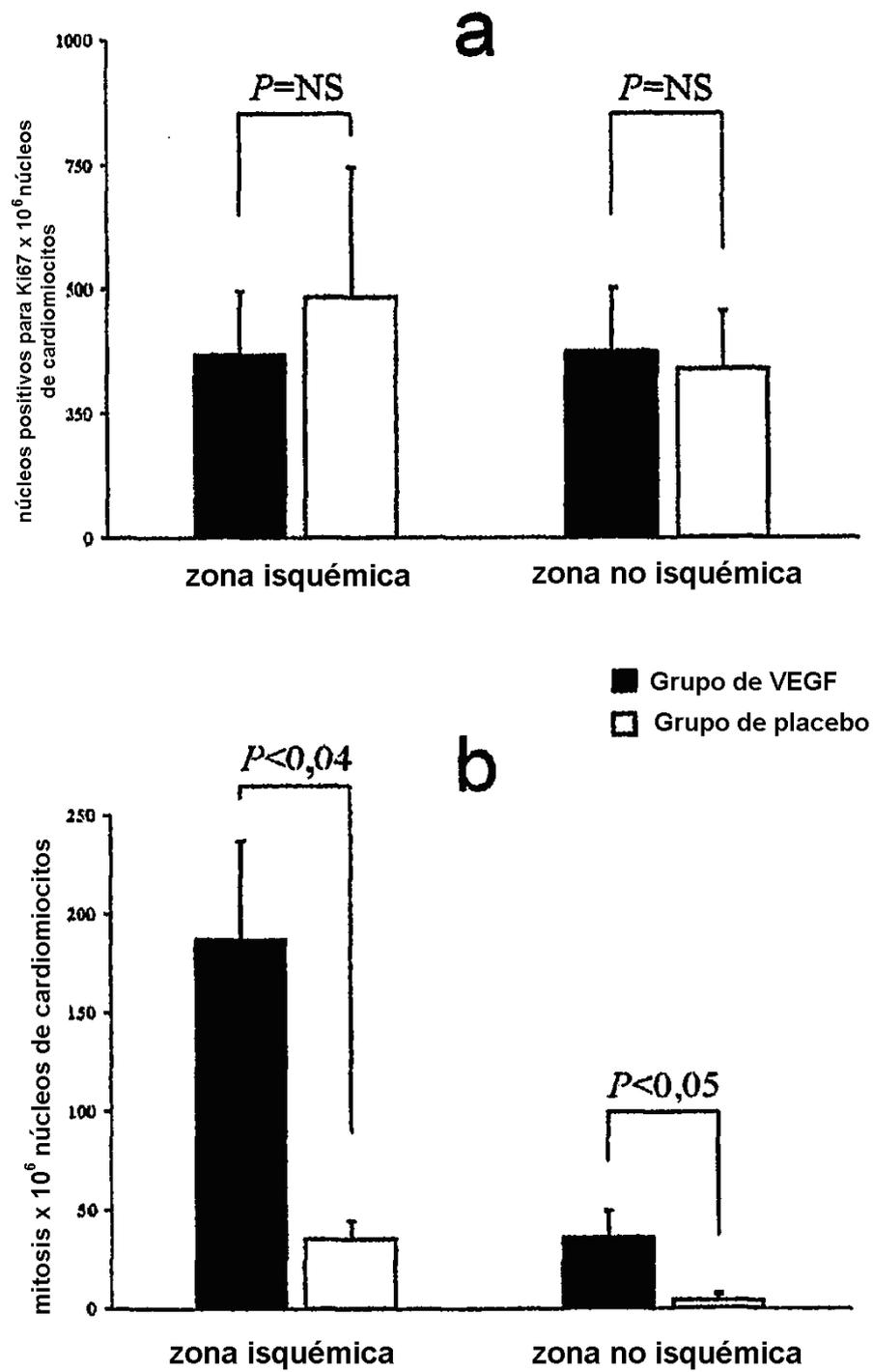


Fig. 6

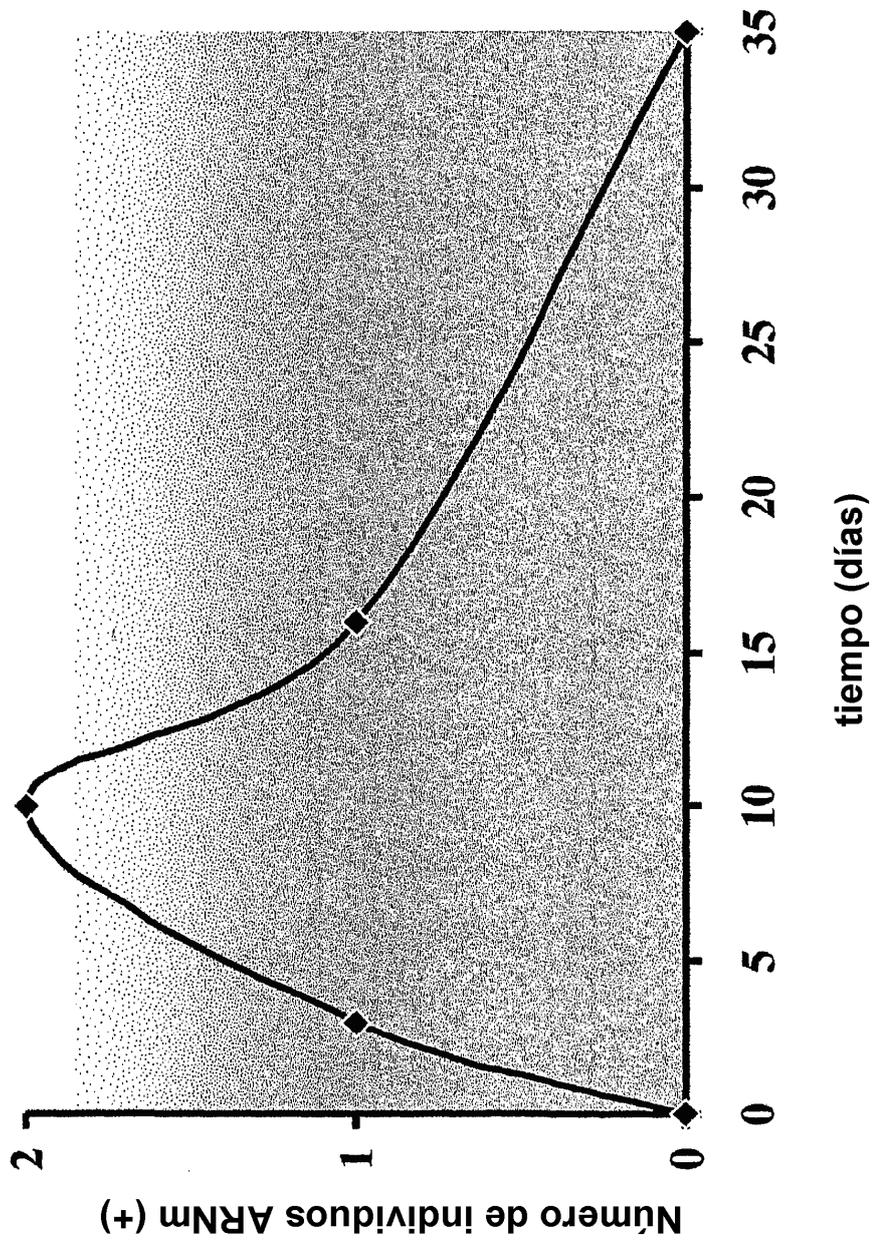


Fig. 7

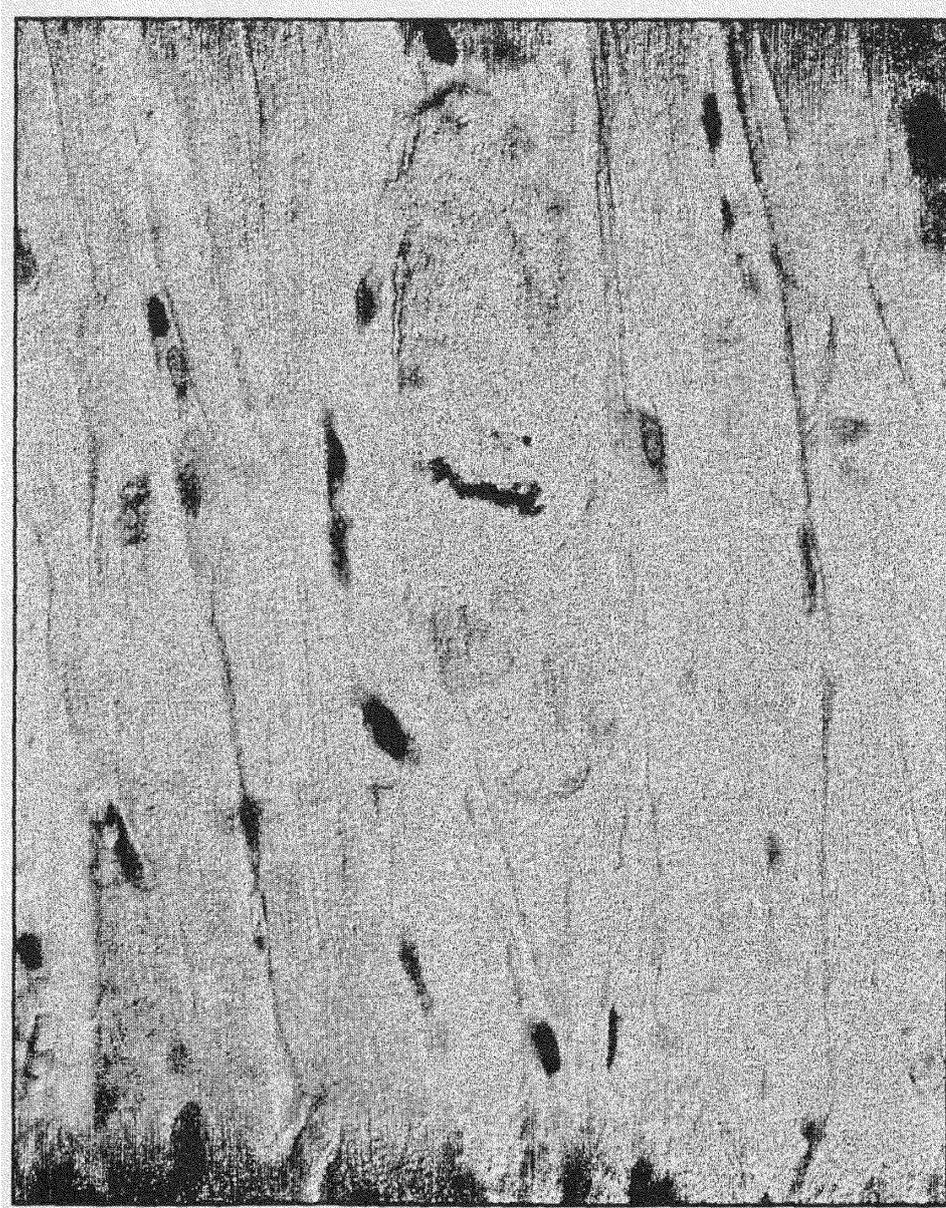


Fig. 8

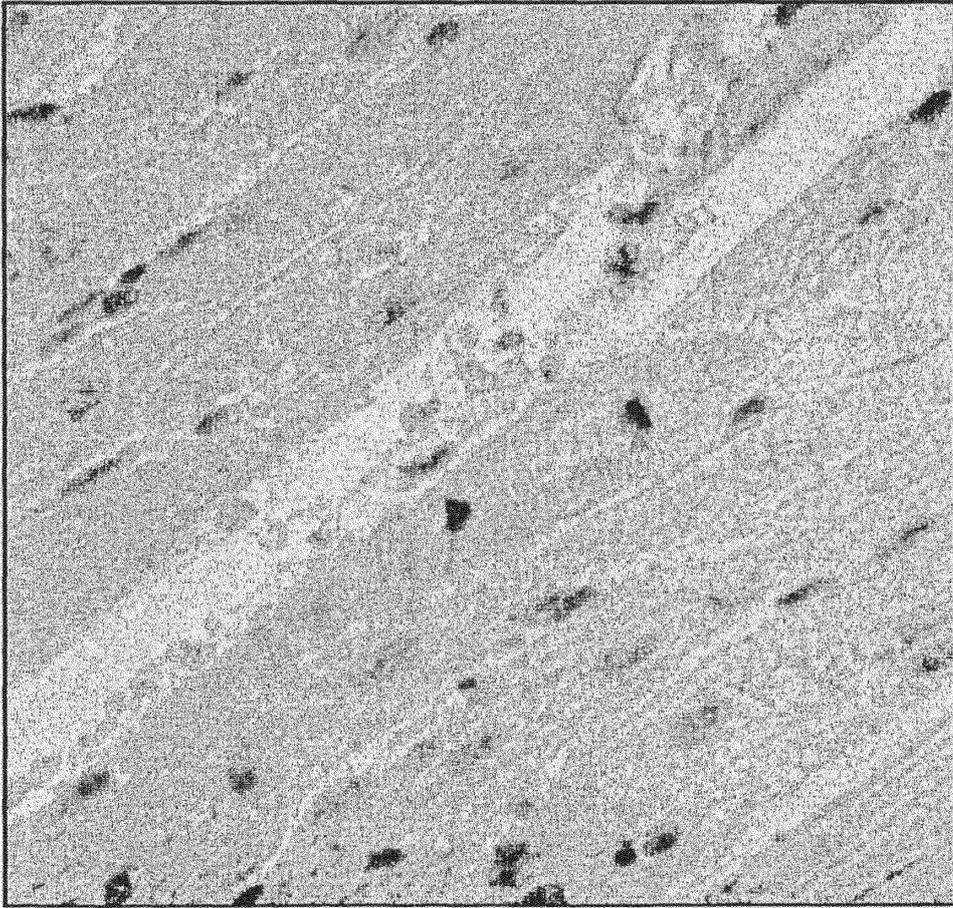


Fig. 9

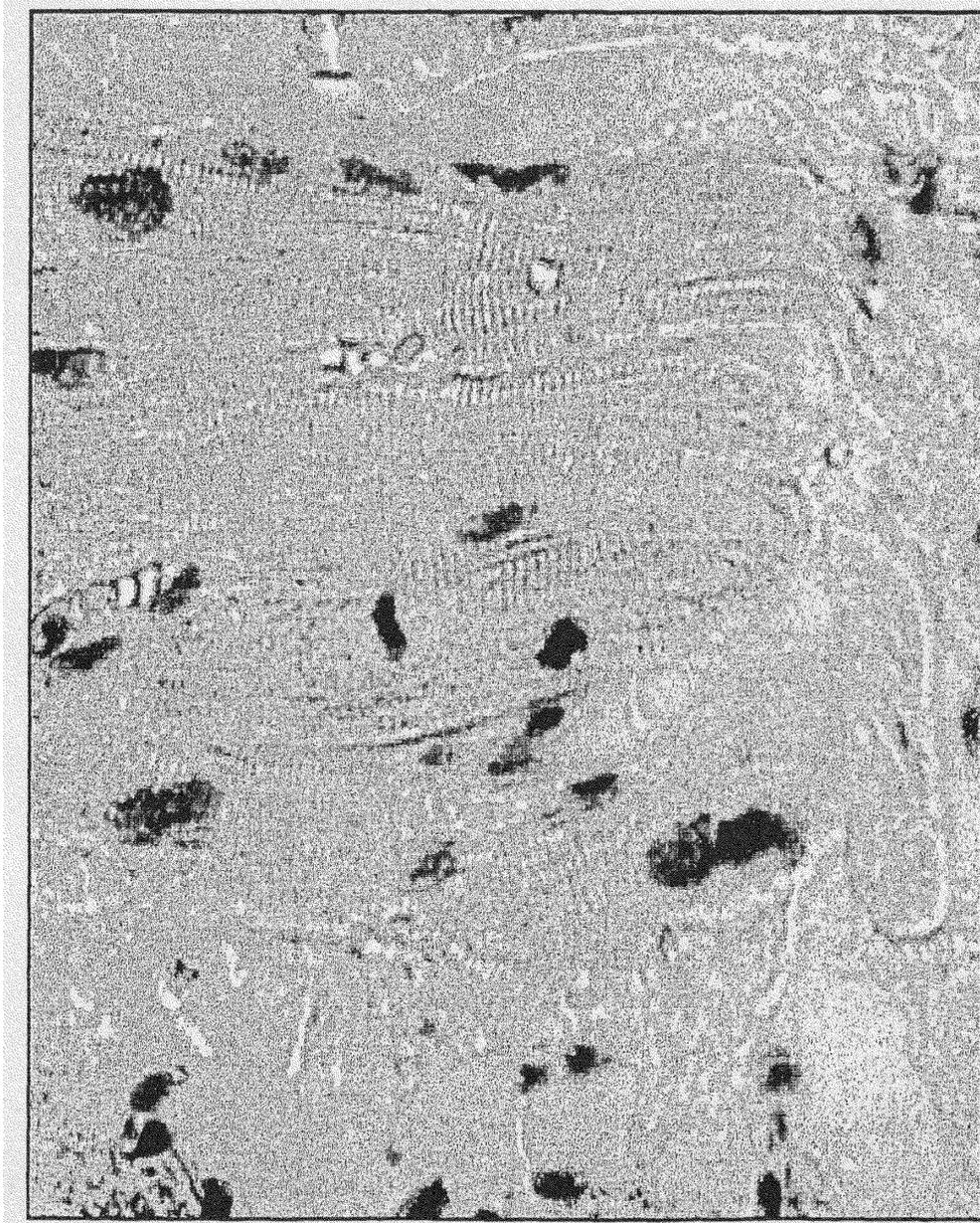


Fig. 10



Fig. 11

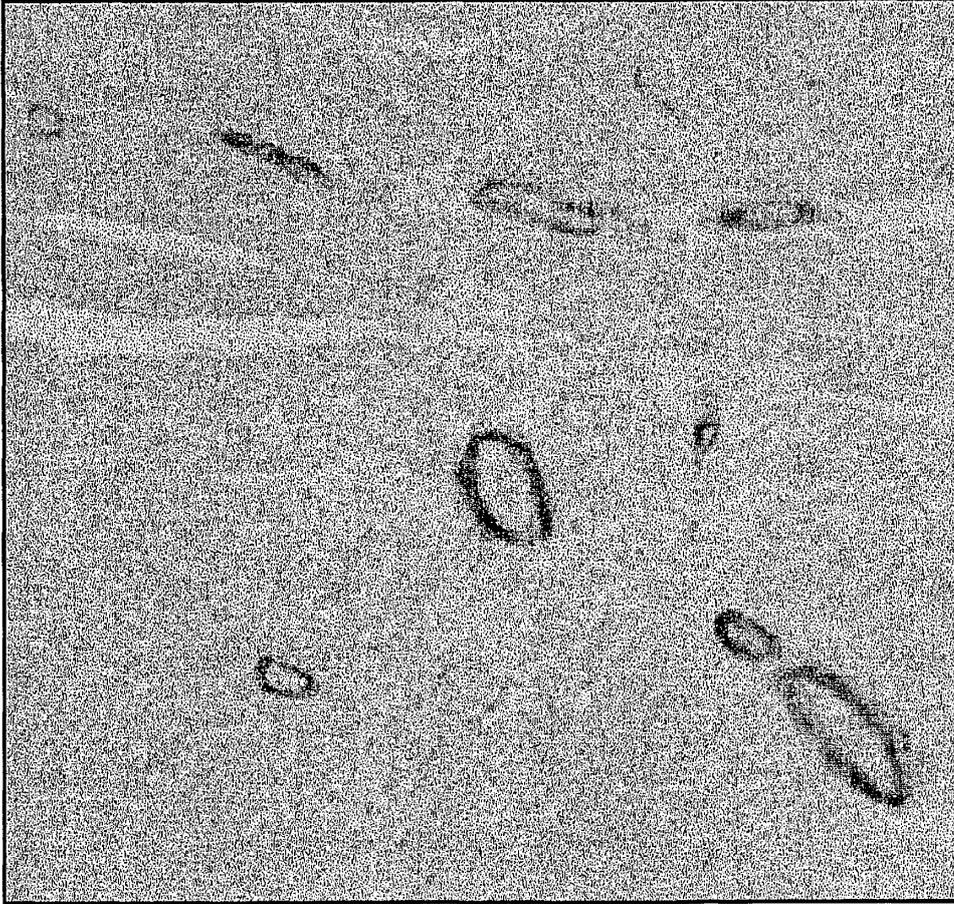


Fig. 12

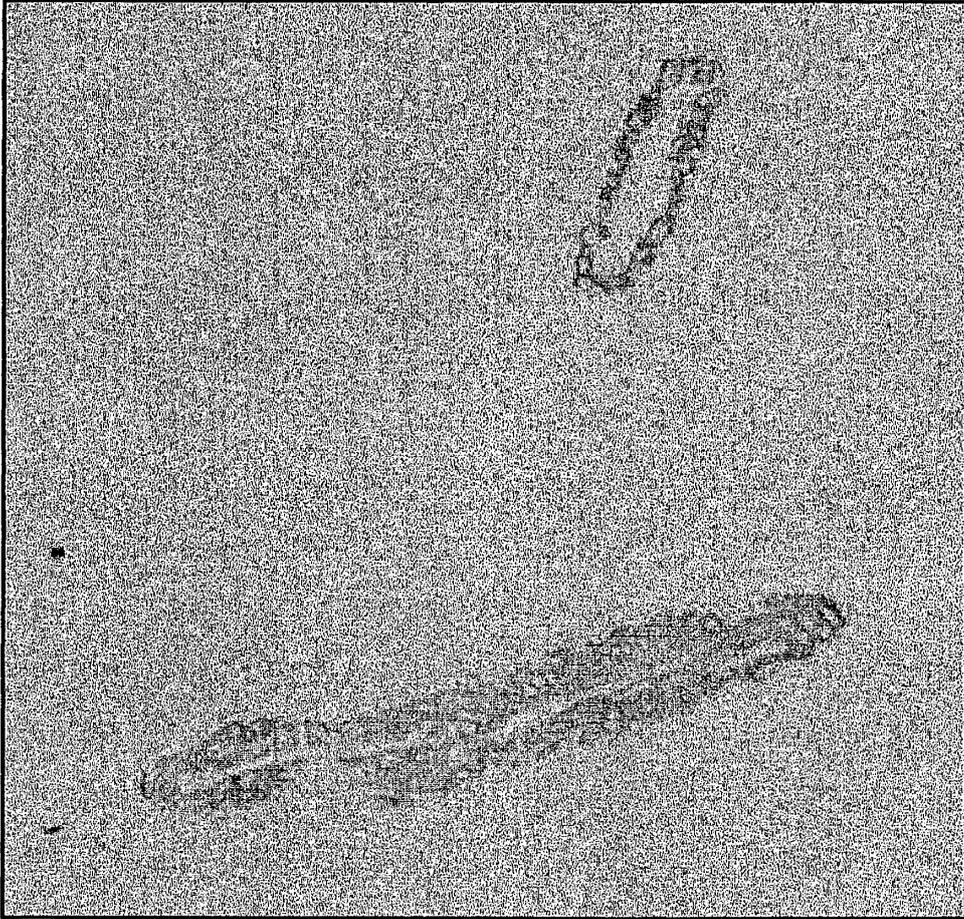


Fig. 13