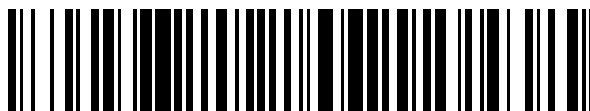


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 806**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/32** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2007 PCT/US2007/001206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2007 WO07084544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2007 E 07716710 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1984017**

54 Título: **Procedimientos para tratar o prevenir el daño tisular causado por aumento de flujo sanguíneo**

30 Prioridad:

**17.01.2006 US 759051 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2017**

73 Titular/es:

**REGENERX BIOPHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
15245 Shady Grove Road, Suite 470  
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**GOLDSTEIN, ALLAN, L. y  
FINKELSTEIN, J.J.**

74 Agente/Representante:

**ARPE FERNÁNDEZ, Manuel**

ES 2 600 806 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

Procedimientos para tratar o prevenir el daño tisular causado por aumento de flujo sanguíneo

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## 1. Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de la prevención de daño tisular causado por un aumento en el flujo sanguíneo.

## 2. Descripción de la técnica anterior

15 **[0002]** Hay una serie de medicamentos, dispositivos y procedimientos médicos que se utilizan para desbloquear o aumentar el flujo sanguíneo a través de las arterias y otros vasos sanguíneos. Sin embargo, la desobstrucción de los vasos sanguíneos a veces permite que una gran cantidad de sangre, que contiene oxígeno, radicales libres y otros productos químicos, se precipiten en un lugar de tejido con un potencial para causar daño a los tejidos.

**[0003]** Sigue habiendo una necesidad en la técnica de procedimientos y composiciones para la prevención de daño tisular causado por un aumento en el flujo sanguíneo.

20 **[0004]** El documento WO 2005/087805 A1 da a conocer un procedimiento de tratamiento para tratar, prevenir, inhibir o reducir la acumulación de matriz extracelular en un tejido del cuerpo o de un vaso de transporte de fluido corporal, en un sujeto, incluyendo el procedimiento de administrar a un sujeto, con necesidad de dicho tratamiento, una cantidad eficaz de una composición que incluye un agente de péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET, una variante conservadora del mismo, o un agente de péptido que estimula la producción de un péptido LKKTET o una variante conservadora de la misma, en el tejido.

## RESUMEN DE LA INVENCION

30 **[0005]** El objeto de la presente invención es un polipéptido para su utilización en un procedimiento para prevenir el daño tisular que ocurre después de producirse un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo que está en comunicación con dicho tejido, y una combinación farmacéutica como se reivindica en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones de la invención se reivindican en las reivindicaciones dependientes respectivas.

35 **[0006]** De acuerdo con la utilización de acuerdo con la presente invención, un procedimiento para prevenir el daño tisular que ocurre con posterioridad a producirse un aumento en el flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo que está en comunicación con dicho tejido, comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un polipéptido de prevención de daño tisular seleccionado del grupo que consiste de timosina beta 4 (Tβ4), un isomorfo de Tβ4, sulfóxido Tβ4, un péptido LKKTET, un péptido LKKTNT, y un péptido de modulación de polimerización de actina. La composición se administra a dicho tejido durante al menos una vez antes, durante o después de que afecte a dicho aumento en el flujo sanguíneo.

## 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 **[0007]** La presente invención se basa en un descubrimiento de que los péptidos tales como timosina β4 (Tβ4) y otros, por ejemplo, actina secuestrante de péptidos o fragmentos de péptidos que pueden contener secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT o variantes conservadoras de la misma (en lo sucesivo a veces referido como un "péptido(s) de prevención o reducción de daño tisular"), que promuevan la curación o la prevención de daños cardíacos, neurológicos u otros daños en los tejidos y otros cambios asociados con un aumento en el flujo sanguíneo. Tal péptidos que previene el daño tisular comprenden, al menos uno de entre, timosina beta 4 (Tβ4), un isomorfo de Tβ4, un fragmento N-terminal de Tβ4, un fragmento C-terminal de Tβ4, sulfóxido Tβ4, un péptido LKKTET, un péptido LKKTNT, una péptido secuestrante de actina, un péptido de unión a actina, un péptido de movilización de actina, un péptido de modulación de polimerización de actina, o una variante conservadora de la misma. Se incluyen fragmentos o variantes terminales N- o C-, que pueden o no incluir LKKTET y LKKTETQ. La Tβ4 se ha sugerido como un factor en la angio-génesis en modelos de roedores. Sin embargo, hasta ahora no ha habido ninguna indicación conocida que tales propiedades pueden ser útiles en el tratamiento de daño tisular

50 causado por un aumento en el flujo sanguíneo. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, estos péptidos pueden tener la capacidad para promover la reparación, la curación y la prevención por tener la capacidad de inducir la desoxinucleotidil transferasa terminal (una plantilla no dirigida de ADN polimerasa), para disminuir y modular los niveles de una o más citocinas o quimiocinas inflamatorias, y para actuar como un quimiotáctica y/o factor angiogénico para células y por lo tanto curar y prevenir el daño tisular causado por un aumento en el flujo

55 sanguíneo. Por lo tanto, el objeto de la presente invención, y reivindicado en el presente documento, son polipéptidos seleccionados del grupo que consiste de timosina beta 4 (Tβ4), un isomorfo de Tβ4, sulfóxido Tβ4, un péptido LKKTET, un péptido LKKTNT y un péptido de modulación de polimerización de actina, para su utilización en un procedimiento para prevenir el daño tisular que ocurre posteriormente a producirse un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo que está en comunicación con dicho tejido.

65 **[0008]** La invención es particularmente útil en conjunción con el utilización de agentes (por ejemplo, medicamentos, dispositivos o procedimientos) utilizados para desatascar o aumentar el flujo sanguíneo a través de las arterias y

otros vasos sanguíneos. Con el fin de prevenir el daño tisular que ocurre posteriormente a producirse un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo que está en comunicación con el tejido, el péptido de prevención de daño tisular puede administrarse antes, durante y/o después de afectar al incremento del flujo sanguíneo.

**[0009]** Agentes que se pueden utilizar para producir un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo incluyen, pero no se limitan a, aspirina, tPA, estreptoquinasa, plasminógeno, agentes anticoagulantes, anistreplasa, reteplasa, tenecteplasa y/o heparina. El péptido de prevención de daño tisular se puede administrar antes, durante y/o después de que el flujo sanguíneo se incremente en conjunción con ellas. Las cantidades de dichos agentes que son eficaces para aumentar el flujo sanguíneo a través de los vasos sanguíneos, se incluyen dentro de la gama de 0,001 a 1,000 mg. La invención también es aplicable a composiciones que comprenden tales agentes de aumento de flujo sanguíneo y un péptido de prevención de daño tisular.

**[0010]** Dispositivos y procedimientos que se pueden utilizar para producir un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo incluyen, pero no se limitan a, estent arteriales, estent venosos, cateterizaciones cardíacas, estent de carótida, estent de aorta, estent pulmonar angioplastia, cirugía de derivación (bypass) y/o neurocirugía. El péptido de prevención de daños tisulares se puede administrar antes, durante y/o después de que el flujo sanguíneo se aumente en conjunción con ellos.

**[0011]** Las indicaciones a las que la invención puede ser de aplicación incluyen, pero no se limitan a, isquemia inducida por trauma, isquemia (neuro o cardio), isquemia inducida por enfermedad, isquemia idiopática y/o accidente cerebro-vascular. El péptido de prevención de daño a tisular se puede administrar antes, durante y/o después de que el flujo sanguíneo aumente en conjunción con ellos.

**[0012]** El péptido de prevención de daño tisular como se describe aquí, puede prevenir y/o limitar la muerte apoptótica del cerebro y de otras células y de tejidos neurovasculares, siguiente al daño isquémico, infeccioso, patológico, tóxico o traumático por aumento de enzimas metabólicas y de señalización tales como la secuencia fosfatidilinositol 3-quinasa(P13-K)/Akt (proteína quinasa  $\beta$ ). Inadecuadas sobrerregulación de P13-K/Akt y fosforilada aguas abajo y prolina rica en quinasa de supervivencia Akt, protege a las células neuronales durante traumas hipóxicos. Además, el péptido de prevención de daño tisular como se describe en el presente documento, en virtud de su capacidad para disminuir las citoquinas inflamatorias tales como IL-18 y quimiocinas tales como IL-8 y las enzimas tales como caspasa 2, 3, 8 y 9 protege las células neuronales y facilitar la curación del tejido nervioso.

**[0013]** El péptido de prevención de daño tisular como se describe en el presente documento, cuando se administra inmediatamente antes de, durante y/o después de la administración de un agente trombolítico como se describe en el presente documento, limitará el daño neuronal debido a un trauma hipóxico induciendo al tejido neuronal a someterse a una forma de hibernación que se caracteriza por la modulación de la secuencia de señalización P13-K/Akt y la disminución de la apoptosis neuronal, y disminución de la actividad de quimiocinas inflamatorias, citoquinas y caspasa.

**[0014]** El péptido de prevención de daño tisular como se describe en el presente documento, previene neurotoxicidad en el cerebro y en la médula espinal después de una lesión isquémica o traumática mediante la prevención de la neurotoxicidad inducida por glutamato. La liberación incontrolada de glutamato, un neurotransmisor excitador, desde el cerebro dañado y los tejidos nerviosos, es un mediador primario de los mecanismos de disfunción mitocondrial y de energía en la célula que da lugar a varias reacciones inflamatorias, señales tróficas alteradas por estrés mecánico y muerte celular y de los tejidos nerviosos afectados.

**[0015]** Como se señaló anteriormente, el péptido de prevención de daño tisular se puede administrar antes, durante y/o después de que se produzca un aumento del flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo que está en comunicación con el tejido. La vías de administración incluyen, pero no se limitan a, parenteral, oral, nasal, pulmonar, intracardiaca, intravenosa, transdérmica y/o liposomal.

**[0016]** La timosina  $\beta 4$  fue identificada inicialmente como una proteína que aumenta durante la migración y diferenciación celular endotelial in vitro. La timosina  $\beta 4$  fue aislada originalmente del timo y es un aminoácido 43, 4,9 kDa de polipéptidos obicuos identificados en una variedad de tejidos. Varias funciones se han atribuido a esta proteína, incluyendo un papel en la diferenciación de células endoteliales y la migración, diferenciación de células T, secuestro de actina y vascularización.

**[0017]** Se describe aquí un procedimiento de tratamiento para promover la curación y la prevención de daño y la inflamación asociada con el daño tisular causado por un aumento del flujo sanguíneo que comprende administrar a un sujeto con necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición que comprende un péptido de prevención del daño que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o una variante conservadora del mismo que tiene una actividad de reducción del daños tisular, preferiblemente timosina  $\beta 4$ , un isomorfo de timosina  $\beta 4$ , o un antagonista de la timosina  $\beta 4$ . El procedimiento también puede utilizar T  $\beta 4$  oxidada.

**[0018]** Las composiciones descritas en este documento incluyen timosina  $\beta 4$  (T $\beta 4$ ), isomorfos de T $\beta 4$ , T $\beta 4$  oxidada, polipéptidos o cualquier otra proteína secuestrante o unión de actina que tiene dominios de unión a actina, o fragmentos de péptidos que pueden o no pueden comprender o consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT o variantes conservadoras de la misma, que tienen la actividad de reducción de daño tisular. La solicitud Internacional PCT/US99/17282, describe isomorfos de T $\beta 4$  que pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención, así como la secuencia de aminoácidos LKKTET y variantes conservadoras de la misma. La solicitud Internacional PCT/GB99/00833 (WO 99/49883), describe timosina oxidada  $\beta 4$  que puede ser utilizada de acuerdo con la presente invención. Aunque la presente invención se describe principalmente en lo sucesivo con respecto a T $\beta 4$  e isomorfos de T $\beta 4$ , se debe entender que la siguiente descripción pretende ser igualmente aplicable a la secuencia de aminoácidos LKKTET, LKKTNT, LKKTETQ, o péptidos KLKKTET y fragmentos que comprende o que consiste esencialmente en LKKTET, o LKKTNT o LKKTETQ o péptidos KLKKTET, así como timosina oxidada  $\beta 4$  y otros péptidos de prevención de daño tisular.

**[0019]** Se describe aquí un procedimiento para la curación y prevención de inflamación y daño en un sujeto contactando el lugar del tejido con una cantidad eficaz de una composición de reducción de daño tisular que contiene T $\beta$ 4 u un isomorfo T $\beta$ 4 u otro péptido de prevención o reducción del daño tisular como se describe aquí. La puesta en contacto puede ser directa o sistémica. Ejemplos de contacto con el lugar dañado incluyen poner en contacto el lugar con una composición que comprende el péptido de prevención o reducción del daño tisular solo, o en combinación con, al menos, un agente que mejora la penetración, o retrasa o libera despacio el péptido de prevención o reducción del daño tisular en la zona a tratar. La administración puede ser directa o por vía sistémica. Los ejemplos de administración incluyen, por ejemplo, aplicación directa, inyección o infusión, con una solución, loción, ungüento, crema gel, pasta pulverizada, suspensión, dispersión, hidrogel, pomada, espuma, aceite o solido que comprende un péptido de prevención o reducción del daño tisular tal como se describe en el presente documento. La administración puede incluir, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o inyecciones subcutáneas, o inhalación, administración transdérmica o oral de una composición que contiene el péptido de prevención o reducción del daño tisular, etc. Esto se aplica igualmente para el polipéptido y la combinación farmacéutica reivindicada aquí. Un sujeto puede ser un mamífero, preferiblemente humano.

**[0020]** El péptido de prevención del daño tisular puede administrarse en cualquier cantidad adecuada para prevenir el daño tisular. Por ejemplo, el péptido de prevención del daño tisular se puede administrar en dosis dentro del rango de alrededor de 0,0001 a 1.000.000 microgramos, más preferiblemente aproximadamente 0,01 a 5.000 microgramos, aún más preferiblemente alrededor 0,1 a 50 microgramos, más preferiblemente en cantidades dentro del intervalo de aproximadamente 1 a 30 microgramos.

**[0021]** Una composición de acuerdo con la presente invención puede administrarse diariamente, cada dos días, etc., con una administración única o múltiples administraciones al día de administración, tanto como las aplicaciones 2, 3, 4 o más veces por día de administración.

**[0022]** Se han identificado isomorfos de T $\beta$ 4 que tienen aproximadamente el 70%, o aproximadamente el 75%, o aproximadamente el 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos conocida de T $\beta$ 4. Tales isomorfos incluyen, por ejemplo, T $\beta$ 4ala, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14 y T $\beta$ 15. Similar a T $\beta$ 4, isomorfos T $\beta$ 10 y T $\beta$ 15 se han demostrado que secuestran actina. T $\beta$ 4, T $\beta$ 10 y T $\beta$ 15, así como estos otros isomorfos comparten una secuencia de aminoácidos, LKKTET o LKKTNT, que parece estar implicada en la mediación de secuestro o unión de actina. Aunque no se desea estar vinculado a ninguna teoría en particular, la actividad de los isomorfos de T $\beta$ 4 puede ser debido, en parte, a la capacidad de regular la polimerización de actina. Las  $\beta$ -timosinas parecen despolimerizar F-actina secuestrando G-actina libre. La capacidad de T $\beta$ 4 para modular la polimerización de actina puede por lo tanto ser debido totalmente, o en parte, a su capacidad para unirse o secuestrar actina mediante la secuencia LKKTET o LKKTNT. Por lo tanto, como con la T $\beta$ 4, otras proteínas de prevención o reducción de daños tisulares que pueden unirse o secuestrar actina o modular la polimerización de actina, incluyendo los isomorfos de T $\beta$ 4 que tienen la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, es probable que sean eficaces, solas o en una combinación con T $\beta$ 4, tal como se expone en el presente documento. Los péptidos específicos que se indican a continuación se usan en realizaciones de la invención.

**[0023]** Por lo tanto, se contempla específicamente que los isomorfos de T $\beta$ 4 conocidos, tales como T $\beta$ 4ala, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14 y T $\beta$ 15, así como isomorfos de T $\beta$ 4 aún sin identificar, serán útiles en la invención. Como tales isomorfos de T $\beta$ 4 son útiles en la invención, incluyendo para la utilización en procedimientos practicados en un sujeto. La invención proporciona por lo tanto además composiciones farmacéuticas que comprenden T $\beta$ 4, así como isomorfos de T $\beta$ 4, T $\beta$ 4ala, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14 y T $\beta$ 15, y un portador farmacológicamente aceptable.

**[0024]** Además, de manera similar en la invención se pueden emplear otras proteínas que pueden modular la polimerización de actina, como se demuestra en un ensayo de polimerización apropiado, o identificado por la presencia de una secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT. Tales proteínas incluyen gelsolina, proteína de unión a vitamina D (DBP), profilina, cofilina, adsevertina, propomyosina, fincilina, depactina, DNaseI, vilina, fragmina, severina, proteínas activadoras por catabolito (capping protein),  $\beta$ -actinina y acumentina. En tanto se utilizan los polipéptidos en procedimientos que incluyen las que se practican en un sujeto, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden gelsolina, proteína de unión a vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, DNaseI, vilina, fragmin, severin, proteínas activadoras por catabolito (capping protein),  $\beta$ -actinina y acumentina como se expone en el presente documento. Por lo tanto, la invención incluye el uso de un polipéptido de prevención de daño tisular que puede comprender la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT (que puede estar dentro de su secuencia primaria de aminoácidos).

**[0025]** Como aquí se utiliza, el término "variante conservadora" o variaciones gramaticales de la misma significan la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, vallina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares.

**[0026]** La T $\beta$ 4 se ha localizado en numerosos tejidos y tipos de células y por lo tanto, los agentes que estimulan la producción de T $\beta$ 4 u otro péptido de prevención o reducción de daño tisular, se pueden añadir a una composición de la divulgación para efectuar la producción del péptido de prevención o reducción de daño tisular a partir de un tejido y/o una célula. Dichos agentes incluyen miembros de la familia de factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), timosina  $\alpha$ 1 (Ta1) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Más preferiblemente, el agente es factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) u otros miembros de la super familia TGF- $\beta$ . Las composiciones

descritas en el presente documento pueden reducir el daño tisular causado por un aumento en el flujo sanguíneo promoviendo el crecimiento del tejido conectivo a través de la deposición de matriz extracelular, migración celular y la vascularización.

**[0027]** De acuerdo con una forma de realización, los sujetos son tratados, además de con el tratamiento con el polipéptido de prevención de daño tisular, con un agente que estimula la producción en el sujeto de un péptido de prevención o reducción de daño tisular como se define aquí.

**[0028]** Adicionalmente, los agentes que ayudan o estimulan la curación del daño tisular causado por un aumento en el flujo sanguíneo, se pueden añadir a una composición junto con el péptido de prevención de daño tisular. Tales agentes incluyen agentes angiogénicos, factores de crecimiento, agentes que dirigen la diferenciación de las células. Por ejemplo, y no a modo de limitación, péptidos de prevención de daño tisular solos o en combinación se pueden añadir en combinación con uno cualquiera o más de los siguientes agentes: VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGF $\beta$ , IGF-1, IGF-2, IL-1, protimolina  $\alpha$  y timosina  $\alpha$ 1 en una cantidad eficaz.

**[0029]** La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido para prevención de daño tisular en un portador farmacológicamente aceptable. Tales portadores incluyen, entre otros, los enumerados en este documento.

**[0030]** La dosificación real, la formulación o composición que cura o previene la inflamación, el daño y la degeneración asociada con daño tisular, causados por un aumento en el flujo sanguíneo pueden depender de muchos factores, incluyendo la talla y la salud de un sujeto. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden usar las enseñanzas que describen los procedimientos y técnicas para determinar las dosificaciones clínicas como se describe en el documento PCT/US99/17282, antes mencionado, y las referencias citadas en el mismo, para determinar la dosificación apropiada a usar.

**[0031]** Las formulaciones adecuadas incluyen un péptido de prevención del daño tisular en una concentración comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,001 a 50% en peso, más preferiblemente comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 0,1% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,05% en peso.

**[0032]** Los enfoques terapéuticos descritos en este documento implican diferentes vías de administración o suministro de reactivos o composiciones que comprenden el compuesto de prevención de daño tisular de la invención, que incluyen cualquier técnica de administración convencional a un sujeto. Los procedimientos descritos y las composiciones que utilizan o que contienen compuestos de prevención de daños tisulares de la invención pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas por mezcla con excipientes no tóxicos o portadores farmacológicamente aceptables.

**[0033]** También se describe aquí la utilización de anticuerpos que interactúan con los péptidos de prevención o reducción del daño tisular o fragmentos funcionales de los mismos. Se proporcionan anticuerpos consistentes esencialmente en anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene fragmentos de la proteína mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica como se describe en el documento PCT/US99/17282, antes mencionado. El término anticuerpo como se utiliza en esta invención, debe entenderse como que incluye anticuerpos monoclonales y policlonales.

**[0034]** Aquí se describe adicionalmente un procedimiento para tratamiento de un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de agente que modula la expresión génica de un péptido de prevención o reducción de daño tisular. El término "modular" se refiere a la inhibición o supresión de la expresión de un péptido de prevención o reducción de daño tisular cuando un péptido de prevención o reducción de daño tisular se encuentra sobre expresado, y la inducción de la expresión cuando un péptido de prevención o reducción de daño tisular está infra expresado. El término "cantidad eficaz" significa la cantidad de agente modulador que es eficaz para modular la expresión génica de un agente un péptido de prevención o reducción de daño tisular, lo que resulta en un tratamiento efectivo. Un agente que modula la expresión de genes de T $\beta$ 4 o un péptido de prevención o reducción de daño tisular, puede ser por ejemplo, un polinucleótido. El polinucleótido puede ser un antisentido, un agente triplex, o una ribozima. Por ejemplo, puede utilizarse un antisentido dirigido a la región del gen estructural o a la región promotora de T $\beta$ 4.

**[0035]** Adicionalmente se describe aquí, un procedimiento para utilización de compuestos que modulan la actividad de un T $\beta$ 4 o un péptido de prevención o reducción de daño tisular. Los compuestos que afectan a la actividad de T $\beta$ 4 o un péptido de prevención o reducción de daño tisular (por ejemplo, antagonistas y agonistas) incluyen péptidos, péptidos miméticos, polipéptidos, compuestos químicos, minerales tales como cinc, y agentes biológicos.

**[0036]** Si estar ligado a ninguna teoría en particular, la curación o prevención de la inflamación o el daño asociado con daño tisular causado por un aumento del flujo sanguíneo puede ser promovida mediante inducción de desoxinucleotidil transferasa terminal (una plantilla no dirigida de ADN polimerasa), para disminuir los niveles de una o más citoquinas o quimiocinas inflamatorias, y para actuar como un factor quimiotáctico para las células endoteliales, y promoviendo así la curación o la prevención de daño tisular causado por un aumento en el flujo sanguíneo u otros factores degenerativos o ambientales. Los siguientes ejemplos ilustran los efectos de T $\beta$ 4.

#### Ejemplo 1

**[0037]** La T $\beta$ 4 sintética y un anticuerpo para T $\beta$ 4 fue proporcionado por RegeneRx Biopharmaceuticals, Inc. (3 Bethesda Metro Center, Suite 700, Bethesda, MD 20814) y se probaron en un ensayo de gel de colágeno para determinar sus efectos sobre la transformación de células endoteliales cardíacas a células mesenquimales. Está bien establecido que el desarrollo de las válvulas del corazón y otros tejidos cardíacos se forman por transformación

epitelial-mesenquimal y que los defectos en este proceso puede causar grave malformación cardiovascular y lesiones durante el desarrollo y durante toda la vida. A concentraciones fisiológicas, la T $\beta$ 4 mejora notablemente la transformación de células endocárdicas a células mesenquimales en el ensayo de gel de colágeno. Además, un anticuerpo para T $\beta$ 4 inhibió y bloqueó esta transformación. Transformación del atrio endocardio ventricular en mesénquima invasiva es un aspecto de la formación y el mantenimiento del tejido cardíaco normal y en la formación de las válvulas del corazón.

## Ejemplo 2

[0038] Las vías reguladoras implicadas en el desarrollo cardíaco pueden tener utilidad en la reprogramación de cardiomiocitos para ayudar en la reparación cardíaca. En los estudios de genes expresados durante la morfogénesis cardíaca, se encontró que el amino ácido péptido timosina  $\beta$ 4 cuarenta y tres se expresó en el corazón en desarrollo. La timosina  $\beta$ 4, tiene numerosas funciones con la más prominente que implica el secuestro de monómeros G-actina y los efectos posteriores en la organización del citoesqueleto de actina necesaria para la motilidad celular, la organogénesis y otros eventos biológicos celulares. Análisis recientes indican que las timosinas  $\beta$ 4 pueden afectar al ensamblaje de actina en función de su afinidad carboxi-terminal para la actina. Además de la motilidad celular, la timosina  $\beta$ 4 puede afectar eventos transcripcionales, influyendo en de la expresión génica Rho-dependientes o eventos de remodelación de la cromatina regulados por actina nuclear.

[0039] Aquí, se muestra que la timosina  $\beta$ 4 puede estimular la migración de los cardiomiocitos y células endoteliales y promover la supervivencia de los cardiomiocitos. El dominio LIM de proteína PINCH y quinasa ligada a la integrina (ILK), ambas de los cuales son necesarios para la migración y la supervivencia celular, forman un complejo con timosina  $\beta$ 4 que resulta en fosforilación quinasa de supervivencia Akt/PKB. La inhibición de la fosforilación de Akt revirtió los efectos de la timosina  $\beta$ 4 en las células cardíacas. El tratamiento de ratones adultos con timosina  $\beta$ 4 después de la ligadura coronaria produjo un aumento de la fosforilación de Akt en el corazón, aumento la supervivencia de los miocitos precoces dentro de veinticuatro horas y la mejora de la función cardíaca. Estos resultados indican que una proteína endógena expresada durante la cardiogénesis puede volver a desplegarse para proteger el miocardio en el marco de los eventos coronarios agudos.

## Resultados

### Expresión del desarrollo de timosina $\beta$ 4

[0040] La expresión de la timosina  $\beta$ 4 en el cerebro en desarrollo se había informado previamente, al igual que la expresión en el sistema cardiovascular, aunque no en detalle significativo. Una hibridación *in situ* de una muestra entera de ARN del día embrionario (E) de 10,5 embriones de ratón reveló expresión de timosina  $\beta$ 4 en el ventrículo izquierdo, la curvatura exterior del ventrículo derecho y el tracto de salida cardíaco. La hibridación radioactiva *in situ* indicó que las transcripciones de timosina  $\beta$ 4, fueron enriquecidas en la región de los precursores de las válvulas cardíacas conocidas como almohadillas endocárdicas. Las células en esta región se derivan de las células endoteliales que se someten a transformación mesenquimal, migran fuera desde el endocardio e invaden una hinchazón de la matriz extracelular que separa el miocardio y el endocardio. Además de las células endocárdicas, un subconjunto de las células del miocardio, migran y pueblan la región almohadilla y este proceso es necesario para la tabicación y remodelación de las cámaras cardíacas. Utilizando inmunohistoquímica, se encontró que las células que expresan timosina  $\beta$ 4 en las almohadillas también expresaron actina de músculo cardíaco, lo que sugiere que la timosina  $\beta$ 4 estaba presente en los cardiomiocitos migratorios que invaden la almohadillas endocárdicas. Finalmente, transcripciones y proteínas de timosina  $\beta$ 4, también se expresaron en E9.5-E11.5 en el tabique ventricular y la región menos diferenciada, más proliferativa del miocardio, conocida como la capa compacta, que migra a la región trabecular en tanto las células maduran. El tracto de salida del miocardio que migra desde el campo del corazón anterior también expresó altos niveles de proteína timosina  $\beta$ 4.

### Timosina $\beta$ 4 secretada supervivencia y migración de células cardíacas estimuladas

[0041] Aunque la timosina  $\beta$ 4 se encuentra en el citosol y en el núcleo y funciones intracelularmente, se encontró que el medio condicionado de Cos 1 células transfectadas con timosina  $\beta$ 4 etiquetada myc, contenían timosina  $\beta$ 4 detectable por Western blot, coherente con los informes anteriores de la secreción de timosina  $\beta$ 4 y presencia en fluido de la herida. Tras la expresión de la timosina  $\beta$ 4 en la superficie de partículas de fago añadidas extracelularmente a explantes cardíacos embrionarios se encontró que un anticuerpo anti-fago recubría la superficie celular y en última instancia, se detectó de forma intracelular en el citosol y en el núcleo, mientras que el fago de control no era detectable. Fueron hechas similares observaciones usando la timosina biotinilada  $\beta$ 4. Estos datos indicaron que la timosina secretada  $\beta$ 4 puede ser internalizada en las células, aunque el mecanismo de entrada celular queda por determinar.

[0042] Para probar los efectos de la timosina secretada  $\beta$ 4 sobre la migración celular cardíaca, se utilizó un sistema de explante de corazón embrionario diseñado para el ensayo de migración celular y eventos de transformación en un gel de colágeno tridimensional. En este ensayo, los explantes de miocardio y de endocardio embrionario adyacentes desde las regiones de formación de la válvula se colocaron en un gel de colágeno con el endocardio adyacente al colágeno. Las señales de los cardiomiocitos inducen la migración de células endocárdicas pero las células del miocardio normalmente no migran al colágeno en número significativo. Por el contrario, tras la adición de

la timosina  $\beta 4$  a los explantes primarios, se observó que un gran número de células cardíacas musculares actina-positivas de latido espontáneo, había migrado lejos del explante. No se observó en estas células en comparación con las células control diferencia significativa en la muerte celular o la tasa de proliferación basada en ensayo de TUNEL o inmunotinción de fosfo-histona H3, respectivamente.

[0043] Para probar la respuesta de los cardiomiocitos postnatales, fueron cultivados cardiomiocitos primarios de ratón neonatal sobre vidrio laminado recubierto y se trataron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o timosina  $\beta 4$ . Similar a los cardiomiocitos embrionarios, se encontró que la distancia migratoria de cardiomiocitos neonatales tratados con timosina  $\beta 4$ -tratada, fue significativamente mayor en comparación con el control ( $p < 0,05$ ). Además de los efectos de la timosina  $\beta 4$  sobre la migración de células del miocardio, se observó un efecto similar sobre la migración endotelial en el explante de corazón embrionario de ensayo. La exposición de los explantes E11.5 a la timosina  $\beta 4$  resultó en un aumento del número de la migración de células endoteliales, en comparación con PBS ( $p < 0,01$ ).

[0044] El cultivo primario de los cardiomiocitos neonatales típicamente sobrevivió durante aproximadamente una a dos semanas con algunas células latiendo hasta dos semanas cuando se cultivan en portaobjetos recubiertos con laminina en nuestro laboratorio. Sorprendentemente, los cardiomiocitos neonatales sobrevivieron significativamente más tiempo cuando se expone a la timosina  $\beta 4$  con miocitos que se contraen rítmicamente visibles hasta por 28 días. Además, la tasa de latidos fue consistentemente más rápido en los cardiomiocitos neonatales tratados con timosina  $\beta 4$  (95 frente a 50 latidos por minuto,  $p < 0,02$ ), lo que indica o bien un cambio en la comunicación célula-célula o cardiomiocitos más vigorosos.

#### **Timosina $\beta 4$ activa ILK y proteína/AK de quinasa B**

[0045] Para investigar los posibles mecanismos a través de los cuales la timosina  $\beta 4$ , podría estar influyendo en los eventos de migración y supervivencia celular, se buscaron las proteínas que interactúan con timosina  $\beta 4$ . El terminal amino de la timosina  $\beta 4$  se fusionó con perlas de affi-gel que resulta en la exposición del terminal carboxi que permite la identificación de proteínas que interactúan previamente desconocidos pero prohibiendo la asociación con actina. Una biblioteca de ADNc de fago de corazón de ratón T7 E9.5-12.5 se sintetizó y se tamizó por presentación de fagos y timosina (34 clones interactuando se enriquecieron y se confirmaron por ELISA. Pinch, una proteína de dominio LIM, fue más consistentemente aislada en esta pantalla e interactuó con timosina  $\beta 4$  en ausencia de actina (ELISA). PINCH y quinasa ligada a integrina (INK) interactúa directamente uno con el otro e indirectamente con el citoesqueleto de actina como parte de un complejo mayor que participan de células en las interacciones de la matriz extracelular conocidas como el complejo de adhesión focal. Se requieren PINCH y ILK para la motilidad celular y para la supervivencia celular, en parte mediante la promoción de la fosforilación de la serina-treonina quinasa Akt/proteína quinasa B, se requiere una quinasa central en la secuencia supervivencia y crecimiento. Los plásmidos que codifican la timosina  $\beta 4$  fueron transfectadas con o sin PINCH o ILK en células cultivadas y se encontró que la timosina  $\beta 4$  co-precipitada con PINCH o ILK independiente. Por otra parte, Pinch, ILK y timosina  $\beta 4$  inmunoprecipitaron consistentemente en un complejo común, aunque la interacción de la ILK con timosina  $\beta 4$  fue más débil que con PINCH. La interacción de PINCH con timosina  $\beta 4$  mapeado en el cuarto y quinto dominio LIM de PINCH mientras que el dominio ankryin amino terminal de INK fue suficiente para que la interacción de timosina  $\beta 4$ .

[0046] Debido a que el reclutamiento de la ILK para el complejo de adhesión focal es importante para su activación, se analizaron los efectos de la timosina  $\beta 4$  en la localización y expresión de ILK. La detección de ILK por inmunocitoquímica se ha mejorado notablemente en los bordes de células después del tratamiento de los explantes cardíacos embrionarios o mioblastos C2C12 con proteína timosina  $\beta 4$  sintética (10 ng/100  $\mu$ l) o timosina  $\beta 4$  expresando plasmida. El análisis de Western indicó un aumento modesto en los niveles de proteína ILK en células C2C12, lo que sugiere que la inmunofluorescencia mejorada puede ser en parte debido a la localización alterada por timosina  $\beta 4$ . Se encontró que tras tratamiento de 12 células C2C con timosina  $\beta 4$ , ILK se activó funcionalmente, demostrado por el aumento de la fosforilación de su conocida sustrato Akt, utilizando un anticuerpo fosfo-específico a serina 473 de Akt, mientras que la proteína Akt total no cambio. Los efectos similares de la timosina  $\beta 4$  administrada extracelularmente y timosina  $\beta 4$  transfectadas fueron consistentes con las observaciones anteriores de la internalización del péptido y sugirieron un papel intracelular en lugar de un papel extracelular en la señalización para timosina  $\beta 4$ . Debido a que la timosina  $\beta 4$  secuestra el grupo de monómeros G-actina, fueron ensayados los efectos sobre la activación de la ILK que dependen del papel de la timosina de  $\beta 4$  en la regulación del equilibrio entre polimerizado F-actina y monomérica Gactin. La polimerización de la F-actina se inhibió mediante transferasa C3 y también fue promovida la formación de F-actina con una Rho activado, pero ninguna intervención afectó a la activación de la ILK observada después del tratamiento de 12 células COS1 o C2C con timosina  $\beta 4$ .

[0047] Para determinar si la activación de la ILK era necesaria para los efectos observados de la timosina  $\beta 4$ , un inhibidor de ILK ampliamente descrito, wortmanina, fue empleado, para inhibir la quinasa aguas arriba de la ILK, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-quinasa). Utilizando la migración de células del miocardio y frecuencia de latido como ensayos para la actividad de timosina  $\beta 4$ , los explantes corazón embrionario, se cultivaron como se ha descrito anteriormente, en presencia de timosina  $\beta 4$  con o sin wortmanina. En consonancia con los efectos de la timosina  $\beta 4$  mediando ILK, se observó una reducción significativa de la migración de células del miocardio y frecuencia cardíaca tras la inhibición de la ILK ( $p < 0,05$ ). En conjunto, estos resultados apoyan una interacción fisiológicamente significativa de la timosina  $\beta 4$ -PINCH-ILK dentro de la célula, y sugirió que este complejo puede mediar algunos de los efectos observados de la timosina  $\beta 4$  relativamente independiente de la polimerización de actina.

## La timosina $\beta 4$ promueve la supervivencia celular después de un infarto de Miocardio y mejora la función cardíaca

[0048] Debido a los efectos de la timosina  $\beta 4$  sobre la supervivencia y la migración de los cardiomiocitos en cultivo *in vitro* y la fosforilación de Akt, se ensayó si la timosina  $\beta 4$  podría ayudar en la reparación cardíaca *in vivo* después de daño de miocárdico. Se crearon infartos de miocardio en cincuenta y ocho ratones adultos mediante ligadura de la arteria coronaria y se trataron la mitad con timosina  $\beta 4$  sistémica, intracardíaca, o timosina  $\beta 4$  sistémica intracardíaca inmediatamente después de la ligadura y la otra mitad con PBS. Se realizaron inyecciones intracardíacas con colágeno (control) o colágeno mezclado con timosina  $\beta 4$ . Todos los cuarenta y cinco ratones que sobrevivieron dos semanas más tarde, fueron examinados para función cardíaca mediante ultrasonografía aleatoria ciega a las 2 y 4 semanas después de un infarto por múltiples mediciones de la contracción cardíaca. Cuatro semanas después de un infarto, los ventrículos izquierdos de los ratones de control tenían una fracción de acortamiento media de  $23,2 \pm 1,2\%$  ( $n = 22$ , 95% intervalo de confianza); en contraste, los ratones tratados con timosina  $\beta 4$  tenían una fracción de acortamiento media de  $37,2 \pm 1,8\%$  ( $n = 23$ , los intervalos de confianza del 95%;  $p < 0,0001$ ). Como una segunda medida de la función ventricular, mediciones de eco-cardiográficas de dos dimensiones revelaron que la fracción media de sangre expulsada desde el ventrículo izquierdo (fracción de eyección) en ratones tratados con timosina  $\beta 4$  fue de  $57,7 \pm 3,2\%$  ( $n = 23$ , 95% de confianza intervalo;  $p < 0,0001$ ) en comparación con una media de  $28,2 \pm 2,5\%$  ( $n = 22$ , 95% intervalo de confianza) en los ratones de control después de la ligadura coronaria. Mas del 60% o el 100% de mejora en la fracción de acortamiento cardíaco o fracción de eyección, respectivamente, sugiere una mejora significativa con la exposición a la timosina  $\beta 4$ , aunque la función cardíaca se mantuvo deprimida en comparación con los animales con operación simulada ( $\sim 60\%$  la fracción de acortamiento;  $\sim 75\%$  fracción de eyección). Por último, la dimensión diastólica final (EDD) y la dimensión sistólica final (ESD) fueron significativamente mayores en el grupo de control, lo que indica que el tratamiento de timosina  $\beta 4$ , dio como resultado una disminución de la dilatación cardíaca después de un infarto, en consonancia con la mejora de la función. Sorprendentemente, el grado de mejora cuando se administró sistémicamente timosina  $\beta 4$  a través de inyecciones intraperitoneales o sólo localmente dentro del infarto de corazón no fue estadísticamente diferente, lo que sugiere que los efectos beneficiosos de la timosina  $\beta 4$  probablemente se produjo a través de un efecto directo sobre las células cardíacas en lugar de a través de una fuente extracardíaca. Se realizaron inyecciones cardíacas de control con el mismo vehículo de colágeno con lo que es poco probable que una reacción endógena a la inyección contribuyera a la recuperación cardíaca.

[0049] Para determinar la forma en que la timosina  $\beta 4$  mejora la función cardíaca, se examinaron varias secciones histológicas seriadas de corazones tratados con o sin timosina  $\beta 4$ . El tricrómico en tres niveles de sección reveló que el tamaño de la cicatriz se redujo en todos los ratones tratados con timosina  $\beta 4$ , pero no fue diferente entre la administración sistémica o local de timosina  $\beta 4$ , consistente con los datos eco-cardiográficos anteriores. La cuantificación del volumen de la cicatriz usando seis niveles de secciones a través del ventrículo izquierdo de un subconjunto de ratones demostró una reducción significativa del volumen de la cicatriz en ratones tratados con timosina  $\beta 4$  ( $p < 0,05$ ). No se detectó la proliferación de cardiomiocitos significativa o incluso la muerte a los tres, seis, once o catorce días después de la ligadura coronaria en corazones tratados con PBS o timosina  $\beta 4$ . Sin embargo, veinticuatro horas después de la ligadura, encontramos una notable disminución en la muerte celular mediante el ensayo de TUNEL (verde) en cardiomiocitos tratados con timosina  $\beta 4$ , confirmado por el doble etiquetado con anticuerpos de músculo-actina (rojo). Células TUNEL positivas que también eran miocitos, fueron poco frecuentes en el grupo de timosina  $\beta 4$  pero abundante en los corazones de control. En consonancia con esta observación, se encontró que el acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo tres días después de un infarto era  $39,2 \pm 2,34\%$  ( $n = 4$ , 95% intervalo de confianza) con tratamiento intracardíaco de timosina  $\beta 4$  en comparación con  $28,8 \pm 2,26\%$  ( $n = 4$ , 95% intervalo de confianza) en los controles ( $p < 0,02$ ); la fracción de eyección fue del  $64,2 \pm 6,69\%$  o  $44,7 \pm 8,4\%$ , respectivamente ( $p < 0,02$ ), lo que sugiere la protección temprana por timosina  $\beta 4$ . Por último, no hubo detección de ninguna diferencia en el número de c-kit, Sca-1 o cardiomiocitos positivos Abcg2 entre corazones tratados y no tratados y el volumen celular de los cardiomiocitos en animales tratados con timosina  $\beta 4$  fue similar a miocitos maduros, lo que sugiere que la mejora inducida por timosina  $\beta 4$  era poco probable que fuera influenciado por el reclutamiento de células madre conocidas en el linaje cardíaco. Por lo tanto, la disminución del volumen de la cicatriz y función conservada en los ratones tratados con timosina  $\beta 4$  eran probablemente debido a la preservación del miocardio después de un infarto a través de los efectos de la timosina  $\beta 4$  sobre la supervivencia de los cardiomiocitos.

[0050] Debido a que la timosina  $\beta 4$  regula al alza la actividad de la ILK y la fosforilación de Akt en células cultivadas, se probaron los efectos sobre estas quinasas *in vivo*. Mediante *Western bolt* se encontró que el nivel de proteína de ILK, se incrementó en lisados de corazón de ratones tratados con timosina  $\beta 4$  después de la ligadura coronaria en comparación con ratones tratados con PBS. En consecuencia, anticuerpos fosfato específicos para Akt-5473 revelaron una elevación en la cantidad de Akt fosforilada-5473 en ratones tratados con timosina  $\beta 4$ , consistentes con los efectos de la timosina  $\beta 4$  en la ILK descrita anteriormente. La proteína total Akt no se incrementó. Estas observaciones *in vivo* fueron consistentes con los efectos de la timosina  $\beta 4$  sobre la migración celular y la supervivencia demostrada *in vitro* y sugieren que la activación de la ILK y la posterior estimulación de la Akt puede explicar en parte la supervivencia mejorada de los cardiomiocitos inducida por timosina  $\beta 4$ , aunque es poco probable que un mecanismo único sea responsable del repertorio completo de los efectos celulares de la timosina  $\beta 4$ .

## Discusión

[0051] La prueba presentada aquí sugiere que la timosina  $\beta 4$ , una proteína implicada en la migración y la supervivencia celular durante la morfogénesis cardíaca, se puede volver a desplegar para minimizar la pérdida de cardiomiocitos después de un infarto cardíaco. Dadas las funciones de PINCH, ILK y Akt, los datos son consistentes con este complejo que juega un papel central en los efectos de la timosina  $\beta 4$  sobre la motilidad celular, la supervivencia y la reparación cardíaca. La capacidad de la timosina  $\beta 4$  para prevenir la muerte celular dentro de las veinticuatro horas después de la ligadura coronaria probablemente conduce a la disminución de volumen de la cicatriz y la función ventricular mejorada observada en los ratones. Aunque la activación de la ILK por timosina  $\beta 4$  es probable que tenga muchos efectos celulares, la activación de Akt puede ser el mecanismo dominante a través del cual la timosina  $\beta 4$  promueve la supervivencia celular. Esto es consistente con el efecto propuesto por Akt en la reparación cardíaca cuando es sobre-expresado en las células madre derivadas de la médula de ratones administradas después de la lesión cardíaca, aunque esto probablemente se produce de una manera autónoma no celular.

[0052] El efecto inicial de la timosina  $\beta 4$  en la protección del corazón de la muerte celular era una reminiscencia de los miocitos que son capaces de sobrevivir al trauma hipóxico por "hibernación". Si bien los mecanismos subyacentes del miocardio hibernado no están claros, las alteraciones en el metabolismo y el consumo de energía parecen promover la supervivencia de las células. Los agentes de inducción, tales como timosina  $\beta 4$ , pueden alterar las propiedades celulares de una manera similar a la hibernación del miocardio, posiblemente permitiendo tiempo para la migración de células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos.

[0053] Aquí, se muestra que el péptido timosina  $\beta 4$  secuestrador de actina G, promueve la migración de las células miocárdicas y endoteliales en el corazón embrionario y conserva esta propiedad en cardiomiocitos postnatales. La supervivencia de los cardiomiocitos embrionarios y postnatales en el cultivo también se ve reforzada por la timosina  $\beta 4$ . Se encontró que la timosina  $\beta 4$  forma un complejo funcional con PINCH y quinasa ligada a integrina (ILK), que resulta en la activación de la quinasa de supervivencia Akt / PKB, que era necesario para efectos de la timosina  $\beta 4$  en cardiomiocitos. Después del ligado de la arteria coronaria en ratones, el tratamiento de timosina  $\beta 4$  resultó en el aumento de la ILK y la actividad de Akt en el corazón, consiguiendo la supervivencia de los miocitos precoces y mejora de la función cardíaca. Estos hallazgos indican que la timosina  $\beta 4$  promueve la migración de los cardiomiocitos, la supervivencia y la reparación y es un nuevo objetivo terapéutico en el entorno de daño agudo de miocardio.

## Procedimientos

### Hibridación de RNA in situ

[0054] La secuencia total o sección de hibridación RNA in situ de embriones de ratón E 9.5-12.5 se realizó con ribosondas antisentido marcadas con digoxigenina o S sintetizados a partir de la región 3'UTR del cDNA del ratón timosina  $\beta 4$  que no comparten homología con la estrechamente relacionada transcripción de la timosina  $\beta 10$ .

### Inmunohistoquímica

[0055] Tejido cardíaco embrionario o adulto fue embebido en parafina y las secciones se utilizaron para inmunohistoquímica. Secciones de corazón embrionarias se incubaron con antithymosin  $\beta 4$  que no reconoce la timosina  $\beta 10$ . Corazones adultos se seccionaron a diez niveles equivalentes desde la base del corazón hasta el ápice. Las secciones seriadas se utilizaron para secciones de tricómico y reacción con aactinin sarcoméricas, c-kit, Sca-1, Abcg2, y anticuerpos BrdU y para el ensayo de TUNEL (Intergen Company # S7111).

### Ensayo de migración de gel de colágeno

[0056] El tracto de salida de embriones de ratón tipo salvaje E11.5 fue diseccionado y se colocaron en matrices de colágeno como se describió anteriormente. Después de 10 horas de fijación explantes se incubaron en 30ng/ 300ml de timosina  $\beta 4$  en PBS, PBS solo o timosina  $\beta 4$  y wortmanina 100 nM. Los cultivos se llevaron a cabo durante 3 a 9 días a 37° C 5% de CO<sub>2</sub> y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a RT. Las células se contaron para la cuantificación de la migración y la distancia utilizando al menos tres explantes separados bajo cada condición para la migración endotelial y ocho explantes separados para la migración de miocardio.

### La inmunocitoquímica en explantes de gel de colágeno

[0057] Explantes con paraformaldehído fijos se permeabilizaron durante 10 minutos a RT con solución de permeabilizar (10 mM PIPES pH 6,8; 50mMNaCl; 0,5% Triton X-100; 300 mM de sacarosa; 3 mM MgCl<sub>2</sub>) y se enjuagó con PBS 2 x 5 min a RT. Después de una serie de pasos de bloqueo y enjuagado, se utilizaron anticuerpos de detección y los explantes se enjuagaron y se incubaron con tampón de equilibrio (kit anti-Fade) 10 min a temperatura ambiente. Los explantes se sacados a un portaobjetos de microscopio de vidrio, cubiertos, y se examinaron por microscopía de fluoresceína. Se realizó ensayo TUNEL utilizando kit de detección ApopTag Plus fluoresceína In Situ Apoptosis (Intergen Company # S7111) como se recomienda.

### Muestra de secuencia de cADN de fago T7 embrionaria

**[0058]** Cantidades iguales de mRNA, se aislaron y purificaron a partir de corazones embrionarios de ratón E09.05-12.05, mediante la utilización de "Straight A's mRNA Isolation System (Novagen, Madison WI)". Se sintetizó ADNc, utilizando el sistema de T7Select10-3 Orientexpress cDNA Random Primer Cloning (Novagen, Madison WI). El vector T7Select10-3 se empleó para mostrar cDNA aleatoriamente cebado en el extremo C-terminal de 5-15 moléculas de fagos moléculas recubierta de proteína 10B. Se indujo la expresión de la segunda proteína de recubrimiento cubierta 10A. Después de digestión EcoRI y Hind III, insertos fueron ligados en T7 select10-3 vector (T7 select System Manual, Novagen). El vector fue empaquetado y la complejidad de la biblioteca era 107. El fago empaquetado se amplificó en una fase de registro de 0,5 L cultivo de la cepa E. Coli BLT5615 a 37°C durante 4 h. El residuo celular se separó por centrifugación y el fago se precipitó con polietilenglicol al 8%. El fago se extrajo del sedimento con 1 M NaCl / Lomm Tris-HCl pH 8,0 / EDTA 1 mM y se purificó por ultra-centrifugación en gradiente de CsCl. Los fagos purificados se dializaron contra PBS y se almacenaron en glicerol al 10% d a -80° C.

### **T7 biopanning fago**

**[0059]** 300 ul de Affi-Gel 15 (Bio-Rad Laboratories) se acopló con 12 ug de proteína sintetizada de timosina  $\beta$ 4 (RegeneRx) siguiendo el manual de los fabricantes, probablemente a través de los residuos terminales amino de la lisina. Después de bloquear con 3% de BSA en PBS durante 1 h, el gel se transfirió a una columna y se lavó con 10 ml de PBS, 2 ml de 1% SDS / PBS y 1 ml de PBS/0,05% de Tween-20 (PBST) x 4.109 de pfu de la secuencia del fago de corazón embrionario T7 (100x de la complejidad) en 500 ul de PBST, se aplicó a la columna y se incubó durante 5 min para alcanzar bajo *biopanning* de baja severidad. Fagos no unidos se lavaron con 50 ml de PBS. Los fagos unidos, se eluyeron en 2,0 ml de 1% SDS. 10 ml de fagos eluidos fueron sometidos a "titer" y el resto de los fagos se amplificaron inmediatamente en 0,5 L de la fase de registro del cultivo BLT5615 E. cultivo Coli hasta la lisis. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación, el lisado sometidos a "titer" y 109 pfu de fagos se utilizaron para la siguiente ronda de *biopanning*. Se realizaron 4 rondas de bioselección y 30 colonias individuales fueron recogidos después de la 2ª 3ª y 4ª ronda antes de la amplificación, respectivamente, para el análisis de secuencias. Las colonias individuales que contienen más de diez aminoácidos se amplificaron y se utilizaron para el ensayo de confirmación ELISA.

### **Ensayo de confirmación ELISA**

**[0060]** Placas MaxiSorp Nunc-Immuno (Nalgene Nunc International) se recubrieron con 1 mg/100 ml de péptido de timosina  $\beta$ 4, sintetizado durante la noche, a continuación se lavaron con PBS y se bloquearon con 3% de BSA. Se añadieron 109 pfu de fago de colonias individuales amplificados en PBST a cada depósito por separado y se incubaron durante 1,5 h a TA. T7 de fago de tipo salvaje se utilizó como control negativo. Los fagos no unidos se eliminaron por lavado con PBS (4 veces), y los fagos unidos se eluyeron mediante la adición de 200 ml de 1% SDS/PBS a los depósitos durante 1 h a TA.

### **Co-immunoprecipitación**

**[0061]** Células Cos y 10T1/2 fueron transfectadas con timosina  $\beta$ 4, PINCH y/o ILK y los lisados se precipitaron con anticuerpos para cada uno como se describió anteriormente. Se realizaron *Western blots* usando el anticuerpo policlonal anti-ILK (Santa Cruz), anticuerpo policlonal anti-timosina  $\beta$ 4 y el anticuerpo anti-myc o anti-FLAG contra versiones etiquetadas de PINCH.

### **Procedimientos quirúrgicos y animales**

**[0062]** El infarto de miocardio se produjo en cincuenta y ocho ratones C57BL / 6J masculinos a las 16 semanas de edad (25 a 30 g) por la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior como se ha descrito anteriormente. Veintinueve de los ratones recibieron tratamiento de timosina  $\beta$ 4 inmediatamente después de la ligadura y los restantes veintinueve recibieron inyecciones de PBS. El tratamiento se administró de forma intracardiaca con timosina  $\beta$ 4 (200 ng en colágeno IOul) o con 10 ul de colágeno; por vía intraperitoneal con timosina  $\alpha$  $\beta$  (150 mg en 300 ml de PBS) o con 3000 de PBS; o por ambas inyecciones intracardiaca y intraperitoneal. Las inyecciones intraperitoneales fueron dadas cada tres días hasta que se sacrificaron los ratones. Las dosis se basan en estudios previos de bio-distribución de timosina  $\beta$ 4. Los corazones se retiraron, se pesaron y se fijaron para el seccionamiento histológico. Ratones adicionales se manejaron de una manera similar para los estudios de 0,5, 1, 3, 6 y 11 días después de la ligadura.

### **Análisis de la función cardíaca mediante ecocardiografía**

**[0063]** Los ecocardiogramas para evaluar la función sistólica se realizaron utilizando el modo M y las mediciones en 2 dimensiones como se ha descrito anteriormente. Las mediciones representan la media de seis ciclos cardíacos seleccionados de, al menos, dos escaneos separados realizados en forma aleatoria ciega con los músculos papilares utilizados como punto de referencia para la coherencia en el nivel de exploración. La diástole final se definió como la dimensión diastólica máxima del ventrículo izquierdo (VI) y la sístole final, se definió como el pico de movimiento de la pared posterior. Los valores extremos individuales de cada grupo se omiten para el análisis

estadístico. Acortamiento fraccional (FS), un sustituto de la función sistólica, se calculó a partir de las dimensiones del VI como sigue:  $FS = EDD - ESD / EDD \times 100\%$ . La fracción de eyección (FE), se calculó a partir de imágenes bidimensionales. EDD, dimensión diastólica final; EDS, dimensión sistólica final.

## 5 Cálculo del volumen de la cicatriz

[0064] El volumen de la cicatriz se calculó utilizando seis secciones a través del corazón de cada ratón, utilizando software Openlab 3,03 (Improvision) similar al descrito anteriormente. El porcentaje de área de la deposición de colágeno se midió para cada sección en forma ciega y se promedió para cada ratón.

## 10 Análisis estadístico

[0065] Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando la prueba t estándar de variables con intervalos de confianza del 95%.

[0066] La timosina  $\beta 4$  promueve la migración de las células endoteliales y miocordiales en el corazón embrionario y conserva esta propiedad en cardiomiocitos postnatales. La supervivencia o cardiomiocitos embrionarios y postnatales en cultivo también fue reforzada por la timosina  $\beta 4$ . La timosina  $\beta 4$ , forma un complejo funcional con PINCH y quinasa ligada integrina (ILK), que resulta en la activación de la quinasa de supervivencia Akt (también conocida como proteína quinasa B). Después de la ligación de la arteria coronaria en ratones, los resultados del tratamiento con timosina  $\beta 4$  en la regulación positiva de la ILK y la actividad de Akt en el corazón, mejora la supervivencia de los miocitos precoces y mejora la función cardíaca. Estos hallazgos indican que la timosina  $\beta 4$  promueve la migración de los cardiomiocitos, la supervivencia y la reparación y de la vía que regula es un nuevo objetivo terapéutico en el entorno de daño agudo de miocardio.

## 25 Ejemplo 3

[0067] La T $\beta 4$  sintética y un anticuerpo para T $\beta 4$  fue proporcionado por Biopharmaceuticals, Inc. (3 Bethesda Metro Center, Suite 700, Bethesda, MD 20814) y se probaron en un ensayo de gel de colágeno para determinar sus efectos sobre la transformación de células endoteliales cardíacas en células mesenquimales. Está bien establecido que el desarrollo de las válvulas del corazón y otros tejidos cardíaco, se forman por transformación epitelial-mesenquimal y que los defectos en este proceso puede causar grave malformación cardiovascular y lesiones durante el desarrollo y durante toda la vida. A concentraciones fisiológicas la T $\beta 4$ , mejora notablemente la transformación de células endocárdicas a células mesenquimales en el ensayo de gel de colágeno. Además, un anticuerpo para T $\beta 4$  inhibe y bloquea esta transformación. La transformación de endocardio atrio-ventricular en mesénquima invasivo es crítico en la formación y mantenimiento del tejido cardíaco normal y en la formación de las válvulas del corazón.

## Ejemplo 4

[0068] Se administró de 0,1ug a 1 ug por kg de peso corporal de timosina B4 (T $\beta 4$ ) por cateterismo cardíaco inmediatamente después de la angioplastia y el paciente recibe entonces 600 ug a TB4 6 mg por vía intravenosa por kg de peso corporal (PC) de dos a cuatro veces por día por un período de hasta siete días. La cantidad y duración del tratamiento depende de la magnitud del daño ventricular tras un infarto agudo de miocardio, medido por la electrocardiografía y la medicina nuclear en el momento de la angiografía y durante la hospitalización inicial del paciente.

## Ejemplo 5

[0069] Se administró de 0,1ug a 1 ug por kg/peso corporal del T $\beta 4$  por cateterización cardíaca inmediatamente después de la angioplastia y/o colocación del estent. Después, el paciente recibió por administración IV 600ug a 6 mg/kg BW de dos a cuatro veces/día durante un periodo de hasta siete días después de un infarto de miocardio. La preservación del músculo cardíaco y la reducción de la restenosis se mide por electrocardiografía y monitoreado por imágenes nucleares u otros procedimientos de diagnóstico.

## 55 Ejemplo 6

[0070] Se administra T $\beta 4$  IV en una dosis de 1 mg a 10 mg/kg de peso corporal/día hasta durante 30 días para reducir la obstrucción coronaria debido a la formación de placa.

## 60 Ejemplo 7

[0071] La timosina beta 4, y otros péptidos de prevención o reducción de daño tisular como se describe aquí, se administran con fármacos, dispositivos y procedimientos utilizados para desatascar o aumentar el flujo sanguíneo a través de arterias y otros vasos sanguíneos, incluyendo la aspirina, tPA, estreptoquinasa, plasminógeno, agentes anti-coagulantes, anistreplase, reteplasa, tenecteplasa, heparina, estent arterial, estent venoso, cateterismos cardíacos, endoprótesis carotídeas, endoprótesis aórticas, endoprótesis vasculares pulmonares, angioplastia, cirugía

de derivación (bypass) y/o neurocirugía. Los polipéptidos de prevención o reducción de daño tisular se administran antes, durante y/o después del aumento del flujo sanguíneo provocado por los medicamentos, dispositivos y procedimientos. Los polipéptidos de prevención o reducción de daño tisular reducen y/o previenen el daño tisular asociado con el aumento en el flujo sanguíneo.

5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido elegido de entre el grupo que consta de timosina beta (T $\beta$ 4), un isomorfo de T $\beta$ 4, sulfóxido de T $\beta$ 4, un péptido LKKTET, un péptido LKKTNT y un péptido modulador de polimerización de actina, para utilización en un procedimiento para prevenir daños tisulares que ocurren subsiguientemente a la afectación de un aumento de flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo en comunicación con dicho tejido.
- 10 2. El polipéptido para la utilización de la reivindicación 1 en el que dicho polipéptido se selecciona de entre el grupo que consta de polipéptidos que comprenden secuencias de ácido amino KLKKTET o LKKTETQ, timosina  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4), un isomorfo de T $\beta$ 4 y T $\beta$ 4 oxidada.
- 15 3. El polipéptido para la utilización de la reivindicación 1 en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste de T $\beta$ 4, T $\beta$ 4ala, T $\beta$ 9, T $\beta$ 10, T $\beta$ 11, T $\beta$ 12, T $\beta$ 13, T $\beta$ 14, T $\beta$ 15, gelsolina, proteína de unión de la vitamina D (DBP), profilina, cofilina, adservertina, propomiosina, fincilina, depactina, Dnasel, vilina, fragmina, severina, proteína activadora por catabolitos,  $\beta$ -actinina o acumentina.
- 20 4. El polipéptido para la utilización de la reivindicación 1 en el que dicho polipéptido es timosina  $\beta$ 4.
5. El polipéptido para la utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido es recombinante o sintético.
- 25 6. El polipéptido para la utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho aumento en el flujo sanguíneo se ve afectado por la administración de, al menos uno, de entre aspirina, tPA, estreptoquinasa, plasminógeno, agentes anticoagulantes, anistreplasa, reteplasa, tenecteplasa o heparina.
- 30 7. El polipéptido para la utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho aumento en el flujo sanguíneo se ve afectado por al menos uno de entre estent arterial, estent venoso, cateterizaciones cardíacas, estent de carótida, estent aórtico, estent pulmonar, angioplastia, cirugía de derivación (bypass) o neurocirugía.
- 35 8. El polipéptido para la utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho daño tisular es daño neurológico.
9. El polipéptido para la utilización de la reivindicación 8, en el que dicho daño es debido a un tratamiento de isquemia inducida por trauma, isquemia inducida por enfermedad, isquemia idiopática o accidente cerebro-vascular.
- 40 10. Una combinación farmacéutica que comprende un polipéptido de prevención de daños en tejidos como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que tiene una actividad de prevención de daños en tejidos, comprendiendo además la combinación, una cantidad efectiva para aumentar el flujo sanguíneo de un agente para aumento del flujo sanguíneo en la que dicho polipéptido y dicho agente para aumento del flujo sanguíneo se puede administrar por separado o de forma conjunta para la utilización como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 11. La combinación de la reivindicación 10 para la utilización como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho agente para aumentar el flujo sanguíneo comprende aspirina, tPA, estreptoquinasa, plasminógeno, agentes anti-coagulación, anistreplasa, reteplase, tenecteplasa, o heparina.
- 50 12. La combinación de la reivindicación 10 para la utilización como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho agente para aumentar el flujo sanguíneo comprende tPA o estreptoquinasa.
13. La combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para la utilización como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho polipéptido es para la administración antes de, durante, o después de la administración de dicho agente para aumentar el flujo sanguíneo a fin de aumentar el flujo sanguíneo.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- WO 2005087805 A1 [0004]
- US 9917282 W [0018] [0030] [0033]
- GB 9900833 W [0018]
- WO 9949883 A [0018]