

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 716**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)
C07K 14/52	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2013 PCT/US2013/068086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 13850199 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2914114**

54 Título: **Acondicionamiento angiogénico para potenciar la reprogramación celular cardiaca de fibroblastos del miocardio infartado**

30 Prioridad:

02.11.2012 US 201261721604 P

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

29.01.2018

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (50.0%)
CCTEC 395 Pine Tree Road Suite 310
Ithaca, NY 14850, US y
THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CRYSTAL, RONALD G.;
ROSENGART, TODD K.;
GERSCH, ROBERT y
MATHISON, MEGUMI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 651 716 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

Acondicionamiento angiogénico para potenciar la reprogramación celular cardiaca de fibroblastos del miocardio infartado

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/721.604, presentada el 2 de noviembre de 2012.

10

Incorporación como referencia de material presentado electrónicamente

Se presenta una secuencia de nucleótidos/aminoácidos legible por ordenador simultáneamente con el presente documento y se identifica tal como sigue: un archivo ASCII (texto) de 1.448 bites denominado "714417SequenceListing.TXT", creado el 1 de noviembre de 2013.

15

Antecedentes de la invención

La arteriopatía coronaria (CAD) sigue siendo la principal causa de muerte en los países occidentales, en parte debido a las opciones todavía limitadas para el tratamiento de CAD difusa, infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca congestiva (Lloyd-Jones *et al.*, *Circulation*, 119(3): 480-486 (2009); Taylor *et al.*, *J. Heart Lung Transplant*, 23(7): 796-803 (2004); Lietz *et al.*, *Circulation*, 116(5): 497-505 (2007); Anyanwu *et al.*, *Brit. Med. J.*, 326(7388): 509-510 (2003)). La terapia con células madres cardiacas se ha adoptado como un nuevo enfoque para el tratamiento de cardiopatía en estadio final que teóricamente repuebla el miocardio de lo contrario cicatrizado permanentemente con células contráctiles (Leor *et al.*, *Circulation*, 94 (supl. 9): II332-II336 (1996); Taylor *et al.*, *Nature Med.*, 4(8): 929-933 (1998); Tomita *et al.*, *Circulation*, 100 (supl. 19): II247-II256 (1999); Orlic *et al.*, *Nature*, 410(6829): 701-704 (5 de abril de 2001); Scorsin *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 119(6): 1169-1175 (2000); Hare *et al.*, *Curr. Opin. Organ Transplant*, 13(5): 536-542 (2008); Rosenzweig, *N. Engl. J. Med.*, 355(12): 1274-1277 (2006); Murry *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(19): 1777-85 (2006); Menasche, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 50(2): 258-265 (2010)). La creación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y la generación de células de tipo cardiomiocitos a partir de iPSC parecen haber representado grandes avances en este campo (Min *et al.*, *J. Appl. Phys.*, 92(1): 288-296 (2002); Takahashi *et al.*, *Cell*, 131(5): 861-872 (2007); Yu *et al.*, *Science*, 318(5858): 1917-1920 (2007); Okita *et al.*, *Nature*, 448(7151): 313-317 (2007); Xu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 106(3): 808-813 (2009); Gai *et al.*, *Cell Biol. Intl.*, 33(11): 1184-1193 (2009); Mauritz *et al.*, *Circulation*, 118(5): 507-517 (2008); Nelson *et al.*, *Circulation*, 120(5): 408-416 (2009); Narazaki *et al.*, *Circulation*, 118(5): 498-506 (2008); Zhang *et al.*, *Circ. Res.*, 104(4): e30-e41 (2009)), pero informes recientes de la inmunogenicidad y tumorigenicidad de iPSC pueden reflejar en última instancia los límites de la aplicabilidad clínica de las iPSC, tal como pueden ser los desafíos logísticos de la administración de iPSC en la práctica clínica (Okita *et al.*, *Circ Res.*, 109(7): 720-721 (2011); Apostolou *et al.*, *Nature*, 474(7350): 165 (2011); Mummery, *N. Engl. J. Med.*, 364(22): 2160-2162 (2011); Zhao *et al.*, *Nature*, 474(7350): 212-214 (2011)).

20

25

30

35

40

El reciente descubrimiento de que podría usarse un trío de factores de transcripción de diferenciación cardiaca para generar cardiomiocitos inducidos (iCM) directamente a partir de células somáticas (Ieda *et al.*, *Cell*, 142(3): 375-386 (2010)) ofrece la nueva posibilidad excitante de generar células autólogas que presentan características que son al menos consecuentes con las de un fenotipo de cardiomiocito (Ieda *et al.*, *Cell*, 142(3): 375-386 (2010); Efe *et al.*, *Nature Cell. Bio.*, 13(3): 215-222 (2011); Qian *et al.*, *Nature*, 485(7400): 593-598 (2012); Passier *et al.*, *Cell Stem Cell*, 7(2): 139-141 (2010); Song *et al.*, *Nature*, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, *Circ. Res.*, 111(1): 5-8 (2012); Jayawardena *et al.*, *Circ. Res.*, 110(11): 1465-1473 (2012); Protze *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 53(3): 323-332 (2012)). Quizá de manera más importante, esta estrategia regenerativa novedosa ofrece la posibilidad fascinante de sortear la estadiación de iPSC y convertir fibroblastos cicatriciales miocárdicos en iCM funcionales *in situ*, transformando potencialmente regiones de infarto de miocardio de nuevo en miocardio funcional (Qian *et al.*, *Nature*, 485(7400): 593-598 (2012); Song *et al.*, *Nature*, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, *Circ. Res.*, 111(1): 5-8 (2012); Jayawardena *et al.*, *Circ. Res.*, 110(11): 1465-1473 (2012)). Sin embargo, informes recientes han proporcionado pruebas contradictorias con respecto a la eficacia potencial de tal regeneración del miocardio *in situ* (Qian *et al.*, *Nature*, 485(7400): 593-598 (2012); Song *et al.*, *Nature*, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, *Circ. Res.*, 111(1): 5-8 (2012); Jayawardena *et al.*, *Circ. Res.*, 110(11): 1465-1473 (2012); Protze *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 53(3): 323-332 (2012); Chen *et al.*, *Circ. Res.*, 111(1): 50-55 (2012)). El documento US 2010/166714 A1 se refiere al aislamiento de células madre cardiovasculares positivas para los marcadores Islet1, NKx2. y flk (VEGF).

45

50

55

60

Por consiguiente, existe la necesidad de métodos adicionales para el tratamiento y la comprensión de la arteriopatía coronaria, incluyendo la generación de células de iCM *in situ*.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona materiales y métodos útiles en el tratamiento y la comprensión de la arteriopatía coronaria. En un aspecto, la invención proporciona materiales para su uso en un método de tratamiento de arteriopatía coronaria administrando vectores virales que codifican para una o más proteínas angiogénicas y uno o más factores

65

de transcripción de diferenciación cardiaca al corazón de un mamífero.

La proteína angiogénica puede ser cualquier proteína implicada en la vascularización, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El factor de transcripción de diferenciación cardiaca puede ser cualquier factor de transcripción implicado en la diferenciación de cardiomiocitos, por ejemplo, Gata4, Mef2c y/o Tbx5.

Los vectores son vectores virales, tales como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores basados en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), vectores basados en virus del herpes simple (VHS), vectores basados en adenovirus, vectores basados en parvovirus (es decir, vectores basados en virus adenoasociado) y vectores quiméricos de VAA-adenovirus. En una realización preferida, el método comprende administrar un vector adenoviral que codifica para VEGF y un vector adenoviral que codifica para Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un conjunto de fotografías que muestran la generación de lentivirus que codifican para factores de transcripción cardiacos individuales. Los lentivirus que codifican para los factores de transcripción Gata4, Mef2c y Tbx5 se prepararon en células de empaquetamiento 293T, y se detectó la expresión de proteínas mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos frente a cada transgén. Se usó un lentivirus que expresaba un gen marcador de proteína fluorescente verde (GFP) como control para estos vectores de expresión, y se usó beta-actina como control de carga.

Las figuras 2A-F son un conjunto de fotografías y gráficos que muestran la generación de iCM *in vitro*. Se cultivaron células de fibroblastos dérmicos de rata (RDF) primarios y se infectaron con un lentivirus de GMT o un lentivirus control de GFP. Catorce días tras la infección, se fijaron las células y se tiñeron para detectar marcadores de cardiomiocitos especificados. La figura 2A es un conjunto de fotografías que se refieren a estudios de inmunofluorescencia. La primera columna representa la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para identificar los núcleos celulares. La segunda columna representa la fluorescencia de GFP para identificar células infectadas por al menos uno de los vectores de lentivirus. La tercera columna representa la tinción de color rojo de marcadores de cardiomiocitos relevantes (primera fila: troponina cardiaca T (cTnT); segunda fila: cadena pesada de miosina 7 (MHY7); tercera fila: actinina sarcomérica α). La cuarta columna representa una fusión de las tres imágenes anteriores. Obsérvese la coincidencia de estos marcadores respectivos y células binucleadas típicas de cardiomiocito, y que las células GFP (-) tampoco pueden expresar los marcadores. RDF sin infectar no expresaban ningún marcador (no mostrado). Todas las fotomicrografías se tomaron a 400X aumentos (barra = 50 μ m). Las figuras 2B-F son un conjunto de gráficos que se refieren al análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se representan gráficos de FACS para la tinción de cTnT: RDF infectados con GMT, que muestran un 7% de expresión de cTnT en células GFPP+P (figura 2B), RDF infectados con lentivirus control de GFP (figura 2C), RDF no infectados (figura 2D), control de cardiomiocito primario (figura 2E) y RDF infectados con GMT, con el uso de un anticuerpo secundario sólo (figura 2F). Los gráficos muestran un mínimo de 5.000 acontecimientos.

La figura 3 es un gráfico que muestra la vascularización del miocardio. La vascularización de regiones de infarto se representa tal como se evalúa determinando el número de vasos por campo microscópico que se tiñen para actina de músculo liso α en secciones obtenidas 7 semanas tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull (n=12/grupo). * p < 0,05.

Las figuras 4A-E son un conjunto de fotografías y gráficos que muestran la densidad de cardiomiocitos en zonas de infarto. Se realizó la tinción con el marcador MYH7 específico de cardiomiocitos de las zonas de infarto y de borde de secciones de miocardio recogidas 7 semanas tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull (4 semanas tras la administración de lentivirus que codifica para GMT o un control de GFP). Las figuras 4A-D son fotomicrografías de secciones representativas de zonas de infarto de animales tratados con AdVEGF-All6AP+P/GMT (fila superior) o /AdNull/GFP (fila inferior) a 100X (izquierda) y 200X (derecha) aumentos, respectivamente. Las barras representan 100 μ m. La figura 4E es un gráfico de la densidad de células con MYH7 como porcentaje de las secciones totales analizadas (n=6/grupo). El grado I/II indica que < 50% de los campos microscópicos examinados estaban ocupados por células MYH7P+P, y el grado III/IV indica que > 50% de los campos microscópicos examinados estaban ocupados por células MYH7P+P (véase la figura 7 para campos microscópicos representativos de cada grado de densidad).

Las figuras 5A-C son un conjunto de gráficos que muestran la extensión de la fibrosis de la pared ventricular izquierda. Se representa el porcentaje de área de pared miocárdica ventricular izquierda que muestra fibrosis tal como se determina mediante tinción tricrómica de secciones de tejido de miocardio recogido 7 semanas tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull (4 semanas tras la administración de lentivirus que codifica para GMT o un control de GFP) en animales. La figura 5A muestra la extensión de la fibrosis en animales que reciben vectores de GMT frente a control de GFP (n=12). * p < 0,01. La figura 5B muestra la extensión de la fibrosis para los cuatro grupos de tratamiento (n=6/grupo). * p < 0,05. La figura 5C muestra el número de miofibroblastos identificados por campo microscópico (200X) en animales que reciben vectores de GMT frente a control de GFP (n=12), tal como se identifican mediante tinción para actina de músculo liso

α ($p = 0,09$).

Las figuras 6A-C son un conjunto de gráficos que muestran el análisis ecocardiográfico de la función ventricular global tras la administración *in vivo* de vectores de AdVEGF-All6AP+P y/o reprogramación celular. Se realizaron estudios ecocardiográficos en los puntos de tiempo especificados antes y tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull a tiempo 0, y después de la administración de lentivirus que codifica para GMT o un control de GFP 3 semanas después ($n=6$). La figura 6A muestra la fracción de eyección global para cada grupo de tratamiento. En el día 49 (prueba de rangos de Kruskal-Wallis; $p < 0,005$): AdVEGF-All6AP+ P/GMTP P frente a AdNull/GFP: $p < 0,05$; AdVEGF-All6AP+P/GMT frente a AdVEGF-All6AP+ P/GFP: $p < 0,05$; AdVEGF-All6AP+ P/GMT frente a AdNull/GMT: $p = 0,08$; AdVEGF-All6AP+ P/GFP frente a AdNull/GFP: $p = 0,86$). La figura 6B muestra el cambio en la fracción de eyección desde el momento de nivel inicial de administración de lentivirus (día 21) hasta el momento de la ecocardiografía de seguimiento 4 semanas después (día 49). Panel superior: animales que reciben vector de GMT frente a control de GFP ($n=12$). * $p < 0,01$. Panel inferior: cada grupo de estudio analizado por separado ($n=6$). * $p < 0,05$. AdVEGF-All6AP+ P/GMT frente a AdVEGF-All6AP+ P/GFP: $p = 0,008$; AdVEGF-All6AP+ P/GMT frente a AdNull/GFP: $p < 0,001$; AdNull/GMT frente a AdNull/GFP: $p = 0,004$. La figura 6C muestra la función de la pared posterior ventricular izquierda. Grosor de la pared posterior ventricular izquierda en la sístole final 7 semanas tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull (4 semanas tras la administración de lentivirus que codifica para GMT o un control de GFP). Las diferencias entre grupos no alcanzaron la significación estadística ($p = 0,09$).

La figura 7 es un conjunto de fotografías que muestran la clasificación de densidad de células con MYH7. Se analizó el número de células MYH7⁺ de una manera semicuantitativa como la densidad de células MYH7⁺ en cinco áreas por portaobjetos observadas a 200X aumentos (en el centro de la zona de infarto, en las áreas del medio entre el centro del infarto y la zona de borde, y en cada zona de borde adyacente al infarto). Un investigador ciego al grupo de tratamiento clasificó estos campos tal como sigue: (parte superior izquierda) grado I: < 25% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; (parte superior derecha) grado II: el 25%-50% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; (parte inferior izquierda) grado III: el 50% -75% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; y (parte inferior derecha) grado IV: >75% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺.

La figura 8 es un conjunto de fotografías que muestran la vascularización del infarto inducida por transferencia mediada por adenovirus de VEGF. Se evaluó la vascularización de las regiones de infarto mediante tinción para actina de músculo liso α en secciones obtenidas 7 semanas tras la ligación coronaria y administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull ($n=12$ /grupo). Las fotomicrografías muestran secciones representativas de zonas de infarto observadas a 200X tras la administración de AdNull/GMT (parte superior) o AdVEGF-All6AP+P/GMT (parte inferior). Las barras representan 100 μm .

La figura 9 es un conjunto de fotografías que muestran la densidad de miofibroblastos tras la administración de GMT. Miofibroblastos identificados mediante tinción de la actina de músculo liso α no vascular de las zonas de infarto y de borde de secciones de miocardio recogidas 7 semanas tras la ligación coronaria y la administración de AdVEGF-All6AP+P o el vector control de AdNull (4 semanas tras la administración de lentivirus que codifica para GMT o un control de GFP). Las fotomicrografías muestran secciones representativas de zonas de infarto observadas a 400X tras la administración de AdNull/GFP (parte superior) o AdVEGF-All6AP+P/GMT (parte inferior). Las barras representan 50 μm .

Las figuras 10A-10B son un conjunto de fotografías (figura 10A) y un gráfico (figura 10B) que muestran la vascularización de la cicatriz tras la administración de AdNull/GFP frente a VEGF/GMT. En la figura 10A, las flechas indican zonas de vascularización. En la figura 10B, el gráfico muestra un número aumentado de vasos/hpf tras la administración de VEGF. * $p < 0,05$, tinción de α SMA.

Las figuras 11A-B son un conjunto de fotografías (figura 11A) y un gráfico (figura 11B) que muestra la densidad de células de iCM (MHC⁺).

Las figuras 12A-B son un conjunto de fotografías (figura 12A) y gráficos (figura 12B) que muestran la extensión de la fibrosis.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa, al menos en parte, en el concepto de que, para lograr una diferenciación cardiaca *in situ* eficaz, la cicatriz miocárdica y el tejido circundante se acondicionan con un gen que codifica para un mediador angiogénico, proporcionando de ese modo vasculatura a una región dañada del corazón que va a someterse a diferenciación cardiaca mediante factores de transcripción relevantes. La isquemia puede afectar de manera adversa a la supervivencia y/o función de iCM en una zona de infarto, puesto que provoca la pérdida de cardiomiocitos nativos e implantes exógenos (de células madre) (Zhang *et al.*, J. Mol. Cell. Cardiol., 33(5): 907-921 (2001); Reinecke *et al.*, Circulation, 100(2): 193-202 (1999); Laflamme *et al.*, Nature Biotechnol., 25(9): 1015-1024 (2007);

Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 133(2): 478-484 (2007)), de manera que una vascularización adecuada de la cicatriz miocárdica vascularización puede ser un componente importante de una estrategia de reprogramación celular *in situ* optimizada (Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 133(2): 478-484 (2007)). El uso de acondicionamiento angiogénico mejora notablemente la eficacia del uso de factores de diferenciación cardíaca para mejorar la función cardíaca tras infarto de miocardio u otra arteriopatía coronaria.

La invención proporciona un método de tratamiento de arteriopatía coronaria en un mamífero, que comprende administrar al corazón del mamífero un primer vector viral que codifica para una o más proteínas angiogénicas que inducen vascularización en el corazón del mamífero, y un segundo vector viral que codifica para uno o más factores de transcripción de diferenciación cardíaca que inducen la producción de cardiomiocitos inducidos (iCM) en el corazón del mamífero, mediante lo cual se trata la arteriopatía coronaria en el mamífero. De manera deseable, los vectores primero y segundo se administran a la misma región del corazón.

El término "arteriopatía coronaria" se refiere a cualquier trastorno o estado que implique a las arterias coronarias. La arteriopatía coronaria puede atribuirse habitualmente a la deposición de placa ateromatosa en las paredes arteriales. El estrechamiento o la oclusión de la luz arterial da como resultado un suministro de oxígeno y nutrientes reducido al corazón. Aunque la oclusión arterial habitualmente avanza lentamente, también es posible el bloqueo súbito de una arteria por un trombo o émbolo. Las manifestaciones de la arteriopatía coronaria incluyen angina de pecho, isquemia, infarto de miocardio, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias y formación de aneurismas.

El término "región del corazón" se refiere a cualquier región del corazón afectada por arteriopatía coronaria. La región del corazón puede incluir las aurículas, los ventrículos y/o los vasos del corazón. La región del corazón puede ser también una región dañada, por ejemplo, por un infarto de miocardio. En este sentido, la región del corazón puede ser una cicatriz miocárdica o región del corazón periinfartada.

El término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero adecuado, incluyendo, pero sin limitarse a, un ratón, una rata, un gato, un perro, una cobaya, un hámster, un conejo, un gato, un perro, un cerdo, una vaca, un caballo, un primate y un ser humano. El mamífero normalmente es un ser humano.

El término "proteína angiogénica" se refiere a una proteína que está implicada en la vascularización. Por ejemplo, la proteína angiogénica puede ser una o más de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (por ejemplo, VEGF-A (120, 164 y 188), VEGF-B, VEGF-C, o VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) (por ejemplo, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, FGF-15, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-19, FGF-20, FGF-21, FGF-22 o FGF-23), PGF (factor de crecimiento placentario), NRP-1 (neuropilina-1), ANG (angiopoyetina) (por ejemplo, ANG-1 o ANG-2), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-BB, o PDGF-AB), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) (por ejemplo, TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3), MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos-1), VE-cadherina (cadherina endotelial vascular), efrina, activador de plasminógeno o inhibidor de activador de plasminógeno, eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial), COX-2 (ciclooxigenasa-2), CD133, MMP (metaloproteinas de la matriz) y DLL44 (ligando de tipo delta 4). La proteína angiogénica puede ser también un receptor para cualquiera de las proteínas angiogénicas mencionadas anteriormente. En una realización preferida, la proteína angiogénica es VEGF.

El término "factor de transcripción de diferenciación cardíaca" se refiere a una proteína, un agente o un factor de transcripción que está implicado en la inducción de diferenciación cardíaca o la producción de iCM, por ejemplo, la producción de iCM a partir de fibroblastos miocárdicos. Por ejemplo, el factor de transcripción de diferenciación cardíaca puede ser uno o más de Hox (proteína de homeodominio sólo), Nkx2-5 (proteína de homeosecuencia Nkx-2.5), Hrt2 (factor de transcripción relacionado con Hairy 2), Pitx2 (factor de transcripción de homeodominio de tipo apareado 2 u homeosecuencia de la hipófisis 2), Smyd1 (proteína que contiene dominio MYND 1), Myocd (miocardina), Baf60c (factor asociado a BRG1/Brm de 60 kDa, subunidad c), Tbx5 (factor de transcripción de caja T 5), Srf (factor de respuesta sérica), Gata4 (factor de transcripción de globina 4), Isl1 (proteína potenciadora del gen de insulina 1), Mef2c (factor potenciador específico de miocitos 2C o factor potenciador de transcripción de caja MADS 2, polipéptido C), Hand2 (proteína expresada en el corazón y derivados de crestas neurales 2) y Mesp1 (homólogo 1 del mesodermo posterior). El factor de transcripción de diferenciación cardíaca puede ser también un receptor para cualquiera de los factores de transcripción de diferenciación cardíaca mencionados anteriormente. En una realización preferida, los factores de transcripción de diferenciación cardíaca son la combinación de Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT).

El término "vector" se refiere a cualquier vehículo usado para transferir material genético a una célula diana. La divulgación proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una o más proteínas angiogénicas y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para uno o más factores de transcripción de diferenciación cardíaca. Los vectores pueden ser vectores no virales, incluyendo, por ejemplo, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros y nanopartículas. El primer vector y el segundo vector son vectores

virales, incluyendo, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores basados en virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), vectores basados en virus del herpes simple (VHS), vectores basados en adenovirus, vectores basados en parvovirus (es decir, vectores basados en virus adenoasociado) y vectores quiméricos de VAA-adenovirus. Estos vectores de transferencia génica pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (1994).

Un retrovirus es un virus de ARN que puede infectar a una amplia variedad de células huésped. Tras la infección, el genoma retroviral se integra en el genoma de su célula huésped y se replica junto con el ADN de la célula huésped, produciendo de ese modo de manera constante ARN viral y cualquier secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma retroviral. Cuando se emplean retrovirus patógenos, por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus linfotróficos de células T humanas (VLTH), debe tenerse cuidado en la alteración del genoma viral para eliminar la toxicidad. Un vector retroviral puede manipularse adicionalmente para hacer que el virus sea de replicación incompetente. Como tales, se considera que los vectores retrovirales son particularmente útiles para la transferencia génica estable *in vivo*.

Los vectores lentivirales, tales como vectores basados en VIH, son a modo de ejemplo de vectores retrovirales usados para suministro génico. A diferencia de otros retrovirus, se sabe que los vectores lentivirales incorporan sus genes pasajeros en células que no se dividen, lo que hace que estos vectores lentivirales sean particularmente útiles en terapia génica. Los lentivirus se componen de dos copias de ARN, una cápside nuclear (NC), una cápside (CA), una matriz asociada a la membrana (MA), proteínas de la envuelta tales como glicoproteínas de superficie (SU) y proteínas transmembrana (TM), y enzimas tales como integrasa (EN), proteasa (PR) y transcriptasa inversa (RT), y proteínas auxiliares. Los vectores lentivirales se basan en la separación física en diferentes plásmidos de las proteínas requeridas para la formación de partículas de virus y la infectividad (los constructos de empaquetamiento y de la envuelta) y de secuencias de actuación en cis suficientes para movilizar el genoma viral (el vector de transferencia). Este último constituye el núcleo del vector, que es un genoma miniviral que carece de marcos de lectura abiertos (ORF) virales, pero que porta un casete de expresión para el transgén de interés. Como consecuencia de la delección de los ORF virales del vector de transferencia, los viriones pueden experimentar una única ronda de infección al final de la cual el ADN proviral expresa sólo el transgén de interés (Durand *et al.*, Viruses, 3(2): 132-159 (2011)).

Los vectores virales basados en VHS son adecuados para su uso como vector de transferencia génica para introducir ácidos nucleicos en neuronas u otros tejidos. El virión de VHS maduro consiste en una cápside icosaédrica con envuelta con un genoma viral que consiste en una molécula de ADN bicatenario lineal que tiene 152 kb. La mayoría de los vectores de VHS de replicación deficiente contienen una delección para eliminar uno o más genes intermedios-tempranos para impedir la replicación. Las ventajas del vector de herpes son su capacidad para entrar en un estadio latente que puede dar como resultado expresión de ADN a largo plazo y su genoma de ADN viral grande puede alojar ADN exógeno de hasta 25 kb.

El adenovirus (Ad) es un virus de ADN bicatenario de 36 kb que transfiere eficazmente ADN *in vivo* a una variedad de tipos de células diana diferentes. Para su uso en los métodos de la invención, el virus se hace preferiblemente de replicación deficiente delecionando genes seleccionados para replicación viral, tales como, por ejemplo, todo o porciones de las regiones E1, E2 y/o E4. La región E3 prescindible también se deleciona frecuentemente para permitir espacio adicional para un inserto de ADN más grande. El vector puede producirse con altos títulos y puede transferir eficazmente ADN a células que se duplican y que no se duplican. La información genética recién transferida permanece de manera epicromosómica, eliminando por tanto los riesgos de mutagénesis por inserción al azar y alteración permanente del genotipo de la célula diana. Los vectores adenovirales pueden derivarse de cualquier serotipo de adenovirus. Las reservas adenovirales que pueden emplearse como fuente de adenovirus pueden amplificarse a partir de los serotipos de adenovirus 1 a 51, que están disponibles actualmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA), o a partir de cualquier otro serotipo disponible de cualquier otra fuente. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (por ejemplo, serotipos 12, 18 y 31), subgrupo B (por ejemplo, serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34 y 35), subgrupo C (por ejemplo, serotipos 1, 2, 5 y 6), subgrupo D (por ejemplo, serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39 y 42-47), subgrupo E (serotipo 4), subgrupo F (serotipos 40 y 41), o cualquier otro serotipo de adenovirus. Preferiblemente, sin embargo, un adenovirus es de serotipo 2, 5 ó 9. En una realización, el vector de adenovirus es de serotipo 5 y tiene delecciones en las regiones E1 y E3.

Los vectores de VAA son vectores virales de particular interés para su uso en protocolos de terapia génica (véase, por ejemplo, Santos Coura *et al.*, Virology J., 4: 99 (2007)). VAA es un virus de ADN sin envuelta, que no se conoce que produzca enfermedad en seres humanos. VAA requiere habitualmente coinfección con un virus auxiliar (es decir, un adenovirus o un virus del herpes), o expresión de genes auxiliares, para lograr una replicación eficaz. En ausencia de un virus auxiliar, los VAA establecen una infección latente dentro de la célula diana. El genoma de VAA consiste en un ADN lineal monocatenario de aproximadamente 4,7 kb que contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF izquierdo codifica para proteínas Rep no estructurales, y el ORF derecho codifica para las proteínas de la cápside (Cap) VP1, VP2 y VP3. Cada extremo del genoma de VAA comprende una repetición terminal

invertida (ITR) de 145 bases (ITR), que contiene el origen viral de replicación del ADN y la señal de empaquetamiento. Las secuencias de nucleótidos de ITR de VAA se han descrito anteriormente (véanse, por ejemplo, Kotin *et al.*, *Human Gene Ther.*, 5: 793-801 (1994); Berns "Parvoviridae and Their Replication" en *Fundamental Virology*, 2ª edición (B. N. Campos and D. M. Knipe, eds.)).

5 Los vectores de VAA usados para la administración de un ácido nucleico terapéutico pueden tener aproximadamente el 96% o más del genoma original deletado, de manera que sólo permanecen las ITR. Esto elimina los efectos secundarios tóxicos o inmunológicos debidos a la expresión de genes virales. Además, la administración de la proteína Rep de VAA permite la integración del vector de VAA que comprende ITR de VAA en una región específica del genoma, si se desea. Las células huésped que comprenden un genoma de VAA integrado no muestran cambios en la morfología o crecimiento celular (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.797.368). Los vectores de VAA pueden derivarse de cualquier serotipo de VAA, incluyendo, pero sin limitarse a, cualquiera de los 11 serotipos de VAA conocidos (es decir, VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10 y VAA11). Las reservas de VAA que pueden emplearse como fuente de VAA pueden amplificarse a partir de VAA1, VAA2, VAA3, VAA4 o VAA5, que están disponibles actualmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA), o de cualquier otro serotipo de VAA disponible de cualquier otra fuente. VAA de serotipo 2 (VAA2) ha sido el más extensamente estudiado de todos los serotipos de VAA. VAA2 puede infectar a muchos tipos de células diferentes, incluyendo células de músculo esquelético, neuronas, células de músculo liso vascular y hepatocitos. En el contexto de la invención, un vector de transferencia génica de VAA2 se usa preferiblemente para infectar neuronas.

La naturaleza a largo plazo persistente y no patógena de la infección por VAA, combinada con su amplio espectro de infectividad, ha hecho que este virus sea un candidato importante como vector de transferencia génica terapéutico. Sin embargo, si se desea, las propiedades integrativas de VAA pueden conferirse a adenovirus construyendo un vector quimérico de VAA-Ad. Por ejemplo, las ITR de VAA y el ácido nucleico que codifica para la proteína Rep incorporada en un vector adenoviral permiten que el vector de adenovirus se integre en el genoma de una célula de mamífero.

Pueden proporcionarse secuencias reguladoras para su uso en el vector de la invención a partir de promotores comúnmente usados derivados de virus tales como poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simios 40. El uso de elementos reguladores virales para dirigir la expresión de la proteína puede permitir una expresión constitutiva de alto nivel de la proteína en una variedad de células huésped. También pueden usarse promotores que se expresan de manera ubicua, incluyendo, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus tempranos (véase, por ejemplo, Boshart *et al.*, *Cell*, 41: 521-530 (1985)), el promotor de timidina cinasa de virus del herpes (VHS-TK) (véase, por ejemplo, McKnight *et al.*, *Cell*, 37: 253-262 (1984)), promotores de β -actina (por ejemplo, el promotor de β -actina humana tal como se describe por Ng *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 5: 2720-2732 (1985)), y el promotor del factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) (véase, por ejemplo, Ladner *et al.*, *EMBO J.*, 6: 2693-2698 (1987)).

Alternativamente, las secuencias reguladoras del vector pueden dirigir la expresión del gen preferentemente en un tipo de célula particular, es decir, pueden usarse elementos reguladores específicos de tejido. Los ejemplos de promotores específicos de tejido que pueden usarse incluyen promotores específicos del sistema cardiovascular, es decir, promotores que son (a) esencialmente inactivos fuera del sistema cardiovascular o (b) más activo en el sistema cardiovascular que en otros sistemas. Por ejemplo, el promotor específico de tejido puede ser un promotor específico para el corazón o los vasos sanguíneos. El promotor puede ser específico para tipos de células particulares, tales como fibroblastos, cardiomiocitos o células endoteliales.

Con el fin de producir partículas virales recombinantes, puede introducirse un vector viral en una célula huésped adecuada usando técnicas conocidas, tales como mediante transfección. Se conocen generalmente en la técnica varias técnicas de transfección (véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, *Virology*, 52: 456-467 (1973); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986); y Chu *et al.*, *Gene*, 13: 97 (1981)). Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen coprecipitación con fosfato de calcio (véase, por ejemplo, Graham *et al.*, *Virology*, 52: 456-467 (1973)), microinyección directa en células cultivadas (véase, por ejemplo, Capecchi, *Cell*, 22: 479-488 (1980)), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa *et al.*, *BioTechniques*, 6: 742-751 (1988)), transferencia génica mediada por liposomas (véase, por ejemplo, Mannino *et al.*, *BioTechniques*, 6: 682-690 (1988)), transducción mediada por lípidos (véase, por ejemplo, Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84: 7413-7417 (1987)), y suministro de ácidos nucleicos usando microproyectiles de alta velocidad (véase, por ejemplo, Klein *et al.*, *Nature*, 327: 70-73 (1987)).

Las células huésped adecuadas para producir partículas virales recombinantes incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, células de levaduras, células de insectos y células de mamíferos, que pueden usarse, o se han usado, como receptores de una molécula de ácido nucleico exógena. Por tanto, una "célula huésped" tal como se usa en el presente documento se refiere generalmente a una célula que se ha transfectado con una molécula de ácido nucleico exógena. La célula huésped incluye cualquier célula eucariota o línea celular siempre que la célula o línea celular no sea incompatible con la proteína que va a expresarse, el sistema de selección elegido o el sistema de fermentación empleado. Los ejemplos no limitativos incluyen células CHO dhfr- (véase, por ejemplo, Urlaub *et al.*,

Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 77: 4216-4220 (1980)), células 293 (véase, por ejemplo, Graham *et al.*, J. Gen. Virol., 36: 59 (1977)), y células de mieloma tales como SP2 y NS0 (véase, por ejemplo, Galfre *et al.*, Met. Enzymol., 73: 3-46 (1981)).

5 En una realización, se usa la línea celular de riñón embrionaria humana estable 293 (por ejemplo, n.º de registro de la ATCC CRL1573) en la práctica de la invención. La línea celular 293 se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma particularmente conveniente en la que producir viriones recombinantes. Por ejemplo, para producir partículas lentivirales recombinantes, puede cotransfectarse una línea celular 293 humana con un vector lentiviral que contiene el transgén, un vector de empaquetamiento (por ejemplo, psPAX) y un vector de envuelta (por ejemplo, pMD2G).

15 Los vectores primero y segundo pueden derivarse cada uno del mismo virus, por ejemplo, el primer vector puede ser un vector adenoviral y el segundo vector puede ser un vector adenoviral. Alternativamente, los vectores primero y segundo pueden derivarse cada uno de virus diferentes, por ejemplo, el primer vector puede ser un vector adenoviral y el segundo vector puede ser un vector lentiviral. En una realización alternativa, un único vector codifica para ambas de la una o más proteínas angiogénicas y el o más factores de transcripción de diferenciación cardíaca, es decir, el primer y el segundo vector son el mismo (único) vector.

20 Cuando los vectores primero y segundo son dos vectores, los vectores primero y segundo pueden administrarse en cualquier orden. Por ejemplo, el primer vector puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el segundo vector. El primer vector puede administrarse, por ejemplo, aproximadamente 1 hora, 1 día, 3 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas o 10 semanas antes o después del segundo vector. En una realización preferida, el primer vector se administra aproximadamente 3 semanas antes del segundo vector.

25 La administración de un vector adenoviral que codifica para tres factores de transcripción (Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT)) usado como estímulo para la generación de iCM junto con la administración de un vector adenoviral que codifica para las tres isoformas principales de VEGF da como resultado mayores mejoras en la función del miocardio tras el infarto que la administración de GMT o VEGF solo. De hecho, este descubrimiento está en contraposición al reciente trabajo de otros investigadores que sugiere que la reprogramación celular mediada por la estrategia de GMT es ineficaz (Chen *et al.*, Circ. Res., 111(1): 50-55 (2012)).

35 Puede considerarse que la arteriopatía coronaria del mamífero va a tratarse si resulta cualquier mejora en la función cardíaca o fisiopatología de la administración de los vectores. Por ejemplo, números aumentados de cardiomiocitos o iCM, fibrosis reducida, vascularización aumentada, función ventricular mejorada y fracción de eyección aumentada son indicadores de un tratamiento satisfactorio de la arteriopatía coronaria. Estos indicadores pueden medirse o evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía o ecocardiografía.

40 El presunto origen de las mejoras en la función ventricular tras el infarto es la generación de iCM funcionales en áreas de cicatriz miocárdica y la potenciación de la supervivencia y/o función de estos miocitos "reprogramados" mediante prevascularización cicatricial (Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012); Passier *et al.*, Cell Stem Cell, 7(2): 139-141 (2010); Song *et al.*, Nature, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, Circ. Res., 111(1): 5-8 (2012); Retuerto *et al.*, J. Thorax. Cardiovasc. Surg., 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, J. Thorax. Cardiovasc. Surg., 133(2): 478-484 (2007)). De manera interesante, las mejoras observadas en la fracción de eyección y las disminuciones en la fibrosis tras la reprogramación celular parecen exceder con mucho lo que se esperaría únicamente basándose en la generación relativamente ineficaz de iCM a partir de células del sustrato (Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012); Passier *et al.*, Cell Stem Cell, 7(2): 139-141 (2010); Song *et al.*, Nature, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, Circ. Res., 111(1): 5-8 (2012)). Más específicamente, en comparación con una tasa de transdiferenciación de fibroblastos del infarto en iCM *in vivo* en el intervalo del 1% - 20%, reducciones en la fibrosis y mejoras en la fracción de eyección que oscilan hasta el 50% sugieren que mecanismos alternativos o adicionales pueden ser responsables de estos resultados (Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012); Song *et al.*, Nature, 485(7400): 599-604 (2012); Jayawardena *et al.*, Circ. Res., 110(11): 1465-1473 (2012)).

55 La generación de iCM funcionalmente competentes, contráctiles puede contribuir individualmente a la restauración de la función cardíaca global. Los aumentos significativos en la densidad de células MYH7⁺ (cardiomiocitos) en animales tratados con GMT frente a control en zonas tanto de infarto como de borde, similares a las observaciones previas de Qian *et al.* y Song *et al.*, apoyan este mecanismo (Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012); Song *et al.*, Nature, 485(7400): 599-604 (2012)). Alternativamente, la generación de iCM en zonas de infarto adelgazadas podría mejorar las tensiones de la pared y de ese modo disminuir las cargas de trabajo del miocardio globales, tal como apoyan las observaciones de la función sistólica mejorada de segmentos remotos de la pared ventricular izquierda en animales tratados, y tal como se postuló previamente que era un mecanismo de acción que subyacía a la eficacia de las terapias de implantes de células madre (Leor *et al.*, Circulation, 94 (supl. 9): II332-II336 (1996); Tailor *et al.*, Nature Med., 4(8): 929-933 (1998); Tomita *et al.*, Circulation, 100 (supl. 19): II247-II256 (1999); Orlic *et al.*, Nature, 410(6829): 701-704 (5 de abril de 2001); Scorsin *et al.*, J. Thorax. Cardiovasc. Surg., 119(6): 1169-1175

(2000); Hare *et al.*, *Curr. Opin. Organ Transplant*, 13(5): 536-542 (2008); Rosenzweig, N. *Engl. J. Med.*, 355(12): 1274-1277 (2006); Murry *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(19): 1777-85 (2006); Menasche, J. *Mol. Cell. Cardiol.*, 50(2): 258-265 (2010); Min *et al.*, *J. Appl. Phys.*, 92(1): 288-296 (2002).

5 La disminución drástica en la fibrosis observada en animales tratados según el método de la presente invención parece exceder con creces los aumentos en el número de iCM recién generados, sugiriendo de ese modo que la
 10 disminución en la fibrosis también puede contribuir a las mejoras significativas en la fracción de eyección observadas en animales tratados. Es concebible que un efecto paracrino de un número relativamente limitado de iCM pueda subyacer a esta reducción en la fibrosis, debido a la expresión por iCM de quimiocinas tales como factor de
 crecimiento de fibroblastos básicos e inhibidor tisular de metaloproteinasa de la matriz (TIMP) - 2 que se ha notificado que limitan o reducen la fibrosis (Daskalopoulos *et al.*, *Microsc. Microanal.*, 18(1): 35-49 (2012); Fedak *et al.*, *Circ. Heart Failure*, 5(3): 349-356 (2012); van den Borne *et al.*, *Nature Rev. Cardiol.*, 7(1): 30-37 (2010)).

15 Alternativamente, la administración de reprogramación celular y/o transgenes de VEGF puede desviar fibroblastos residentes/cicatriciales de su diferenciación normal tras el infarto a miofibroblastos, que se sabe que producen fibrosis por medio expresión de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, y hacia un destino más benigno como iCM (Daskalopoulos *et al.*, *Microsc. Microanal.*, 18(1): 35-49 (2012); Fedak *et al.*, *Circ. Heart Failure*, 5(3): 349-356 (2012); van den Borne *et al.*, *Nature Rev. Cardiol.*, 7(1): 30-37 (2010); Chen *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291(4): H1653-1658 (2006); Yang *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 93(3): 1140-1151 (2002); Zhang *et al.*, *Circulation*, 119(13): 1776-1784 (2009); Song *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 354(4): 999-1003 (2007);
 20 Claes *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 91(3): 369-370 (2011)). La reducción de cuatro veces de las poblaciones de miofibroblastos observada en animales tratados con GMT frente a los controles, consecuente con una tendencia similar en la extensión reducida de la fibrosis, apoya esta suposición. Teóricamente, procesos alternativos tales como función reprimida y/o apoptosis de miofibroblastos (es decir, expresión disminuida de componentes de la matriz extracelular) también podrían desempeñar un papel en tales mecanismos (Daskalopoulos *et al.*, *Microsc. Microanal.*, 18(1): 35-49 (2012); Fedak *et al.*, *Circ. Heart Failure*, 5(3): 349-356 (2012); van den Borne *et al.*, *Nature Rev. Cardiol.*, 7(1): 30-37 (2010); Chen *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291(4): H1653-1658 (2006); Yang *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 93(3): 1140-1151 (2002); Zhang *et al.*, *Circulation*, 119(13): 1776-1784 (2009); Song *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 354(4): 999-1003 (2007); Claes *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 91(3): 369-370 (2011)).

30 El uso de vectores de lentivirus y adenovirus que infectan a células que se dividen y que no se dividen (incluyendo cardiomiocitos) genera la posibilidad también de efectos de GMT/VEGF sobre cardiomiocitos residentes además de la selección como diana de fibroblastos (Qian *et al.*, *Nature*, 485(7400): 593-598 (2012); Passier *et al.*, *Cell Stem Cell*, 7(2): 139-141 (2010); Song *et al.*, *Nature*, 485(7400): 599-604 (2012); Srivastava *et al.*, *Circ. Res.*, 111(1): 5-8 (2012); Jayawardena *et al.*, *Circ. Res.*, 110(11): 1465-1473 (2012)). Algunas pruebas en la bibliografía sugieren que tales efectos podrían incluir cambios en la estructura, función o estabilidad/resistencia de los cardiomiocitos a la isquemia (es decir, "supercélulas cardíacas") (Daskalopoulos *et al.*, *Microsc. Microanal.*, 18(1): 35-49 (2012); Fedak *et al.*, *Circ. Heart Failure*, 5(3): 349-356 (2012); van den Borne *et al.*, *Nature Rev. Cardiol.*, 7(1): 30-37 (2010); Chen *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291(4): H1653-1658 (2006); Yang *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 93(3): 1140-1151 (2002); Zhang *et al.*, *Circulation*, 119(13): 1776-1784 (2009); Song *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 354(4): 999-1003 (2007); Claes *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 91(3): 369-370 (2011)). GMT y/o VEGF, cuando se administran por medio de estos vectores, podrían incluir en la diferenciación de otras células que no proliferan, tales como células progenitoras cardíacas residentes, fibroblastos o células endoteliales hacia un destino de cardiomiocito y/o lejos de un fenotipo de miofibroblastos.

45 La vascularización cicatricial es importante para apoyar la supervivencia y función de implantes de células madre, y comienza una meseta en la neovascularización 3 semanas tras la administración de VEGF (Retuerto *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 133(2): 478-484 (2007); Amano *et al.*, *Mol. Ther.*, 12(4): 716-724 (2005)). Estudios de supervivencia celular preliminares sugieren que se aplican consideraciones similares a la observación de neovascularización aumentada que proporciona la perfusión de nutrientes necesaria para apoyar la conversión de fibroblastos con metabolismo bajo en cardiomiocitos con alto metabolismo (inducidos).

55 La importancia de la prevascularización cicatricial para la estrategia de reprogramación celular *in situ* descrita en el presente documento está apoyada por la observación de la capacidad de AdVEGF para inducir vascularización cicatricial en un modelo de infarto de miocardio agudo, junto con la observación de mejoras significativas en la fracción de eyección cuando se administra VEGF como complemento a GMT. La falta de cambio en la densidad de células MYH7⁺ observada cuando se administra VEGF sin GMT sugiere que VEGF no desempeña un papel significativo, independiente en la reprogramación celular en este entorno. En cambio, en el contexto de la demora en la neovascularización inducida por VEGF en relación con el transcurso de tiempo más rápido del infarto de miocardio, y la observación de una extensión equivalente de la fibrosis en animales tratados con VEGF frente a sin VEGF, la mejora (comparativamente limitada) en la fracción de eyección observada tras la administración de VEGF (sin GMT) puede atribuirse potencialmente a las propiedades antiapoptóticas así como angiogénicas de VEGF, en la promoción de la viabilidad y/o función de células de la zona de borde (Daskalopoulos *et al.*, *Microsc. Microanal.*, 18(1): 35-49 (2012); Fedak *et al.*, *Circ. Heart Failure*, 5(3): 349-356 (2012); van den Borne *et al.*, *Nature Rev. Cardiol.*, 7(1): 30-37 (2010); Chen *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291(4): H1653-1658 (2006); Yang *et al.*,

J. Appl. Physiol., 93(3): 1140-1151 (2002); Zhang *et al.*, Circulation, 119(13): 1776-1784 (2009); Song *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 354(4): 999-1003 (2007); Claes *et al.*, Cardiovasc. Res., 91(3): 369-370 (2011)).

5 Los métodos de la divulgación pueden combinarse con cualquier otro tratamiento conocido para la arteriopatía coronaria, tal como terapias farmacológicas o procedimientos quirúrgicos/de intervención. Las terapias farmacológicas incluyen fármacos antiplaquetarios y anticoagulantes, betabloqueantes, inhibidores de ACE, nitratos y bloqueantes de canales de calcio. Los procedimientos de intervención y las cirugías incluyen injerto de derivación de arterias coronarias (comúnmente denominada derivación o CABG), que se reserva habitualmente para pacientes con arteriopatía coronaria grave, e intervención coronaria percutánea (comúnmente denominada angioplastia o PCI),
10 que implica normalmente la colocación de una endoprótesis de arteria coronaria.

El siguiente ejemplo ilustra adicionalmente la invención pero, por supuesto, no debe interpretarse que limita en ningún modo su alcance.

15 **EJEMPLO 1**

Este ejemplo demuestra la administración de VEGF mediado por adenovirus a miocardio infartado tras la administración mediada por lentivirus de los factores de transcripción de reprogramación celular Gata 4, Mef 2c y Tbx5 (GMT).

20 Vectores y células: Se usó un vector de adenovirus (AdVEGF-All6A⁺) basado en la estructura principal del serotipo Ad5 con deleciones en las regiones E1 y E3 y que contenía un casete de secuencia de corte y empalme artificial para proporcionar la administración de las tres isoformas principales de VEGF (121, 165 y 189) (Amano *et al.*, Mol Ther., 12(4): 716-724 (2005)). Se usó un constructo análogo con un casete de expresión vacío (AdNull) como vector control.
25 control.

Se construyeron vectores de lentivirus para proporcionar la expresión de Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT) en tejidos de miocardio seleccionados como diana. Para la construcción del vector de GMT, se aisló en primer lugar ARN de corazón de rata usando reactivo TRIzol (Invitrogen) y se convirtió en ADNc usando un kit de transcripción inversa (Roche). Se usaron estas muestras (para Mef2c) o ADNc disponible comercialmente (para Gata4 y Tbx5; AddGene) para amplificar secuencias codificantes relevantes usando cebadores basados en las secuencias codificantes de nucleótidos de PubMed para estos tres transgenes (tabla 1) (Ieda *et al.*, Cell, 142(3): 375-386 (2010); Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012)). Se diseñaron los cebadores para que incluyeran un sitio de unión Sal1 en 5' y un sitio de restricción Xho1 en 3' de cada secuencia codificante. Se amplificaron los insertos génicos usando un kit de PCR (Roche) y se clonaron en el vector pENTR3C antes de la recombinación homóloga en el vector F12-CMV (Invitrogen) bajo el control de un promotor de CMV. F12-CMV también incluye un casete de eGFP bajo el control de un promotor de ubiquitina para el análisis de la eficacia y el linaje.
30
35

40 Tabla 1. Cebadores usados para la construcción de plásmidos

Nombre del cebador	Secuencia	Tm
Gata4 5'	GGCGGTCGACATGTACCAAGCCTGGCTATG (SEQ ID NO: 1)	72,6
Gata4 3'	GATTCTCGAGTACGCGGTGATTATGTCCCATG (SEQ ID NO: 2)	70,9
Mef2c 5'	GGACTGTCGACATGGGGAGAAAAAGATTTCAG (SEQ ID NO: 3)	68,5
Mef2c 3'	TGTGACTCGAGTCATGTTGCCATCCTTCAGAGAG (SEQ ID NO: 4)	71,7
Tbx5 5'	CACCGTCGACATGGCCGACGCAGATGAG (SEQ ID NO: 5)	73,4
Tbx5 3'	CCTTCTCGAGTCAAGCTATTCTCGCTCCACTCTG (SEQ ID NO: 6)	71,9

45 Los plásmidos Gata4, Mef2c y Tbx5 F12-CMV así generados se transfectaron en la línea celular de fibroblastos de riñón humano 293T (ATCC) junto con el sistema de entrada usando los plásmidos pMD2G y psPAX por medio del reactivo LIPOFETAMINE™ 2000 (Invitrogen). Se aisló el sobrenadante de portaba virus y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y filtración con jeringa (tamaño de poro de 0,45 µm; Sarstedt). Se concentró adicionalmente el virus mediante centrifugación (2 h a 10.000 x g) y entonces se aspiraron los sobrenadantes y se diluyeron los sedimentos en diluyente viral (sacarosa al 3%, Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM).

50 Se sembraron en placa fibroblastos dérmicos derivados de biopsias de 1 cm² de la piel abdominal de ratas Fischer 344 sobre placas de plástico (Xu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 106(3): 808-813 (2009); Ieda *et al.*, Cell, 142(3): 375-386 (2010)). Se cultivaron los fibroblastos unidos durante 7 d en medio DMEM/FBS al 10% a 10⁴/cm². Entonces volvieron a sembrarse en placa las células y se infectaron con vectores apropiados tras 24 h. Se obtuvieron cardiomiocitos a partir de los ventrículos neonatales de ratas Sprague Dawley (regalo de E. Entcheva) que se cortaron en pequeños trozos y se digirieron con disolución de colagenasa de tipo II. Entonces se obtuvo una
55 suspensión de células individuales de cardiomiocitos primarios mediante pase suave a través de un colador de células de 40 µm y se sembraron en placa las células sobre placas tratadas de cultivo tisular (Thermo Scientific).

Estudios de inmunofluorescencia (IF) *in vitro*: Se añadieron lentivirus que codificaban para vectores de GMT o

control de GFP en presencia de POLIBRENE™ (Millipore) 8 µg/ml a medio de cultivo de fibroblastos dérmicos de rata (DMEM + FBS al 10%) durante 16 h. Entonces se retiró este medio y se permitió que las células se transdiferenciaran en condiciones de cultivo normales a lo largo de un transcurso de tiempo de 14 d. Se lavaron estas células dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% (Affymetrix) durante 10 min. Se permeabilizaron entonces las células con saponina al 0,5% (Sigma) a temperatura ambiente durante 10 min. Se bloquearon los portaobjetos con suero de cabra al 10% (Santa Cruz) antes de la incubación en suero de cabra al 5% con anticuerpos primarios dirigidos hacia troponina cardíaca T (cTnT; Abcam), cadena pesada de miosina beta 7 (MYH7; Sigma) o actinina sarcomérica α (Sigma). A los anticuerpos primarios se les unió anticuerpo secundario fluorescente (647 nm; Alexafluor), y se visualizó la fluorescencia usando un microscopio fluorescente/de fase invertida Ti-S con un sistema de cámara digital de 2.0 megapíxeles enfriada SPOT (Nikon).

Clasificación celular activada por fluorescencia (FACS): Para análisis de FACS, se lavaron las células con PBS y se trataron con tripsina al 0,05% (Gibco). Entonces se sedimentaron estas células y se permeabilizaron con saponina al 0,1% durante 30 min a 4°C, volvieron a sedimentarse y se suspendieron en suero de cabra al 5%, y se incubaron con anticuerpos primario relevantes seguido por incubación con un anticuerpo secundario fluorescente (647 nm; Alexafluor). Se fijaron las células con paraformaldehído al 1% y se analizaron para determinar la fluorescencia usando el software Cell Quest V3.3 en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton/Dickinson) (Ieda *et al.*, Cell, 142(3): 375-386 (2010); Efe *et al.*, Nature Cell. Bio., 13(3): 215-222 (2011); Qian *et al.*, Nature, 485(7400): 593-598 (2012)).

Infarto de miocardio en un modelo animal: Se creó un infarto de miocardio mediante ligación coronaria, tal como se describió anteriormente, en ratas Fischer 344 macho adultas (275-300 g; Harlan; Indianápolis, EN), usando protocolos aprobados por la State University de Nueva York, Stony Brook Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) (Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 133(2): 478-484 (2007)). Se alojó a los animales, se utilizaron y se cuidaron en instalaciones gestionadas por la Division of Laboratory Animal Resources (DLAR) en la Stony Brook University, que está totalmente acreditada por la Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International.

En primer lugar se anestesiaron los animales con isoflurano al 4% en una caja de inducción, se incubaron y se colocaron en un ventilador para roedores (Harvard Apparatus) usando inhalación de isoflurano (3,5%) complementado con oxígeno. Se administró lidocaína (4 mg/kg) por vía intramuscular. Entonces se realizó una toracotomía izquierda, y se ligó la arteria coronaria izquierda de 1 a 2 mm desde su origen con una sutura de polipropileno 7-0. Esta preparación produce de manera sistemática un infarto de miocardio (IM) antero-apical macroscópico (pálido) con <20% de mortalidad.

En el momento de la ligación coronaria, se administraron cinco inyecciones de 20 µl distribuidas uniformemente que contenían cada una 2×10^8 pu (dosis total de 1×10^9) de Ad VEGF-All6A⁺ o AdNull (n=12/grupo) alrededor de la zona de infarto, identificada como un área de blanqueo en la pared anterolateral del ventrículo izquierdo, por operarios ciegos al grupo de tratamiento. Entonces se cerró por sutura el tórax capa a capa, y se colocaron los animales en una cámara calentada y se permitió que se recuperaran bajo supervisión. Se les administró ketorolaco (3-5 mg/kg) y buprenorfina (0,05-0,1 mg/kg) por vía subcutánea en el momento del cierre y cada 12-24 h tras la operación según se necesitase, determinado por el nivel de actividad que presentaban los animales.

Se realizó una segunda toracotomía 3 semanas después, y los animales que recibieron anteriormente AdVEGF-All6A⁺ o AdNull cada uno se sometieron entonces a administración en la zona de infarto de 1×10^5 TU de lentivirus (5 inyecciones de 20 µl distribuidas uniformemente) que codificaban para Gata4, Mef2c o Tbx5 acoplados a un marcador de GFP, o que codificaban para GFP solo (final n=6/grupo). Se recuperaron de nuevo los animales tal como se describió anteriormente. Se realizó posteriormente la eutanasia 4 semanas más tarde mediante anestesia con isoflurano profunda (4%) seguido por exsanguinación, consecuente con las directrices de AVMA.

Ecocardiografía: Se realizó la ecocardiografía bajo anestesia ligera con isoflurano al 3% usando un sistema de obtención de imágenes Veno 770™ (VisualSonics Inc., Toronto, ON, Canadá) en cinco puntos de tiempo diferentes: antes de y 3 d después de la ligación coronaria y AdVEGF-All6A⁺ o AdNull, en el momento de la administración de GMT o GFP 21 d más tarde (nivel inicial), y luego 2 semanas y 4 semanas más tarde después del nivel inicial (día 35 y día 49 tras la ligación, respectivamente) (Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 127(4): 1041-1049 (2004); Retuerto *et al.*, J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 133(2): 478-484 (2007)). Se obtuvieron imágenes ecocardiográficas del ventrículo izquierdo en vistas tanto del eje corto como del eje largo paraesternal por investigadores ciegos al grupo de tratamiento. Se midieron los diámetros sistólico final y diastólico final del ventrículo izquierdo y el grosor posterior y del tabique del ventrículo izquierdo (en las fases tanto sistólica final como diastólica final) a partir de los trazos en modo M. Se analizaron entonces estos datos de obtención de imágenes por investigadores ciegos al grupo de tratamiento. Se calculó el cambio en la fracción de eyección (FE) como: (FE en el día 49) - (FE en el día 21)] / (FE en el día 21).

Análisis histológicos: Para obtener muestras de tejido cardíaco, se exsanguinaron los animales bajo anestesia

profunda por medio de una incisión realizada en la aurícula derecha. Mientras que el corazón todavía estaba latiendo, se perfundió con solución salina normal y se fijó con solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2) que contenía paraformaldehído al 4% (p/v) por medio de una aguja de calibre 25 insertada en el vértice ventricular izquierdo. Entonces se recogió el corazón y se enjuagó con solución salina para quitar la sangre. Se fijaron los corazones extirpados con paraformaldehído al 4% durante 24 h, y luego paraformaldehído al 2% durante 48 h a 4°C. Entonces se cortó el corazón transversalmente y se seccionó para obtener dos cortes (2-3 mm), uno inmediatamente cefálico y uno inmediatamente caudal con respecto a la línea central transversal de la región de infarto, que era fácilmente identificable por inspección macroscópica. Tras la incrustación en parafina de estos cortes, se obtuvieron siete secciones de 5 µm de grosor a intervalos de 90 µm.

Para los análisis de la reprogramación celular *in vivo*, se tiñeron los portaobjetos para microscopio de cada sección alterna tal como se describió anteriormente con anticuerpos primarios contra la cadena pesada de miosina beta 7 (anti-MYH7, Sigma), luego se incubaron con anticuerpo frente a IgG secundario. Cinco campos microscópicos por portaobjetos (en el centro de la zona de infarto, en las áreas medias entre el centro de la zona de infarto y la de borde [izquierdo y derecho], y en cada zona de borde adyacente al infarto [izquierdo y derecho]) observados a 200X aumentos se clasificaron de manera semicuantitativa con el fin de determinar la densidad de células MYH7⁺. La clasificación de la densidad evaluada por un investigador ciego al grupo de tratamiento se definió tal como sigue: grado I: < 25% de del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; grado II: el 25%-50% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; grado III: el 50%-75% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺; y grado IV: >75% del campo microscópico seleccionado muestra células MYH7⁺ (figura 7).

Estas observaciones se notifican como el porcentaje de campos por animal que muestran un grado de densidad dado, y la media de estos porcentajes por grupo para todos los animales con al menos diez campos analizables dentro de una zona de infarto.

Para evaluar la extensión de la fibrosis, se tiñeron 22 secciones por animal (a un intervalo de 120 µm entre cada sección) obtenidas tal como se describió anteriormente con tinción tricrómica de Masson. Se esbozaron el área fibrótica (color azul) y la región no fibrótica (color rojo) usando el software Adobe PHOTOSHOP™ CS5, y luego se cuantificaron con el software MATLAB & SIMULINK (Math Works, Inc). Se calculó el área total de fibrosis como: [total de píxeles de color azul de todas las secciones / total de píxeles de color azul más rojo de todas las secciones].

Para la identificación de miofibroblastos, se tiñeron dos secciones por animal que mostraban el mayor área de sección transversal de fibrosis, tal como se determinó mediante tinción tricrómica, para detectar actina de músculo liso α (anticuerpo anti-actina de músculo liso, Spring Bioscience [α-SMA]). Se contaron las células positivas para α-SMA en estas secciones excluyendo las encontradas en estructuras vasculares o endocardio a 200X aumentos.

Para estudios de vascularización, se determinó el número de vasos por campo microscópico a partir de las secciones teñidas como anteriormente con α-SMA, o con factor VIII (anticuerpo anti-antígeno relacionado con factor VIII, Ventana) y se contaron a 200X o 400X, respectivamente.

Análisis estadístico: Se realizó el análisis estadístico con SAS, 9.2. Los datos se presentan como media ± error estándar de la media. Se examinó la normalidad de los datos con Shapiro-Wilk. Cuando había una distribución normal, se realizó una prueba de ANOVA para detectar significaciones estadísticas entre múltiples grupos. Cuando la prueba de ANOVA mostró significación, se realizó una prueba de la t de Student con una corrección de Holm-Bonferroni a posteriori. Cuando no había una distribución normal, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando la prueba era significativa, se realizó la prueba de rangos de Wilcoxon con una corrección de Holm-Bonferroni a posteriori. Para variables categóricas, se realizó una prueba exacta de Fischer. Valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Generación de iCM *in vitro*: Se confirmó la competencia de cada uno de los lentivirus de GMT mediante ensayos de infección de células *in vitro*, que demostraron la expresión de los tres factores de transcripción de reprogramación (figura 1). La confirmación de la capacidad de estos factores de transcripción para inducir transdiferenciación de iCM se obtuvo mediante tinción de inmunofluorescencia de fibroblastos dérmicos de rata tras la transducción lentiviral de GMT. En estos estudios, células expuestas a vectores de GMT expresaban marcadores específicos de cardiomiocitos incluyendo troponina cardíaca T (cTnT), actina sarcomérica alfa y cadena pesada de miosina beta (MYH) 7, mientras que las células no infectadas y los fibroblastos expuestos sólo a un vector control de GFP no pudieron expresar estos marcadores (figura 2A). Mediante cuantificación por FACS, la infección con GMT demostró pruebas de expresión de marcadores de cardiomiocitos en aproximadamente el 7% de los fibroblastos infectados (figuras 2B-F).

Vascularización del miocardio infartado: La vascularización de la región de infarto tal como se evaluó mediante tinción de α-SMA era significativamente mayor en animales tratados con AdVEGF-All6A⁺ en comparación con animales que recibieron un vector control de AdNull: 5,5 ± 0,9 frente a 3,3 ± 0,4, respectivamente; p < 0,05 (figura 3; figura 8). Se observó un aumento similar, de aproximadamente dos veces en vasos teñidos con factor VIII en animales que recibieron AdVEGF-All6A⁺ solo frente a los que recibieron AdNull solo (14,1 ± 2,1 frente a 7,3 ± 1,4, p

< 0,05). Véanse también las figuras 10A-B.

Evaluación histológica de los ventrículos tras el infarto: Con el fin de evaluar la eficacia de la administración de GMT con o sin tratamiento previo con VEGF *in vivo*, se realizaron una serie de análisis histológicos en secciones del corazón obtenidas 4 semanas tras la administración de GMT/GFP (7 semanas tras la ligación coronaria y administración de AdVEGF-All6A⁺/AdNull). Estos estudios demostraron una mayor densidad de células que se teñían para el marcador de cardiomiocitos MYH7 en la zona de infarto en animales tratados con GMT en comparación con animales control (figuras 4A-D). Normalmente, los animales tratados con GMT mostraban islas relativamente grandes de células MYH7⁺, en comparación con focos dispersos de MYH7⁺ en animales control.

Usando una escala de grado I - IV para evaluar semicuantitativamente la densidad de células con MYH7, los animales tratados con GMT mostraban una densidad de células con MYH7 de grado III/IV en la zona de infarto en un mayor porcentaje de campos microscópicos que los animales control de GFP, tanto en la zona de infarto como en las zonas de borde (tabla 2).

Tabla 2. Densidad de células MYH7⁺*

	Grado I [†]	Grado II [†]	Grado III [†]	Grado IV [†]
Área de infarto				
AdVEGF-All6A ⁺ /GMT	12±5	44 ± 8	30 ± 7	14 ± 5
AdNull/GMT	29 ± 13	41 ± 8	22 ± 7	8 ± 5
AdVEGF-All6A ⁺ /GFP	61 ± 14	34 ± 13	5 ± 3	0
AdNull/GFP	50 ± 14	40 ± 10	10 ± 6	0
Área de zona de borde				
AdVEGF-All6AGMT	4 ± 3	29 ± 9	48 ± 10	19 ± 7
AdNull/GMT	14 ± 10	24 ± 7	38 ± 9	25 ± 10
AdVEGF-All6A ⁺ /GFP	30 ± 14	48 ± 11	21 ± 12	1 ± 1
AdNull/GFP	43 ± 13	32 ± 7	22 ± 10	3 ± 2

* Porcentaje de campos microscópicos analizados que muestran un grado de densidad (n=6 animales por grupo de tratamiento).

[†] Grado I: < 25% de campo microscópico contienen células MYH7⁺; grado II: el 25% - 50% del campo microscópico contiene células MYH7⁺, grado III: el 50% - 75% del campo microscópico contiene células MYH7⁺; grado IV: > 75% del campo microscópico contiene células MYH7⁺. Todas las mediciones a 200X

El porcentaje de campos microscópicos que muestran una densidad de células con MYH7 de grado III/IV era significativamente mayor en animales tratados con GMT en comparación con animales control tratados con GFP (el 36% ± 8% frente al 7% ± 4%, p < 0,01) en la zona de infarto y en las zonas de borde adyacentes a estas zonas de infarto (el 65% ± 10% frente al 23% ± 9%, p < 0,01). De manera notable, ninguna de las secciones mostró una densidad de células con MYH7 de grado IV en la zona de infarto en los grupos control de GFP. La administración de AdVEGF-All6A⁺ no parecía alterar la densidad de células con MYH7 (figura 4E). Véanse también las figuras 11A-B.

La extensión de la fibrosis en estas secciones, tal como se detectó mediante tinción tricrómica, también se redujo significativamente en animales tratados con GMT en comparación con los que recibieron GFP, independientemente de la administración de VEGF (figura 5A). El área de sección transversal de la fibrosis en estos grupos, como porcentaje del área del miocardio del ventrículo izquierdo total en las secciones analizadas, era del 12% ± 2% frente al 24% ± 3%, (p < 0,01). No se detectaron diferencias en la extensión de la fibrosis en animales tratados con AdVEGF-All6A⁺ sin GMT en comparación con controles de AdNull/GFP (figura 5B). Además, la administración de AdVEGF-All6A⁺ no redujo adicionalmente la extensión de la fibrosis en comparación con animales tratados con GMT sin VEGF. Véanse también las figuras 12A-B.

De manera consecuente con la reducción en la fibrosis detectada en animales tratados con GMT, hubo una disminución de aproximadamente cuatro veces en el número de miofibroblastos observados en animales tratados con GMT en comparación con animales control, independientemente de la administración de VEGF (figura 5C; figura 9).

Mejora en la función ventricular tras la administración de GMT y VEGF: Se realizó ecocardiografía para evaluar las implicaciones funcionales de los resultados observados anteriormente. Los análisis ecocardiográficos realizados antes e inmediatamente después de la ligación coronaria demostraron que la fracción de eyección se redujo en aproximadamente el 30% con respecto a los valores de nivel inicial (figura 6A). Esta disminución en la función cardíaca persistía 3 semanas después, en el momento de la administración de lentivirus de GMT o GFP.

Tal como se detalla en la tabla 3, la fracción de eyección media 4 semanas tras la administración de GMT o GFP era la mayor para animales que recibieron administración de GMT con tratamiento previo con AdVEGF-All6A⁺ (AdVEGF-All6A⁺/GMT), siendo significativamente mayor que en animales que recibieron o bien AdVEGF-All6A⁺ sin GMT (AdVEGF-All6A⁺/GFP; p < 0,05) o bien ambos vectores control (AdNull/GFP; p < 0,05).

5

Tabla 3. Medias de grupos de la fracción de eyección tal como se evalúa mediante ecocardiografía*

Grupo	Tiempo (días) [†]				
	0	3	21	35	49
AdVEGF-All6A ⁺ /GMT	75 ± 2	55 ± 3	54 ± 2	65 ± 2	63 ± 2 ^{‡§}
AdNull/GMT	75 ± 1	56 ± 3	53 ± 2	61 ± 3	56 ± 2
AdVEGF-All6A ⁺ /AGFP	76 ± 1	51 ± 3	51 ± 2	53 ± 4	51 ± 2 ^{§##}
AdNull/GFP	74 ± 1	51 ± 2	53 ± 3	52 ± 8	48 ± 2 [#]

Todos los datos expresados como un porcentaje de la fracción de eyección (n=6 animales por grupo de tratamiento)
[†] Día 0 representa el momento de la ligación coronaria y administración de AdVEGF-All6A o AdNull; día 21 representa el momento de la administración de lentivirus que codifica para GMT o GFP
[‡] AdVEGF-All6A⁺/GMT frente a AdNull/GFP en el d 49: p < 0,05
[§] AdVEGF-All6A⁺/GMT frente a AdVEGF-All6A⁺/GFP en el d 49: p < 0,05
^{||} AdVEGF-All6A⁺/GMT frente a AdNull/GMT en el d 49: p = 0,08
[#] AdVEGF-All6A⁺/GFP frente a AdNull/GFP en el d 49: p = 0,86

Se hicieron observaciones similares para las diferencias entre grupos en acortamiento fraccional (tabla 4).

10

Tabla 4. Métricas de la función ventricular tal como se evalúa mediante ecocardiografía*

Parámetro	Tiempo (días) ^{†‡}				
	0	3	21	35	49
Volumen diastólico final ^{†/}					
AdVEGF-All6AGMT	217 ± 7	181 ± 13	215 ± 17	222 ± 21	234 ± 25
AdNull/GMT	206 ± 8 ⁺	147 ± 18	239 ± 12	208 ± 16	231 ± 23
AdVEGF-All6A+/GFP	192 ± 11 ^{†/}	197 ± 11	302 ± 30	240 ± 32	280 ± 32
AdNull/GFP	207 ± 13	193 ± 19	262 ± 17	265 ± 32	252 ± 26
Volumen sistólico final					
AdVEGF-All6 [§] /AGMT	54 ± 5	80 ± 7	99 ± 10	80 ± 11	84 ± 7
AdNull/GMT	51 ± 2	65 ± 5	112 ± 10	81 ± 10	105 ± 14
AdVEGF-All6A [§] /GFP	47 ± 3	97 ± 8	148 ± 17	117 ± 23	139 ± 20
AdNull/GFP	54 ± 4	95 ± 11	123 ± 11	131 ± 23	134 ± 18
Acortamiento fraccional					
AdVEGF-All6AGMT	45 ± 2	30 ± 2	29 ± 1	36 ± 2	35 ± 1 [#]
AdNull/GMT	45 ± 1	29 ± 2	28 ± 1	34 ± 2	30 ± 1 ^{**}
AdVEGF-All6AGFP	46 ± 1	27 ± 2	27 ± 1	28 ± 2	27 ± 1
AdNull/GFP	44 ± 1	27 ± 1	28 ± 2	27 ± 2	25 ± 1 ^{###}

*Todos los datos expresados como un porcentaje de la fracción de eyección (n=6 animales por grupo de tratamiento)
[†] Día 0 representa el momento de la ligación coronaria y administración de AdVEGF-All6A o AdNull; día 21 representa el momento de la administración de lentivirus que codifica para GMT o GFP
[‡] Sin diferencia significativa entre grupos en cualquier intervalo de tiempo.
[§] AdVEGF-All6A+/GMT frente a AdNull/GMT: p = 0,08
^{||} AdVEGF-All6A+/GMT frente a AdVEGF-All6A+/GFP: p < 0,01
[#] AdVEGF-All6A+/GMT frente a AdNull/GFP: p < 0,0001
^{**} AdNull/GMT frente a AdNull/GFP: p = 0,07

15

Quando se agrupan juntos independientemente de la administración de AdVEGF previa, los animales tratados con GMT mostraron una fracción de eyección media significativamente mayor en comparación con animales control de GFP combinados de manera similar, tanto a las 2 semanas como a las 4 semanas tras la administración de lentivirus (2 semanas: el 63% ± 2% frente al 52% ± 2%, p < 0,01); 4 semanas: el 60% ± 2% frente al 49% ± 2%, p < 0,001). En comparación, no se observaron diferencias en la fracción de eyección tras la administración de AdVEGF-All6A⁺ solo (sin GMT) frente a animales que recibieron vectores control.

20

El cambio en la fracción de eyección desde el momento de nivel inicial de administración de lentivirus hasta el momento de la ecocardiografía de seguimiento 4 semanas más tarde (figura 6B, panel superior) era también mayor en los grupos de GMT frente a GFP (el 12% ± 3% frente al -7% ± 3%, p < 0,01). Ocho (73%) animales tratados con GFP, pero ninguno de los animales con GMT, mostraron una fracción de eyección disminuida durante este intervalo

($p < 0,01$). Además, tal como se representa en la figura 6B (panel inferior), la mejora en la fracción de eyección observada en el grupo de AdVEGF-All6A⁺/GMT era cuatro veces mayor que la observada para el grupo de AdNull/GMT (el $17\% \pm 2\%$ frente al $4\% \pm 1\%$, $p < 0,05$), y era significativamente mayor ($p = 0,008$) que el cambio en la fracción de eyección observado tras la administración de VEGF solo (AdVEGF-All6A⁺/GFP).

5 De manera interesante, el engrosamiento sistólico de la pared de la pared posterior del ventrículo izquierdo (remota, sin inyectar) también tendía hacia valores mayores en el grupo de GMT/VEGF en comparación con animales que recibieron GMT sin VEGF y en comparación con controles de GFP/AdNull (figura 6C).

10 El uso de los términos “un” y “una” y “el/la” y “al menos uno” y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) ha de interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. El uso del término “al menos uno” seguido por una lista de uno o más puntos (por ejemplo, “al menos uno de A y B”) ha de interpretarse que significa un punto seleccionado de los puntos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los puntos enumerados (A y B), a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye”, y “que contiene”, han de interpretarse como términos de extremos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a,”) a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende meramente servir como método de abreviatura de la referencia individual a cada valor diferenciado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor diferenciado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga de otra forma claramente el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, pretende meramente iluminar mejor la invención y no supone una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse que indica que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

20 Se describen realizaciones preferidas de esta invención en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Pueden resultar evidentes variaciones de esas realizaciones preferidas para los expertos habituales en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otra manera distinta de la descrita específicamente en el presente documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas al presente documento tal como permita la ley aplicable. Además, la invención abarca cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de los mismos a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga de otra forma claramente el contexto.

40 **Lista de secuencias**

<110> CORNELL UNIVERSITY
THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK

45 <120> ACONDICIONAMIENTO ANGIOGÉNICO PARA POTENCIAR LA REPROGRAMACIÓN CELULAR CARDIACA DE FIBROBLASTOS DEL MIOCARDIO INFARTADO

<130> 714417
50 <150> 61/721.604
<151> 02-11-2012

<160> 6

55 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

65 <400> 1

ES 2 651 716 T3

	ggcggctgac atgtaccaaa gcctggctat g	31
5	<210> 2 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 2 gattctcgag tacgcggtga ttatgtcccc atg	33
15	<210> 3 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 3 ggactgtcga catggggaga aaaaagattc ag	32
25	<210> 4 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
35	<400> 4 tgtgactcga gtcatgttc ccatcctca gagag	35
40	<210> 5 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 5 caccgtcgac atggccgacg cagatgag	28
50	<210> 6 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 6 ccttctcgag tcaagctatt ctgctccac tctg	34

REIVINDICACIONES

1. Combinación de vectores que comprende
 - 5 (a) un primer vector viral que codifica para una o más proteínas angiogénicas que inducen vascularización en el corazón del mamífero, y
 - (b) un segundo vector viral que codifica para uno o más factores de transcripción de diferenciación cardiaca que inducen la producción de cardiomiocitos inducidos (iCM) en el corazón del mamífero
- 10 para su uso en un método de tratamiento de arteriopatía coronaria en un mamífero, en la que el primer y segundo vector se administran al corazón del mamífero.
- 15 2. Combinación de vectores para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína angiogénica es uno o más de VEGF, FGF, PGF, NRP-1, ANG, PDGF, TGF- β , MCP-1, efrina, activador de plasminógeno o inhibidor de activador de plasminógeno, eNOS, COX-2, CD133, MMP y DLL44.
3. Combinación de vectores para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína angiogénica es VEGF.
- 20 4. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el factor de transcripción de diferenciación cardiaca es uno o más de Hopx, Nkx2-5, Hrt2, Pitx2, Smyd1, Myocd, Baf60c, Tbx5, Srf, Gata4, Isl1, Mef2c, Hand2 o Mesp1.
- 25 5. Combinación de vectores para su uso según la reivindicación 4, en la que los factores de transcripción de diferenciación cardiaca son Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT).
- 30 6. Combinación de vectores para su uso según las reivindicaciones 1-5, en la que los vectores virales son vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores basados en VIH, vectores basados en VHS, vectores basados en adenovirus, vectores basados en parvovirus, vectores basados en VAA o vectores quiméricos de VAA-adenovirus.
- 35 7. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el primer vector es un vector adenoviral, en la que opcionalmente el vector adenoviral es de serotipo 5 y tiene deleciones en las regiones E1 y E3.
8. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el segundo vector es un vector lentiviral.
- 40 9. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el primer vector y el segundo vector se administran a una cicatriz miocárdica o región del corazón periinfartada.
10. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la arteriopatía coronaria es infarto de miocardio.
- 45 11. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, mediante lo cual se mejora la función ventricular del corazón del mamífero.
- 50 12. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que los iCM se derivan de fibroblastos miocárdicos.
13. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el primer vector se administra antes del segundo vector, de manera opcional aproximadamente 3 semanas antes del segundo vector, o en la que el primer vector se administra al mismo tiempo que el segundo vector.
- 55 14. Combinación de vectores para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el primer vector es un vector adenoviral, el segundo vector es un vector lentiviral, la proteína angiogénica es VEGF, y los factores de transcripción de diferenciación cardiaca son Gata4, Mef2c y Tbx5 (GMT).

FIG. 1

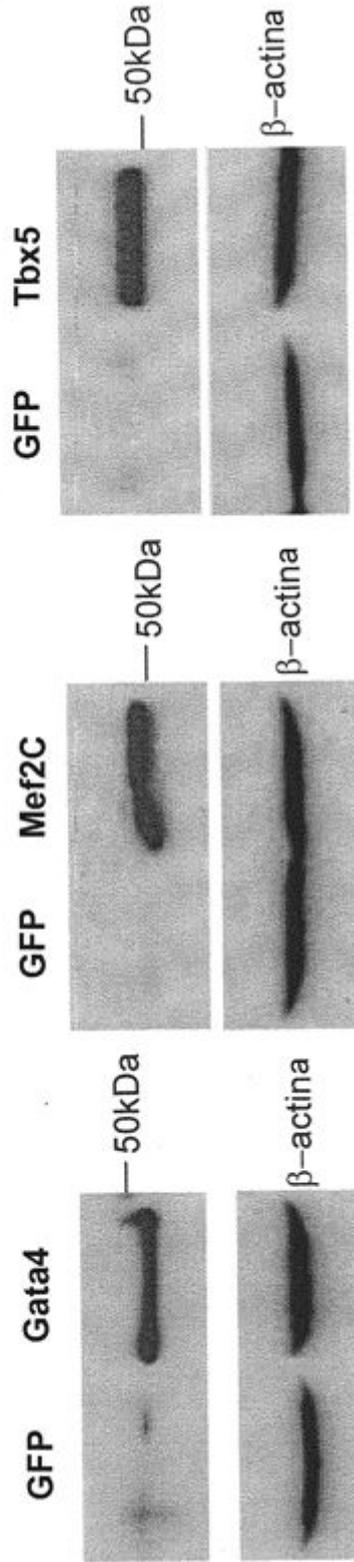
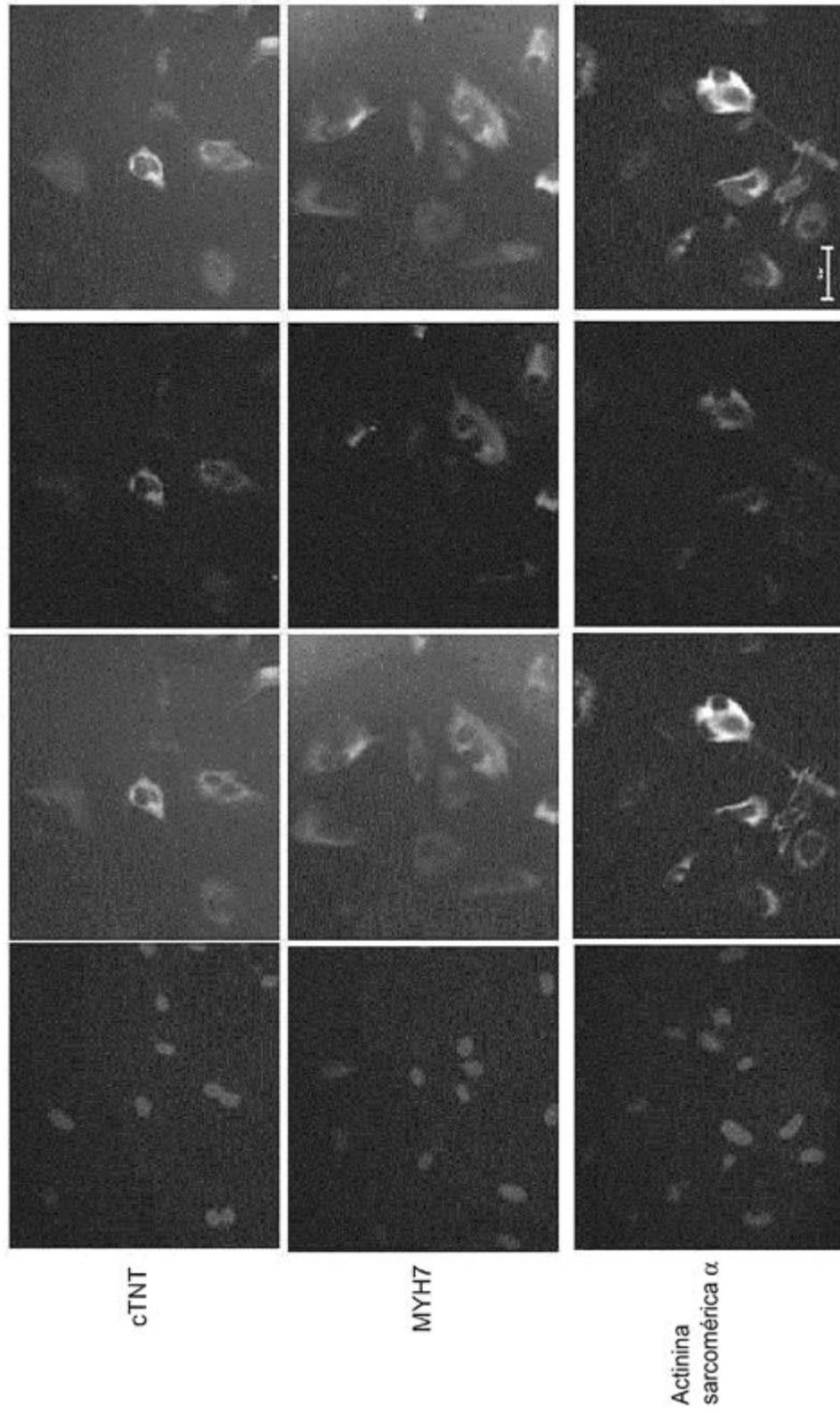


FIG. 2A



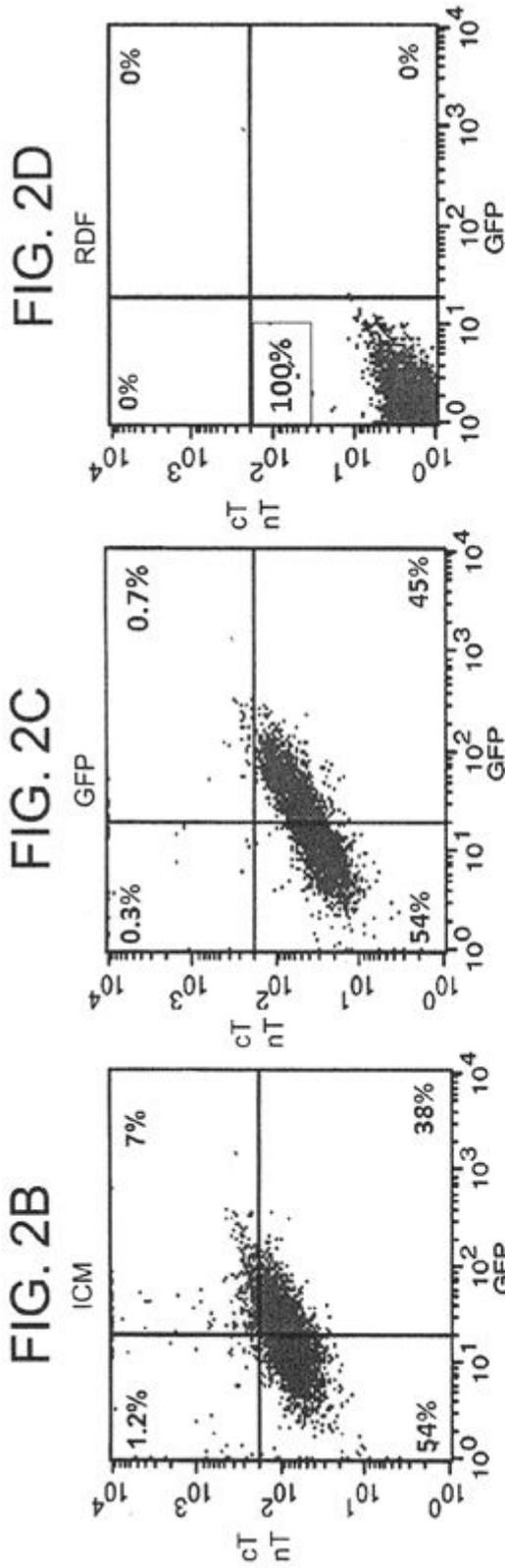


FIG. 2E

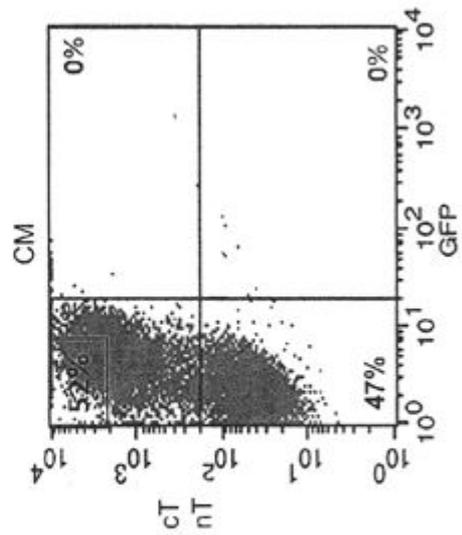


FIG. 2F

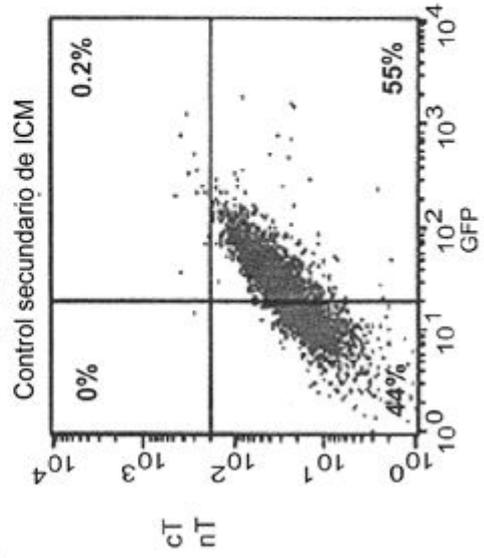


FIG. 3

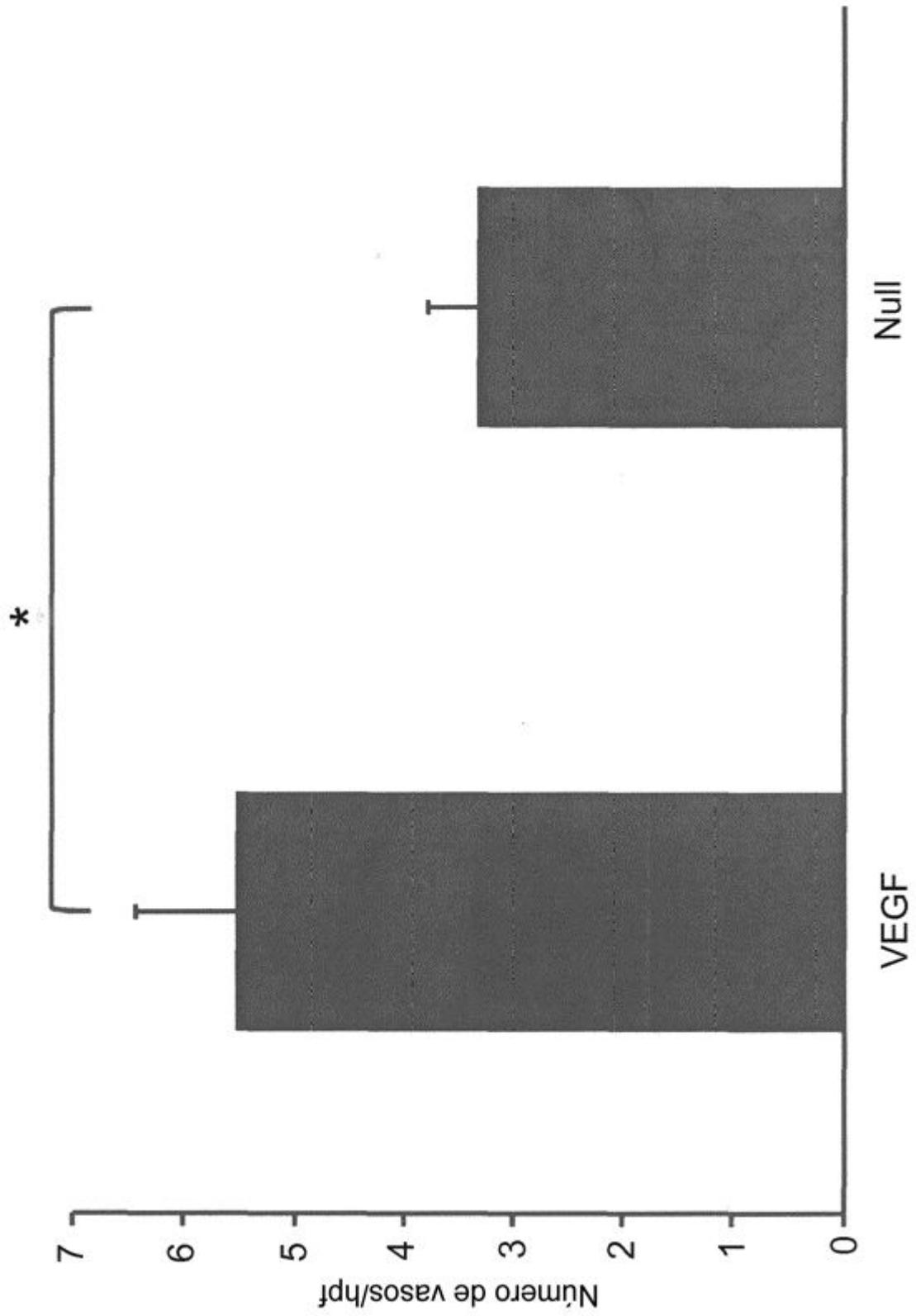


FIG. 4A

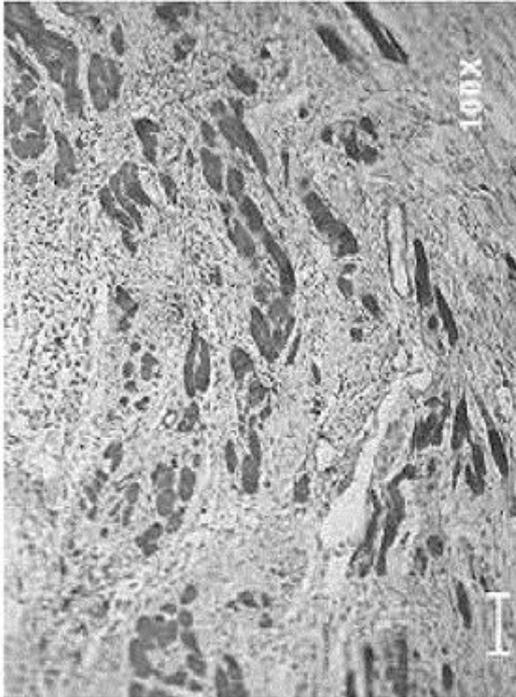


FIG. 4B

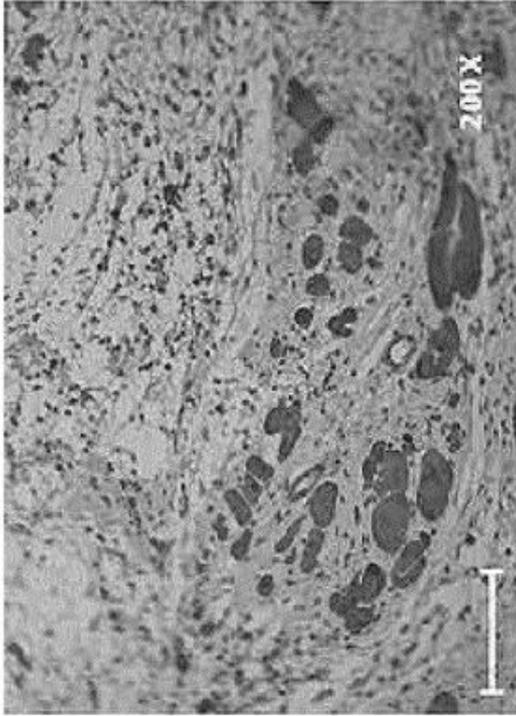


FIG. 4C

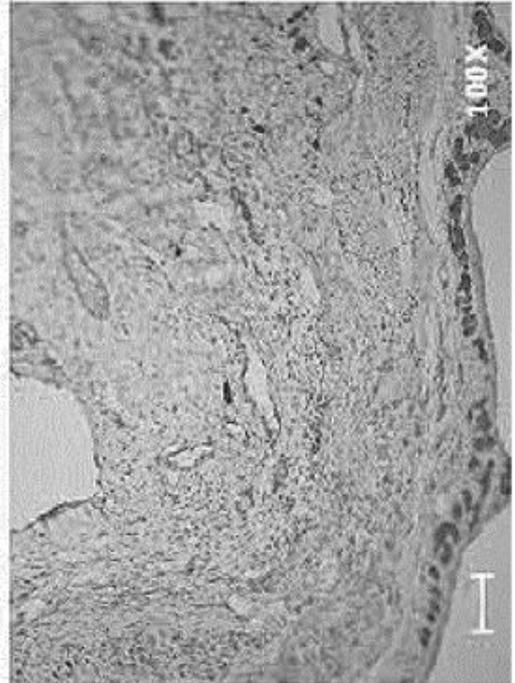


FIG. 4D

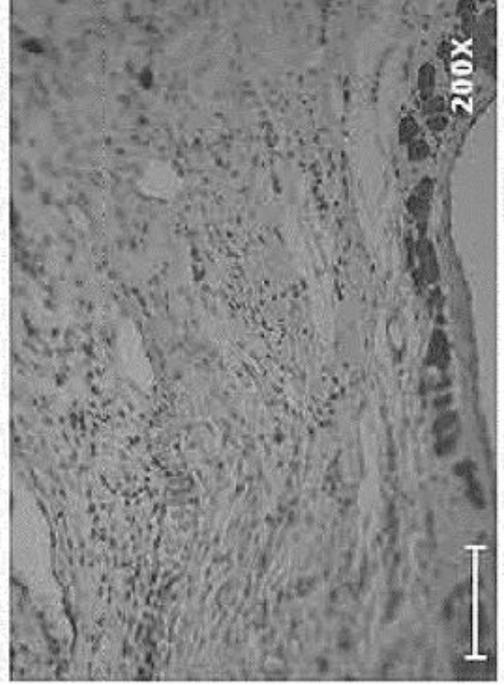
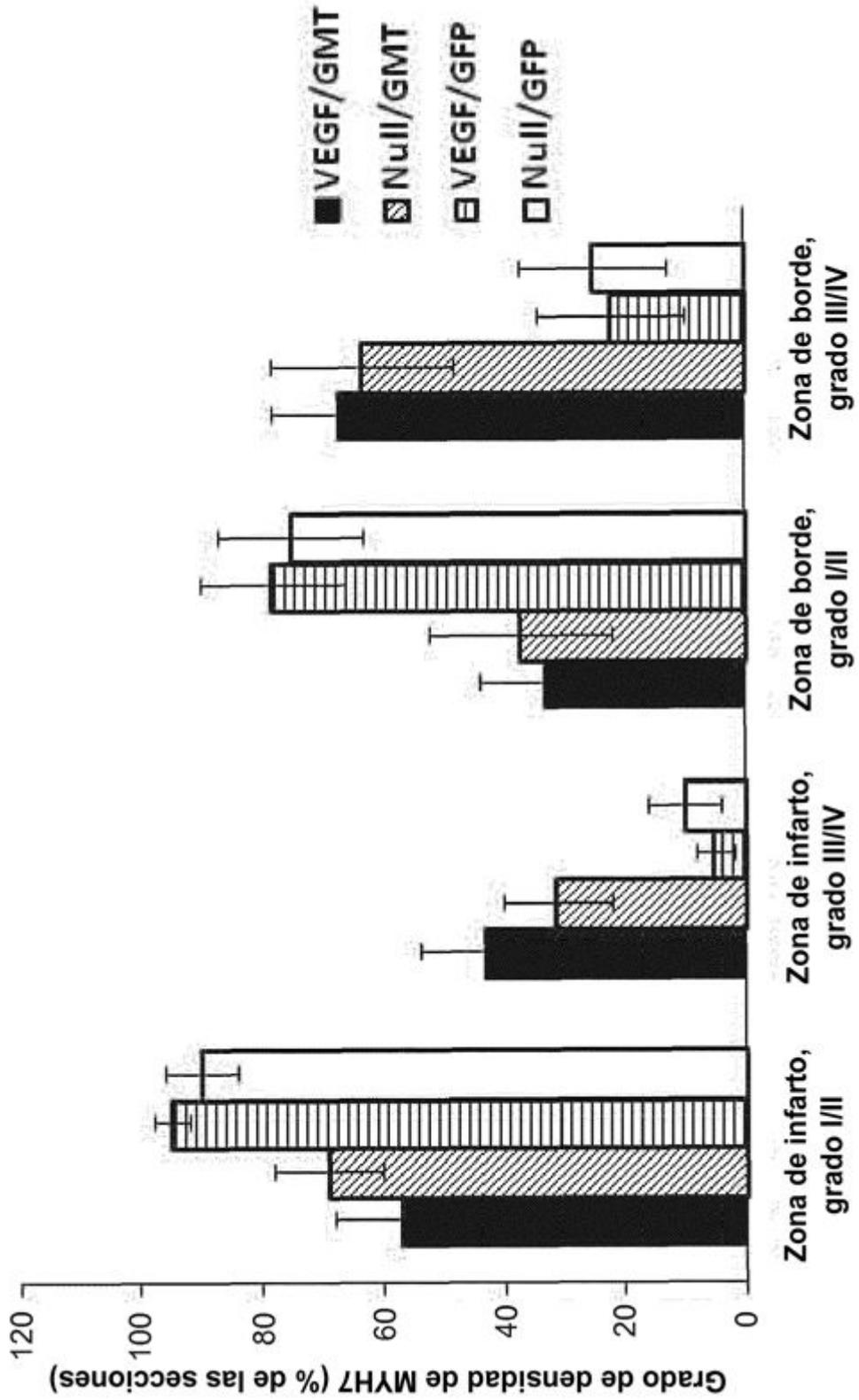


FIG. 4E



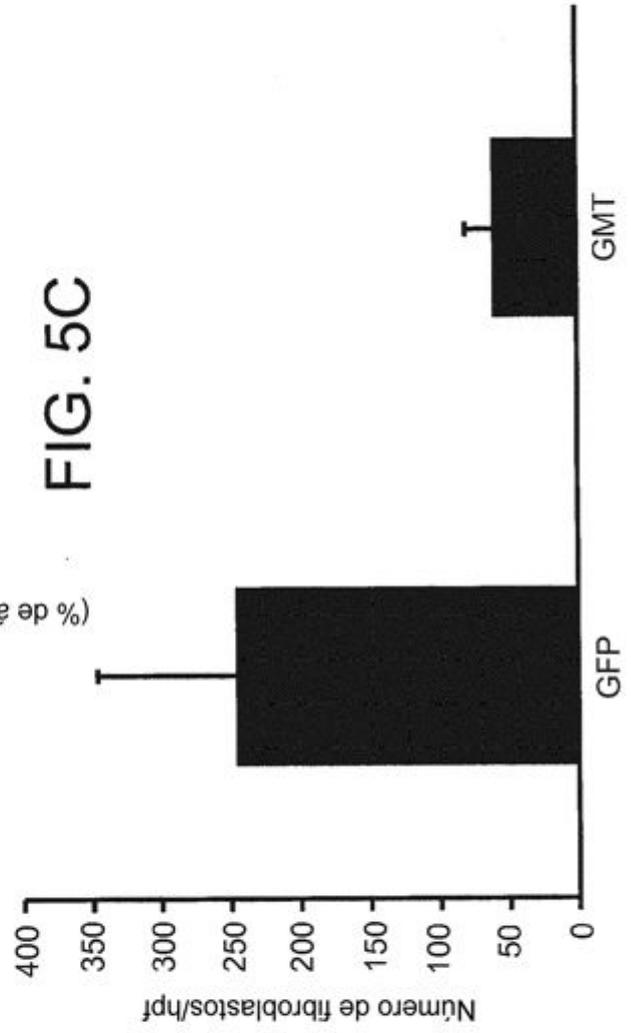
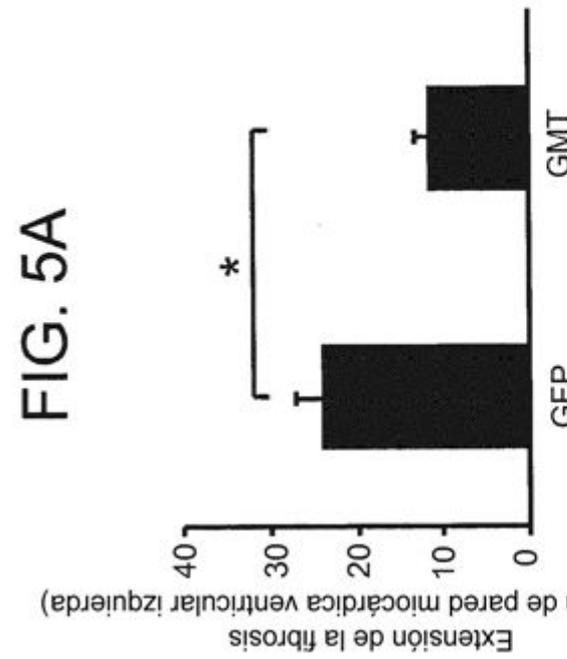
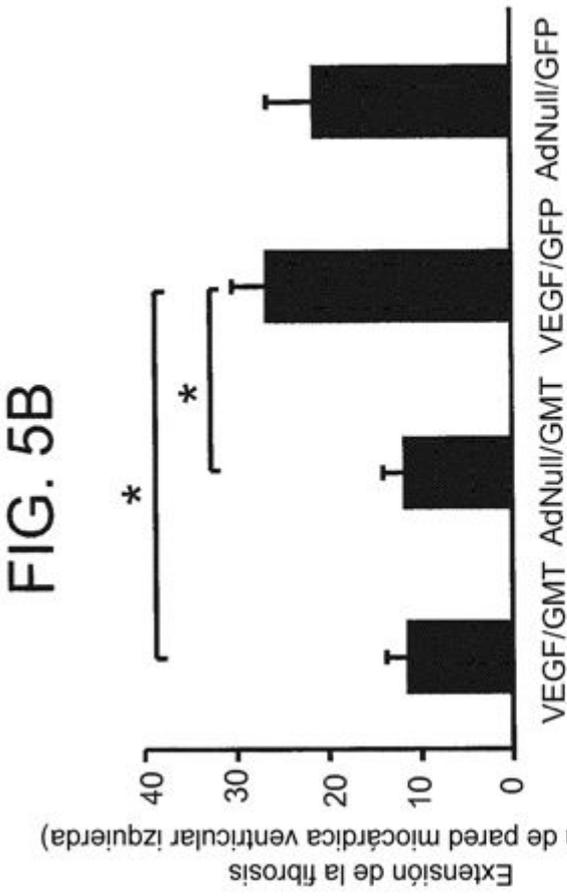


FIG. 6A

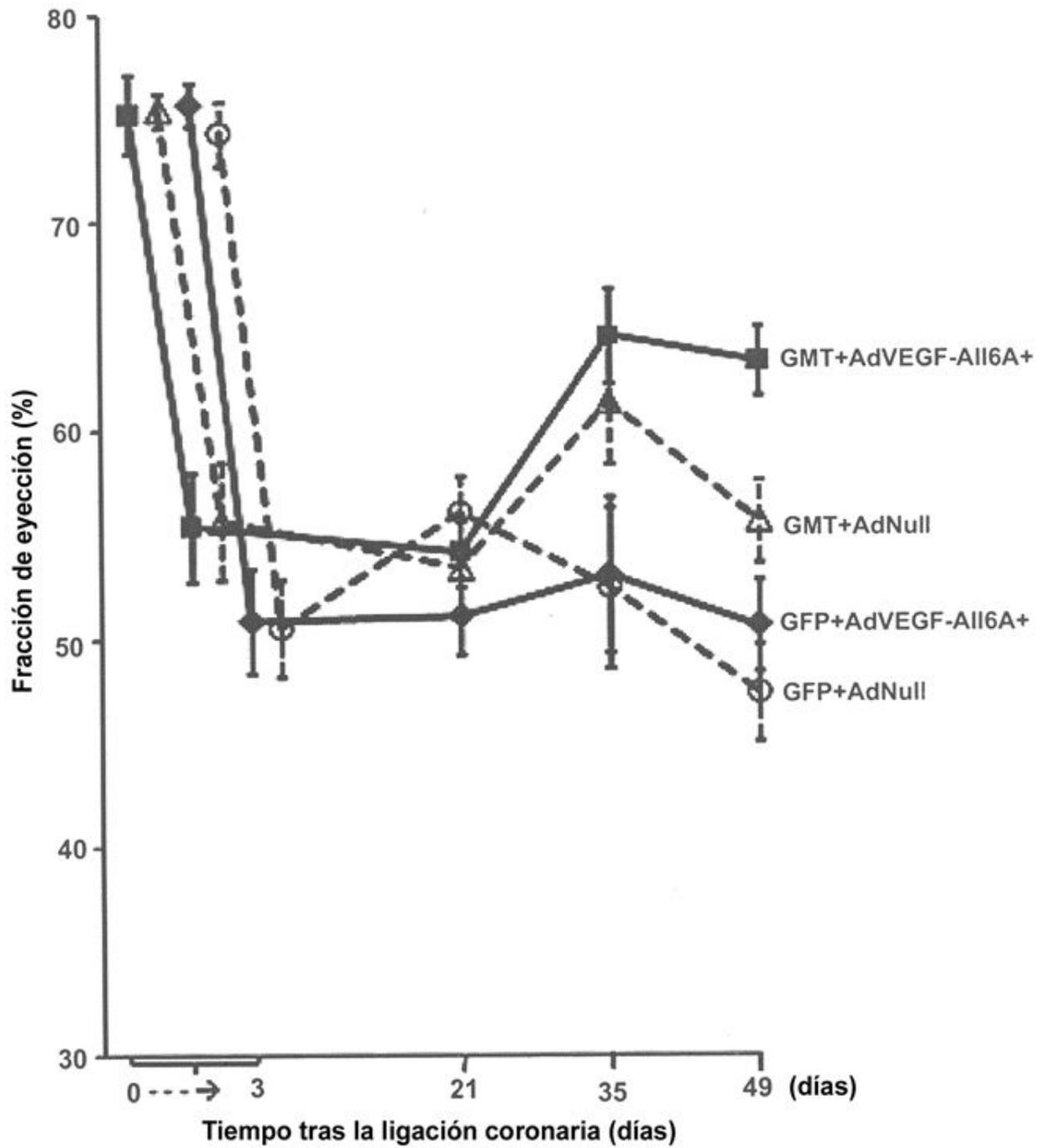


FIG. 6B

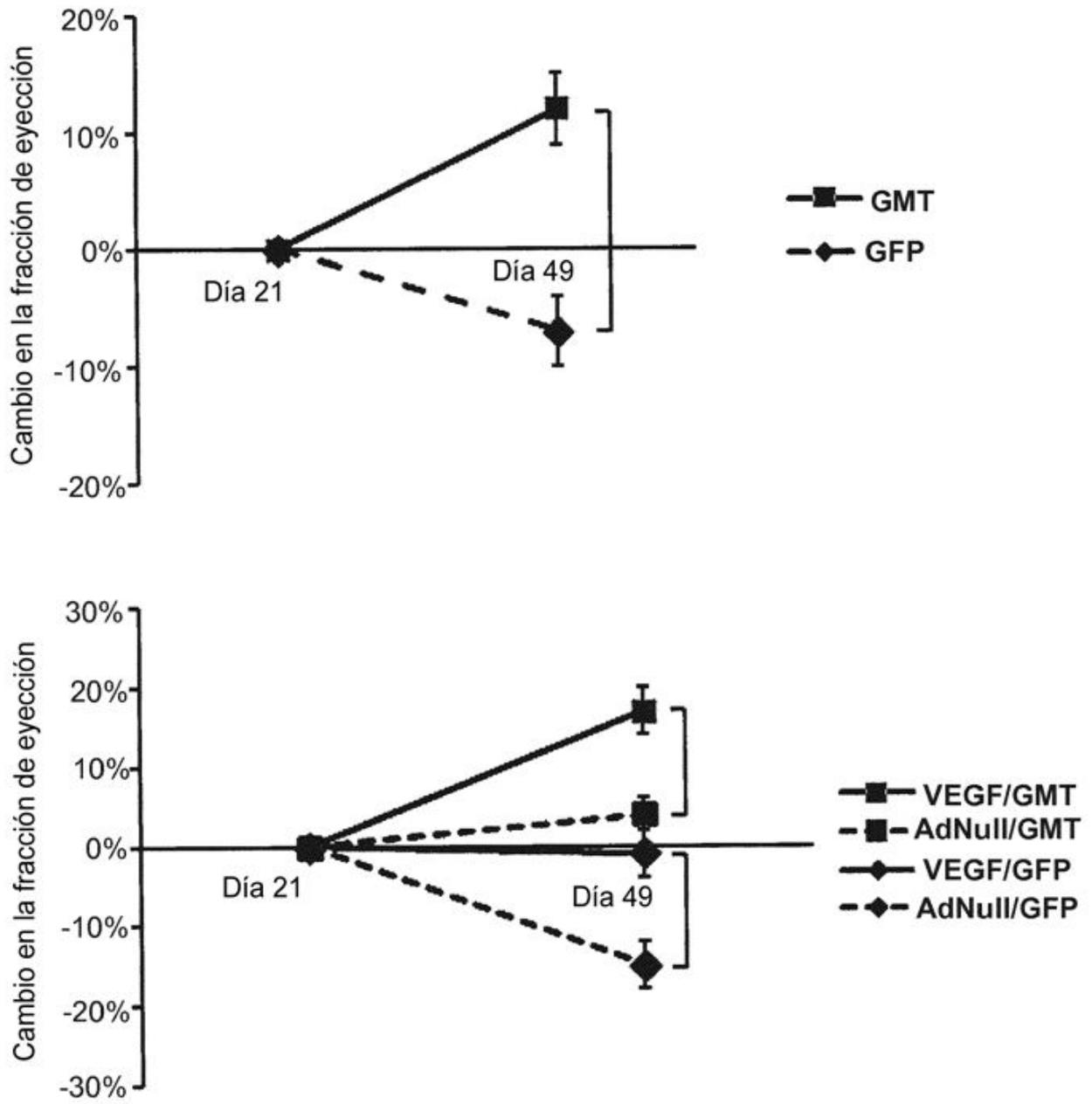


FIG. 6C

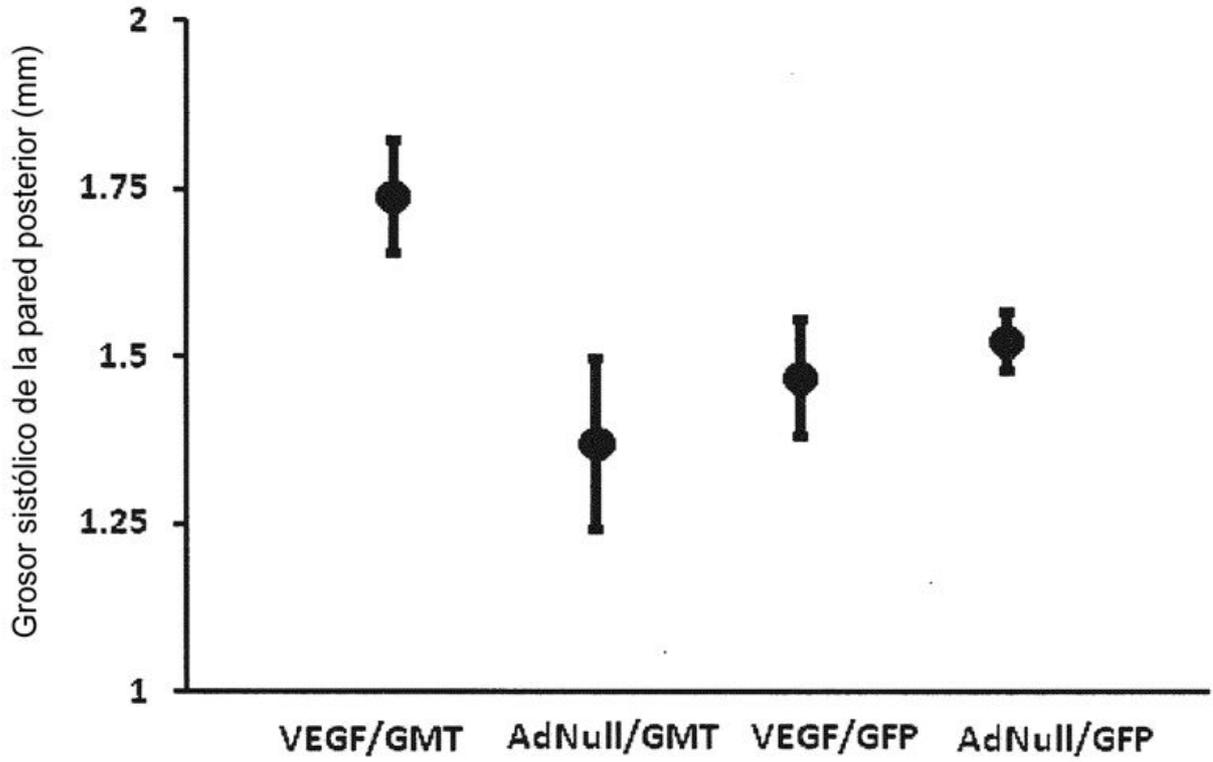
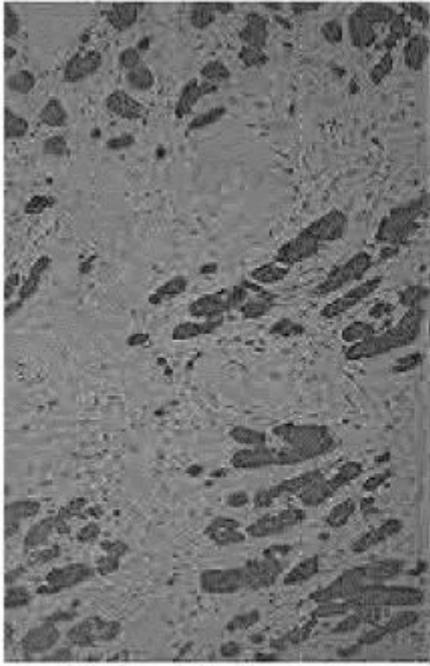


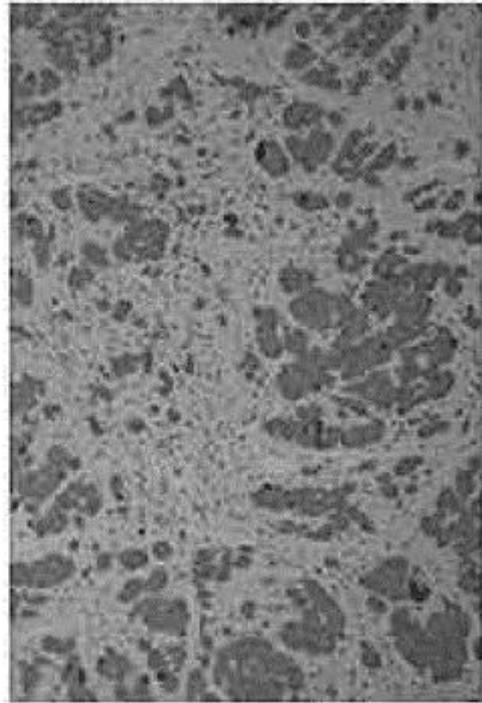
FIG. 7



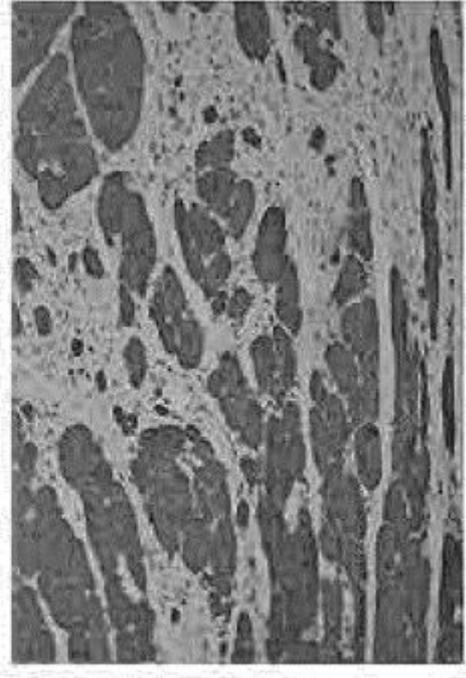
0-25%



25-50%



50-75%



75-100%

FIG. 8

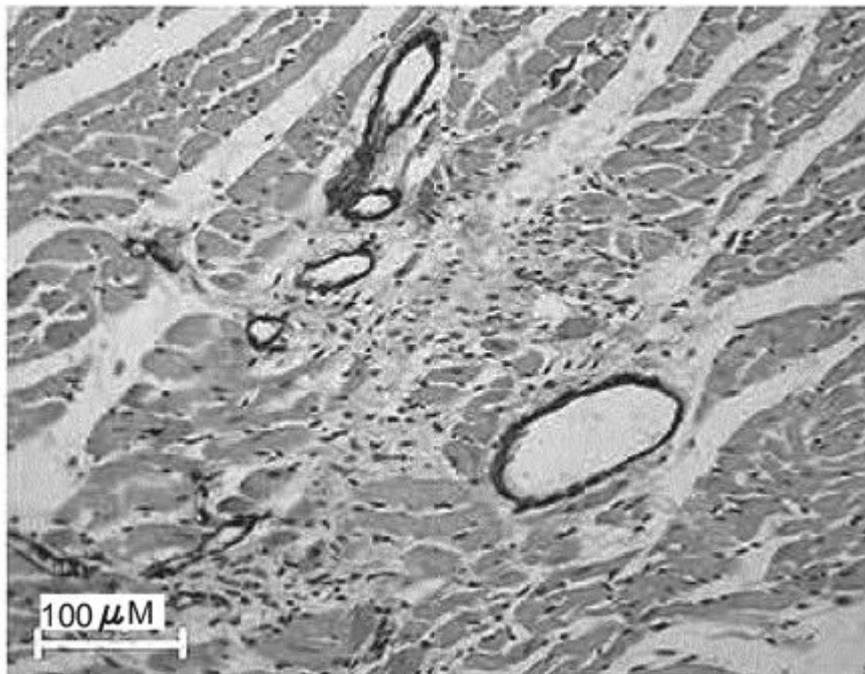
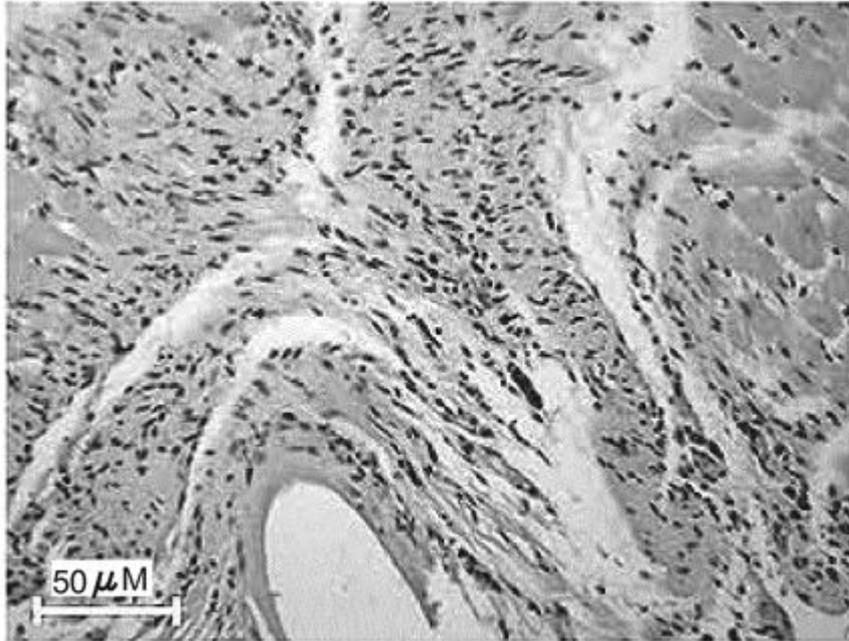


FIG. 9

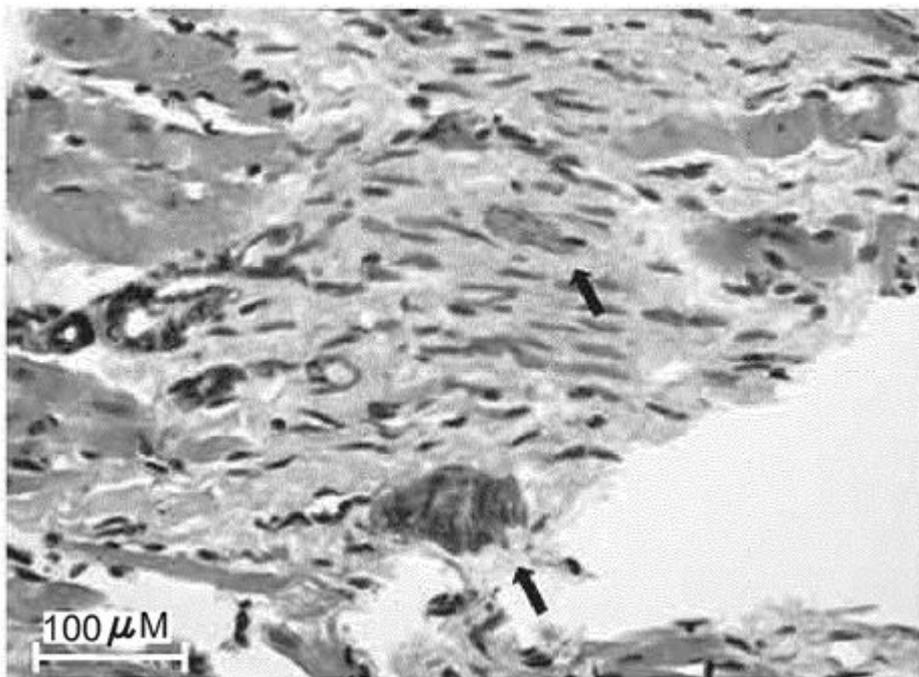
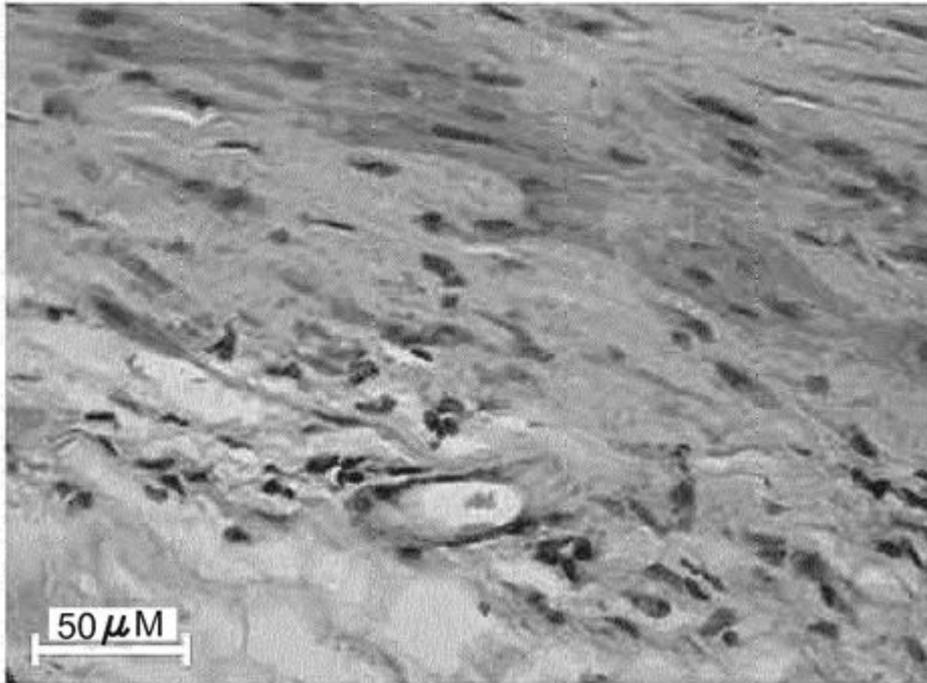
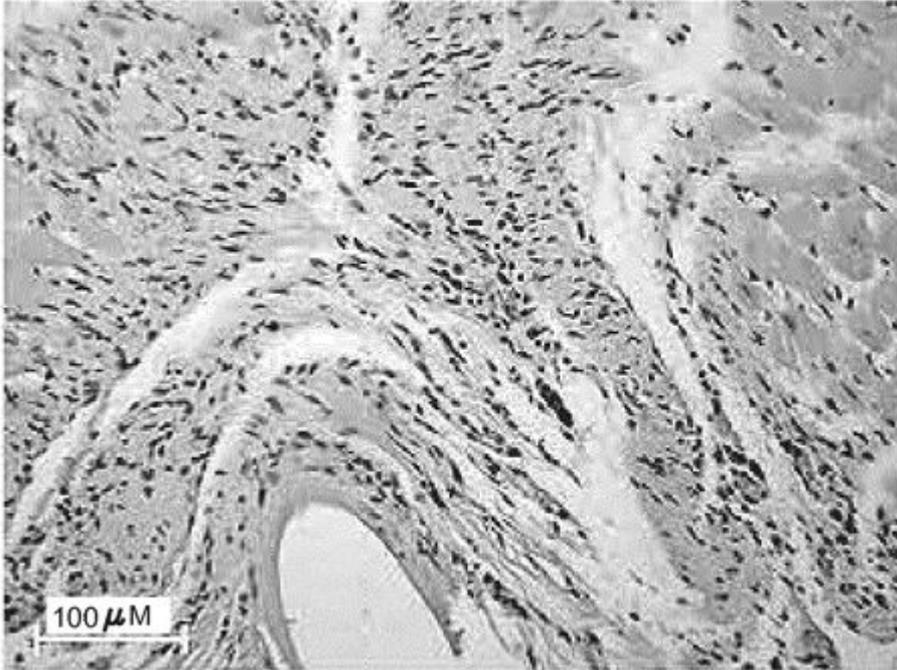
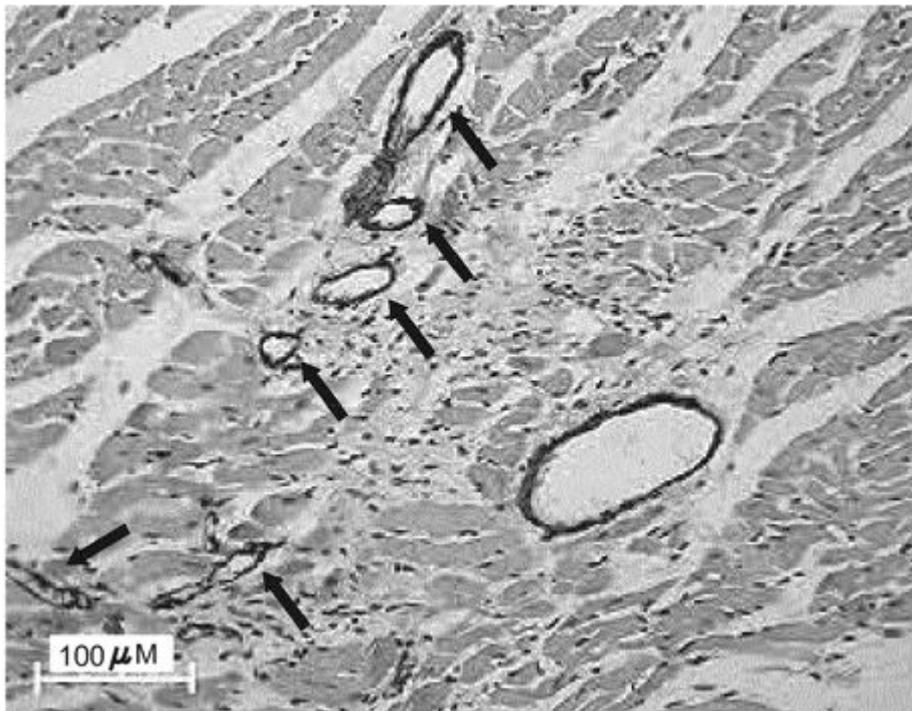


FIG. 10A



AdNull/
GFP



VEGF/
GMT

FIG. 10B

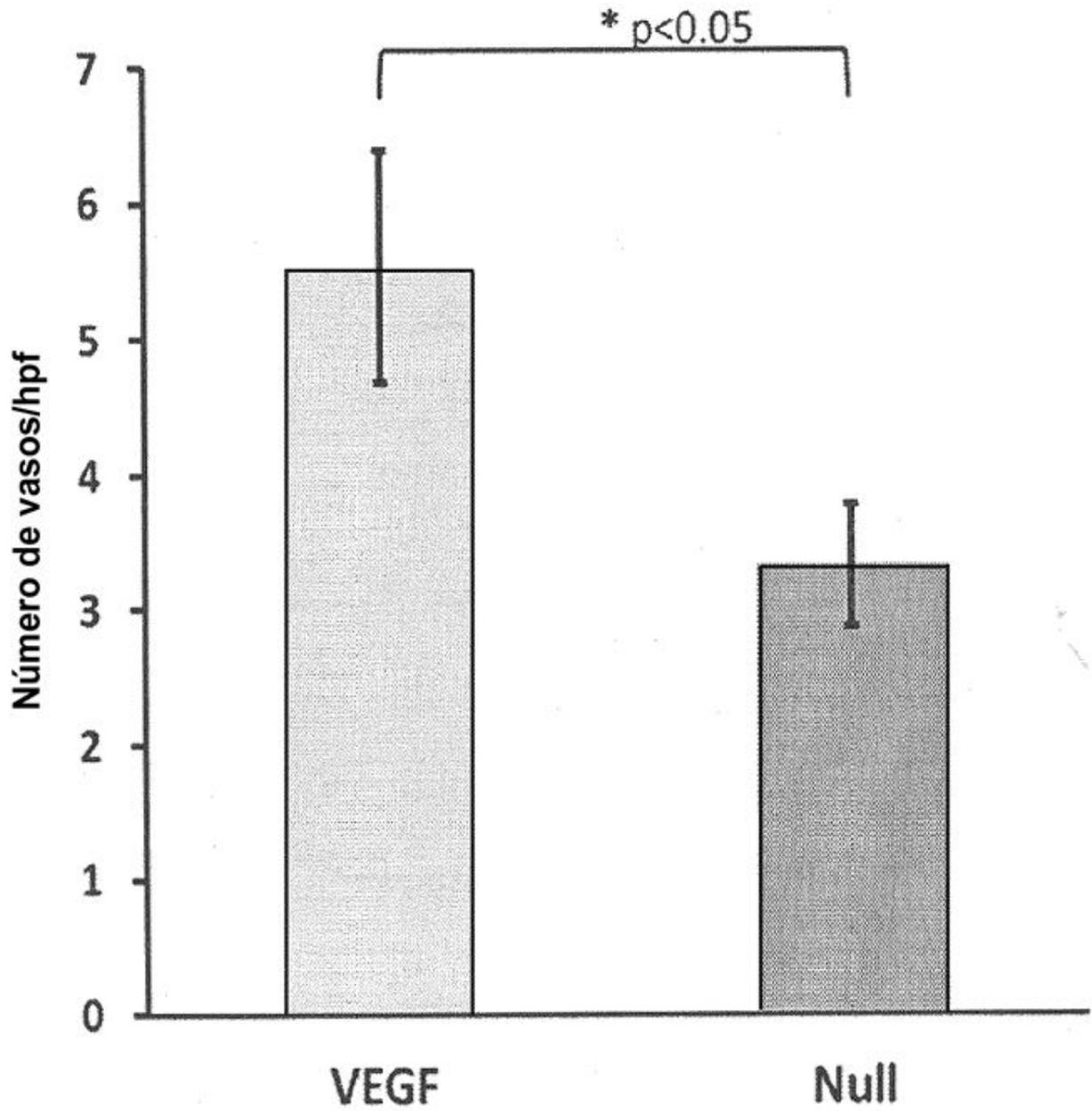


FIG. 11A

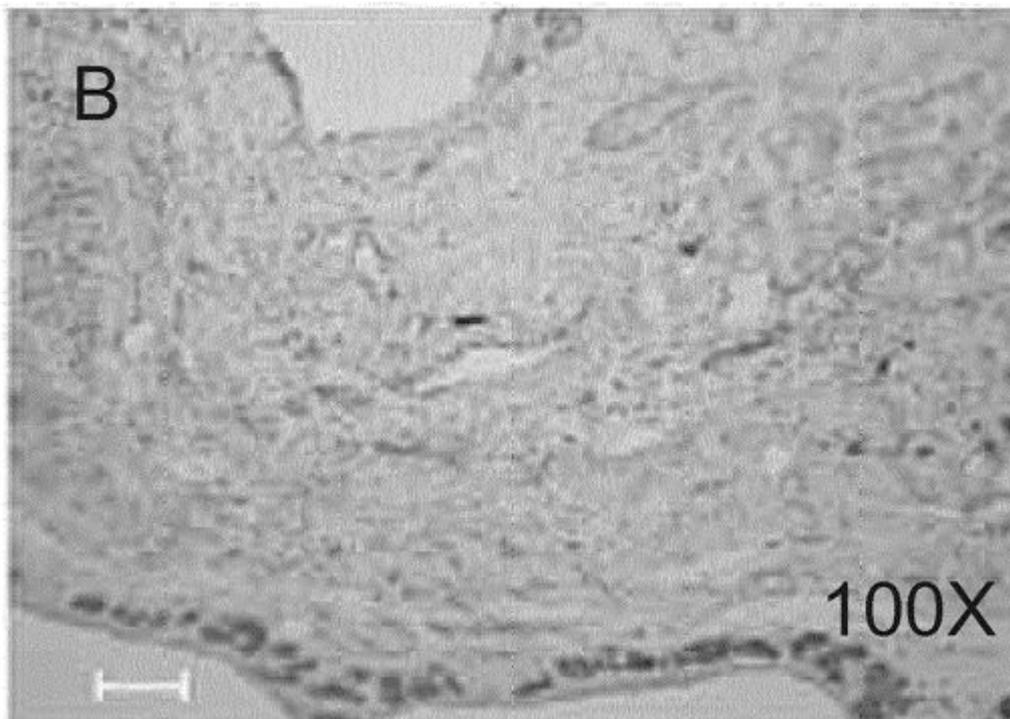
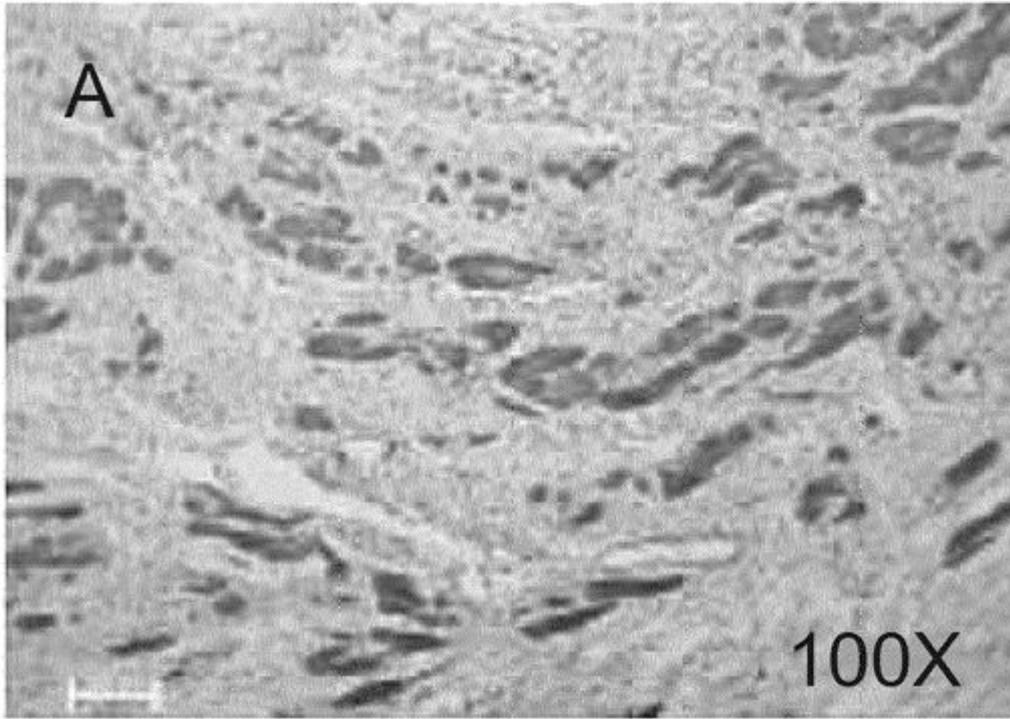
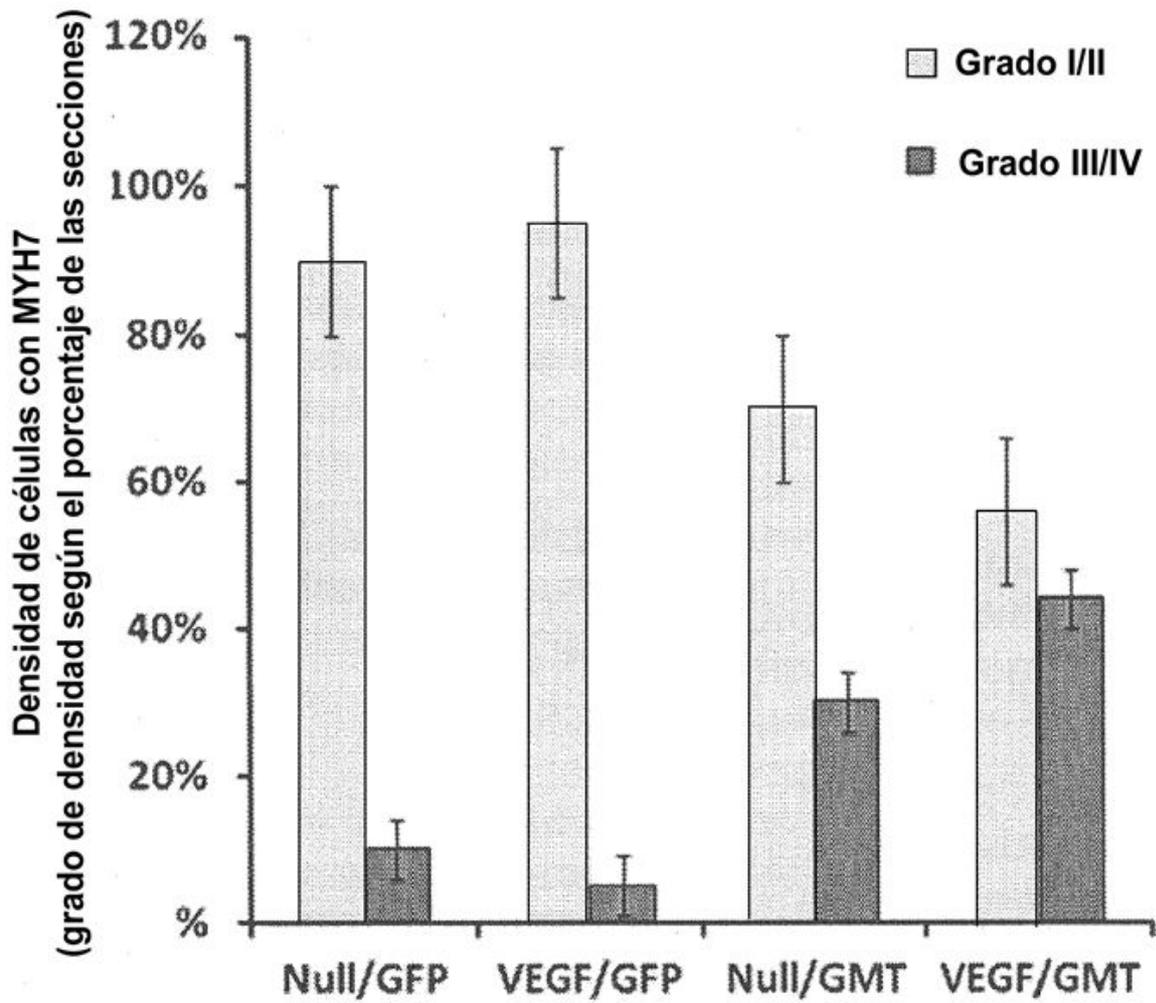


FIG. 11B



p < 0.01

FIG. 12A

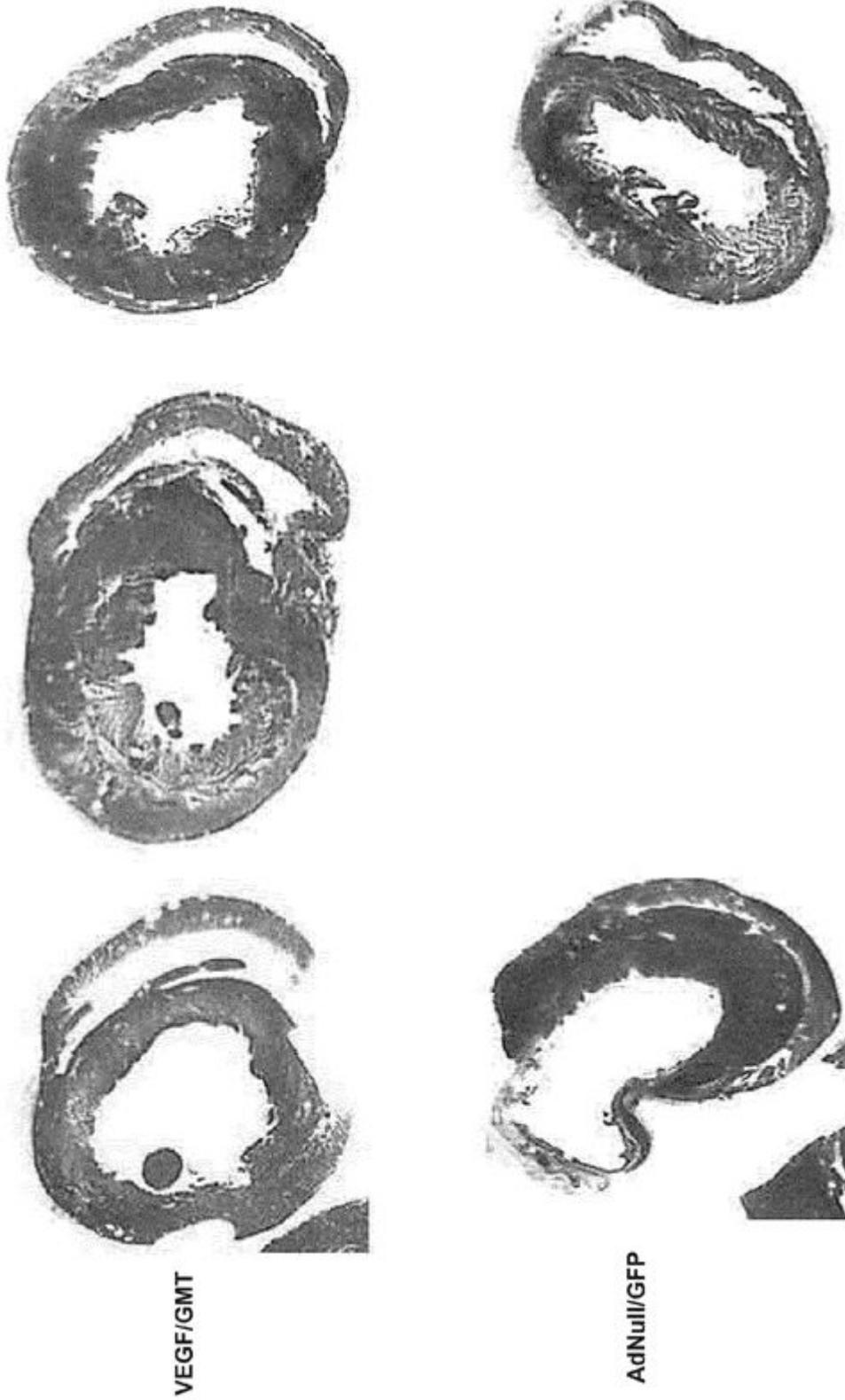


FIG. 12B

