

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 251**

51 Int. Cl.:

A61K 38/29 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2007** **PCT/EP2007/003272**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007** **WO07118680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2007** **E 07724213 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017** **EP 2007416**

54 Título: **Hormona paratiroidea (PTH) para su utilización en el tratamiento de la isquemia**

30 Prioridad:

19.04.2006 US 792943 P

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(100.0%)
GESCHWISTER-SCHOLL-PLATZ 1
80539 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

FRANZ, WOLFGANG, M.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 654 251 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

Hormona paratiroidea (PTH) para su utilización en el tratamiento de la isquemia.

La presente invención se refiere a unas composiciones farmacéuticas que comprenden hormona paratiroidea (PTH) y fragmentos de la misma, preferentemente PTH (1-34), para su utilización en el tratamiento de cardiopatías isquémicas. La composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH se utiliza para reclutar células madre en un tejido que padece isquemia, en la que dichas células madre preferentemente pueden reparar y/o regenerar dicho tejido que padece isquemia. La PTH puede utilizarse en la composición farmacéutica sola o en combinación con un antagonista de DPP-IV o con un G-CSF o un fragmento de G-CSF.

Células madre

La movilización de células madre hematopoyéticas se ha convertido en un método establecido para el trasplante de células madre autólogas. En condiciones de estado estacionario, el número de células madre hematopoyéticas es mucho menor en sangre periférica que en médula ósea. La movilización de estas células con quimioterapia y/o factores de crecimiento hizo posible aumentar la concentración en la sangre periférica, haciendo posible el trasplante de células madre con células madre hematopoyética autólogas de la sangre periférica. Este método da como resultado un tratamiento más suave y una recuperación hematológica más rápida¹. Además de estos hallazgos, en los últimos años varios estudios han mostrado un aumento de la neovascularización en modelos isquémicos después de la movilización de células progenitoras con citocinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos² y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos³, factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial vascular⁴, el factor de crecimiento placentario⁵ y eritropoyetina⁶, quimiocinas tales como el factor 1 derivado de células del estroma⁷, hormonas tales como estrógenos⁸ y fármacos hipolipemiantes^{9,10} así como la actividad física¹¹. Por consiguiente, esto podría conducir a nuevas opciones terapéuticas para enfermedades isquémicas.

Además, la movilización mediada por citocinas de células madre hematopoyéticas se ha convertido en un método establecido en el campo del trasplante de células madre autólogas de sangre periférica.

Hormona paratiroidea (PTH)

Se conoce bien la hormona paratiroidea como una de las dos hormonas principales que modulan la homeostasis de calcio y fósforo. Es responsable de mantener concentraciones de calcio ionizado en suero dentro de un estrecho intervalo, a través de su acción para estimular la reabsorción de calcio tubular renal y la resorción ósea. A más largo plazo, la hormona paratiroidea también estimula la conversión de calcidiol en calcitriol en células tubulares renales, estimulando de ese modo la absorción de calcio intestinal¹²⁻¹⁶. En los últimos años, se mostró que el receptor para la hormona paratiroidea se expresaba en varios tejidos, sugiriendo funciones más complejas de esta hormona^{17,18}. Sólo recientemente se ha mostrado la influencia de la hormona paratiroidea sobre el nicho de células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea, donde refuerza la supervivencia y autorrenovación de células madre hematopoyéticas¹⁹. Zhu²² sugirió que a través de la señalización de PTH se regula por incremento la expresión de N-cadherina y Jag1, lo que refuerza la supervivencia y autorrenovación de HSC a través de la ruta de señalización de Notch 1.

PTH(1-34) exógena *in vitro* e *in vivo* y su péptido secretado endógeno relacionado PTHrP son potentes dilatadores del lecho arterial^{30,31}. Además, la PTH (1-34) aumenta de manera dependiente de la dosis el flujo sanguíneo miocárdico regional^{31,32}. Recientemente, se mostró que la administración de PTH (1-34) en un modelo de reperfusión en cerdos después de infarto de miocardio mejoró la contractilidad miocárdica y la perfusión miocárdica³². La vasodilatación arterial se basa en la activación del receptor de PTH/PTHrP tipo I³³ que se sabe que se expresa en células del músculo liso. La activación del receptor de PTH/PTHrP da como resultado un aumento de la producción de AMPc. En resumen, se sabe que la PTH presenta funciones cardiovasculares tales como vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo miocárdico, efectos hipotensivos, hipertrofia miocárdica, efectos cronotrópicos positivos y de contractilidad. Sin embargo, este último efecto se comenta de manera controvertida en la materia. Además, también se ha observado en estudios clínicos que el avance de la enfermedad cardiovascular puede estar asociado con PTH; véase Wing *et al.* (1984), Contr. Nephrol., Bernardi *et al.* (1985), Nephron o London *et al.* (1987), Kidney Int. Los ratones que carecen del receptor de PTH/PTHrP tipo I mueren en la edad gestacional media alrededor del día 12 debido a una necrosis abrupta de cardiomiocitos mostrando el papel esencial de PTH en el desarrollo cardiovascular temprano. Además, el tratamiento con PTH(1-34) indujo un mayor nivel de ARNm de SDF-1 en la médula ósea³⁵.

Péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP)

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) es realmente una familia de hormonas proteicas producidas por la mayor parte de, si no todos, los tejidos en el cuerpo. Un segmento de PTHrP está estrechamente relacionado con la hormona paratiroidea, y de ahí su nombre, pero los péptidos de PTHrP presentan un espectro de efectos mucho más amplio. La hormona paratiroidea y algunos de los péptidos de

PTHrP se unen al mismo receptor, pero los péptidos de PTHrP también se unen a varios otros receptores. Se descubrió PTHrP como proteína secretada por determinados tumores que provocaban hipercalcemia (niveles elevados de calcio en sangre) en pacientes afectados. Se mostró enseguida que la secreción descontrolada de PTHrP por muchas células tumorales induce hipercalcemia al estimular la resorción de calcio del hueso y la supresión de la pérdida de calcio en la orina, de manera similar a lo que se observa con el hiperparatiroidismo. Sin embargo, rápidamente resultó evidente que PTHrP presentaba muchas actividades no observadas con la hormona paratiroidea. Por ejemplo, se cree en la materia que PTHrP provoca baja tensión arterial y taquicardia en relación con hipercalcemia paraneoplásica; véase Nichols *et al.* (1989), *Endocrinology*.

Enfermedades isquémicas

La isquemia es una restricción en el riego sanguíneo, generalmente debido a factores en los vasos sanguíneos, con la lesión o la disfunción resultante del tejido. La isquemia es una característica de las cardiopatías, accidentes isquémicos transitorios, accidentes cerebrovasculares, anomalías arteriovenosas rotas y enfermedad oclusiva arterial periférica. Por tanto, la isquemia afecta a casi todos los órganos y tejidos. Tejidos especialmente sensibles a un riego sanguíneo inadecuado son el corazón, los riñones y el cerebro. La isquemia en tejido cerebral, por ejemplo debido a ictus o traumatismo craneal, provoca que se desencadene un proceso denominado la cascada isquémica, en el que enzimas proteolíticas, especies reactivas de oxígeno y otros productos químicos perjudiciales y puede destruir en última instancia tejido cerebral. La isquemia del músculo cardíaco debida a una enfermedad cardiovascular, por ejemplo, debido a infarto de miocardio es un problema importante al que ha de enfrentarse la medicina moderna. La enfermedad cardiovascular es la causa número uno de mortalidad en países occidentales y se cobra aproximadamente 1 millón de vidas cada año en los Estados Unidos. La mayoría de muertes de causa cardiovascular se deben a arteriopatía coronaria (AC). AC es una enfermedad progresiva que da como resultado un espectro de manifestaciones clínicas, que van de aterosclerosis asintomática y angina estable a los síndromes coronarios agudos (es decir, angina inestable, infarto de miocardio (IM) y muerte súbita de causa isquémica). El tratamiento de elección para IM agudo con elevación del segmento ST es o bien trombólisis o bien intervención coronaria primaria (ICP) cuando el cateterismo coronario es accesible inmediatamente. Estas estrategias de revascularización están bien establecidas en el tratamiento de IM agudo cuando se inicia el tratamiento muy pronto después de la aparición del infarto (habitualmente en el plazo de 6 horas).

A pesar del hecho de que la mortalidad hospitalaria después de infarto de miocardio disminuyó con un tratamiento mejorado en la última década, cada vez hay más pacientes que experimentan el deterioro a insuficiencia cardíaca a lo largo del tiempo. Por tanto, son necesarias estrategias regenerativas alternativas para superar este importante problema. Algunos datos prometedores sobre modelos de animales así como algunos estudios clínicos revelaron efectos positivos después del trasplante de células derivadas de médula ósea sobre la función cardíaca después del IM³²⁻³⁹. Una alternativa elegante podría ser la administración de sustancias cardioprotectoras que también presentan la capacidad para movilizar e influir en células madre. Algunos estudios previos han puesto de manifiesto que la administración de citocinas de movilización de células madre como G-CSF después de infarto de miocardio reduce el daño miocárdico y la mortalidad^{35,40,41}. Además, los primeros estudios clínicos han mostrado un papel beneficioso del tratamiento con G-CSF sobre la función tras IM^{42,43}. Además, en los últimos años se ha demostrado en diferentes estudios que la movilización de células derivadas de médula ósea es una potente herramienta para fomentar la neovascularización en tejidos isquémicos. Algunos datos prometedores sobre modelos de animales así como algunos estudios clínicos han mostrado que el trasplante o la movilización de células derivadas de médula ósea muestran efectos positivos sobre la función cardíaca después de infarto de miocardio³⁵⁻³⁹.

Ballen *et al.* (*Blood* 106 (2005), página 557 A) informan que la PTH puede mejorar la movilización de células madre autólogas. Calvi *et al.* (*Nature* 425 (2003), páginas 841-846) dan a conocer que las células osteoblásticas regulan el nicho de células madre hematopoyéticas. En Horowitz *et al.* (*J. Clin. Invest.* 83 (1989), páginas 149-157) se describe que PTH y LPS inducen células similares a osteoblastos mínimas. El documento WO 2004/056186 A1 se refiere a la administración de VEGF basada en células. Orlic *et al.* (*PNAS* 98 (2001), páginas 10344-10349) informan sobre cómo las células de la médula ósea movilizadas reparan el corazón con infección. El artículo de Kuete *et al.* (*D. Med. Wschrft* 129 (2004), páginas 424-428) investigó la movilización de células madre por G-CSF para la regeneración de tejido miocárdico después de infección miocárdica. Kocher *et al.* (*Nat. Med.* 7 (2001), páginas 430-436) hallaron que la neovascularización de miocardio con isquemia por angioblastos humanos derivados de médula ósea previene la apoptosis de cardiomiocitos, reduce la remodelación y mejora la función cardíaca.

No obstante, a pesar de muchos esfuerzos existe la necesidad de medios y métodos eficaces para tratar y/o prevenir la isquemia. En particular, existe la necesidad de medios y métodos económicos y/o clínicos eficaces para el tratamiento y/o la prevención de la isquemia.

Por tanto, el problema técnico de la presente invención es satisfacer las necesidades descritas anteriormente. Se logra la solución de este problema técnico proporcionando las realizaciones descritas en la presente memoria y caracterizadas en las reivindicaciones.

Tal como se detalla a continuación en la presente memoria y también se resume en la parte experimental de esta invención, la presente invención proporciona remedios para la isquemia, en particular, medios, métodos y utilizaciones para prevenir y/o tratar la isquemia.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos habitualmente por un experto habitual en la materia. Preferentemente, los términos utilizados en la presente memoria se definen tal como se describen en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger. H.G.W, Nagel, B. y Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza). En la totalidad de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que el término "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecido pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Se citan varios documentos en la totalidad del texto de esta memoria descriptiva. Cada uno de los documentos citados en la presente memoria (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya se citasen anteriormente o se citen a continuación, se incorporan por la presente como referencia en su totalidad. No debe interpretarse nada en la presente memoria como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder a tal divulgación en virtud de una invención previa.

Debe indicarse que tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un(o)", "una" y "el/la", incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales diferentes reactivos, y la referencia a "el método" o "la utilización" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes o utilizaciones conocidas por los expertos habituales en la materia que podrían modificarse o sustituir a los métodos o las utilizaciones descritos en la presente memoria.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Por consiguiente, en un aspecto la presente invención se refiere a la utilización de hormona paratiroidea (PTH) o fragmentos específicos de la misma para la preparación de una composición farmacéutica para reclutar células madre en tejido que padece isquemia y/o apoptosis. Se cree, sin querer limitarse por la teoría, que dichas células madre tras la administración de PTH o fragmentos específicos de la misma se movilizan desde la médula ósea de modo que estén presentes en la periferia. Se supone además que dichas células madre se reclutan preferentemente en tejido que padece isquemia. Además, se cree que PTH o fragmentos específicos de la misma presentan un efecto beneficioso directo sobre células de tejido que padece isquemia a través de la unión al receptor de PTH, respectivamente. Por consiguiente, se cree que PTH o fragmentos específicos de la misma presentan un efecto beneficioso sobre tejido que padece isquemia debido al efecto sobre células madre tal como se describe en la presente memoria y/o debido a un efecto directo sobre células de tejido que padece isquemia.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que pueden reclutarse células madre de la médula ósea a la periferia, preferentemente en tejido que padece isquemia por la hormona paratiroidea (PTH) o fragmentos específicos de la misma. Por consiguiente, los presentes inventores tenían como objetivo definir en un sistema de modelo murino el impacto de PTH sobre la movilización de células madre, el crecimiento de vasos, la supervivencia tras infarto de miocardio así como parámetros funcionales de miocardio infartado 6 días y 30 días después de un procedimiento quirúrgico detallado a continuación en la presente memoria y en los ejemplos adjuntos. Los datos obtenidos en el modelo murino con respecto a la prevención y/o el tratamiento de isquemia del corazón son generalizables para la prevención y/o el tratamiento de isquemia de otros tejidos y/u órganos tal como se describe en la presente memoria.

La movilización de células madre de la médula ósea mediante terapia con citocinas presenta una alternativa a la aplicación directa de células madre mediante cateterismo cardiaco: parece que las células madre movilizadas e inyectadas solo permanecen durante un corto tiempo en el miocardio infartado. Esto podría deberse al transcurso de tiempo de la capacidad de migración miocárdica tras un infarto: HSC expresa el receptor de migración CXCR-4 que corresponde a su factor de migración único SDF-1. SDF-1 está regulado por incremento durante aproximadamente 24-48 horas tras el infarto. Sin querer limitarse por la teoría, este periodo podría ser demasiado corto para una migración eficiente y constante de células madre en pacientes humanos. Así, una regulación por incremento eficiente y prolongada de SDF-1 podría optimizar la terapia con células madre después de, por ejemplo, infarto de miocardio.

SDF-1 (CXCL12) es, entre otros, un sustrato para CD26, que es una dipetidil peptidasa extracelular unida a membrana que empalma proteínas en su extremo N-terminal después de la secuencia de aminoácidos X-alanina o X-prolina. Un gran número de células madre de médula ósea expresa CD26 en la superficie celular. Bloqueando la actividad de CD26, se cree que puede lograrse un aumento en la capacidad de trans migración hacia un gradiente de SDF-1.

En combinación con la aplicación basada en catéter o de movilización de citocinas de células madre, esto podría conducir a un gran avance de la terapia con células madre en enfermedades cardíacas.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, los presentes inventores han analizado el efecto de la administración del inhibidor DPP-IV diprotina A después de infarto de miocardio en un modelo de ratón. DPP-IV es la abreviatura para dipeptidil peptidasa IV y también se denomina CD26 en la presente memoria y también en la bibliografía. La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV o CD26) escinde dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y degrada, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1. La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV o CD26) puede inhibirse, por ejemplo, mediante diprotina A. Los datos obtenidos por los presentes inventores (véanse los ejemplos adjuntos y figuras, en particular el ejemplo 22 y la figura 14) muestran que la inhibición de DPP-IV por medio de, por ejemplo, diprotina A conduce a una función cardíaca significativamente mejorada después de infarto de miocardio en un modelo de ratón. Por tanto, un antagonista de DPP-IV (también utilizado de manera intercambiable en la presente memoria como “inhibidor de DPP-IV”) tal como se define en la presente memoria puede aplicarse en las realizaciones descritas en la presente memoria, es decir, en las utilizaciones, métodos y/o composiciones de la presente invención en lugar de, o junto con hormona paratiroidea (PTH) o fragmentos específicos de la misma. Por consiguiente, la utilización combinatoria/de combinación de PTH o fragmentos específicos de la misma y de un inhibidor de DPP-IV también está prevista en las realizaciones de esta invención. El término hormona paratiroidea (PTH) se describe en gran detalle a continuación en la presente memoria. Se entenderá que diprotina A es, por supuesto, sólo un ejemplo de un antagonista de DPP-IV dentro del significado de la presente invención y, por tanto, en general, se contempla que cualquier antagonista de DPP-IV se aplique en las utilizaciones, métodos y/o composiciones de la presente invención. En la materia se conocen antagonistas de DPP-IV, por ejemplo, diprotina A, vildagliptina o sitagliptina. También se describen antagonistas de DPP-IV, por ejemplo, en los documentos US2003/0119750, WO 2005/063750, DE-A1 1 010 0053, US 2004/147434, WO 2003/002596, WO 2007/035665, EP 1 743 655, US 2006/270701, US 2006/217428, WO 2005/025554, AU 2003261487, CA 2 471 204. Por ejemplo, ya están aprobados inhibidores de DPP-IV como vildagliptina o sitagliptina para su utilización clínica en diabetes mellitus y están, por tanto, dentro del alcance de la presente invención.

El término “inhibidor” define en el contexto de la presente invención un compuesto o una pluralidad de compuestos que interacciona(n) con DPP-IV de modo que la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala se reduce y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 se reduce. El término “pluralidad de compuestos” ha de entenderse como una pluralidad de sustancias que pueden o no ser idénticas. La pluralidad de compuestos puede actuar preferentemente de manera aditiva o sinérgica. Dicho compuesto o pluralidad de compuestos puede sintetizarse químicamente o producirse microbiológicamente y/o estar comprendido en, por ejemplo, muestras, por ejemplo, extractos celulares de, por ejemplo, plantas, animales o microorganismos. Además, dicho(s) compuesto(s) puede(n) pueden conocerse en la materia pero hasta ahora no se conoce si pueden reducir la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 mediada por DPP-IV.

La interacción del inhibidor con DPP-IV de modo que la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala se reduce y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 se reduce puede, según esta invención por ejemplo, efectuarse mediante una reducción de la cantidad de la DPP-IV en células, en tejidos que comprenden dichas células o sujetos que comprenden dicho tejidos o células por ejemplo por aptámeros, oligonucleótidos antisentido, ARNi o ARNip que se unen específicamente a las secuencias de nucleótidos que codifican para dicha DPP-IV o por ribozimas que degradan específicamente polinucleótidos que codifican para DPP-IV; bloqueando el sitio de unión de DPP-IV para sus sustratos; mediante inhibición competitiva o alostérica de la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 o reduciendo o evitando de otro modo la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1, por ejemplo dirigiendo anticuerpos y/o aptámeros a DPP-IV y reduciendo o evitando así la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1. Por tanto, un ejemplo de un inhibidor de esta invención es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo cuya unión interfiere con la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 mediada por DPP-IV; un constructo antisentido, ARNi, ARNip o constructos de ribozima dirigidos contra un transcrito o la secuencia de nucleótidos codificante de DPP-IV; secuencias de nucleótidos que codifican para tales constructos y compuestos que inhiben la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1.

El término “reducido” o “que reduce” tal como se utiliza en la presente memoria define la reducción de la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1. Para el tratamiento médico es preferible utilizar inhibidores que actúan de manera reversible y que no bloquean completamente procesos bioquímicos, porque tales fármacos pueden aplicarse en una dosificación que cumple con el efecto deseado.

Por consiguiente, se prevé que el inhibidor reduzca por lo menos la escisión de dipéptidos N-terminales después de XPro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 tal como se media por DPP-IV

hasta el 5%, el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o incluso el 100% cuando se compara la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 que se logra sin la adición de dicho inhibidor. La reducción también dependerá de la dosificación y de la forma de administración del inhibidor. El régimen de dosificación que utiliza el inhibidor de la presente invención, se selecciona, por tanto, según una variedad de factores incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad del estado que va a tratarse; la vía de administración; y el compuesto particular empleado. Se reconocerá que un médico o veterinario experto en la materia puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz del compuesto requerida para prevenir, contrarrestar o detener el avance del estado.

Dicho(s) inhibidor(es) reduce(n) específicamente la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 mediada por DPP-IV. El término "reduce(n) específicamente" utilizado según la presente invención significa que el inhibidor provoca específicamente una reducción de la escisión de dipéptidos N-terminales después de X-Pro/X-Ala y/o la degradación de, por ejemplo, los sustratos SDF-1 y GLP-1 mediada por DPP-IV pero no presenta o no presenta esencialmente efecto significativo en otras enzimas o proteínas celulares.

El término "antagonista de DPP-IV" o "inhibidor de DPP-IV" cuando se utiliza en la presente memoria también abarca un agente o un fármaco o un compuesto que inhibe o antagoniza el efecto fisiológico de DPP-IV. También abarca antagonistas competitivos, no competitivos, funcionales, no funcionales y químicos que inhiben o antagonizan el efecto fisiológico de DPP-IV.

Cualquier compuesto puede someterse a prueba mediante métodos conocidos en la materia para determinar su efecto en DPP-IV, es decir, si puede o no actuar como inhibidor de DPP-IV. Por ejemplo, para medir la actividad de DPP-IV, puede emplearse un ensayo fluorométrico continuo utilizando, por ejemplo, el péptido Gly-Pro-AMC, que escinde la enzima liberando la aminometilcumarina fluorescente (AMC). Una reacción típica contenía enzima 50 pmol/l, Gly-Pro-AMC 50 μ mol/l y tampón (HEPES 100 mmol/l, pH 7,5, BSA 0,1 mg/ml) en un volumen de reacción total de 100 μ l. La liberación de AMC puede monitorizarse utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. La enzima utilizada en estos estudios puede ser soluble, estar unida o inmovilizada, y es preferentemente una proteína humana producida, por ejemplo, en un sistema de expresión en baculovirus. Por consiguiente, con el fin de medir una actividad de inhibición de DPP-IV de un compuesto, un compuesto de este tipo se añade al ensayo descrito anteriormente y el experto en la materia puede monitorizar fácilmente si la liberación de AMC se inhibe en comparación con una reacción de prueba en la que no se añade el compuesto que va a someterse a prueba.

Los presentes inventores han investigado la hormona paratiroidea (PTH) y/o un antagonista de DPP-IV por su potencial para movilizar células derivadas de médula ósea y/o para mejorar la migración y/o direccionamiento de células madre. De hecho, se observó que la hormona paratiroidea (PTH), que es conocida como una hormona reguladora en la homeostasis de calcio y fósforo, es un agente eficaz para movilizar células de médula ósea de manera que esté presente en la periferia en la que dichas células madre, sin limitarse a ninguna teoría, se deben a la acción de PTH reclutada preferentemente en tejidos isquémicos y/o órganos.

Por consiguiente, con el fin de investigar el efecto de la hormona paratiroidea (PTH) en la movilización de células derivadas de médula ósea madre hematopoyéticas, se trataron ratones con hormona paratiroidea (PTH) (80 μ g/kg/d) durante 6 o 14 días. Se trató un grupo de control negativo con solución salina, un grupo de control positivo con factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) (200 μ g/kg/d) durante 5 días. Los resultados de citometría de flujo en distintas subpoblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ evidenciaron un aumento significativo en ratones tratados con PTH (de 1,5 a 9,8 veces). En comparación con el tratamiento con G-CSF, la movilización de células CD45⁺/CD34⁺ mediante PTH es menos eficaz (el 20-50%) mientras que los efectos en células CD45⁺/CD34⁻ fueron similares en ambos grupos. En médula ósea, todas las subpoblaciones de CD45⁺/CD34⁺ permanecieron constantes después del tratamiento con PTH pero disminuyeron después del tratamiento con G-CSF. El porcentaje de subpoblaciones de CD45⁺/CD34⁻ disminuyó significativamente en todos los grupos. En ratones tratados con PTH, los resultados de ELISA revelaron un aumento significativo en los valores de G-CSF (2,8 veces) pero no de factor de células madre (SCF). En resumen, estos resultados mostraron que PTH puede inducir movilización de células derivadas de médula ósea. En particular, los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron un aumento de todas las subpoblaciones de células derivadas de médula ósea en la sangre periférica después de la estimulación con PTH. En la médula ósea, las subpoblaciones de CD45⁺/CD34⁺ permanecieron constantes mientras que el porcentaje de subpoblaciones de CD45⁺/CD34⁻ disminuyó después de la estimulación. Los niveles séricos de G-CSF pero no de SCF muestran valores aumentados.

Por consiguiente, la presente invención muestra por primera vez el papel de la hormona paratiroidea como un estimulador eficaz para la movilización de células derivadas de médula ósea. Por tanto, PTH es una sustancia prometedora para la reparación de tejidos defectuosos, en particular tejidos isquémicos por medio de la movilización de células derivadas de médula ósea tal como se describe en la presente memoria.

De hecho, los presentes inventores, al abordar la cuestión de si PTH además de sus efectos vasodilatadores, regula el nicho de células madre de médula ósea, para efectuar la reparación del tejido, en particular tejido isquémico tal como se describe en la presente memoria, tenían como objetivo definir la supervivencia, los parámetros funcionales así como la movilización de células madre en un modelo murino de infarto de miocardio inducido quirúrgicamente (IM) después del tratamiento con PTH. Con ese fin, 12-24 h después de la ligación de la arteria descendente anterior izquierda (LAD), se inyectó PTH (1-34) de rata una vez al día durante 14 días consecutivos. En dos puntos de tiempo (día 6 y día 30) después del procedimiento quirúrgico, se investigaron las relaciones de presión en volumen *in vivo* utilizando catéteres de conductancia. Además, se determinó el tamaño de infarto así como la proliferación celular mediante incorporación de BrdU y Ki67. Además, se analizó la movilización de células madre mediante FACS.

El tratamiento con PTH dio como resultado una mejora significativa de supervivencia tras IM (el 60% frente al 40%). Los datos de FACS en muestras de sangre periférica demostraron la movilización de células madre 6 y 14 días después del tratamiento con PTH. En comparación con la solución salina, el tratamiento con PTH dio como resultado una función miocárdica mejorada que mostraba valores comparables en el día 6 (EF: el 30% frente al 15%) y día 30 (EF: el 29% frente al 15%). Se asoció la mejora funcional con una resistencia periférica reducida en el día 6 (elasticidad arterial Ea: 6,0 frente a 8,9 mmHg/ μ l) y día 30 (Ea: 11,4 frente a 7,1 mmHg/ μ l). Se redujo el tamaño de infarto en el día 30 (el 23% frente al 33%) pero no en el día 6 (el 37% frente al 39%). La histología de ratones tratados con PTH reveló una disminución reducida del grosor de la pared del VI libre en los dos puntos de tiempo investigados (día 6: 0,58 frente a 0,42 mm, día 30: 0,22 frente a 0,13 mm). Por tanto, se cree que la administración de PTH después de infarto de miocardio está asociada con la movilización de células madre, una tasa mejorada de supervivencia, y un efecto beneficioso sobre la función miocárdica de hasta 4 semanas después de IM.

Por supuesto, estos hallazgos pueden generalizarse a otros tejidos y/o órganos que padecen isquemia, puesto que los resultados experimentales mencionados anteriormente se han obtenido en un sistema modelo para la isquemia. Tal como se describe en la presente memoria, la isquemia es una restricción general en el riego sanguíneo que, por tanto, afecta a muchos órganos y/o tejidos que son estrictamente dependientes de un flujo sanguíneo continuo. Por tanto, se cree que los resultados obtenidos en el sistema de modelo murino descrito en la presente memoria son también aplicables para prevenir y/o tratar la isquemia de otros tejidos y/o órganos tal como se describe en la presente memoria.

Los resultados y hallazgos descritos anteriormente con respecto al reclutamiento de células madre en tejido que padece isquemia y/o apoptosis y para la prevención y/o el tratamiento de isquemia, respectivamente, que se describen adicionalmente en los ejemplos adjuntos son incluso más sorprendentes. Este es porque la técnica anterior no consideraba PTH beneficiosa en infarto de miocardio agudo. Concretamente, Conway *et al.* (1990), Am. Surg. 8:463-470 repitieron estudios previos realizados por Feola y colaboradores (Feola *et al.* (1985), Circ. Shock 17:163-177 y Feola *et al.* (1986), Surg. Gynecol. Obstet. 163:523-530) y ha llegado a la conclusión de que PTH no es beneficiosa en el tratamiento de infarto de miocardio agudo que provoca isquemia y, por tanto, defectos en los órganos. Sin embargo, tal como se describe en la presente memoria, la presente invención da a conocer y demuestra en la presente memoria, en particular en los ejemplos adjuntos, que PTH es preferentemente útil en la prevención y/o el tratamiento de isquemia.

Además, en el trabajo descrito por Conway *et al.* (1990), Feola *et al.* (1985) y Feola *et al.* (1986), todos citados anteriormente, la oclusión de la LAD del corazón de los ratones fue sólo temporalmente para estudiar el efecto de PTH, mientras que en los experimentos realizados por los presentes inventores, la oclusión de la LAD fue permanente. A pesar de esta grave carga para los ratones que se supone que provoca isquemia principal, es incluso más sorprendente que PTH tuvo los efectos beneficiosos descritos en la presente memoria y descritos adicionalmente en los ejemplos adjuntos.

Cuando se utiliza en el contexto de la presente invención, el término "hormona paratiroidea", también abreviada como "PTH" también se denomina a veces "parathormona" abarca tanto PTH que se produce de manera natural como formas sintéticas y otras formas de PTH, tales como variantes, análogos etc. tal como se describe a continuación en la presente memoria. Ha de entenderse que PTH es un polipéptido.

El término "polipéptido" cuando se utiliza en la presente memoria significa un péptido, una proteína, o un polipéptido que se utilizan de manera intercambiable y que abarca cadenas de aminoácidos de una longitud dada, en la que los residuos de aminoácido se unen mediante enlaces de péptido covalentes. Sin embargo, la invención también abarca peptidomiméticos de tales proteínas/polipéptidos en los que se han reemplazado aminoácido(s) y/o enlace(s) peptídico(s) por análogos funcionales así como distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes, tales como selenocisteína. Péptidos, oligopéptidos y proteínas pueden denominarse polipéptidos. Tal como se menciona, los términos polipéptido y proteína se utilizan a menudo de manera intercambiable en la presente memoria. El término polipéptido también se refiere a, y no excluye, modificaciones del polipéptido. Las modificaciones incluyen glicosilación, acetilación, acilación, fosforilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hémico, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol,

reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfonación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación; véanse, por ejemplo, PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2ª ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York (1983), págs. 1-12; Seifter, Met. Enzymol. 182 (1990); 626-646, Rattan, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992); 48-62. Por ejemplo, una PTH modificada, es decir [Leu²⁷]ciclo (Glu²²-Lys²⁶)PTH (1-31) es una forma de PTH abarcada por el término PTH.

La PTH que se produce de manera natural es un producto de 84 aminoácidos secretado de la glándula paratiroidea de mamíferos que controla los niveles de calcio en suero a través de su acción en diversos tejidos, incluyendo hueso. La PTH que contiene 84 aminoácidos se denomina PTH 1-84; véanse G.N. Hendy *et al.* (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7365; T. Kimura *et al.* (1983), Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 493; J. M. Zanelli *et al.* (1985), Endocrinology 117, 1962 o E. Wingender *et al.* (1989), J. Biol. Chem. 264, 4367. La PTH también se da a conocer en los documentos EP-B1 926 158 o EP-A1 1 059 933. La PTH puede obtenerse mediante métodos recombinantes o de síntesis, tales como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.086.196 y 5.556.940. Cuando se adopta la síntesis de péptidos, puede obtenerse PTH mediante síntesis química de péptidos que se lleva a cabo de manera ordinaria. Para llevar a cabo la síntesis química de péptidos puede emplearse, por ejemplo, el método de azida, el método de cloruro de ácido, el método de anhídrido de azida, el método de DCC, el método de éster activado, el método de carbono imidazol o el método de oxidación-reducción.

Cuando se utiliza el término "PTH" en la presente memoria incluye una hormona paratiroidea que se caracteriza por que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 muestra el péptido de longitud completa de PTH humana. El péptido de longitud completa contiene 115 aminoácidos. Se cree que los aminoácidos 1-25 pertenecen a una secuencia de señalización, se cree que los aminoácidos 26-115 pertenecen a la propeptina de PTH y se cree que los aminoácidos 32 a 115 pertenecen a la hormona paratiroidea. Los aminoácidos 32 a 115 de SEQ ID NO: 1 tal como se describe en la presente memoria se considera que constituyen la PTH (1-84) mostrada en SEQ ID NO: 2, en la que la posición de aminoácido 32 y 115 de SEQ ID NO: 1 corresponde a las posiciones 1 y 84 de PTH, respectivamente. PTH (1-84) incluye PTH (1-34) que corresponde a las posiciones de aminoácido 32 a 65 de SEQ ID NO: 1. Para la PTH (1-34) mostrada en SEQ ID NO: 3 también la posición de aminoácido 32 de SEQ ID NO: 1 corresponde a la posición de aminoácido 1. Lo mismo es cierto para la numeración de todas las PTH descritas en la presente memoria.

Por supuesto, también se contempla emplear PTH de ratón (n.º de registro NP 065648), rata (n.º de registro NP 058740), gallina (n.º de registro NP 990783), bovino (n.º de registro NP 776379) u otros mamíferos por las composiciones farmacéuticas para su utilización en el tratamiento médico de la presente solicitud. Se describen además "variantes" de PTH en las que se sustituye uno o más residuos de aminoácido, preferentemente se sustituyen de manera conservadora en comparación con dicho polipéptido y en la que dicha variante puede preferentemente presentar actividad de PTH. Cualquier forma de PTH que puede emplearse en las composiciones farmacéuticas utilizadas en el método de tratamiento de la presente invención presenta preferentemente actividad de PTH que se caracteriza preferentemente por la capacidad de PTH de unirse a su receptor. Alternativamente, la actividad de PTH puede medirse tal como se conoce en la materia.

Tales variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas según normas generales conocidas en la materia de modo que no presentan efecto sobre la actividad del polipéptido. Por ejemplo, se proporciona orientación respecto a cómo realizar sustituciones de aminoácido fenotípicamente silenciosas en Bowie, Science 247: (1990) 1306-1310, en la que los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio. La primera estrategia explota la tolerancia de sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso de evolución. Al comparar secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de las proteínas. En cambio, las posiciones de aminoácidos en las que se han tolerado sustituciones mediante selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de las proteínas. Por tanto, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos podrían modificarse mientras mantienen la actividad biológica de la proteína. La segunda estrategia utiliza ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de las proteínas. Por ejemplo, puede utilizarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediante alanina (introducción de mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula). (Cunningham y Wells, Science 244: (1989) 1081-1085.) Las moléculas mutantes resultantes pueden luego someterse a prueba para determinar su actividad biológica.

Tal como declaran los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además qué cambios de aminoácidos son probablemente permisivos en determinadas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, la mayoría

de los residuos de aminoácidos enterrados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que se conservan generalmente pocas características de cadenas laterales de superficie.

- 5 Los polipéptidos presentan un menor grado de identidad pero presentan suficiente similitud como para realizar una o más de las funciones realizadas por el polipéptido.

La similitud se determina mediante sustitución de aminoácido conservadora. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares (por ejemplo, propiedades químicas). Según Cunningham *et al.* anteriormente, tales sustituciones conservadoras son probablemente fenotípicamente silenciosas. Se encuentra orientación adicional sobre qué cambios de aminoácido son probablemente fenotípicamente silenciosos en Bowie, Science 247: (1990) 1306-1310.

15 Las sustituciones de aminoácido conservadoras toleradas implican el reemplazo de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu y Ile; reemplazo de los residuos hidroxilo Ser y Thr; reemplazo de los residuos ácidos Asp y Glu; reemplazo de los residuos amida Asn y Gln, reemplazo de los residuos básicos Lys, Arg, y His; reemplazo de los residuos aromáticos Phe, Tyr, y Trp, y reemplazo de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met y Gly.

20 Además, también se contemplan las sustituciones conservadoras proporcionadas a continuación.

Para el aminoácido	Código	Reemplazar con cualquiera de:
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys Arginina R D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-As
Ácido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala, Acp
Isoleucina		D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina o 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, ácido L-1-tioazolidina-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidina-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, alo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, alo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

25 Aparte de las utilidades descritas anteriormente, tales sustituciones de aminoácido también pueden aumentar la estabilidad de la proteína o péptido. Se describen además sustituciones de aminoácido que contienen, por ejemplo, uno o más enlaces no peptídicos (que reemplazan los enlaces peptídicos) en la proteína o secuencia de péptidos así como sustituciones que incluyen residuos de aminoácido distintos de los L-aminoácidos que se producen de manera natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos que se producen de manera natural o sintéticos, por ejemplo, β o γ aminoácidos.

30 Tanto la identidad como la similitud pueden calcularse fácilmente por referencia a las siguientes publicaciones: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Infoluiaties and Genome Projects, Smith, D.M., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Informafies Computer Analysis of Secuence Data, parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Neva Jersey, 1994; Secuence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academie Press, 1987; y Secuence Analysis Primer, Gribkov, M. y Devereux, eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991.

40 Las alternativas en forma de variantes de PTH incorporan desde 1 hasta 5 sustituciones de aminoácidos que mejoran la estabilidad de PTH y la semivida, tal como el reemplazo de residuos de metionina en las posiciones 8 y/o 18 con leucina u otro aminoácido hidrófobo que mejora la estabilidad de PTH contra la oxidación y el reemplazo de aminoácidos en la región 25-27 con aminoácidos insensibles a tripsina tales como histidina u otro aminoácido que mejora la estabilidad de PTH contra proteasa.

Los fragmentos de PTH (1-84) se caracterizan por presentar 84-n aminoácidos, en los que n es un número entero desde 1 hasta 56. Concretamente, los fragmentos de PTH contienen delecciones secuenciales del extremo

C-terminal, por ejemplo, los fragmentos contienen de manera deseable por lo menos los primeros 28 residuos N-terminales, por ejemplo PTH (1-28), PTH (1-31), PTH (1-34), PTH (1-37), PTH (1-38) y PTH (1-41). Particularmente preferida es PTH (1-34) que se conoce también como teriparatida; véanse, por ejemplo S. H. Doppelt *et al.* (1981), *Calcif. Tissue Int.* 33, 649 ; R.Podbesek *et al.* (1983), *Endocrinology* 112, 1000 ; G.N.Kent *et al.* (1985), *Clin. Sci.* 68, 171 ; R.L. McKee y M.P.Caulfield (1989), *Peptide Res.* 2, 161 ; S.C. Lee y A.F. Russell (1989), *Biopolymers* 28, 1115; J. Reeve *et al.* (1990), *Br. Med. J.* 301, 314 o W. Neugebauer *et al.* (1994), *Int. J. Peptide Protein Res.* 43, 555.

Los polipéptidos de PTH pueden ser por lo menos el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95 o el 99% idénticos a cualquier secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2 o 3, respectivamente. Se proporciona a continuación en la presente memoria orientación adicional con respecto al cálculo de la identidad de porcentaje y puede aplicarse a la realización mencionada anteriormente. Se describen además en la presente memoria análogos de PTH tal como se da a conocer en los documentos EP-A1 651 765, EP-A1 1 123 401, EP-A 1 772 448 o EP-A2 1 276 767 (en particular, los análogos enumerados en las tablas de los mismos). El término "péptido relacionado con hormona paratiroidea", también abreviado como "PTHrP" puede denominarse a veces "péptido relacionado con parathormona" abarca tanto formas que se producen de manera natural como sintéticas de PTHrP y otras formas de PTHrP, tales como variantes, análogos etc. tal como se describe a continuación en la presente memoria. Ha de entenderse que PTHrP es un polipéptido.

Podría emplearse un péptido de PTH de cualquier organismo en las composiciones farmacéuticas utilizadas en el método de tratamiento de la presente solicitud. Puede identificarse un péptido de PTH de cualquier organismo, por ejemplo, utilizando comparaciones y/o alineaciones de secuencia empleando medios y métodos en la materia, preferentemente los descritos en la presente memoria y que comparan y/o alinean (una) PTH conocida con una secuencia que se sospecha que es una PTH. Por ejemplo, cuando se ocupa una posición en ambas de las dos secuencias comparada por la misma subunidad monomérica de aminoácido (por ejemplo, si se ocupa una posición en cada uno de dos polipéptidos por una lisina), entonces las moléculas respectivas son idénticas en esa posición. La identidad de porcentaje entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes o idénticas compartidas por las dos secuencias divididas entre el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si 6 de 10 de las posiciones en dos secuencias son coincidentes o son idénticas, entonces las dos secuencias son el 60% idénticas. A modo de ejemplo, las secuencias de aminoácidos ALTSPY y AYTIFYWY comparten el 50% de homología (3 de las 6 posiciones totales son coincidentes). Generalmente, puede hacerse una comparación cuando dos secuencias se alinean dando homología y/o identidad máximas. Tal alineación puede proporcionarse utilizando, por ejemplo, el método de Needleman, J. Mol Biol. 48 (1970): 443-453, implementado convenientemente por programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácido idénticos o similares, en donde residuos similares son sustituciones conservadoras para, o "mutaciones puntuales permitidas" de residuos correspondientes de aminoácido en una secuencia de aminoácido alineada. En este aspecto, un "sustitución conservadora" de un residuo en una secuencia de referencia son aquellas sustituciones que son física o funcionalmente similares a los residuos de referencia correspondientes, por ejemplo, que presentan similar tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluyendo la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Sustituciones conservadoras particularmente preferidas son aquellas que satisfacen los criterios para una "mutación puntual aceptada" en Dayhoff *et al.*, 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: suppl. 3, capítulo 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D. C. (1978).

Por supuesto, el término "PTH" no sólo representa un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos, pero también representa las moléculas de ácido nucleico que presentan secuencias de nucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos de PTH.

El término "molécula de ácido nucleico" cuando se utiliza en la presente memoria abarca cualquier molécula de ácido nucleico que presenta una secuencia de nucleótidos de bases que comprenden purina, y bases de pirimidina que están comprendidas por dicha molécula de ácido nucleico, por lo cual dichas bases representan la estructura primaria de una molécula de ácido nucleico. Secuencias de ácido nucleico incluyen AND, ADNc, ADN genómico, ARN, formas sintéticas, por ejemplo, PNA, y polímeros mezclados, tanto hebras sentido como antisentido, o pueden contener bases de nucleótido no naturales o derivatizadas, como será fácilmente apreciado por los expertos en la materia. El polinucleótido de la presente invención está compuesto preferentemente por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, el polinucleótido puede estar compuesto por ADN mono y bicatenario, AND que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más normalmente, bicatenario o una mezcla de regiones mono y bicatenarias.

Además, el polinucleótido puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El polinucleótido también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados por motivos de estabilidad u otros. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritadas y bases inusuales tales como inosina. Puede realizarse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, el término "moléculas de ácido nucleico" abarca formas modificadas química, enzimática o

metabólicamente. También pueden utilizarse secuencias de ácido nucleico que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una PTH. Además, también podrían emplearse secuencias de ácido nucleico que son por lo menos el 65%, más preferentemente el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% idénticas a una secuencia de ácido nucleico que codifica para una PTH.

Por consiguiente, el término "secuencias de hibridación" se refiere preferentemente a secuencias que presentan una identidad de secuencia de por lo menos el 65%, incluso más preferentemente por lo menos el 70%, particularmente preferido de por lo menos el 80%, más particularmente preferido de por lo menos el 90%, incluso más particularmente preferido de por lo menos el 95% y lo más preferentemente de por lo menos el 97, el 98% o el 99% de identidad con una secuencia de ácido nucleico tal como se describió anteriormente.

Dichas condiciones de hibridación pueden establecerse según protocolos convencionales descritos, por ejemplo, en Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), o Higgins y Hames (Eds.) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985). El establecimiento de las condiciones está bien dentro de la experiencia del experto y puede determinarse según protocolos descritos en la materia. Por tanto, la detección de sólo secuencias que se hibridan específicamente requerirá habitualmente condiciones de lavado e hibridación rigurosas tales como 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 65°C. Pueden establecerse condiciones de hibridación no rigurosas para la detección de secuencias homólogas o no exactamente complementarias a 6xSSC, SDS al 1% a 65°C. Tal como se conoce bien, la longitud de la sonda y la composición del ácido nucleico que va a determinarse constituyen parámetros adicionales de las condiciones de hibridación. Obsérvese que pueden lograrse variaciones en las condiciones anteriores a través de la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos utilizados para suprimir el fondo en experimentos de hibridación. Los reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad. Las moléculas de ácido nucleico de hibridación también comprenden fragmentos de las moléculas descritas anteriormente. Tales fragmentos pueden representar secuencias de ácido nucleico tal como se describe en la presente memoria. Además, las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con cualquiera de las moléculas de ácido nucleicos mencionadas anteriormente también incluyen fragmentos complementarios, derivados y variantes alélicas de estas moléculas. Adicionalmente, un complejo de hibridación se refiere a un complejo entre dos secuencias de ácido nucleico en virtud de la formación de enlaces de hidrógeno entre bases de G y C complementarias y entre bases de A y T complementarias; estos enlaces de hidrógeno pueden estabilizarse adicionalmente mediante interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias de ácido nucleico complementarias se unen por enlaces de hidrógeno en una configuración antiparalela. Puede formarse un complejo de hibridación en disolución (por ejemplo, análisis de Cot o Rot) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en disolución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido (por ejemplo, membranas, filtros, chips, clavijas o portaobjetos de vidrio a los, por ejemplo, se les han fijado células). Los términos complementario o complementariedad se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones de temperatura y sal permisivas mediante apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "AG-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", en la que sólo algunos de los ácidos nucleicos se unen, o puede ser completa cuando existe complementariedad entre moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico presenta efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre cadenas de ácidos nucleicos. El término "idéntico" o "porcentaje de identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales, o que presentan un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, por lo menos el 65% de identidad, preferentemente, por lo menos el 70-95% de identidad, más preferentemente por lo menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación, o a lo largo de una región diseñada tal como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencias tal como se conoce en la materia, o mediante alineación manual e inspección visual. Secuencias que presentan, por ejemplo, del 65% al 95% o más de identidad de secuencia se considera que son sustancialmente idénticas. Una definición de este tipo también se aplica al complemento de una secuencia de prueba. Los expertos en la materia conocerán cómo determinar el porcentaje de identidad entre secuencias utilizando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245), tal como se conoce en la materia. Aunque el algoritmo FASTDB normalmente no considera adiciones o deleciones no coincidentes internas en las secuencias, es decir, huecos, en su cálculo, esto puede corregirse manualmente para evitar una sobreestimación del % de identidad. CLUSTALW, sin embargo, no tiene en cuenta huecos de secuencia en sus cálculos de identidad. También están disponibles para los expertos en la materia los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402). El programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff Proc. Natl. Acad.

Sci., USA, 89, (1989), 10915) utiliza alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas hebras.

Por ejemplo, BLAST2.0, que representa Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410), puede utilizarse para la búsqueda de alineaciones de secuencias locales. BLAST produce alineaciones de tanto secuencias de nucleótidos como de aminoácidos para determinar la similitud de secuencia. Debido a la naturaleza local de las alineaciones, BLAST es especialmente útil en la determinación de las coincidencias exactas o en la identificación de secuencias similares. La unidad fundamental de la salida del algoritmo BLAST es el par de segmentos de alta puntuación (*High-scoring Segment Pair*) (HSP). Un HSP consiste en sus fragmentos de secuencia de longitud arbitraria pero igual cuya alineación es localmente máxima y para la que la puntuación de alineación satisface o supera una puntuación umbral o de punto de corte fijada por el usuario. El enfoque de BLAST es buscar HSP entre una secuencia de consulta y una secuencia de base de datos, para evaluar la significación estadística de cualquier coincidencia encontrada, y notificar sólo las coincidencias que satisfacen el umbral de significación seleccionado por el usuario. El parámetro E establece el umbral estadísticamente significativo para notificar coincidencias con la secuencia de base de datos. E se interpreta como el límite superior de la frecuencia esperada de posibilidad de aparición de un HSP (o conjunto de HSP) dentro del contexto de la búsqueda completa en la base de datos. Cualquier secuencia de base de datos cuya coincidencia satisfaga E se notifica en la salida del programa.

Se utilizan técnicas informáticas análogas utilizando BLAST (Altschul (1997), lugar citado; Altschul (1993), lugar citado; Altschul (1990), lugar citado) se utilizan para la búsqueda de moléculas relacionadas o idénticas en bases de datos de nucleótidos tales como GenBank o EMBL. Este análisis es mucho más rápido que hibridaciones múltiples basadas en membrana. Además, la sensibilidad de la búsqueda informática puede modificarse para determinar si cualquier coincidencia particular se clasifica como exacta o similar. La base de la búsqueda es la puntuación de producto que se define como:

$$\frac{\% \text{de identidad de secuencia} \times \% \text{de puntuación de BLAST máxima}}{100}$$

y tiene en cuenta el grado de similitud entre dos secuencias y la longitud de la coincidencia de secuencia. Por ejemplo, con una puntuación de producto de 40, la coincidencia será exacta dentro de un error del 1-2%; y a 70, la coincidencia será exacta. Se identifican habitualmente moléculas similares seleccionando las que muestran puntuaciones de producto de entre 15 y 40, aunque puntuaciones inferiores pueden identificar moléculas relacionadas. Pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico cuya secuencia está degenerada en comparación con la secuencia de una molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. Cuando se utiliza según la presente invención el término "que está degenerado como resultado del código genético" significa que debido a la redundancia del código genético diferentes secuencias de nucleótidos codifican para el mismo aminoácido. Puede utilizarse la cadena complementaria a las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente y a continuación si pueden estar en una forma monocatenaria. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico puede estar en cualquier de ácido nucleico, por ejemplo ADN, ADN genómico, ADNc, ARN o PNA (ácido nucleico peptídico). Un ácido nucleico peptídico (PNA) es un tipo de poliamida de análogo de ADN y las unidades monoméricas de adenina, guanina, timina y citosina están disponibles comercialmente (Perceptive Biosystems). Determinados componentes del ADN, tales como fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa, no están presentes en PNA. Tal como dan a conocer Nielsen *et al.*, Science 254:1497 (1991); y Egholm *et al.*, Nature 365:666 (1993), los PNA se unen específica y fuertemente a cadenas de ADN complementarias y no se degradan por nucleasas. De hecho, el PNA se une más fuertemente al ADN que el propio ADN. Este es probablemente porque no hay repulsión electrostática entre las dos cadenas, y también la estructura principal de poliamida es más flexible. Debido a esto, los dúplex de PNA/ADN se unen en un intervalo más amplio de condiciones de rigurosidad que los dúplex de ADN/ADN, lo que hace más fácil realizar hibridación múltiple. Pueden utilizarse sondas más pequeñas que con ADN debido a la unión fuerte. Además, es más probable que puedan determinarse apareamientos erróneos de una única base con la hibridación de PNA/ADN debido a que un único apareamiento erróneo en un PNA/ADN de 15 meros disminuye el punto de fusión (T_m) en 8°-20° C, frente a 4°-16° C para el dúplex de ADN/ADN de 15 meros. También, la ausencia de grupos de carga en PNA significa que la hibridación puede realizarse a fuerzas iónicas bajas y reducirse la posible interferencia mediante sal durante el análisis.

El ADN, por ejemplo, puede ser ADN genómico o ADNc. El ARN puede ser, por ejemplo, ARNm. La molécula de ácido nucleico puede ser natural, sintética o semisintética o puede ser un derivado, tal como ácido nucleico peptídico (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500) o fosforotioatos. Además, la molécula de ácido nucleico puede ser una molécula quimérica de ácido nucleico producida recombinantemente que comprende cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente o bien sola o bien en combinación.

El término "reclutar células madre" cuando se utiliza en la presente memoria significa que las células madre se movilizan desde lugares dentro de un cuerpo humano o animal, por ejemplo desde la médula ósea para que

estén presentes en la periferia, desde donde dichas células madre pueden migrar preferentemente a otros lugares dentro del cuerpo humano o animal, preferentemente en tejido que padece isquemia. El término “tejido” que padece isquemia incluye células, tejido y/u órganos del cuerpo humano o animal que padecen isquemia. Además, el término “reclutar células madre” tal como se utiliza en la presente memoria también se refiere a la capacidad de atraer células madre y/o progenitoras a partir de, por ejemplo la médula ósea preferentemente hacia tejido que padece isquemia. Sin querer restringirse a la teoría, se supone que se requiere SDF-1 para inducir la migración de células madre a tejido dañado, por ejemplo, miocardio. Las células madre pueden unirse a SDF-1 por medio de su receptor CXCR4 (Petit (2002) Nat. Immunol. 687-694). El proceso mencionado anteriormente se entiende también como “migración”. El término “migración” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad innata de las células madre y/o progenitoras para desplazarse preferentemente al lugar correcto en el cuerpo. Preferentemente, dichas células madre y/o progenitoras se desplazan a sitios en donde tienen lugar disfunción/defectos de órganos provocados por isquemia.

Preferentemente, dichas células madre se seleccionan del entre el grupo que consiste en células CD34(+)/CD45(+) y CD34(-)/CD45(+), cada una en combinación con las subpoblaciones CD31(+), Sca-1 (+) o C-kit(+), células progenitoras adultas multipotentes (MAPC)1 células progenitoras endoteliales (EPC) caracterizadas por CD34(+), CD45(+), CD31(+), células de población lateral (SP) y células madre de linaje negativo, lin(-), c- kit(+). Las células madre mencionadas anteriormente pueden expresar adicionalmente CXCR4. Las células madre y/o células progenitoras se caracterizan mediante la utilización de análisis de FACS tal como se describe en los ejemplos adjuntos.

Notablemente, los presentes inventores observaron que la administración de PTH no provoca un agotamiento de células madre en la médula ósea, sino una movilización y una estabilización muy eficaces de células madre tal como se describe en los ejemplos adjuntos y se muestra en las figuras. En particular, se observó que se movilizan eficazmente células madre que expresan c-kit (5 veces superior en comparación con un control). Las células madre tal como se describe en la presente memoria reparan y/o regeneran tejido que padece isquemia. Los términos “reparar” y “regenerar” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a restaurar por lo menos parcialmente las condiciones anteriores del tejido orgánico con defectos.

La indicación “(+)” y “(-)” se refieren a los resultados obtenidos mediante análisis de citometría de flujo (FACS). “(+)” o “positivo” significa que una proteína definida, tal como CD45, CD34 o CD31, etc. se expresa en la superficie de una célula analizada, tal como una célula madre o célula progenitora, etc. “(-)” o “negativo” significa que una proteína definida, tal como CD34, CD31 etc. no se expresa en la superficie de una célula analizada, tal como una célula madre o una célula progenitora, etc. El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición que comprende PTH o fragmentos específicos de la misma. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, dicha composición farmacéutica también comprende G-CSF o un fragmento de G-CSF del mismo. En una realización adicional, dicha composición farmacéutica también comprende un antagonista/inhibidor de DPP-IV. También se ha observado que el ejercicio físico es beneficioso para movilizar células madre. Por consiguiente, se prevé que las utilidades médicas puedan ir acompañadas por ejercicio físico y cualquier otra medida que sea adecuada para movilizar células madre.

Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de PTH o fragmentos específicos de la misma y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede comprender también uno o más de los siguientes compuestos, por ejemplo, GM-CSF, SCF, IL-3, IL-6, EPO, VEGF, un antagonista de DPP-IV, estatinas o tiolactonas. Tal como se detalla en la presente memoria, estos factores pueden emplearse también en combinación en las utilidades (médicas o farmacéuticas) dadas a conocer en la presente memoria y los métodos de esta invención. La composición farmacéutica puede administrarse con un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en la presente memoria. En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea generalmente reconocida para su utilización en animales, y más particularmente en humanos. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse disoluciones de solución salina y disoluciones de dextrosa acuosa y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, ión de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en “Remington's

Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos mencionados anteriormente, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Preferentemente, la composición farmacéutica es adecuada para su administración a un paciente. En el contexto de la presente invención, el término "paciente" significa un individuo que necesita un tratamiento, preferentemente que necesita un tratamiento de un tejido que padece isquemia. Preferentemente, el paciente es un vertebrado, incluso más preferido un mamífero, particularmente preferido un ser humano.

En otra realización preferida, la composición se formula según procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a mamíferos, preferentemente a vertebrados y más preferentemente a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los componentes pueden mezclarse antes de su administración.

La composición farmacéutica puede formularse como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistema de prueba *in vitro* o con modelos de animales. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o el trastorno y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Además, por ejemplo, también pueden tenerse en cuenta los siguientes factores relativos a la dosis precisa: la talla, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, la salud general del paciente, y otros fármacos que estén administrándose de manera concurrente. Por tanto, se conoce bien en la materia que el régimen de dosificación se determinará por el médico que atiende y por factores clínicos. Puede estar presente materia proteínica farmacéuticamente activa en cantidades de entre 1 ng y 10 mg/kg de peso corporal por dosis; sin embargo, se contemplan dosis por debajo o por encima de este intervalo de ejemplo, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente.

Se conocen habitualmente en la materia regímenes conocidos en la materia que pueden movilizar números crecientes de células madre derivadas de médula ósea en la circulación sanguínea.

El régimen de dosificación de la composición farmacéutica que va a administrarse al paciente oscila preferentemente entre 0,1 y 200, entre 0,1 y 150 o entre 0,1 y 100 μg por kg de peso corporal, más preferentemente entre 1 y 100 μg por kg de peso corporal, incluso más preferentemente entre 1 y 90, entre 1 y 80, entre 1 y 70, entre 1 y 60, entre 1 y 50, entre 1 y 40, entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 10 o entre 1 y 5 μg por kg de peso corporal d. s. c. a lo largo de un periodo de por lo menos 1 día, preferentemente por lo menos 2 días, más preferentemente por lo menos 3 días, incluso más preferentemente por lo menos 4 días, particularmente preferido por lo menos 5 días, incluso más particularmente preferido por lo menos 6 días, 10 días, 14 días, 21 días, 28 días o 30 días. Sin embargo, se prevé cualquier otro régimen de dosificación adecuado que puede determinarse tal como se describe en la presente memoria.

La administración de los agentes candidatos puede realizarse de una variedad de modos, incluyendo, pero sin limitarse a, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intranasal, por vía intrabronquial, por vía transdérmica, por vía intranodal, por vía intradérmica, por vía intrarrectal, por vía intraperitoneal, por intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía intraocular, por vía vaginal, por vía rectal o por vía tópica. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los componentes se suministran o bien por separado o bien mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición va a administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene solución salina o agua estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los componentes pueden mezclarse antes de su administración.

En una realización particularmente preferida, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se administra a través de vías de administración tal como se describe anterior y posteriormente.

Tal como se menciona en la presente memoria, las realizaciones mencionadas anteriormente de composiciones farmacéuticas de la presente invención también se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden, aparte de PTH o fragmentos específicos de la misma, fragmentos de G-CSF y un antagonista de DPP-IV. Esta realización se aplica, cambiando lo que se deba cambiar, para las utilizaciones y métodos (farmacéuticos y/o médicos) dados a conocer en la presente memoria. Por consiguiente, también las utilizaciones combinatorias/de combinación de estos factores y antagonistas se prevén.

El término "G-CSF" (factor estimulante de colonias de granulocitos) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un/unos polipéptido/polipéptidos de G-CSF que se conocen(n) bien en la materia; por ejemplo, como G-CSF; nombre comercial: Neupogen(R) (filgrastim, disponible comercialmente de Amgen) o Granocyte(R) (lenograstim, disponible comercialmente de Chugai Pharma). La secuencia de aminoácidos de G-CSF se describe, por ejemplo, en Nagata (1986) Nature 319:415-418. Se sabe que G-CSF presenta 174 residuos de aminoácido, sin embargo, se conocen variantes del mismo y también están abarcadas por el término "G-CSF" tal como se describe más adelante. Por ejemplo, se conoce un polipéptido de G-CSF que presenta un residuo de metionina adicional en su extremo N-terminal. La función de G-CSF puede someterse a prueba mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, descritos en el documento PCT/EP2004/01 2036 (WO/2005/049062).

Dicho término también abarca polipéptidos de G-CSF de preparaciones bien conocidas en la materia, o bien de fuentes naturales o bien producidas preferentemente mediante medios recombinantes. Se conocen en la materia múltiples formas de G-CSF humano, de ratón o rata naturales o recombinantes. Se prevé que el G-CSF o fragmento del mismo utilizado en el contexto de la presente invención sea de calidad farmacéutica adecuada para la administración a pacientes tal como se describe más adelante.

Dicho término también abarca polipéptidos de G-CSF que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica en por lo menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 97% o el 99% al polipéptido de G-CSF que se conoce en la materia y presenta preferentemente actividad G-CSF tal como se describe en el documento WO/2005/049062. El término "fragmento de G-CSF" cuando se utiliza en el contexto de la presente invención significa fragmentos de polipéptidos de G-CSF que presentan actividad G-CSF. La secuencia de aminoácidos de G-CSF y de variantes correspondientes se conocen en la materia y se publicaron en Nagata (1986), Nature 319:415-418. Por consiguiente, dichos fragmentos de G-GSF comprenden partes de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 o 170 residuos de aminoácido de la proteína G-CSF. Preferentemente dichos fragmentos son fragmentos biológicamente activos, es decir fragmentos que presentan actividad G-CSF. Por ejemplo, dichos fragmentos pueden movilizar, por ejemplo, células madre multipotentes, mejorar la función cardíaca o reducir la mortalidad después de infarto de miocardio agudo. Puede determinarse una actividad G-CSF particularmente preferida por su capacidad para inducir la formación de colonias, tal como se notifica en la bibliografía por Bodine (1993), Blood 82:445-55; Bodine (1994), Blood 84, 1482-91.

Además, también se prevén variantes de G-CSF. Por consiguiente, las variantes de G-CSF son tales variantes descritas en el contexto de variantes de PTH.

Los términos "tratamiento" y "tratar" se utilizan en la presente memoria para significar generalmente la obtención de un efecto farmacéutico y/o fisiológico deseado. Preferentemente, el efecto es terapéutico en cuanto a la cura parcial o completa de isquemia. El término "tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria cubre cualquier tratamiento de tejido que padece isquemia y/o defectos de órganos y/o disfunción provocada por isquemia en un mamífero, particularmente un vertebrado y más preferentemente un ser humano, e incluye regenerar y/o reparar un tejido y/u órgano que padece isquemia o con disfunción. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención es adecuada para el tratamiento de isquemia.

El término "prevención" o "prevenir" cuando se utiliza en la presente memoria significa obtener un efecto protector en un tejido que ya padece isquemia de modo que se prevenga un daño adicional y/o un efecto protector en un tejido que corre el riesgo de padecer isquemia.

Por consiguiente, con el fin de prevenir la isquemia puede administrarse preferentemente la composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que corre el riesgo de padecer isquemia del corazón.

La composición farmacéutica se administra a un sujeto que ya padece isquemia del corazón. El término "isquemia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un estado que puede producirse en cualquier tejido y/o órgano que experimente una falta de aporte de oxígeno y/o aporte de metabolitos que se produce cuando existe un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno, debido a una perfusión inadecuada, por

ejemplo, provocada por aterosclerosis, lesiones de reestenosis, anemia, ictus o arterias obstruidas por nombrar algunos, que conduce a oxígeno insuficiente en tejidos tales como, por ejemplo, el corazón o el cerebro. Sin embargo, también intervenciones médicas tales como la interrupción del flujo sanguíneo, por ejemplo, durante revascularización quirúrgica puede conducir a isquemia. Dicho término también abarca los dos tipos más comunes de isquemia; es decir isquemia cardiaca e isquemia cerebral. La isquemia cardiaca incluye una amplia variedad de estados, desde isquemia asintomática hasta angina estable o inestable hasta infarto de miocardio (IMA o "ataque al corazón"). La isquemia cerebral incluye síndromes isquémicos cerebrales prolongados hasta ictus consumado o infarto cerebral. Sin embargo, la isquemia no se limita a los órganos o tejidos anteriormente mencionados, respectivamente, puesto que puede producirse en cualquier órgano que experimente una falta de aporte de oxígeno y/o aporte de metabolitos. En el contexto de la presente invención, la isquemia provoca disfunción de órganos y/o defectos de órganos.

El término "procedimiento quirúrgico o intervencionista" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento quirúrgico y/o intervencionista que es adecuado para mejorar la función de órganos, para mejorar el flujo sanguíneo en tejido de órganos con defectos y/o para inducir revascularización como trombólisis (o bien sistémica o local mediante colocación de catéter), angioplastia de balón, colocación de endoprótesis, revascularización quirúrgica coronaria, carotídea o periférica, endarterectomía o colocación de endoprótesis ventriculo-coronaria.

El término "administrado" significa la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica. Preferentemente, dicha dosis terapéuticamente eficaz se administra a un paciente que presenta tejido que padece isquemia. De manera particularmente preferida, dicha dosis terapéuticamente eficaz se administra a un paciente que experimenta defectos de órganos y/o disfunción provocada por isquemia. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" quiere decirse una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá determinarla un experto en la materia utilizando técnicas conocidas. Tal como se conoce en la materia y se describió anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para la administración sistémica frente a localizada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la interacción farmacológica y la gravedad del estado, y podrán determinarlos con experimentación de rutina los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas son aplicables a aplicaciones tanto de terapia en seres humanos como veterinarias. Los compuestos descritos en la presente memoria que presentan la actividad terapéutica deseada pueden administrarse en un portador fisiológicamente aceptable a un paciente, tal como se describe en la presente memoria. Dependiendo del modo de introducción, los compuestos pueden formularse en una variedad de manera tal como se comentan a continuación. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar entre aproximadamente el 0,1-100% en peso. Los agentes pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos.

La administración de la composición farmacéutica puede realizarse de una variedad de maneras tal como se comentó anteriormente.

El médico responsable y factores clínicos determinarán el régimen de dosificación tal como se describe en la presente memoria. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 mg; y sin embargo, tal como se describió anteriormente, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo a modo de ejemplo, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Las dosificaciones se administran preferentemente una, dos, tres, cuatro veces o cinco veces al día durante el periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28 o 30 días, sin embargo, durante la progresión del tratamiento las dosificaciones pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más largos y, si se necesita, pueden administrarse en intervalos de tiempo mucho más cortos, por ejemplo, diariamente divididas en múltiples aplicaciones. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de unidades de 1 µg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. Puede monitorizarse la evolución mediante evaluación periódica. También se prevé que las composiciones farmacéuticas se empleen en enfoques de terapia conjunta, es decir en coadministración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo otros fármacos para prevenir, tratar y/o mejorar la isquemia. También se prefiere que la composición farmacéutica se coadministre con GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), SCF (factor células madre), IL-3 (interleucina-3) y/o IL-6 (interleucina-6), EPO, VEGF o un fragmento del mismo, estatinas, tiolactonas y/o con un antagonista de DPP-IV. Preferentemente, la composición farmacéutica de la presente invención se coadministra con G-CSF o un fragmento de G-CSF y/o con un antagonista de DPP-IV. Esto significa que pueden administrarse PTH o fragmentos específicos de la misma y G-CSF o fragmento de G-CSF y/o un antagonista de DPP-IV en combinación con uno o más de las sustancias mencionadas anteriormente.

Cuando se prevé la coadministración, se explica por sí mismo que dos o más sustancias tal como se describe en la presente memoria, por ejemplo, PTH o fragmentos específicos de la misma y G-CSF o PTH o fragmentos específicos de la misma y un antagonista de DPP-IV pueden administrarse simultáneamente, de manera secuencial o por separado entre sí. La composición farmacéutica puede administrarse antes de un procedimiento quirúrgico o intervencionista. El término "antes de dicha medida quirúrgica o intervencionista" cuando se utiliza en

el contexto de la presente invención significa que la composición farmacéutica de la presente invención va a administrarse un día, preferentemente dos días, más preferentemente tres días e incluso más preferentemente cuatro o cinco días antes de dicha medida quirúrgica o intervencionista, por ejemplo, para prevenir una enfermedad isquémica tal como se describe en la presente memoria. La composición farmacéutica de la presente invención también puede administrarse durante un procedimiento quirúrgico o intervencionista.

El término “durante dicha medida quirúrgica o intervencionista” cuando se utiliza en el contexto de la presente invención significa que la composición farmacéutica puede administrarse durante un procedimiento quirúrgico o intervencionista. Adicionalmente, la composición farmacéutica puede administrarse después de un procedimiento quirúrgico o intervencionista.

El término “después de dicha medida quirúrgica o intervencionista” cuando se utiliza en el contexto de la presente invención significa que la composición farmacéutica preferentemente puede administrarse inmediatamente después de dicha medida quirúrgica o intervencionista. De manera particularmente preferida, puede administrarse preferentemente inmediatamente después de dicha medida quirúrgica o intervencionista o, alternativamente, después de por lo menos 1 hora, preferentemente después de por lo menos 6, 12, 24 o 48 horas. Además, tal como se describió anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención, después de haberse administrado antes, durante o después de una medida quirúrgica o intervencionista puede administrarse además durante el periodo de tiempo tal como se describió anteriormente de modo que preferentemente se prevengan y/o traten cardiopatías isquémicas. La cardiopatía isquémica tratada con la composición farmacéutica se selecciona de entre isquemia miocárdica, isquemia asintomática y angina estable o inestable. La isquemia miocárdica que se trata con la composición farmacéutica está provocada por insuficiencia cardíaca, hipertensión, arteriopatía coronaria (AC), infarto de miocardio, acontecimientos tromboembólicos, traumatismo y/o procedimientos quirúrgicos. Otras causas de isquemia que pueden tratarse con la composición farmacéutica de la invención son:

La isquemia cerebral provocada por traumatismo, ictus, acontecimientos tromboembólicos, malformación de vasos de irrigación sanguínea, enfermedad multiinfartica, hemorragia cerebral, medidas quirúrgicas y/o intervencionistas.

La isquemia renal provocada por acontecimientos tromboembólicos, aterosclerosis, malformación de vasos de irrigación sanguínea, traumatismo y/o procedimientos quirúrgicos.

La isquemia hepática o isquemia retiniana que se trata con la composición farmacéutica está provocada por acontecimientos tromboembólicos, malformación de vasos de irrigación sanguínea, traumatismo y/o procedimientos quirúrgicos.

La isquemia de tejido muscular periférico o isquemia de la médula espinal que se trata con la composición farmacéutica está provocada por acontecimientos tromboembólicos, aterosclerosis, malformación de vasos de irrigación sanguínea, traumatismo y/o procedimientos quirúrgicos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos específicos de la misma y/o G-CSF o un fragmento de G-CSF para su utilización en el tratamiento de cardiopatía isquémica.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos específicos de la misma y/o un antagonista de DPP-IV para su utilización en el tratamiento de cardiopatía isquémica. Además, puede utilizarse una composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos específicos de la misma y/o un antagonista de DPP-IV y/o cualquiera de los compuestos mencionados en la presente memoria, por ejemplo, GM-CSF, SCF, IL-3, IL-6, estatinas, tiolactonas y/o EPO. A continuación, se resumen los hallazgos observados en el modelo murino con respecto a la movilización de células madre: en este estudio se examinó la potencia de PTH para movilizar células derivadas de médula ósea y se investigaron los cambios en la composición de células en la médula ósea después de la administración de PTH. Además, se analizaron los niveles en suero de citocinas como posibles efectores.

Los principales hallazgos son: 1) PTH indujo la movilización de células derivadas de médula ósea. El efecto de movilización afectó a casi todos los tipos de células investigados, por tanto parece no ser específico del tipo de célula. 2) Después de la administración de PTH, en la médula ósea se produjo una disminución de todos los subtipos de células CD45⁺CD34⁻, mientras que los subtipos de células CD45⁺CD34⁺ permanecieron constantes. 3) El tratamiento con G-CSF condujo a una movilización más eficaz de células CD45⁺CD34⁺ y presenta un efecto similar sobre células CD45⁺CD34⁻. 4) En contraposición a los ratones tratados con PTH, el tratamiento con G-CSF condujo a una disminución significativa de todos los subtipos investigados de células CD45⁺CD34⁺ y CD45⁺CD34⁻. 5) La estimulación con PTH condujo a un aumento de los niveles en suero de G-CSF y una disminución de los niveles de SCF.

Recientemente, Calvi *et al.* demostraron una relación entre PTH y el sistema hematopoyético. En su estudio,

hallaron un aumento de células madre hematopoyéticas en la médula ósea después de la administración de PTH en animales de tipo natural. Además, se ha mostrado que mejoró notablemente la supervivencia después del trasplante de médula ósea en ratones irradiados con una dosis letal después de la estimulación con PTH¹⁹. No se investigaron los cambios de células derivadas de médula ósea en cuanto a su número y composición en sangre periférica y todavía han de dilucidarse. En este estudio, se muestra por primera vez un aumento de células derivadas de médula ósea en sangre periférica después de la administración de PTH. Caracterizando estas células, se encontró un aumento de ambas subpoblaciones CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ en sangre periférica, indicando que se movilizaron diferentes subtipos de células madre hematopoyéticas por PTH. El aumento de estas células se produjo ya después de 6 días de la estimulación con PTH. Hubo un ligero aumento pero no significativo adicional después de 14 días de la estimulación, sugiriendo que se alcanzó el efecto máximo en este periodo de tiempo. La movilización no afectó específicamente a distintos tipos de célula.

Sin embargo, la influencia de PTH sobre células en la médula ósea pareció ser más específico. Estos resultados mostraron una disminución de todos los subtipos investigados de células CD45⁺/CD34⁻ indicando que estas células se liberaron de la médula ósea a la sangre periférica. Sin embargo, los subtipos CD45⁺/CD34⁺ permanecieron constantes y no cambiaron después de la estimulación. Calvi *et al.* describieron el efecto de reforzamiento de PTH sobre la supervivencia y autorrenovación de células madre hematopoyéticas a través de ligamiento de Notch1/Jagged1. La señalización de PTH regula por incremento la expresión de Jagged1 por células del estroma osteogénicas que activan la ruta de señalización de Notch1 en células madre hematopoyéticas¹⁹. La estimulación de PTH también aumenta el nivel de expresión de N-cadherina en osteoblastos²⁰. La adhesión mediada por N-cadherina puede vincularse a la ruta de Wnt-LEF-1-Notch1 a través de la señalización de β -catenina^{21, 22}. Estos resultados indican que este mecanismo puede realizarse solo en células CD45⁺/CD34⁺ dando como resultado un nivel constante de estas células en la médula ósea.

Se sabe que varias citocinas como G-CSF, SCF, VEGF o SDF-1 estimulan la médula ósea provocando una liberación de células madre a la circulación^{2, 4, 7}. Para investigar la función de PTH como estímulo para la liberación endógena de citocinas de movilización como posible mecanismo del aumento de células derivadas de médula ósea en la sangre periférica después de la estimulación con PTH, se midieron los niveles en suero de G-CSF y SCF, factores empleados en varios estudios que tenían como objetivo movilizar células madre^{2, 23-26}. Después de la administración de PTH, se halló un fuerte aumento de la concentración de G-CSF, mientras que pudo detectarse una disminución leve pero no significativa de SCF. Los osteoblastos, que son entre otras células estructurales en el nicho hematopoyético de células madre, pueden activarse por PTH y pueden producir factores de crecimiento²⁷⁻²⁹. Estos datos sugieren un efecto de movilización indirecto de PTH mediante la estimulación de osteoblastos para producir citocinas tales como G-CSF. SCF se regula negativamente por PTH, sin embargo la ruta y función no se conocen aún y todavía tienen que dilucidarse.

Para investigar si el efecto de movilización de PTH es solamente un efecto indirecto provocado por la liberación endógena de G-CSF, se trataron ratones sanos con G-CSF y se investigaron los mismos subtipos de células. Se muestran patrones de movilización diferentes de manera interesante. El tratamiento con G-CSF dio como resultado un efecto más intenso sobre la movilización de células CD45⁺/CD34⁺, mientras que el efecto sobre células CD45⁺/CD34⁻ fue comparable con el tratamiento con PTH, sugiriendo un efecto más específico de G-CSF sobre células CD34⁺. Investigando el patrón de células en la médula ósea después de la estimulación con G-CSF, se mostró asimismo un efecto diferente de G-CSF. El tratamiento con G-CSF no mostró un efecto de estabilización sobre células CD45⁺/CD34⁺, sino que dio como resultado una disminución significativa de estas células en la médula ósea como signo de liberación celular sin autorrenovación. El tratamiento con G-CSF y PTH provocó una disminución de células CD45⁺/CD34⁻ en la médula ósea a niveles comparables, pero con diferentes intensidades en diferentes subtipos. Además del efecto indirecto de PTH a través de G-CSF endógeno, los resultados sugieren un efecto independiente de PTH sobre células derivadas de la médula ósea. Este estudio muestra por primera vez la capacidad de PTH para movilizar células derivadas de la médula ósea. El mecanismo para la movilización celular podría producirse en parte a través de la liberación endógena de citocinas tales como G-CSF pero no de SCF. En contraposición a G-CSF, PTH muestra un efecto de estabilización en la médula ósea. Este efecto de PTH parece actuar especialmente sobre células CD34⁺.

En resumen, los principales hallazgos de la presente invención con respecto al modelo murino para isquemia son: 1) un efecto beneficioso sobre la función miocárdica y la supervivencia que se relacionó con 2) un aumento de la movilización de células madre a la sangre periférica 3) una carga arterial reducida y a 4) un efecto beneficioso sobre la remodelación posinfarto caracterizada por una mayor tasa de proliferación endotelial y un deterioro reducida de la pared anterior del VI.

El tratamiento con PTH induce la movilización de células madre a la sangre periférica

Recientemente, Calvi *et al.*³⁴ mostraron que PTH está implicada en la regulación de la reserva de células madre de la médula ósea³⁶. La sobreexpresión del receptor de hPTH/PTHrP bajo el control del promotor de colágeno $\alpha 1(I)$ específico de osteoblastos condujo a un aumento de células madre positivas para Sca-1 y c-kit en la médula ósea. El aumento del número de células madre estaba mediado por la señalización de jagged 1 Notch que condujo a una proliferación de células madre primitivas. Además, se sabe que PTH(1-34) induce la

expresión y secreción de G-CSF y MMP-9, inductores conocidos de la movilización de células madre^{47, 48}. Por tanto, se midió la cantidad de movilización de células madre después del tratamiento con PTH. Pudo demostrarse que se conocía por primera vez que la aplicación diaria de PTH (80 mg/kg/d) era suficiente para aumentar diversas poblaciones de células madre positivas para CD45 en la sangre periférica. En comparación con el tratamiento con G-CSF, el efecto es solo moderado. Como un aumento en las cantidades de células madre en la sangre periférica se correlaciona con una revascularización miocárdica mejorada después de IM, se investigaron los efectos de PTH sobre la vascularización.

Además, estos resultados demuestran un efecto estable de la aplicación de PTH (80 mg/kg/d) sobre la movilización de diversas poblaciones de células madre positivas para CD34, CD31, Sca-1 y c-kit de la médula ósea a la sangre periférica. Hasta ahora no se conocía PTH como movilizador de células madre. Calvi (*loc. cit*) mostraron que la PTH está implicada en la regulación del nicho de células madre de la médula ósea: la sobreexpresión del receptor de hPTH/PTHrP bajo el control del promotor de colágeno $\alpha 1(I)$ específico de osteoblastos condujo a un aumento de la proliferación de células madre positivas para Sca-1 y c-kit en la médula ósea. La elevación del número de células madre estaba mediado por la señalización de jagged1 Notch lo que condujo a una proliferación pronunciada de células primitivas. Sin embargo, la movilización de células madre mediante la aplicación de PTH podría reflejar un nuevo concepto de tratamiento de nicho y no se ha descrito hasta la fecha. Posibles mecanismos implicados en la movilización inducida por PTH podrían ser el aumento de la expresión y secreción de G-CSF, SDF y MMP-9 que son inductores conocidos de la movilización de células madre y el direccionamiento de células madre.

El tratamiento con PTH después de IM mejora la supervivencia a largo plazo y restaura parcialmente la función miocárdica

Estos resultados mostraron que el tratamiento con PTH después de IM está relacionado con efectos beneficiosos sobre la supervivencia y función miocárdica global a lo largo de un periodo de tiempo de 4 semanas. Se relacionó la reducción de la mortalidad y la mejora de la función miocárdica con un deterioro reducido de la pared del ventrículo izquierdo y un efecto positivo sobre la resistencia arterial periférica. Previamente, se mostró que la administración de PTH(1-34) por vía intravenosa (1 U/kg/min) empezando 30 minutos después de oclusión coronaria en perros ejerció un efecto de preservación de tejido sobre el miocardio, restauró la función del VI y previno el desarrollo de choque cardiogénico a corto plazo⁴⁷. Más recientemente, se mostró que el tratamiento con PTH(1-34) aumentaba el flujo sanguíneo miocárdico al reducir la resistencia arterial coronaria en cerdos en miocardio normal y aturdido después de infusión intracoronaria de PTH(1-34) en una dosis acumulada de entre 12 y 18 mg³². Sin embargo, no se ha estudiado aún el efecto de una aplicación intermitente de PTH después de IM. En este estudio, la aplicación de 80 mg/kg/d de PTH dio como resultado una reducción significativa de la resistencia arterial en el día 6 y en el día 30, sugiriendo efectos vasorrelajantes tempranos en el sistema arterial incluyendo la vasculatura coronaria. Como apareció la mayor mortalidad en los primeros 6 días después de IM estos datos podrían estar relacionados con otros que muestran una prevención de choques cardiogénicos después del tratamiento con PTH⁴⁷. Además, se halló un deterioro reducido de la pared del ventrículo izquierdo que redujo el estrés de la pared miocárdica.

Además, estos resultados (véanse las figuras 15, 16 y 17) mostraron efectos beneficiosos del tratamiento posinfarto con PTH sobre la supervivencia y función miocárdica global a lo largo de un periodo de tiempo de 4 semanas. La reducción de la mortalidad y la mejora de la función miocárdica se relacionó con un aumento de la movilización y migración de células madre CD45⁺/Sca-1⁺ y CD45⁺/CD34⁺ al corazón isquémico que podrían explicar el aumento de la expresión de VEGF e IGF-1. Como VEGF e IGF-1 son factores de crecimiento conocidos que potencian la neovascularización y reducen la tasa de apoptosis esto podría dar como resultado un deterioro reducido de la pared del ventrículo izquierdo y una menor cicatriz del infarto. Además, estos datos mostraron una poscarga arterial reducida reflejada mediante una elasticidad arterial reducida en el día 6 y el día 30. *In vitro* e *in vivo*, PTH (1-34) exógena y su péptido secretado endógeno relacionado estructuralmente PTHrP son dilatadores conocidos del lecho de vasos arteriales. La vasodilatación arterial se basa en la activación del receptor de PTH/PTHrP tipo I que se sabe que se expresa en células del músculo liso: tras la activación del receptor, PTH da como resultado un aumento de la producción de AMPc que da como resultado una disminución del flujo de entrada de calcio que da como resultado vasodilatación. En este contexto, se mostró que el tratamiento con PTH (1-34) aumentaba el flujo sanguíneo miocárdico al reducir la resistencia arterial coronaria en cerdos y ratas en miocardio normal y aturdido después de infusión intracoronaria de PTH (1-34) en una dosis acumulada entre 12 y 18 mg. Otro estudio experimental que sometió ratas Sprague-Dawley macho a oclusión permanente de la arteria cerebral central mostró que el tratamiento con el péptido PTHrP(1-34) disminuyó significativamente el tamaño de infarto cortical hasta el 47%. Además, se mostró previamente que la administración de PTH(1-34) por vía intravenosa (1 U/kg/min) empezando 30 minutos después de la oclusión coronaria en perros ejerció un efecto de preservación de tejido sobre el miocardio, restauró la función del VI y previno el desarrollo de choques cardiogénicos a corto plazo. Sin embargo, no se ha estudiado aún el efecto de una aplicación intermitente de PTH después de IM a largo plazo. En este estudio, la aplicación de 80 mg/kg/d de PTH dio como resultado una reducción significativa de la resistencia arterial en el día 6 y en el día 30 sugiriendo efectos vasorrelajantes tempranos en el sistema arterial incluyendo la vasculatura coronaria.

El impacto de PTH(1-34) sobre la angiogenesis y la supervivencia celular está mediado por el eje de IGF-1 y VEGF.

Se investigaron los efectos del tratamiento con PTH sobre la expresión de IGF-1 en el corazón infartado.

La unión de IGF-1 a su receptor de superficie celular (IGF-1R) activa las actividades tirosina cinasa intrínsecas del receptor, lo que da como resultado la fosforilación de los sustratos de receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). IRS con tirosinas fosforiladas interaccionan con proteínas citoplasmáticas con dominios de homología 2 de src (SH2), tales como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La activación de PI3K conduce entonces a la transducción de los efectos funcionales de IGF-1, tales como transporte potenciado de glucosa, contractilidad potenciada de cardiomiocitos y la inhibición de la muerte celular programada (apoptosis). Además, también se mostró que la remodelación cardíaca después de infarto de miocardio se ve afectada en ratones deficientes en IGF-1⁵⁴

La movilización y transfusión de células de médula ósea CD34⁺ contribuye a la potenciación de la neovascularización. Células de médula ósea y sangre CD34⁺ aisladas expresan y secretan factores de crecimiento angiogénicos incluyendo VEGF, HGF e IGF-1. Como se demuestra (véanse las figuras 18 y 19) una migración inducida por PTH de células CD45⁺/CD34⁺ al corazón, la acumulación de estas células angiogénicas podría explicar los mayores niveles de expresión de receptor VEGF-A, VEGF-R1 e IGF-1 en la zona de infarto. A este respecto, se halló un aumento significativo de angiogenesis acompañado de una expresión pronunciada de VEGF-A y VEGF-R1 en el infarto y la zona limítrofe después del tratamiento con PTH. Sin embargo, no está claro indudablemente que el aumento de la expresión de los factores proangiogénicos VEGF-A y VEGF-R1 sea un efecto directo de PTH o resulte de células sanguíneas infiltradas movilizadas que secretan la proteína VEGF. La inmunotinción de corazones 2 y 6 días después de IM reveló un alto número de leucocitos y monocitos en el tejido de granulación que se tiñó positivo para la proteína VEGF, respaldando la tesis de que se han transportado factores angiogénicos hasta el sitio de isquemia. Además, se mostró que se derivan células c-kit⁺ cardioprotectoras de la médula ósea y actúan sobre el miocardio isquémico mediante una potenciación de la neovascularización a través de citocinas angiogénicas como VEGF-A. Recientemente, se detectó 7 días después de IM un aumento de 2 veces de la expresión de VEGF después de trasplante de células GFP⁺/CD34⁺ en la zona de infarto. Además, se mostró que el VEGFR1 es un receptor funcional en monocitos/macrófagos y neutrófilos que podría reclutarse a los lados de la isquemia por VEGF-A. Los monocitos/macrófagos que expresan VEGFR1 no pudieron incorporarse en estructuras vasculares pero pudieron liberar factores angiogénicos como VEGF-A e inducir neovascularización. Otra fuente para la expresión enriquecida de factor de crecimiento podría ser la migración potenciada de células CD45⁺/Sca-1⁺ después de la aplicación de PTH. Algunos ratones tratados con PTH también mostraron una acumulación pronunciada de CD45⁺/Sca-1⁺ pero este efecto no fue sistemático (datos no mostrados). Recientemente, Wang *et al.* describieron una población de células positivas para Sca-1/CD31⁻ aislada del corazón que mostró un aumento de la neovascularización como motivo principal para una mejora de la función cardíaca después de trasplante en corazones isquémicos. Células positivas para Sca-1 cardíacas aisladas mostraron un aumento de 8 veces de factores de crecimiento como VEGF, SDF-1 e IGF-1 cuando se compararon con miocitos cardíacos adultos, identificando una posible fuente de factores angiogénicos. Otra publicación reciente muestra la diferenciación potencial de células madre embrionarias positivas para Sca-1 en células endoteliales funcionales mediante la activación de HDAC3, acelerando la reendotelización de arterias lesionadas y reduciendo la formación de la neointima.

Por consiguiente, estos datos muestran que PTH induce la migración dependiente de SDF-1 de células madre CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/Sca-1 que liberan factores de crecimiento angiogénicos como VEGF e IGF-1 para fomentar la angiogenesis y muerte celular antiapoptótica. Por otro lado, solo se han investigado escasamente la influencia directa de PTH sobre la neovascularización. Previamente, se mostró que PTHrP(1-34) aumentó de manera dependiente de la dosis la formación de capilares de células endoteliales en una matriz de gel de colágeno. Además, se notificó que PTH estimulaba la expresión de VEGF en células similares a osteoblastos humanas *in vitro*. Otro trabajo mostró una correlación de los niveles en suero de PTH y la proteína VEGF en glándulas paratiroides explantadas, trasplantadas a ratas por vía subcutánea. Otro factor conocido que se secreta desde células sanguíneas infiltradas es IGF-1. Estos datos experimentales mostraron que la proteína receptora de IGF-1 estaba regulada por incremento básicamente en cardiomiocitos en la zona limítrofe en el día 2 y en el día 6, lo que se asoció con un aumento de la cantidad de neovascularización y un número reducido de cardiomiocitos apoptóticos. La unión de IGF-1 a su receptor de superficie celular (IGF-1R) activa las actividades tirosina cinasa intrínsecas del receptor, lo que da como resultado la fosforilación de los sustratos de receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). IRS con tirosinas fosforiladas interaccionan con proteínas citoplasmáticas con dominios de homología 2 de src (SH2), tales como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La activación de PI3K conduce entonces a la transducción de los efectos funcionales de IGF-1, tales como transporte potenciado de glucosa, contractilidad potenciada de cardiomiocitos y la inhibición de la muerte celular programada (apoptosis). En cambio, ratones deficientes en IGF-1 mostraron una remodelación cardíaca afectada después de infarto de miocardio mientras que la sobreexpresión de IGF-1 en ratones protege frente a la muerte de miocitos después de un infarto, atenuando la dilatación ventricular, el estrés de la pared y la hipertrofia cardíaca. En cardiomiocitos en cultivo, IGF-1 aumentó la expresión de ARNm y proteína de VEGF en 2 veces y recientemente se mostró que IGF-1 regula la expresión y secreción de VEGF mediante rutas dependientes e independientes de HIF-1. La actividad del promotor de VEGF estimulada por IGF-1 dependía de PI3-K/Akt/mTOR. En estos experimentos, el

receptor de IGF-1 se expresaba en gran medida básicamente en cardiomiocitos en la zona limítrofe del infarto. Como el ARNm de IGF-1 también estaba regulado por incremento, esto podría significar una mayor sensibilidad de cardiomiocitos de la zona limítrofe frente a los efectos cardioprotectores de IGF-1 como reducción de la apoptosis y aumento de la neovascularización.

PTH indujo la migración de células madre positivas para CD45/Sca-1 y CD45/CD34/CXCR4 al corazón

En estos experimentos (véanse las figuras 20 y 21) se demuestra que la aplicación de PTH dio como resultado un cambio significativo en el nicho cardíaco de células madre reflejado mediante la potenciación de la migración de células madre positivas para CD45/Sca-1 y especialmente CD45/CD34 48 horas después de isquemia miocárdica. El subanálisis de la fracción de células madre CD45/CD34 reveló una alta expresión del receptor de factor de direccionamiento CXCR4 y otros marcadores de células madre como CD31, c-kit y Sca-1. Casi el 80-90% de las células cardíacas positivas para CD45/CD34 coexpresaron el receptor CXCR4 en su superficie, sugirieron fuertemente un mecanismo de direccionamiento dependiente de SDF-1-CXCR4. En cambio, el subconjunto de células CD45⁺/CD34^{neg} solo expresó el 10% de CXCR4 en su superficie, indicando un mecanismo independiente de CXCR4-SDF-1 de migración celular al corazón. La relevancia para el aumento del direccionamiento del subconjunto de células CD34⁺/CXCR4⁺ está respaldado por este hallazgo de que el factor de direccionamiento SDF-1 α está regulado por incremento en el miocardio isquémico 48 horas después del tratamiento con PTH. Sin embargo, el direccionamiento de células positivas para CD45/CD34/CXCR4 también se observó en animales tratados con solución salina y operados de manera simulada. La migración fue menos pronunciada especialmente en ratones operados de manera simulada y se relacionó con una reducción de la expresión de SDF-1 48 horas después de IM (en comparación con el tratamiento con PTH) mostrando una relación positiva entre la expresión de SDF-1 y la migración de células madre positivas para CD45/CD34/CXCR4 al corazón. Con respecto a este asunto, la sobreexpresión de SDF-1 α en un modelo crónico de isquemia cardíaca condujo a un aumento de la infiltración de células madre positivas para CD34 y c-kit en el corazón pero no se analizó la fracción de CXCR4. Se mostró un aumento del 80% de la migración de células de médula ósea Lin⁻ marcadas genéticamente e infundidas por vía intravenosa en el corazón 48 horas después de IM. La administración de AMD3100, que bloquea específicamente la unión de SDF-1 a su receptor endógeno CXCR4, disminuyó el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea después de IM en un 64%. Sin embargo, en este estudio solo se cuantificó el direccionamiento de una subpoblación infundida de células Lin⁻. Los datos de esta invención muestran migración celular al corazón después de IM: la acumulación de células positivas para CD45/CD34/CXCR4 en el corazón no se relacionó con una modalidad de tratamiento especial, indicando un mecanismo común de migración celular para células positivas para CD34/CXCR4 de manera dependiente de SDF-1. En cambio y de manera sorprendente, la fracción de células CD45⁺/CD34⁻ reveló una débil expresión de CXCR4 y, por consiguiente. Se desencadenó otro mecanismo de migración celular por ICAM/VCAM y quimiocinas, como TNF- α o interleucinas.

En resumen y tal como se documenta en la presente memoria, el tratamiento con PTH después de infarto de miocardio dio como resultado la movilización y migración de células madre y la preservación de la función cardíaca mediante un aumento de la angiogénesis y la supervivencia celular mediante mecanismos mediados por VEGFA e IGF-1 que podrían explicarse mediante una potenciación de la migración de células madre positivas para CD45/CD34/CXCR4 angiogénicas. Como la PTH (1-34) ya se ha utilizado clínicamente en pacientes con osteoporosis para aumentar la densidad mineral ósea, la hormona paratiroidea podría ser un complemento o una alternativa interesante a otros agentes de modulación de células madre como G-CSF o GM-CSF en la cardiopatía isquémica.

Las consideraciones y los resultados mencionados anteriormente podrían aplicarse con respecto a PTHrP o una combinación de PTH y PTHrP. Por consiguiente, estos resultados y consideraciones pueden generalizarse en la medida en que PTH y/o PTHrP sea(n) útil(es) para reclutar de células madre de la médula ósea a la periferia y, además, sea(n) útil(es) para la prevención y/o el tratamiento de isquemia.

Bibliografía

1. Jansen, J., Hanks, S., Thompson, J.M., Dugan, M.J. & Akard, L.P. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med* 9, 37-50 (2005).
2. Orlic, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349 (2001).
3. Takahashi, T. et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-438 (1999).
4. Asahara, T. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18, 3964-3972 (1999).
5. Hattori, K. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from

bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8, 841-849 (2002).

6. Heeschen, C. et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102, 1340-1346 (2003).

7. Hattori, K. et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97, 3354-3360 (2001).

8. Iwakura, A. et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 108, 3115-3121 (2003). 9. Dimmeler, S. et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108, 391-397 (2001).

10. Vasa, M. et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103, 2885-2890 (2001).

11. Laufs, U. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109, 220-226 (2004).

12. Brown, E.M. Four-parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 56, 572-581 (1983).

13. Brown, E.M. Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2, 541-551 (1993).

14. Diaz, R., El-Hajj Fuleihan, G. & Brown, E.M. in *Handbook of Physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. 3.* (ed. G.G.S. Fray) (Oxford University Press, New York; 1999).

15. Madore, G.R., Sherman, P.J. & Lane, J.M. Parathyroid hormone. *J Am Acad Orthop Surg* 12, 67-71 (2004).

16. Potts, J.T. & Juppner, H. in *Principles of Bone Biology.* (eds. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz & G.A. Rodan) 325 (Academic Press, New York; 1996).

17. Qian, J. et al. Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology* 144, 1053-1061 (2003).

18. Tian, J., Smogorzewski, M., Kedes, L. & Massry, S.G. Parathyroid hormone-parathyroid hormone related protein receptor messenger RNA is present in many tissues besides the kidney. *Am J Nephrol* 13, 210-213 (1993).

19. Calvi, L.M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841-846 (2003).

20. Marie, P.J. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol* 190, 297-305 (2002).

21. Reya, T. et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414 (2003).

22. Zhu, J. & Emerson, S.G. A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. *Bioessays* 26, 595-599 (2004).

23. Duarte, R.F. & Frank, D.A. SCF and G-CSF lead to the synergistic induction of proliferation and gene expression through complementary signaling pathways. *Blood* 96, 3422-3430 (2000).

24. Duarte, R.F. & Frank, D.A. The synergy between stem cell factor (SCF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): molecular basis and clinical relevance. *Leuk Lymphoma* 43, 1179-1187 (2002).

25. Hematti, P. et al. Comparison of retroviral transduction efficiency in CD34+ cells derived from bone marrow versus G-CSF-mobilized or G-CSF plus stem cell factor-mobilized peripheral blood in nonhuman primates. *Stem Cells* 22, 1062-1069 (2004).

26. Hess, D.A. et al. Functional analysis of human hematopoietic repopulating cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor alone versus granulocyte colony-stimulating factor in combination with stem cell factor. *Blood* 100, 869-878 (2002).

27. Taichman, R.S. & Emerson, S.G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of

granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 179, 1677-1682 (1994).

28. Taichman, R.S., Reilly, M.J. & Emerson, S.G. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* 87, 518-524 (1996).

29. Taichman, R., Reilly, M., Verma, R., Ehrenman, K. & Emerson, S. Hepatocyte growth factor is secreted by osteoblasts and cooperatively permits the survival of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 112, 438-448 (2001).

30. Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff, JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Braodus AE, y Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76: 127-173, 1996.

31. Roca-Cusachs A, DiPette DJ, y Nickols GA. Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced

32. Jansen, Johanna, Petra Gres, Christian Umschlag, Frank R. Heinzel, Heike Degenhardt, Klaus-Dieter Schluter, Gerd Heusch, y Rainer Schulz. Parathyroidhormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H49-H55, 2003.

33. Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT & Segre GV. PTH/PTHrP receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 1993; 133:617-623.

34. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, et al. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425:841-846.

35. Jung Y, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley, Taichmann RS. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 2005:

36. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., y Anversa, P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705

37. Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M., y Itescu, S. (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436

38. Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Koesterling, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Koegler, G., y Wemet, P. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-1918

39. Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., y Steinhoff, G. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-46

40. Assmus, B., Schaechinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Doeber, N., Gruenwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., y Zeiher, A. M. (2002) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation* 106, 3009-3017

41. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., y Anversa, P. (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10344-10349

42. Ohtsuka, M., Takano, H., Zou, Y., Toko, H., Akazawa, H., Qin, Y., Suzuki, M., Hasegawa, H., Nakaya, H., y Komuro, I. (2004) Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization. *FASEB J*, Epub ahead of print

43. Kuethe, F., Figulla, H. R., Voth, M., Richartz, B. M., Opfermann, T., Sayer, H. G., Krack, A., Fritzenwanger, M., Hoffken, K., Gottschild, D., y Werner, G. S. (2004) Mobilization of stem cells by granulocyte colony-stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 129, 424-428

44. Yang, F., Liu, Y. H., Yang, X. P., Xu, J., Kapke, A., y Carretero, O. A. (2002) Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 87, 547-555

45. Wettschureck, N., Ruetten, H., Zywiets, A., Gehring, D., Wilkie, T. M., Chen, J., Chien, K. R., y Offermanns, S. (2001) Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gαq/Gα11 in

cardiomyocytes. *Nat Med* 7, 1236-1240

46. Georgakopoulos, D., Mitzner, W. A., Chen, C. H., Byrne, B. J., Millar, H. D., Hare, J. M., y Kass, D. A. (1998) In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol* 274, H1416-1422
47. Tanaka, J., Miyake, T., Shimizu, T., Wakajana, T., Tsumori, M., Koshimura, K., Murakami, Y., y Kato, Y. (2002) Effect of continuous subcutaneous administration of a low dose of G-CSF on stem cell mobilization in healthy donors: a feasibility study. *Int J Hematol* 75, 489-492
48. Kawashima-Ohaya Y, Satakeda H, Kuruta Y, Kawamoto T, Yan W, Akagawa Y, Hayakawa T, Noshiro M, Okada Y, Nakamura S y Kato Y. Effects of Parathyroid Hormone (PTH) and PTH-Related Peptide on Expressions of Matrix Metalloproteinase-2, -3, and -9 in Growth Plate Chondrocyte Cultures. *Endocrinology* 139: 2120-2127, 1998.
49. McClelland P, Onyia JE, Miles RR, Tu Y, Liang J, Harvey AK, Chandrasekhar S, Hock JM, Bidwell JP. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. *J Cell Biochem.* 1998 Sep 1;70(3):391-401.
50. Feola M, Gonzales H, Canizaro PC. Vasoactive parathyroid hormone in the treatment of acute ischemic left ventricular failure and the prevention of cardiogenic shock. *Circ Shock.* 1985;17(2):163-77.
51. Palmen M, Daemen MJ, Bronsaer R, Dassen WR, Zandbergen HR, Kockx M, Smits JF, van der Zee R, Doevendans PA. Cardiac remodeling after myocardial infarction is impaired in IGF-1 deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2001 Jun;50(3):516-24.
52. Balsam, L. B., Wagers, A. J., Christensen, J. L., Kofidis, T., Weissman, I. L., y Robbins, R. C. (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673
53. Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B., Virag, J. I., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A., y Field, L. J. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668
54. Harada, M., Qin, Y., Takano, H., Minamino, T., Zou, Y., Toko, H., Ohtsuka, M., Matsuura, K., Sano, M., Nishi, J., wanaga, K., Akazawa, H., Kunieda, T., Zhu, W., Hasegawa, H., Kunisada, K., Nagai, T., Nakaya, H., Yamauchi- Takihara, K., y Komuro, I. (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11, 305-311
55. Fuste, B., Mazzara, R., Escolar, G., Merino, A., Ordinas, A., y Diaz-Ricart, M. (2004) Granulocyte colonystimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK. *Haematologica* 89, 578-585
56. Bussolino, F., Wang, J. M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C. J., Aglietta, M., Arese, P., y Mantovani, A. (1989) Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 337, 471-473
57. Hoefer, I. E., Grundmann, S., van Royen, N., Voskuil, M., Schirmer, S. H., Ulusans, S., Bode, C., Buschmann, I. R., y Piek, J. J. (2005) Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: Specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. 181, 285-289
58. Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Pipp, F., Kostin, S., Martin, S., Clauss, M., y Schaper, W. (2002) Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2411-2419
59. Hoefer, I. E., van Royen, N., Rectenwald, J. E., Deindl, E., Hua , J., Jost, M., Grundmann, S., Voskuil, M., Ozaki, C. K., Piek, J. J., y Buschmann, I. R. (2004) Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res Epub ahead of print*
60. Deindl, E., Ziegelhoffer, T., Kanse, S. M., Fernandez, B., Neubauer, E., Carmeliet, P., Preissner, K. T., y Schaper, W. (2003) Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J*, 1174-1176
61. Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinkel, R., Helisch, A., y Schaper, W. (2003) Bone Marrow-Derived Cells Do Not Incorporate Into the Adult Growing Vasculature. *Circ Res* 94, Epub ahead of print

62. Norol, F., Merlet, P., Isnard, R., Sebillon, P., Bonnet, N., Cailliot, C., Carrion, C., Ribeiro, M., Charlotte, F., Pradeau, P., Mayol, J. F., Peinnequin, A., Drouet, M., Safsafi, K., Vernant, J. P., y Herodin, F. (2003) Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 102, 4361-4368
- 5 63. Deten, A., Volz, H. C., Clamors, S., Leiblein, S., Briest, W., Marx, G., y Zimmer, H. G. (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 65, 52-63
64. Deindl, E., Helisch, A., Scholz, D., Heil, M., Wagner, S., y Schaper, W. (2004) Role of hypoxia/ischemia/VEGFA and strain differences. In *Arteriogenesis* (Schaper, W., y Schaper, J., eds) pp. 115-131, Kluwer Academic Publishers, Boston Dordrecht London
- 10 65. Kong, D., Melo, L. G., M., G., Zhang, L., Mostoslavsky, G., Liew, C. C., Pratt, R. E., y Dzau, V. J. (2004) Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 110, 2039-2046
- 15 66. Herold, J., Pipp, F., Fernandez, B., Xing, Z., Heil, M., Tillmanns, H., y Braun-Dullaues, R. C. (2004) Transplantation of monocytes: a novel strategy for in vivo augmentation of collateral vessel growth. *Hum Gene Ther* 15, 1-12
- 20 67. Schneeloch, E., Mies, G., Busch, H. J., Buschmann, I. R., y Hossmann, K. A. (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12730-12735
- 25 68. Buschmann, I. R., Hoefer, I. E., van Royen, N., Katzer, E., Braun-Dulleaus, R., Heil, M., Kostin, S., Bode, C., y Schaper, W. (2001) GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 159
69. Buschmann, I. R., Busch, H. J., Mies, G., y Hossmann, K. A. (2003) Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108, 610-615
- 30 70. Seiler, C., Pohl, T., Wustmann, K., Hutter, D., Nicolet, P. A., Windecker, S., Eberli, F. R., y Meier, B. (2001) Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 23, 2012-2017
- 35 71. Sugano, Y., Anzai, T., Yoshikawa, T., Maekawa, Y., Kohno, T., Mahara, K., Naito, K., y Ogawa, S. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 65, 446-456
72. Peter, F. W., Schuschke, D. A., Barker, J. H., Fleishcher-Peter, B., Pierangeli, S., Vogt, P. M., y Steinau, H. U. (1999) The effect of severe burn injury on proinflammatory cytokines and leukocyte behavior: its modulation with granulocyte colony stimulating factor. *Burns* 25, 477-486
- 40 73. Vargel, I., Erdem, A., Ertoy, D., Pinar, A., Erk, Y., Altundag, M. K., y Gullu, I. (2002) Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GMCSF and G-CSF. *Ann Plastic Surg* 49, 646-653
- 45 74. Carstanjen, D., Ulbricht, N., Iacone, A., Regenfus, M., y Salama, A. (2002) Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF. *Transfusion* 42, 588-596
- 50 75. Minatugucchi, S., Takemura, G., Chen, X. H., Wang, N., Uno, Y., Koda, M., Arai, M., Misao, Y., Lu, C., Suzuki, K., Goto, K., Komada, A., Takahashi, T., Kosai, K., Fujiwara, T., y Fujiwara, H. (2004) Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction Granulocyte Colony-Stimulating Factor treatment. *Circulation* 109, 2572-2580
- 55

Las figuras muestran:

Figura 1:

A Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ en sangre periférica (valores relativos)
B Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁻ en sangre periférica (valores relativos)

* significativo en comparación con control
** significativo en comparación con PTH 6d
*** significativo en comparación con PTH 14d

Figura 2:

A Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ en médula ósea
B Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁻ en médula ósea

* significativo en comparación con control
** significativo en comparación con PTH 6d
*** significativo en comparación con PTH 14d

Figura 3:

A Niveles séricos de SCF
B Niveles séricos de G-CSF

* significativo en comparación con control

Figura 4: Mortalidad entre ratones tratados con PTH y con solución salina en los que se ha inducido infarto de miocardio

Cuatro semanas después del infarto de miocardio, los ratones tratados con rPTH (1-34) mostraron un aumento significativo en la tasa de supervivencia en comparación con los animales tratados con solución salina (el 60,0% frente al 40,2%). La mortalidad entre los ratones sin tratar fue muy alta en el plazo de los primeros seis días.

Figura 5: Datos hemodinámicos en el día 6

Usando catéteres de conductancia se midieron las relaciones de presión-volumen del nivel inicial (animales simulados y de control), ratones tratados con PTH(1-34) así como tratados con solución salina el día 6 después del infarto de miocardio inducido quirúrgicamente *in vivo*

Figura 6: Datos hemodinámicos en el día 30

Usando catéteres de conductancia se midieron las relaciones de presión-volumen del nivel inicial (animales simulados y de control), ratones tratados con PTH(1-34) así como tratados con solución salina el día 30 después del infarto de miocardio inducido quirúrgicamente *in vivo*

Figura 7: Fracción de eyección

El tratamiento con PTH el día 6 dio como resultado una función sistólica mejorada reflejada por una fracción de eyección aumentada (el 30% frente al 15%).

El día 30, todavía estaba presente mejora hemodinámica en el grupo tratado con PTH: la fracción de eyección (EF: el 29,0% ± el 7,1% frente al 14,5% ± 0,9%, p<0,001) estaba significativamente mejorada.

Figura 8: Gasto cardiaco

El tratamiento con PTH el día 6 dio como resultado una función sistólica mejorada reflejada por un gasto cardiaco aumentado (5537 frente a 3588 µl/min).

El día 30, todavía estaba presente mejora hemodinámica en el grupo tratado con PTH: el gasto cardiaco (3810 ± 205 frente a 2690 µl/min) estaba significativamente mejorado.

Figura 9: Trabajo de ictus

El tratamiento con PTH el día 6 dio como resultado una función sistólica mejorada reflejada por un trabajo de ictus aumentado.

El día 30, todavía estaba presente mejora hemodinámica en el grupo tratado con PTH: trabajo de ictus (382 ± 59 frente a 258 ± 27 mmHg x ml, p<0,05).

Figura 10: Elasticidad arterial

La carga vascular arterial estaba significativamente reducida en los animales tratados con PTH lo que se refleja por una elasticidad arterial disminuida (E_a : 6,1 ± 0,5 frente a 8,9 ± 0,9 mmHg/µl, figura 10). De manera

similar al grupo de 6 días, la elasticidad arterial ($Ea: 7,2 \pm 0,5$ frente a $11,5 \pm 1,6$ mmHg/ μ l) estaba significativamente reducida 30 días después de tratamiento hormonal.

Figura 11: Tamaño de infarto

El día 30, los ratones con infarto tratados con solución salina revelaron un infarto de miocardio transmural con adelgazamiento de pared pronunciado a lo largo del tiempo y aneurisma apical, mientras que el tratamiento con rPTH(1-34) estaba asociado con una frecuencia menor de aneurismas de VI grandes (figura 6). El tamaño de infarto del VI el día 6 calculado como el área de necrosis y tejido de granulación (el $37,3\% \pm$ el $4,9\%$ frente al $39,8\% \pm$ el $3,1\%$ del área de VI total, $p=ns$) no fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento con solución salina.

Figura 12: Número de células en el área de infarto

El día 30, los ratones con infarto tratados con solución salina revelaron un infarto de miocardio con transmural con adelgazamiento de pared pronunciado a lo largo del tiempo y aneurisma apical, mientras que el tratamiento con rPTH(1-34) estaba asociado con una frecuencia menor de aneurismas de VI grandes (figura 6). El tamaño de infarto de VI el día 6 calculado como el área de necrosis y tejido de granulación (el $37,3\% \pm$ el $4,9\%$ frente al $39,8\% \pm$ el $3,1\%$ del área de VI total, $p=ns$) no fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento con solución salina. Sin embargo, la composición de infarto estaba alterada con una densidad celular significativamente menor (4383 ± 409 frente a $3317 \pm 171/\text{mm}^2$, $p<0,05$) en the tejido de granulación.

Figura 13: Grosor de pared

El día 30 después de la oclusión de la LAD, el tamaño de infarto medido como el área de fibrosis fue significativamente más pequeño en los animales tratados con PTH (el $23,3 \pm$ el $4,6\%$ frente al $33,6\% \pm$ el $2,6\%$, $p<0,05$, figura 11). El grosor de pared anterior disminuyó a lo largo del tiempo en ambos grupos, sin embargo, en un grado menor en los ratones tratados con G-CSF (tabla 1 y figura 6). El día 6 y el día 30, la pared anterior en el grupo de animales tratados con rPTH fue más gruesa en comparación con los ratones tratados con solución salina (día 6: $0,58$ frente a $0,42$ mm, día 30: $0,22$ frente a $0,13$ mm, figura 13).

Figura 14: Mejora de la función cardíaca después del infarto de miocardio aumentando la migración y el direccionamiento de células madre al miocardio a través de la inhibición de DPP-IV

Función cardíaca reducida (evaluada por catéter de punta Millar) en un modelo de ratón 6 días después del infarto de miocardio ("IMA") en comparación con un grupo de control ("simulado"). La fracción de eyección (EF) mejoró significativamente después de la inhibición de DPP-IV a través de diprotina A ("IMA+DiprA") después del infarto de miocardio.

Figura 15: Hallazgos histológicos y relaciones de presión-volumen en ratones

A. Tinción tricrómica de Masson representativa de corazones con infarto u operados de manera simulada (parte superior) en relación con relaciones de presión-volumen *in vivo* medidas (parte inferior) de los mismos ratones 30 días después del IM. (Izquierda) Ratones operados de manera simulada (parte central) ratones con infarto y tratados con solución salina y (derecha) ratones con infarto tratados con PTH. Los ratones operados de manera simulada revelaron relaciones de presión-volumen con bajos volúmenes sistólico final y diastólico final (izquierda), mientras que los ratones con infarto revelaron bajas presiones de VI con altos volúmenes de llenado dando como resultado una fracción de eyección menor (parte central), que se restableció parcialmente en los animales tratados con G-CSF dando como resultado un desplazamiento hacia la izquierda del bucle de PV (derecha).

B. Gráficos de barras que representan la fracción de eyección (izquierda) y la elasticidad arterial (derecha) de animales operados de manera simulada ($n=10$, barras blancas), simulados+PTH ($n=8$, barras punteadas), con infarto tratados con solución salinas (barras rayadas) y con infarto tratados con PTH (barras negras) a los 6 días ($n=6$) y a los 30 días ($n=6-10$) después del infarto de miocardio. $*p<0,05$ solución salina frente a PTH.

Figura 16: Tamaño de infarto y grosor de pared anterior

Gráficos de barras que representan A) la disminución de la pared libre anterior izquierda y B) el tamaño de infarto en animales con infarto tratados con solución salina (barras rayadas) y animales con infarto tratados con PTH (barras negras) el día 6 ($n=6$) y el día 30 ($n=6-10$) después del IM. C). Tinciones tricrómicas de Masson representativas de ratones tratados con solución salina (parte superior) y tratados con PTH (parte inferior) el día 6 (izquierda) y el día 30 (derecha) después del IM. $*p<0,05$ solución salina frente a PTH.

Figura 17: Neovascularización aumentada por PTH en el tejido de granulación

A) Gráficos de barras que representan el número de vasos positivos para CD31 en el tejido de granulación en la zona de límite de animales tratados con solución salina (barras rayadas) y de animales tratados con PTH (barras negras) el día 6 (n=6) y el día 30 (n=6) después de la ligación de la LAD.

B) Tinción inmunohistoquímica representativa de CD31 (marrón) en el corazón de ratones tratados con solución salina (izquierda) y tratados con PTH (derecha) el día 6 (fila superior 400x) y el día 30 después del IM (fila inferior 400x). C) Tinción representativa de vasos positivos para CD31 (izquierda: 100x, derecha: 400x) en el tejido de granulación que alberga la zona de límite de animales tratados con PTH (fila superior) y tratados con solución salina (fila inferior). D) Los análisis inmunohistoquímicos de capilares de ratones tratados con PTH 6 días después del IM revelaron doble tinción de vasos positivos para CD31 (marrón) y Ki67 (violeta). En todos los cortes, los núcleos (azul) se contratiñeron con hematoxilina. *p<0,05 solución salina frente a PTH.

Figura 18: Tinción inmunohistoquímica de proteína VEGF-A en el tejido de granulación en la zona de límite de infarto y análisis de RT-PCR de la expresión de VEGF-A/VEGF-R1

A) Tinción representativa de proteína VEGF-A (marrón) en el tejido de granulación de corazones operados de manera simulada (izquierda), tratados con solución salina (parte central) y tratados con PTH (derecha). La proteína VEGF-A se localiza principalmente en células infiltradas en the tejido de granulación en la zona de límite.

B) Gráficos de barras que representan el aumento en veces relativo de expresión de ARNm de VEGF-A (izquierda) y de receptor de VEGF-1 (derecha) de tejido miocárdico tratado con solución salina (n=3, barras rayadas) y tratado con PTH (n=3-5, barras negras) normalizado con ratones de control sin infarto (n=3) 48 horas después del infarto de miocardio. *p<0,05.

Figura 19: Patrones de expresión de IGF-1/IGF-1 y su influencia sobre la apoptosis

A) Gráficos de barras que representan el aumento en veces relativo de expresión de ARNm de receptor de IGF-1 y B) expresión de ARNm de IGF-1 de ratones tratados con de solución salina (n=3, barras rayadas) y tratados con PTH (n=3-5, barras negras) normalizado con ratones de control sin infarto (n=3) 48 horas después del infarto de miocardio. *p<0,05. C) Tinción inmunohistoquímica de cardiomiocitos positivos para proteína receptora de IGF-1 (marrón) en la zona de límite de animales operados de manera simulada (n=3, izquierda), tratados con solución salina (n=3, parte central) y tratados con PTH (n=5, derecha) a los 2 días (fila superior) a 6 días (fila inferior) después del IM. D) Gráfico de barras que representa el porcentaje de cardiomiocitos positivos para receptor de IGF-1 en la zona de límite. E-F) Tinción de Tunel y cuantificación de cardiomiocitos positivos para Tunel en la zona de límite de infarto 48 horas después del IM de animales operados de manera simulada (n=3, barras blancas), tratados con solución salina (n=3, barras rayadas) y de animales tratados con PTH (n=3-5, barras negras). *p<0,05.

Figura 20: Aumento significativo de población de células Sca-1/CD31 después de infarto de miocardio

A (A): Análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia representativo de suspensiones celulares empobrecidas en cardiomiocitos obtenidas de un corazón normal (izquierda), un músculo esquelético normal (parte central) y un corazón que sufrió infarto 7 días antes de la recogida de células (derecha). Están presentes Significativamente más células Sca-1/CD31 endógenas (cuadrante inferior derecho) en miocardio normal que en músculo esquelético. El número de células Sca-1/CD31 en miocardio aumentó después del infarto de miocardio.

Figura 21: Perfil de expresión génica después del infarto de miocardio y aplicación de PTH. Gráficos de barras que representan el aumento en veces relativo de expresión de ARNm de SDF-1 α , parte inferior, el receptor de PTH/PTHrP (parte superior derecha), MMP-9 (parte inferior izquierda) y TIMP-2 (parte inferior derecha) de animales tratados con solución salina (n=3, barras rayadas) y de animales tratados con PTH (n=3-5, barras negras) normalizado con ratones de control sin infarto (n=3) 48 horas después de infarto de miocardio. *p<0,05.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención.

PRIMER CONJUNTO DE EXPERIMENTOS (MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE)

Ejemplo 1 (Animales)

Para los experimentos se utilizaron ratones C57BL/6 (Charles River) sanos de edad y sexo correspondientes

(machos, 8-12 semanas de edad). El cuidado de los animales y todos los procedimientos experimentales se realizaron en estricta conformidad con las directrices de legislación sobre animales de los Institutos de Salud Alemán y Nacional y se aprobaron por los comités locales de cuidado y utilización de animales.

5 Ejemplo 2 (Administración de PTH o G-CSF)

Se dividieron los ratones en los siguientes grupos: 1) Administración de solución salina diariamente durante 6 días, sacrificados el día 7 (n=6). 2) Administración de PTH (Bachem) diariamente durante 6 días consecutivos (80 µg por kg de peso corporal por día, vía intraperitoneal), sacrificados el día 7 (n=6). 3) Administración de PTH diariamente durante 14 días consecutivos, sacrificados el día 15 (n=6). 4) Administración de G-CSF (Amgen Biologicals) diariamente durante 5 días consecutivos (200 µg por kg de peso corporal por día, vía intraperitoneal), sacrificados el día 6 (n=6).

15 Ejemplo 3 (Análisis de citometría de flujo)

El día 6, se recogió 1 ml de sangre periférica de cada ratón mediante aspiración de la arteria carótida. Se obtuvieron células de la médula ósea lavando las tibias y los fémures de los ratones sacrificados. Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando disolución de Histopaque 1,077 g/ml (Sigma Chemicals), se purificaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina sérica bovina al 1%. Se incubaron las células durante 40 minutos en la oscuridad a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y peridina-clorofila-proteína (PerCP): CD45-PerCP, C34-FITC, CD31-PE, Sca-1-PE y c-kit-PE (todos ellos de BD Pharmingen). Anticuerpos de isotipo idéntico (BD Pharmingen) sirvieron como controles. Se analizaron las células mediante citometría de flujo de 3 colores utilizando un citómetro de flujo Coulter® Epics® XL-MCL™ (Beckman Coulter). Cada análisis incluyó 20000 eventos. Se calculó el número absoluto de células positivas para antígeno por ml de sangre completa multiplicando el porcentaje de células positivas para antígeno por el número total de células mononucleares por ml de sangre detectadas por el analizador de células hematológicas convencional. El número de linfocitos junto con el número de monocitos comprendió el número total de células mononucleares.

30 Ejemplo 4 (Niveles séricos de G-CSF y SCF)

Se determinaron los niveles séricos de G-CSF y SCF mediante ELISA (G-CSF de ratón y SCF de ratón, RayBiotech).

35 Ejemplo 5 (Análisis estadístico)

Los datos se muestran como la media ± EEM. Se realizó una comparación de múltiples grupos mediante de análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido por el procedimiento de Bonferroni para la comparación de medios. Las comparaciones entre dos grupos se realizaron utilizando la prueba de la t de datos independientes. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $P < 0,05$.

45 Ejemplo 6 (Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ en sangre periférica después del tratamiento con PTH)

Al investigar las células mononucleares a través del análisis de citometría de flujo, se encontró un aumento significativo de diferentes subtipos de células CD45⁺/CD34⁺ (CD45⁺/CD34⁺/CD31⁺, CD45⁺/CD34⁺/Sca-1⁺, CD45⁺/CD34⁺/c-kit⁺) y células CD45⁺/CD34⁻ (CD45⁺/CD34⁻/CD31⁺, CD45⁺/CD34⁻/Sca-1⁺, CD45⁺/CD34⁻/c-kit⁺) en sangre periférica el día 6 y el día 14 de la estimulación con PTH. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los días 6 y 14 de tratamiento (figura 1 A+B).

50 Ejemplo 7 (Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ en sangre periférica después del tratamiento con G-CSF)

Los resultados mostraron un aumento significativo de diferentes subtipos de células CD45⁺/CD34⁺ y células CD45⁺/CD34⁻ en sangre periférica el día 6 de la estimulación con G-CSF (figura 1 A+B). Al comparar el tratamiento con PTH y con G-CSF se encontró un número significativo menor de subtipos movilizados de células CD45⁺/CD34⁺ después de la administración de PTH. No se detectaron cambios significativos en los subtipos movilizados de células CD45⁺/CD34⁻ excepto para las células CD45⁺/CD34⁻/c-kit⁺ (49-50%, $p < 0,05$) (figura 1 A+B).

60 Ejemplo 8 (Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ en médula ósea después del tratamiento con PTH)

En médula ósea, no se detectó ningún cambio significativo de los subtipos de células CD45⁺CD34⁺ el día 6 o el día 14 de la estimulación con PTH (figura 2 A).

Sin embargo, los subtipos de células CD45⁺/CD34⁻ mostraron una disminución significativa el día 6 de la estimulación con PTH (figura 2 B).

5 **Ejemplo 9 (Poblaciones de células CD45⁺/CD34⁺ y CD45⁺/CD34⁻ en médula ósea después del tratamiento con G-CSF)**

En contraposición con los animales tratados con PTH, el tratamiento con G-CSF dio como resultado una disminución significativa en todos los subtipos de células CD45⁺CD34⁺ en comparación con el grupo de control (figura 2A).

Las células CD45⁺/CD34⁻ están aumentadas significativamente en la médula ósea después del tratamiento con G-CSF (aumento del 18,9% en comparación con los ratones tratados con solución salina, $p < 0,001$), mientras que todos los subtipos investigados de células CD45⁺/CD34⁻ están disminuidos significativamente (figura 2 B).

15 **Ejemplo 10 (Niveles séricos de citocinas)**

Los niveles séricos de G-CSF analizados mediante ELISA estaban significativamente elevados el día 6 de la estimulación con PTH ($2171,0 \pm 93,6$ pg/ml frente a $6035,5 \pm 1318,4$ pg/ml, $p < 0,05$). El SCF mostró niveles disminuidos significativos el día 6 de la estimulación con PTH ($670,4 \pm 19,1$ pg/ml frente a $594,6 \pm 26,8$ pg/ml, $p < 0,05$). (Figura 3 A+B).

SEGUNDO CONJUNTO DE EXPERIMENTOS (INFARTO DE MIOCARDIO)

25 **Ejemplo 11 (Modelo animal)**

Se indujo infarto de miocardio en ratones C57BL/6 macho de 8-12 semanas de edad mediante oclusión quirúrgica de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) a través de un enfoque anterolateral izquierdo. Se anestesió a los ratones mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina 100 mg/kg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y xilazina 5 mg/kg (Sigma), se intubaron y se les aplicó respiración artificial mediante un respirador de ratones (HUGO SACHS, March, Alemania) con 200 descargas/min y 200 μ l/descarga. El cuidado de los animales y todos los procedimientos experimentales se realizaron en estricta conformidad con las directrices de legislación sobre animales de los Institutos de Salud Alemán y Nacional y se aprobaron por los comités locales de cuidado y utilización de animales.

35 **Ejemplo 12 (Administración de PTH (1-34) y bromodesoxiuridina (BrdU))**

Después de la oclusión de la LAD, se dividieron los ratones en los siguientes grupos 1) administración subcutánea de solución salina diariamente durante 5 días, sacrificados el día 6 ($n=10$) y el día 30 ($n=15$); 2) administración de PTH (1-34) de rata diariamente durante 5 y 14 días consecutivos (80 μ g/kg/d s.c., Bachem), sacrificados el día 6 ($n=9$) y el día 30 ($n=15$); 3) animales operados de manera simulada sacrificados el día 30 ($n=5$), y animales de control no operados que recibieron solución salina ($n=6$) sacrificados el día 6 y el día 30. Todos los animales recibieron BrdU (50 μ g/kg/d) durante 5 días consecutivos. Los tratamientos con BrdU y citocina comenzaron 12-24 horas después de la oclusión de LAD.

45 **Ejemplo 13 (Análisis de citometría de flujo)**

Se trataron ratones C57BL/6 de 8-12 semana de edad ($n = 5$) o bien con PTH (80 μ g/kg/d) o bien con solución salina diariamente durante 5 o 14 días consecutivos. El día 6 y el día 14, se recogió 1 ml de sangre periférica de cada ratón mediante aspiración de la arteria carótida. Para definir el número de leucocitos, se analizaron muestras de sangre heparinizada utilizando un analizador de célula hematológicas convencional (Sysmex XE 2100). Se separaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando disolución de Histopaque disolución (1,077 g/ml, Sigma Chemicals), se purificaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina sérica bovina al 1%. Se incubaron las células durante 40 minutos en la oscuridad a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y peridina-clorofila-proteína (PerCP): CD45-PerCP, CD34-FITC, CD31-PE, Sca-1-PE y c-kit-PE (todos ellos de BD Pharmingen). Anticuerpos de isotipo idéntico (BD Pharmingen) sirvieron como controles. Se analizaron las células mediante citometría de flujo de 3 colores utilizando un citómetro de flujo Coulter® Epics® XL-MCL™ (Beckman Coulter). Cada análisis incluyó 20000 eventos.

60 **Ejemplo 14 (Histología y análisis inmunohistoquímicos)**

El día 6 ($n=10$) y el día 30 ($n=10$) se extirparon los corazones. Después de la fijación en formalina tamponada con fosfato al 4% se cortaron los corazones transversalmente en cortes de 2 mm de grosor y se incluyeron en

parafina. Se cortaron secciones de 4 µm de grosor y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Se realizaron procedimientos histológicos convencionales (hematoxilina/eosina y tinción tricrómica de Masson) e inmunotinción (véase a continuación).

Se determinó el tamaño de infarto como el área de infarto (AI) correlacionada con el área del ventrículo izquierdo (incluyendo el tabique del VI) en cuatro cortes diferentes desde la base hasta la punta del corazón. Se calculó el tamaño de infarto total multiplicando el valor en porcentaje medio del área de infarto circular por el cociente: extensión vertical del área de infarto / extensión ventricular total. Se midió el grosor de pared tomando la longitud promedio de cinco segmentos a lo largo de los radios desde el centro del ventrículo izquierdo a través de los puntos más finos de la pared de VI libre y la pared del tabique. Todos los estudios los realizó un patólogo desconocedor del experimento.

Para la inmunotinción, se desparafinaron cortes de tejido montados aclarando durante 3 x 5 minutos en xileno seguido por 2 x 5 minutos de aclarados con etanol al 100%, 2 x 5 minutos al 96% y 2 x 5 minutos al 70%. Se extinguieron las peroxidases endógenas en H₂O₂ al 7,5% en agua destilada durante 10 minutos. Después de aclarar en agua destilada durante 10 minutos y 2 x 5 minutos en tampón TRIS, pH 7,5, se incubaron los cortes a temperatura ambiente durante 60 minutos con los siguientes anticuerpos primarios: CD45 (anticuerpo de rata anti-ratón, BD Pharmingen), ICAM-1 (anticuerpo de cabra anti-ratón, R&D), CD34 (anticuerpo de rata anti-ratón, Linaris), Ki67 (anticuerpo de cabra anti-ratón, Santa Cruz) o BrdU (anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU, BD Pharmingen). El tratamiento previo se realizó durante 30 minutos (microondas 750 W) utilizando TRS 6 (Dako) para CD45, Glykol (biologo) para CD34, Retrieven A (BD Pharmingen) para BrdU y tampón citrato (10 mM, pH 6,0) para Ki67.

Para la detección de la inmunorreacción se utilizaron avidina-enzima biotinilada Comlex-IgG de rata, avidina-enzima biotinilada Comlex-IgG de cabra (ambos de Vector) o IgG de conejo anti-cabra (DAKO). Se utilizó aminoetilcarbazol como cromógeno (10 minutos de incubación). A continuación, se aclararon los cortes en agua corriente y se contratiñeron con hematoxilina, fórmula de Gill (Vector). Se montaron cubreobjetos con gelatina glicerina de Kaiser. Se realizó tinción doble para CD31 y Ki67 utilizando un sistema de detección de avidina-enzima biotinilada Comlex-IgG de cabra y diaminobencidina como cromógeno y el sistema de rata APAAP y cromógeno rojo (todos de Dako), respectivamente.

Evaluaciones cuantitativas: a) tejido de granulación: se relacionó el número de núcleos positivos para BrdU y Ki76 con el número total de núcleos cuantificados en el tejido de granulación. b) arteriolas: sólo se incluyeron arteriolas con alta actividad proliferativa.

Ejemplo 15 (Parámetros funcionales)

Para la evaluación de las relaciones de presión-volumen *in vivo*, se anestesiaron los ratones supervivientes del grupo 1) IM día 6 (n=6) y día 30 (n=6), 2) IM+PTH día 6 (n=6) y día 30 (n=6), y 3) simulado (n=5) y animales de control (n=6) con tiopental (100 mg/kg, i.p.), se intubaron y se les aplicó respiración artificial (MiniVent, HUGO SACHS, Freiburg, Alemania). Después de la cateterización a través de la arteria carótida derecha, se introdujo un catéter de impedancia-micromanómetro (Millar Instruments, Houston, Texas) en el ventrículo izquierdo. Se corrigieron los volúmenes de conductancia de partida para la conductancia paralela mediante el método de dilución con solución salina hipertónica. Para las mediciones de volumen absolutas, se calibró el catéter con volúmenes conocidos de sangre de ratón tratada con heparina. Se registraron las señales de presión-volumen en el estado estacionario y durante la reducción de precarga transitoria lograda por la oclusión de la vena cava para obtener valores independientes de la poscarga cardíaca⁴⁵. Se realizaron los análisis de los datos tal como se describió anteriormente⁴⁴ utilizando el software de análisis PVAN (HUGO SACHS, March, Alemania).

Ejemplo 16 (Análisis estadísticos)

Los resultados se expresaron como la media ± E.E.M. Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba de la t de Student de datos independientes. Se analizó la mortalidad mediante el método de Kaplan-Meier. Los animales que murieron en el plazo de las primeras 24 horas después de la cirugía o los animales que presentaron infecciones miocárdicas más pequeñas del 10% del VI no se incluyeron en los análisis estadísticos para excluir la influencia de traumatismos perioperatorios. Los datos se consideraron estadísticamente significativos a un valor p≤0,05.

Ejemplo 17 (Movilización de células derivadas de médula ósea mediante tratamiento con PTH(1-34))

Se analizaron muestras de sangre periférica para determinar el número de células madre positivas para CD45. Se encontró un aumento significativo en fracciones de células madre positivas para CD34, CD31, Sca-1 y c-kit 6 días y en una cantidad mayor 14 días después del tratamiento con PTH(1-34): CD45⁺/CD34⁺, 4,4 veces el día 6 y 6,0 veces el día 14; CD45⁺/CD34⁺/CD31⁺, 2,9 veces el día 6 y 3,1 veces el día 14; CD45⁺/CD34⁺/Sca-1⁺, 2,9 veces el día 6 y 2,9 veces el día 14; CD45⁺/CD34⁺/c-kit⁺, 6,1 veces el día 6 y 9,0 veces el día 14 (tabla 1).

Tabla 1: Análisis histológico

Parámetro	Simulado	*		*	
		IM + solución salina, d6	PTH(1-34) + IM, d6	IM + solución salina, d30	PTH(1-34) + IM, d30
Grosor de pared de VI anterior (mm)	0,95 ± 0,01	0,47 ± 0,06	0,61 ± 0,03*	0,13 ± 0,01†	0,28 ± 0,05*†
Grosor de pared de tabique (mm)	1,4 ± 0,17	1,06 ± 0,09	1,05 ± 0,15	0,86 ± 0,06	1,00 ± 0,06
Tamaño de infarto (% de VI)	-	39,8 ± 3,10	37,3 ± 4,90	33,6 ± 2,60†	23,3 ± 4,6*†
Tejido de granulación (% de infarto)	-	84,4 ± 3,30	-	-	-
		†		†	

Análisis histológico de tamaño de infarto (n=10), grosor de pared de VI anterior y de tabique (n=10 así como porcentaje de tejido de granulación dentro del área de infarto (n=6) a los 6 días y a los 30 días tras el IM. IM + solución salina d6 frente a IM + PTH(1-34) d6 y IM + solución salina d30 frente a PTH(1-34) d30, *p< 0,05. IM + solución salina d6 frente a IM + solución salina d30 e IM + G-CSF d6 frente a IM + G-CSF d30, † p < 0,05. Los valores son la media ± E.E.M.

Ejemplo 18 (Supervivencia 4 semanas después del IM)

Cuatro semanas después del infarto de miocardio, los ratones tratados con rPTH (1-34) mostraron un aumento significativo en la tasa de supervivencia en comparación con los animales tratados con solución salina (el 60,0% frente al 40,2%). La mortalidad entre los animales sin tratar fue muy alta en el plazo de los primeros seis días después del infarto de miocardio, mientras que los ratones que sobrevivieron los primeros 6 días después del IM mostraron una mortalidad menor en ambos grupos (figura 4).

Ejemplo 19 (relaciones de presión-volumen medidas en un seguimiento a largo plazo *in vivo*)

Usando catéteres de conductancia se midieron las relaciones de presión-volumen del nivel inicial (animales simulados y de control), ratones tratados con PTH(1-34) así como tratados con solución salina el día 6 y el día 30 después del infarto de miocardio inducido quirúrgicamente *in vivo* (tabla 1, figuras 5, 6). En comparación con el nivel inicial, el tratamiento con PTH de animales operados de manera simulada dio como resultado una reducción significativa en la presión máxima del VI ($90,1 \pm 3,7$ frente a $80,3 \pm 2,1$ mmHg) mientras que los otros parámetros hemodinámicos estuvieron en el mismo intervalo. Los ratones tratados con solución salina así como los animales tratados con PTH que portaban infarto de miocardio mostraron una función sistólica y diastólica disminuidas significativamente el día 6 y el día 30. Sin embargo, el tratamiento con PTH el día 6 dio como resultado una función sistólica mejorada reflejada por una fracción de eyección aumentada (el 30% frente al 15%, figura 7), gasto cardíaco (5537 frente a 3588 $\mu\text{l}/\text{min}$, figura 8) y contractilidad (4742 ± 394 frente a 3392 ± 358 mmHg/s) mejorados. Además, la carga vascular arterial estaba significativamente reducida en los animales tratados con PTH lo que se refleja por una elasticidad arterial disminuida ($E_a: 6,1 \pm 0,5$ frente a $8,9 \pm 0,9$ mmHg/ μl , figura 10). La función diastólica fue similar en ambos grupos sin cambios significativos en Tau glantz.

El día 30, todavía estaba presente mejora hemodinámica en el grupo tratado con PTH: la fracción de eyección (EF: $29,0 \pm 7,1\%$ frente a $14,5 \pm 0,9\%$, $p < 0,001$, figura 7), el gasto cardíaco (3810 ± 205 frente a 2690 ± 329 , figura 8) y el trabajo de ictus (382 ± 59 frente a 258 ± 27 mmHg x μl , $p < 0,05$, figura 9) estaban significativamente mejorados. De manera similar al grupo de 6 días, la elasticidad arterial ($E_a: 7,2 \pm 0,5$ frente a $11,5 \pm 1,6$ mmHg/ μl , figura 10) estaba significativamente reducida 30 días después del tratamiento hormonal. Además, la relajación diastólica tiende a mejorar después del tratamiento con PTH lo que se refleja por una relajación diastólica acelerada (Tau Glantz: $12,0 \pm 0,8$ frente a $14,81 \pm 1,5$ ms). Además, los volúmenes diastólicos finales (EDV: $34,4 \pm 6,1$ frente a $41,3 \pm 3,2$) no estaban significativamente reducidos en los animales tratados con PTH(1-34) (tabla 2).

Tabla 2: Datos hemodinámicos

Parámetro	Nivel inicial (n=10)	Simulado + PTH, d30 (n=10)	*		
			IM + solución salina, d6 (n=6)	PTH(1-34) + IM, d6 (n=6)	PTH(1-34) + IM, d30 (n=6)
HR (ppm)	4,0 ± 4,6	434 ± 17	434 ± 12	479 ± 35	422 ± 13
Pmax (mmHg)	90,1 ± 3,7	80,3 ± 2,1†	52,5 ± 4,0	71,5 ± 3,0	65,0 ± 4,2
EDV (μl)	23,1 ± 2,6	27,8 ± 2,9	56,4 ± 7,2	43,9 ± 7,4	34,4 ± 6,4
Parámetros contráctiles					
EF (%)	61,7 ± 2,8	59,6 ± 2,5	14,5 ± 1,2	30,5 ± 8,0 †	29,5 ± 7,0 †
CO (ml/min)	7919 ± 1018	7319 ± 56,3	3585 ± 568	5536 ± 466 †	38,10 ± 205 †
dP/dl máx. (mmHg/s)	592 ± 427	5306 ± 196	3392 ± 358	4742 ± 394 †	3488 ± 287 *
SW (mmHg x μl)	978 ± 139	1091 ± 56	349,7 ± 60	569 ± 62 †	382 ± 90 †
Parámetros de relajación					
Tau Glantz (ms)	9,8 ± 0,5	9,5 ± 0,4	11,9 ± 0,5	10,3 ± 0,5	12,0 ± 0,8
dP/dl mín. (mmHg/s)	-6093 ± 371	-5884 ± 244	-3577 ± 351	-4838 ± 372 †	-3871 ± 468 †
Elasticidad arterial, Ea (mmHg/μl)	6,1 ± 0,7	5,5 ± 0,4	0,9 ± 0,9	6,0 ± 0,5 †	7,1 ± 0,6 †

Las relaciones de presión-volumen se obtuvieron a partir de los ratones de control y los operados de manera simulada (nivel inicial), a partir de ratones tratados con PTH(1-34) así como tratados con solución salina en el día 6 y en el día 30 después del IM *in vivo* utilizando catéteres de conductancia con punta de Millar. HR: frecuencia cardíaca, Pmax: Presión máxima del VI, EDV: volumen diastólico final, EF: fracción de eyección, CO: gasto cardíaco (HR x volumen de ictus), SW: trabajo de ictus (área encerrada por bucles de presión-volumen PxV), Tau-Glantz: función de regresión de dp/dt frente a la presión, elasticidad arterial; presión sistólica final/volumen de ictus. IM + solución salina d6 frente a IM + solución salina d30 e IM + G-CSF d6 frente a IM + G-CSF d30, * p < 0,05. IM + solución salina d6 frente a IM + PTH(1,34) d6 e IM + solución salina d30 frente a IM + PTH(1-34) d30, †p<0,05. Los valores son la media ± E.E.M.

Ejemplo 20 (Cambios histopatológicos después del tratamiento con PTH(1-34))

El día 30, los ratones con infarto tratados con solución salina revelaron un infarto de miocardio transmural con adelgazamiento de pared pronunciado a lo largo del tiempo y aneurisma apical, mientras que el tratamiento con rPTH(1-34) estaba asociado con una frecuencia menor de aneurismas de VI grandes (figura 6). El tamaño de infarto del VI el día 6 calculado como el área de necrosis y tejido de granulación (el 37,3% $\pm$ el 4,9% frente al 39,8% $\pm$ el 3,1% del área de VI total, $p=ns$, figura 11) no fue significativamente diferente en comparación con el tratamiento con solución salina. Sin embargo, la composición del infarto se alteró con una densidad celular significativamente menor (4383 ± 409 frente a $3317 \pm 171/\text{mm}^2$, $p<0,05$, figura 12) en el tejido de granulación. El día 30 después de la oclusión de la LAD, el tamaño de infarto medido como el área de fibrosis fue significativamente más pequeño en los animales tratados con PTH (el 23,3 $\pm$ el 4,6% frente al 33,6% $\pm$ el 2,6%, $p<0,05$, figura 11). El grosor de pared anterior disminuyó a lo largo del tiempo en ambos grupos, sin embargo, en un grado menor en los ratones tratados con G-CSF (tabla 1 y figura 6). El día 6 y el día 30, la pared anterior en el grupo de animales tratados con rPTH fue más gruesa en comparación con los ratones tratados con solución salina (día 6: 0,58 frente a 0,42 mm, día 30: 0,22 frente a 0,13 mm, figura 13).

Ejemplo 21 (Cambios celulares después del tratamiento con PTH)

Seis días después del infarto de miocardio, el tejido de granulación de los animales tratados con PTH(1-34) así como de los tratados con solución salina reveló una fuerte infiltración de células positivas para CD45, principalmente monocitos y granulocitos. Para evaluar la cantidad de proliferación celular, se midieron las células positivas para BrdU y Ki67 en el tejido de granulación. El número de células positivas para Ki67 y BrdU no fue significativamente diferente entre los animales tratados con PTH y los tratados con solución salina, ya fuera dentro del tejido de granulación (Ki67: el 34,8 $\pm$ el 4,8% frente al 52,5% $\pm$ el 10,4%, $p=ns$; BrdU: el 72,1% $\pm$ el 2,4% frente al 64,8% $\pm$ el 6,8%, $p=ns$) o dentro del área remota (menos del 1%). Sin embargo, el día 30 se encontró una cantidad significativamente más alta de células positivas para BrdU en la región de preinfarto ($99,1 \pm 25,0$ frente a $35,6 \pm 12,5/\text{mm}^2$). Muchas de estas células estaban situadas entre cardiomiocitos. Además, se encontraron altos números de células endoteliales positivas para Ki67 que estaban asociadas con arteriolas positivas para CD31 en los animales tratados con PTH(1-34) en comparación con los animales tratados con solución salina. Estos vasos estaban caracterizados por una capa de células del músculo liso y estaban situados en la zona de límite y en el área del tejido de granulación del infarto.

Investigaciones adicionales sobre arteriolas positivas para Ki67 revelaron una expresión aumentada de ICAM-1, que se asoció con una infiltración pronunciada de células positivas para CD45. Se observó tinción con CD34 en células endoteliales de los capilares y venas y la túnica adventicia de las arterias y en células de estroma adicionales, pero no en células endoteliales de las arteriolas ni en células de infiltración. Además, no hubo ninguna diferencia obvia en la fuerza de la tinción ni en los tipos celulares que se tenían de manera positiva para CD34 entre los ratones tratados con G-CSF y los tratados con solución salina (datos no mostrados).

Ejemplo 22 (Mejora de la función cardíaca después del infarto de miocardio aumentando la capacidad de direccionamiento a través de la inhibición de DPP-IV)

Se demostró que el trasplante o la movilización de las células madre procedentes de médula ósea da como resultado la función cardíaca y supervivencia mejoradas después de infarto de miocardio en animales. Probablemente, estos efectos se deben más al potencial paracrino de las células madre que a la transdiferenciación real. Sin embargo, los resultados de estudios clínicos de la terapia con células madre son ambivalentes: Algunos mostraron mejora de la función cardíaca y otros fueron negativos. Teniendo en cuenta los resultados sorprendentes de estudios con animales, el enfoque prometedor de la terapia con células madre después de infarto de miocardio necesita obviamente modificaciones y alternativas para su utilización clínica. Se cree que una cuestión importante que es necesario abordar definitivamente es la complejidad del direccionamiento de las células madre. Este proceso funciona principalmente a través de la interacción de SDF-1 del miocardio con su receptor CXCR-4 que se expresa en células madre. Una regulación por incremento de SDF-1 de miocárdico mejoraría considerablemente el direccionamiento de las células madre. Por tanto, las estrategias innovadoras tienen que concentrarse en aumentar la expresión de SDF-1 en el miocardio (tal como se pretende en la presente solicitud):

Se ha analizado el efecto de la administración del inhibidor de DPP-IV diprotina A después del infarto de miocardio en un modelo de ratón. La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV o CD26) degrada SDF-1 y puede inhibirse por diprotina A. Ya se han aprobado inhibidores de DPP-IV como vildagliptina o sitagliptina para su utilización clínica en diabetes mellitus.

En los estudios realizados pudo demostrarse que la fracción de eyección ventricular izquierda se reduce 6 días después del infarto de miocardio agudo ("IMA") en comparación con un grupo de control ("simulado", cada uno $n=6$; el 24 $\pm$ 5% frente al 67 $\pm$ 7%, $p<0,05$). Se indujo infarto de miocardio en ratones mediante un modelo establecido de ligación de LAD y se evaluó la función cardíaca mediante análisis de punta de Millar basado en

catéter. En un tercer grupo ("IMA+diprA") se aplicó diprotina A (5 μ mol i.p.) dos veces al día durante 5 días después del infarto de miocardio. En este grupo, la fracción de eyección fue significativamente mayor en comparación con el grupo de IMA" sin inhibición de DPP-IV (el 49 $\pm$ 6% frente al 24 $\pm$ 6%, $p < 0,05$).

- 5 Los datos muestran (véase la figura 14) que la inhibición de DPP-IV a través de diprotina A conduce a una función cardíaca significativamente mejorada después del infarto de miocardio en un modelo de ratón. Ya se han aprobado inhibidores de DPP-IV como vildagliptina o sitagliptina para su utilización clínica en diabetes mellitus.

Lista de secuencias

10

Las secuencias muestran:

SEQ ID NO: 1 (PTH humana de longitud completa)

15

mipakdmakv mivmlaicfl tksdgksvkk rsvseiqlmh nlghlnsme rvewlrkkklq
dvhnfvalga plaprdagsq rprkkednvl veshekslge adkadvnvlt kaksq

SEQ ID NO: 2 (PTH humana (1-84))

20

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

SEQ ID NO: 3 (PTH humana (1-34))

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe

25

SEQ ID NO: 4 (PTHrP humana (1-139))

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
20 25 30

Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro
35 40 45

Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu
50 55 60

Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu
65 70 75 80

Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly Lys Pro Gly Lys
85 90 95

Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp Leu
100 105 110

Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp His Leu Ser Asp
115 120 125

Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg
130 135

ES 2 654 251 T3

SEQ ID NO: 5 (PTHrP humana (1-141))

```

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1           5           10           15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
      20           25           30

Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro
      35           40           45

Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu
      50           55           60

Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Gln Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu
      65           70           75           80

Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly Lys Pro Gly Lys
      85           90           95

Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp Leu
      100          105          110

Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp His Leu Ser Asp
      115          120          125

Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg His
      130          135          140

```

5 SEQ ID NO: 6 (PTHrP humana (1-173))

Ala	Val	Ser	Glu	His	Gln	Leu	Leu	His	Asp	Lys	Gly	Lys	Ser	Ile	Gln	1	5	10	15
Asp	Leu	Arg	Arg	Arg	Phe	Phe	Leu	His	His	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	His	20	25	30	
Thr	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Pro	Asn	Ser	Lys	Pro	35	40	45	
Ser	Pro	Asn	Thr	Lys	Asn	His	Pro	Val	Arg	Phe	Gly	Ser	Asp	Asp	Glu	50	55	60	
Gly	Arg	Tyr	Leu	Thr	Gln	Glu	Thr	Asn	Lys	Val	Glu	Thr	Tyr	Lys	Glu	65	70	75	80
Gln	Pro	Leu	Lys	Thr	Pro	Gly	Lys	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Pro	Gly	Lys	85	90	95	
Arg	Lys	Glu	Gln	Glu	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Thr	Arg	Ser	Ala	Trp	Leu	100	105	110	
Asp	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Asp	His	Leu	Ser	Asp	115	120	125	
Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Leu	Glu	Leu	Asp	Ser	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Trp	130	135	140	
Gly	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Glu	Asn	Asn	Arg	Arg	Thr	His	His	Met	Gln	145	150	155	160
Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu				165	170		

SEQ ID NO: 7 (PTHrP humana (1-34))

Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-Leu-His-His-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-His-Thr-Ala

5

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende hormona paratiroidea (PTH) o fragmentos de PTH que presentan 84-n aminoácidos, en la que n es un número entero comprendido entre 1 y 56, y en la que los fragmentos contienen los primeros 28 residuos de aminoácido N-terminales, para su utilización en el tratamiento de cardiopatías isquémicas.
2. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define anteriormente para su utilización según la reivindicación 1, en la que el fragmento se selecciona de entre los grupos de PTH(1-28), PTH(1-31), PTH(1-34), PTH(1-37), PTH(1-38) y PTH(1-41).
3. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en la reivindicación 1 o 2 para su utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha cardiopatía isquémica se selecciona de entre el grupo de isquemia asintomática, angina estable o inestable, e isquemia miocárdica.
4. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en la reivindicación 1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su utilización en el tratamiento del infarto de miocardio.
5. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en la reivindicación 1 o 2, para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para reclutar células madre en un tejido que padece isquemia y/o apoptosis, en la que dichas células madre se seleccionan de entre el grupo que consiste en células CD34(+)/CD45(+) y CD34(-)/CD45(+), cada una en combinación con las subpoblaciones CD31(+), Sca-1(+) o C-kit(+), células progenitoras adultas multipotentes (MAPC), células progenitoras endoteliales (EPC) caracterizadas por CD34(+), CD45(+), CD31(+), células de población lateral (SP) y células madre de linaje negativo, lin(-), c- kit(+).
6. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición farmacéutica se administra por lo menos una vez al día durante por lo menos un día.
7. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.
8. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las cardiopatías isquémicas son isquemia miocárdica provocada por insuficiencia cardíaca, hipertensión, arteriopatía coronaria (AC), infarto de miocardio, acontecimientos tromboembólicos, traumatismo, medidas quirúrgicas y/o intervencionistas.
9. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según la reivindicación 8, en la que dicho procedimiento quirúrgico o intervencionista es un procedimiento para recuperar el flujo sanguíneo seleccionado de entre el grupo que consiste en trombólisis, angioplastia de balón, colocación de endoprótesis, revascularización quirúrgica coronaria o periférica y colocación de endoprótesis ventriculocoronaria.
10. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición farmacéutica va a administrarse en combinación con G-CSF o un fragmento de G-CSF.
11. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho fragmento de PTH es PTH 1-34.
12. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición farmacéutica además comprende un antagonista de DPP-IV.
13. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha cardiopatía isquémica es una isquemia miocárdica provocada por un infarto de miocardio.
14. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH tal como se define en las reivindicaciones 1 o 2, G-CSF o fragmentos de G-CSF y un antagonista de DPP-IV para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

- 5 15. Composición farmacéutica que comprende PTH o fragmentos de PTH según la reivindicación 12 o 13 o composición farmacéutica según la reivindicación 14, en la que dicho antagonista de DPP-IV se selecciona de entre el grupo que consiste en diprotina A, vildagliptina y sitagliptina para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

Figura 1

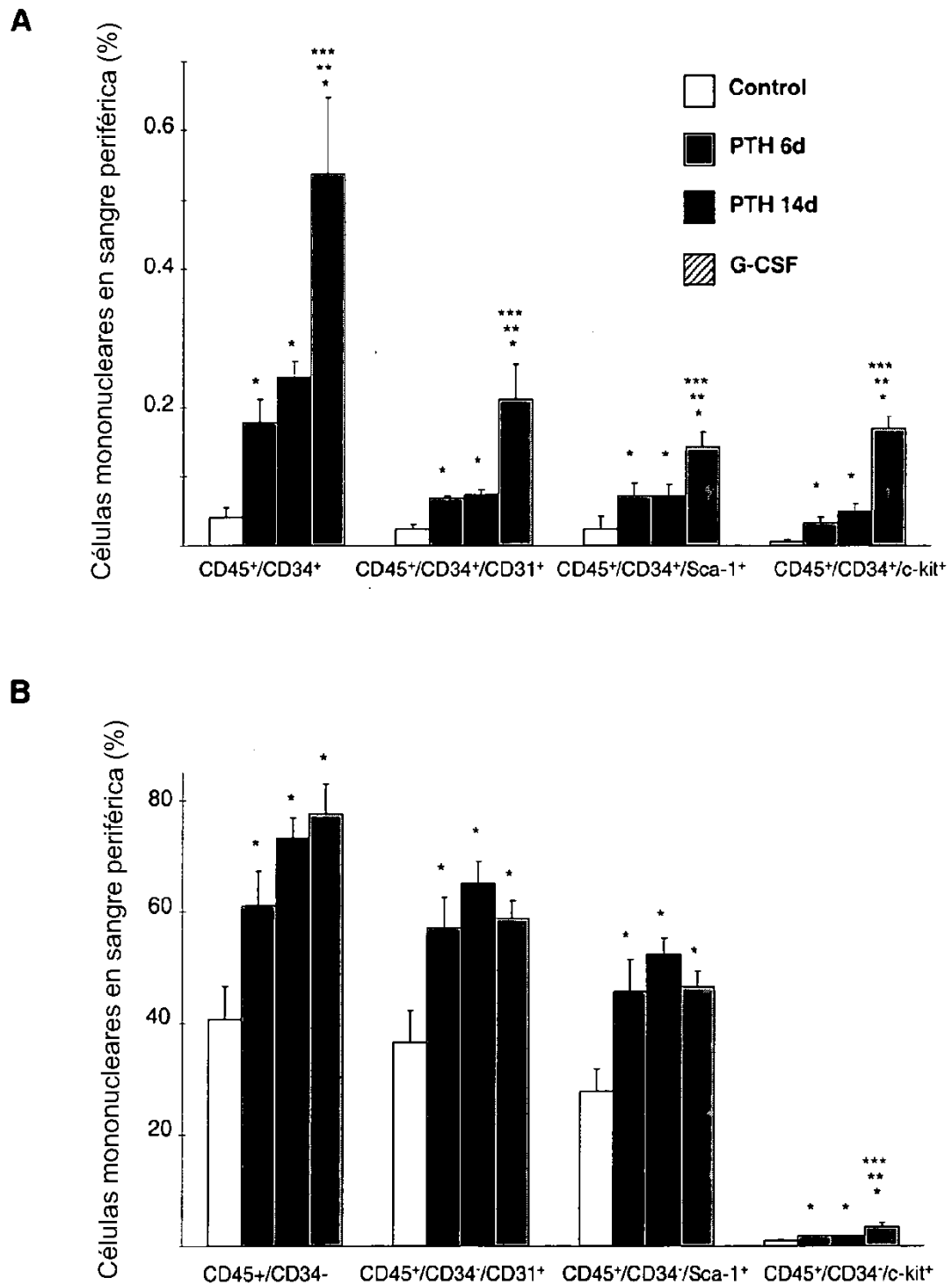
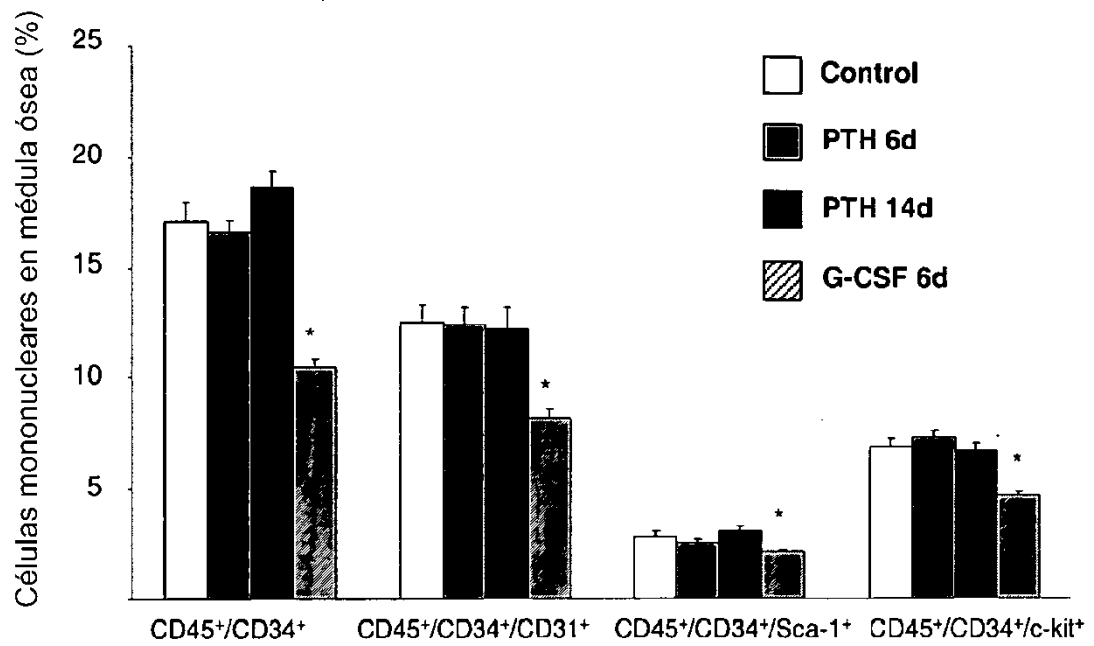


Figura 2

A



B

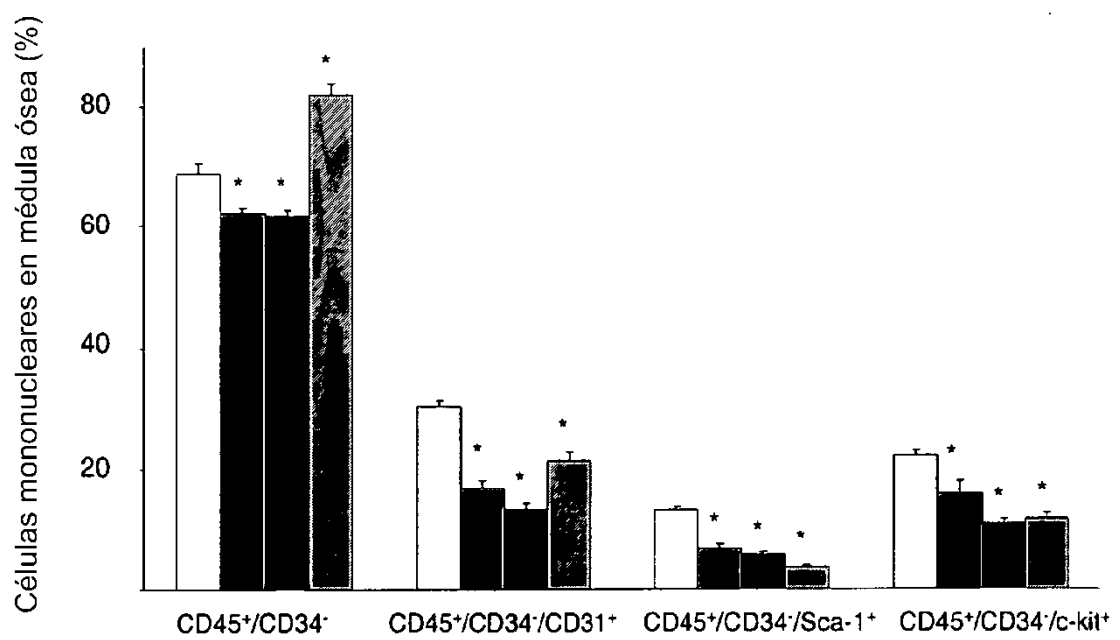
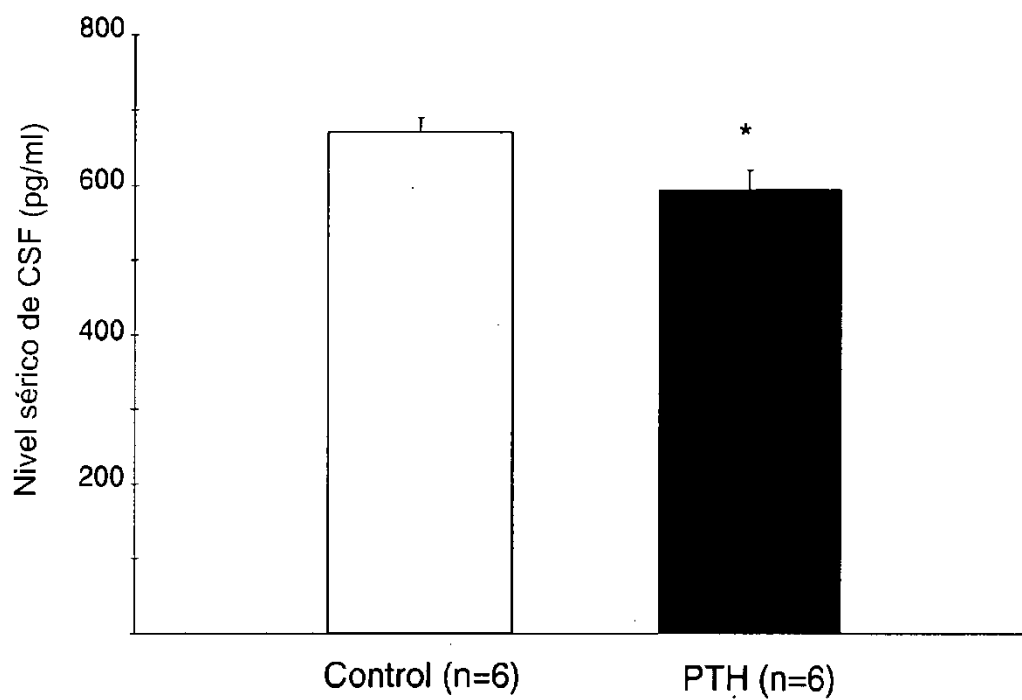
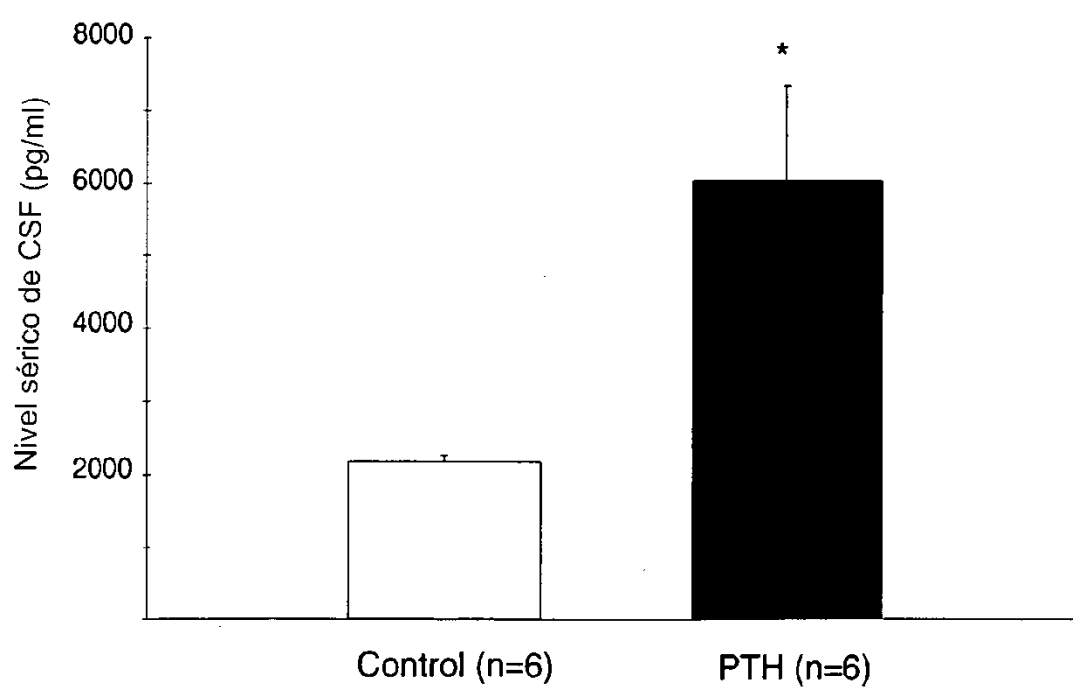


Figura 3

A



B



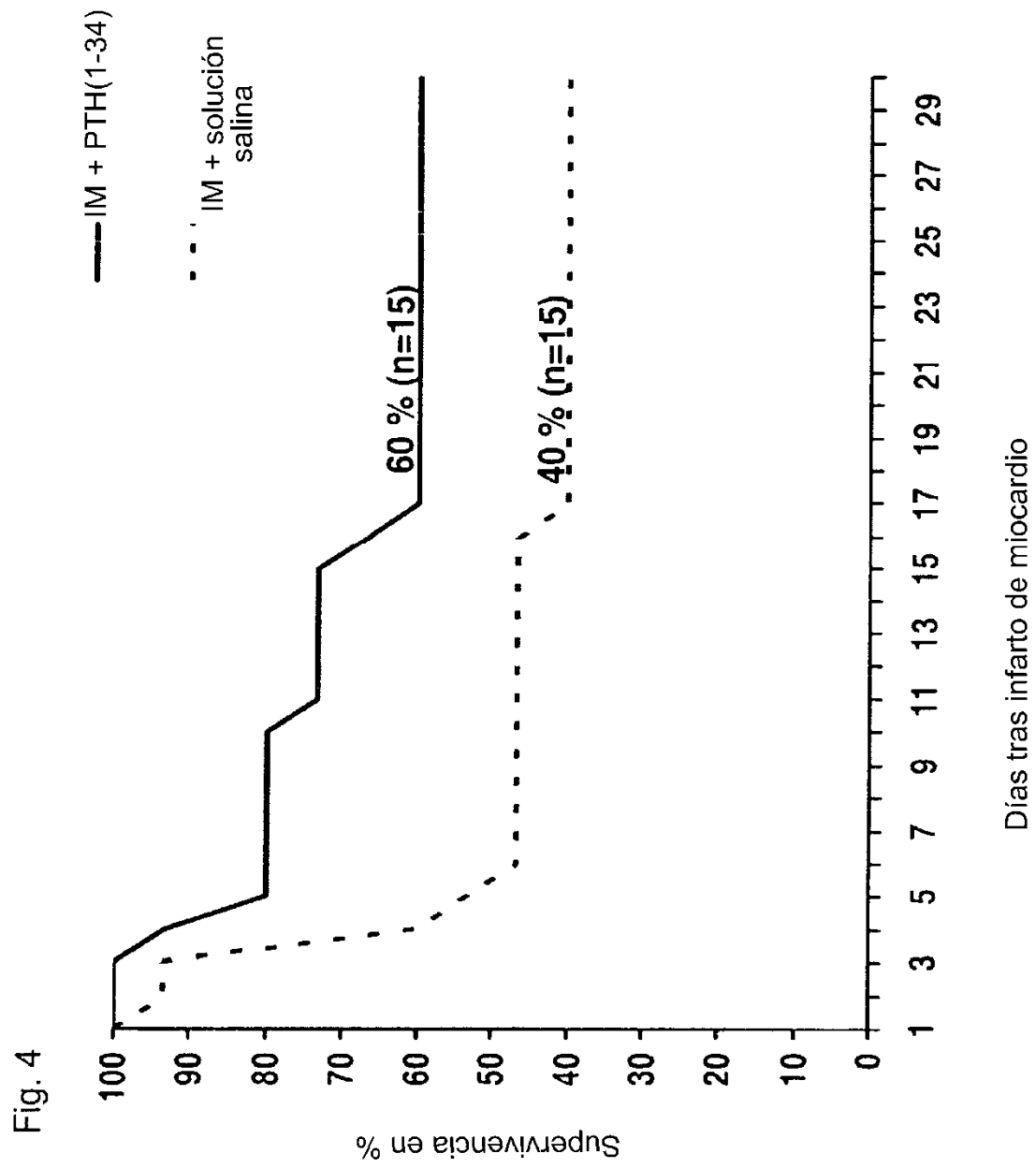


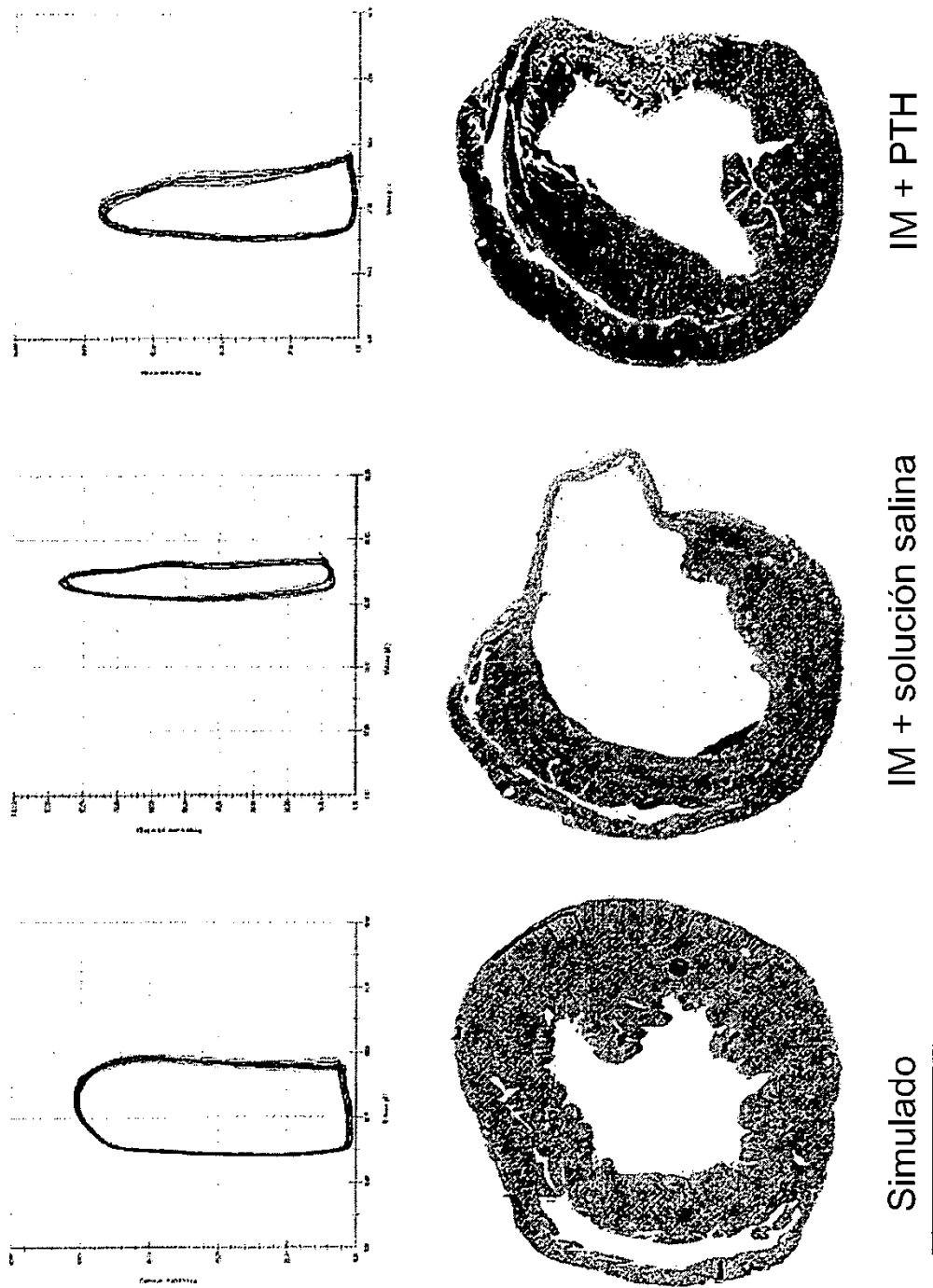
Fig. 5

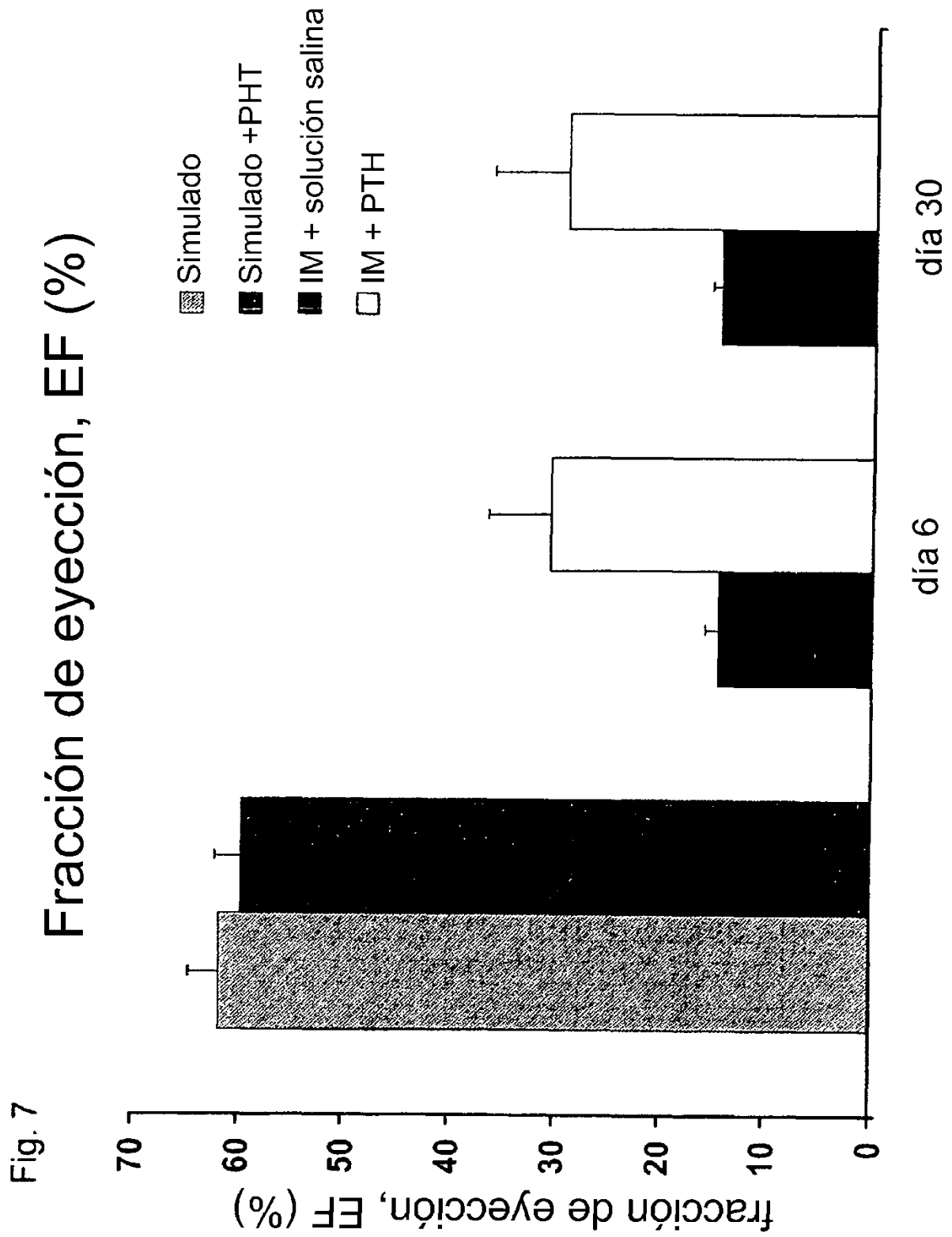
Datos hemodinámicos en el día 6

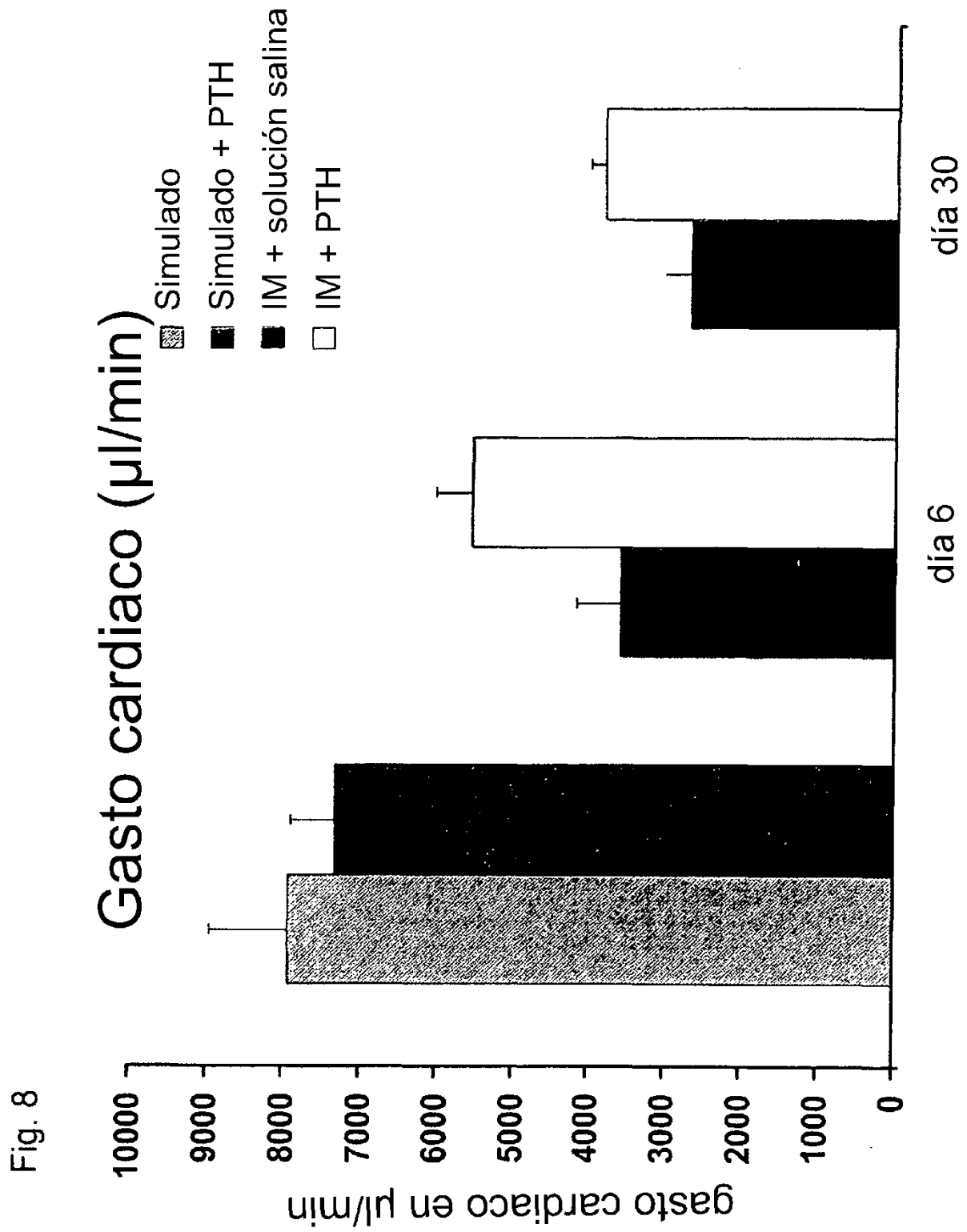


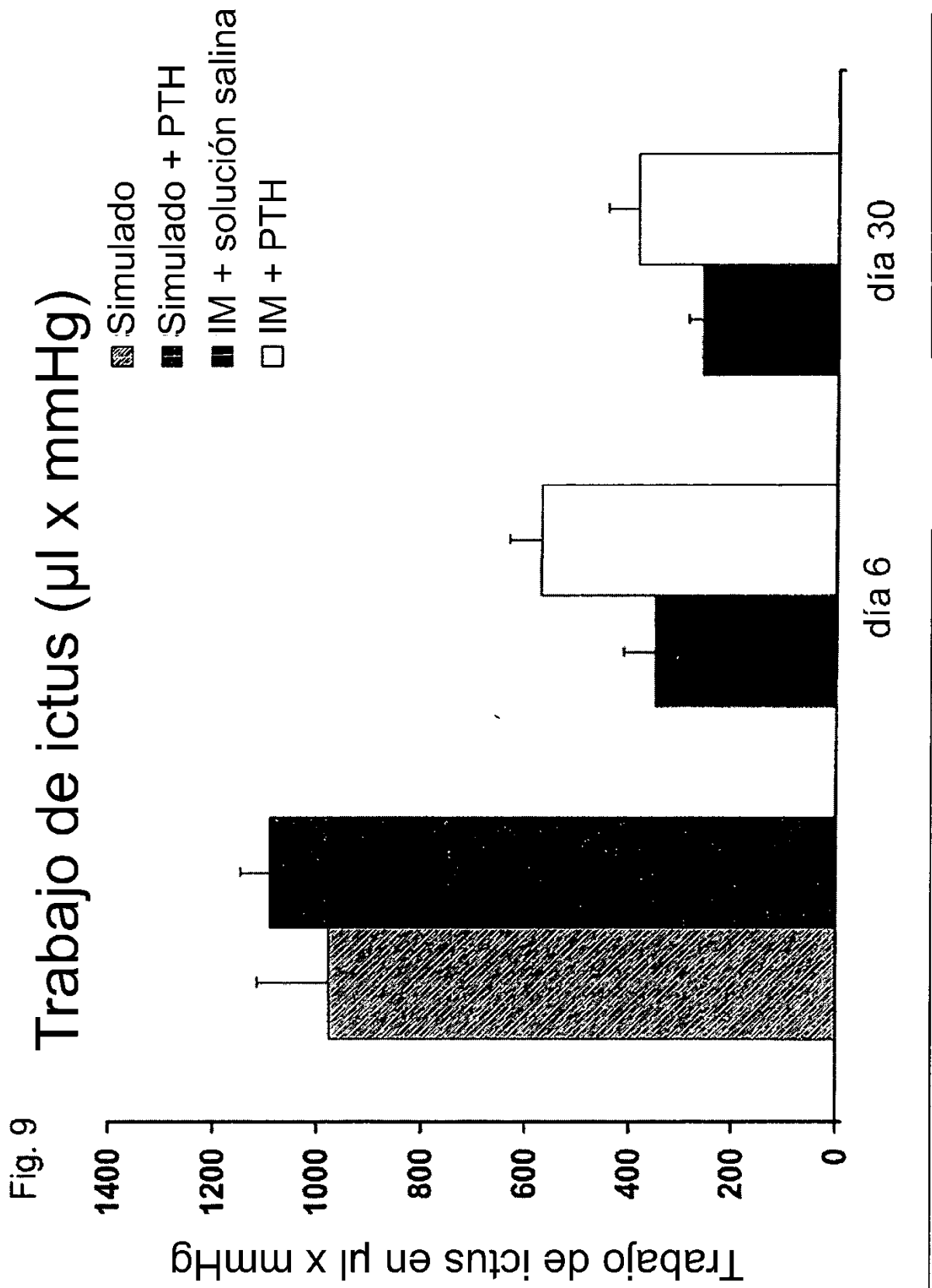
Fig. 6

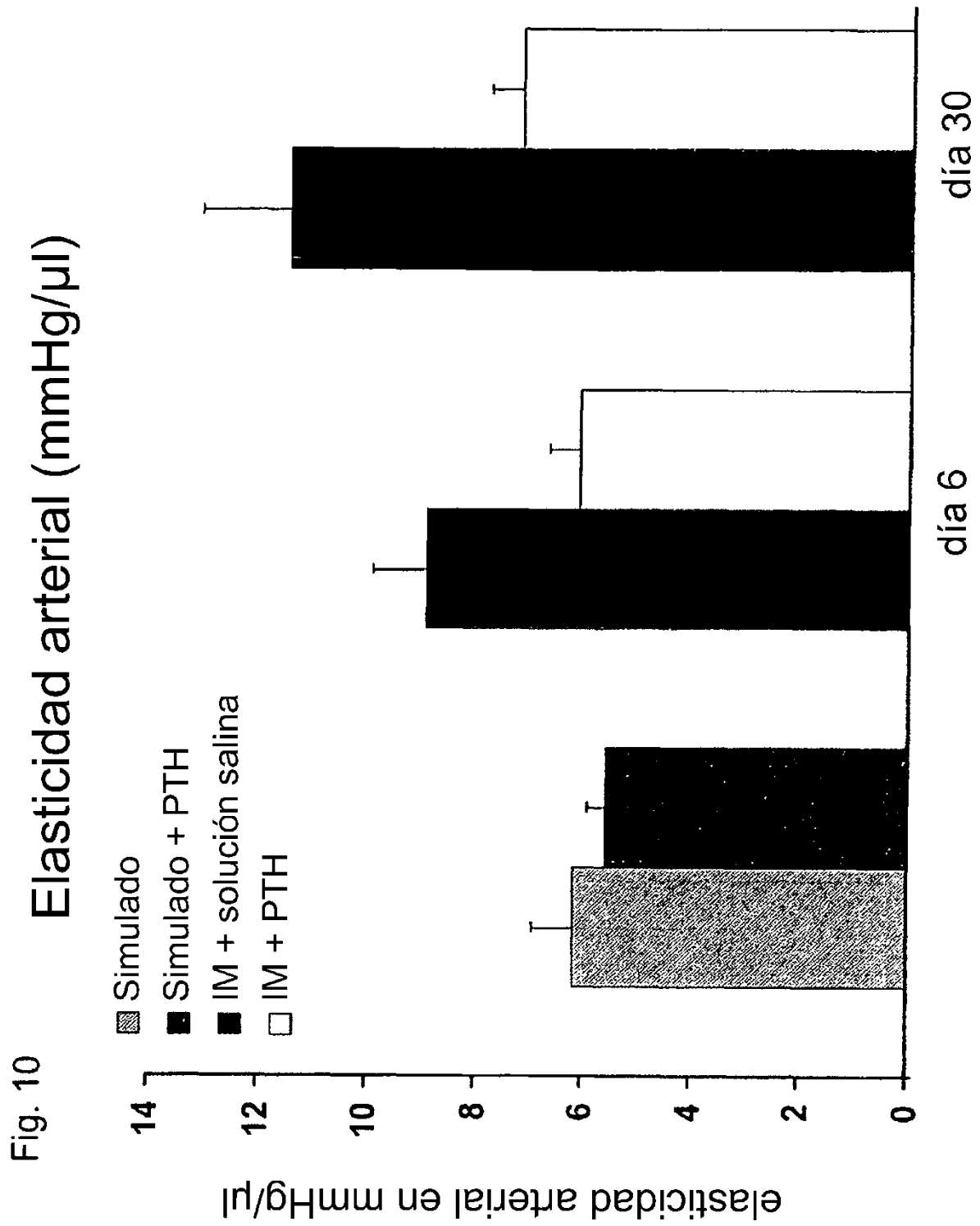
Datos hemodinámicos en el día 30











Tamaño de infarto

Fig. 11

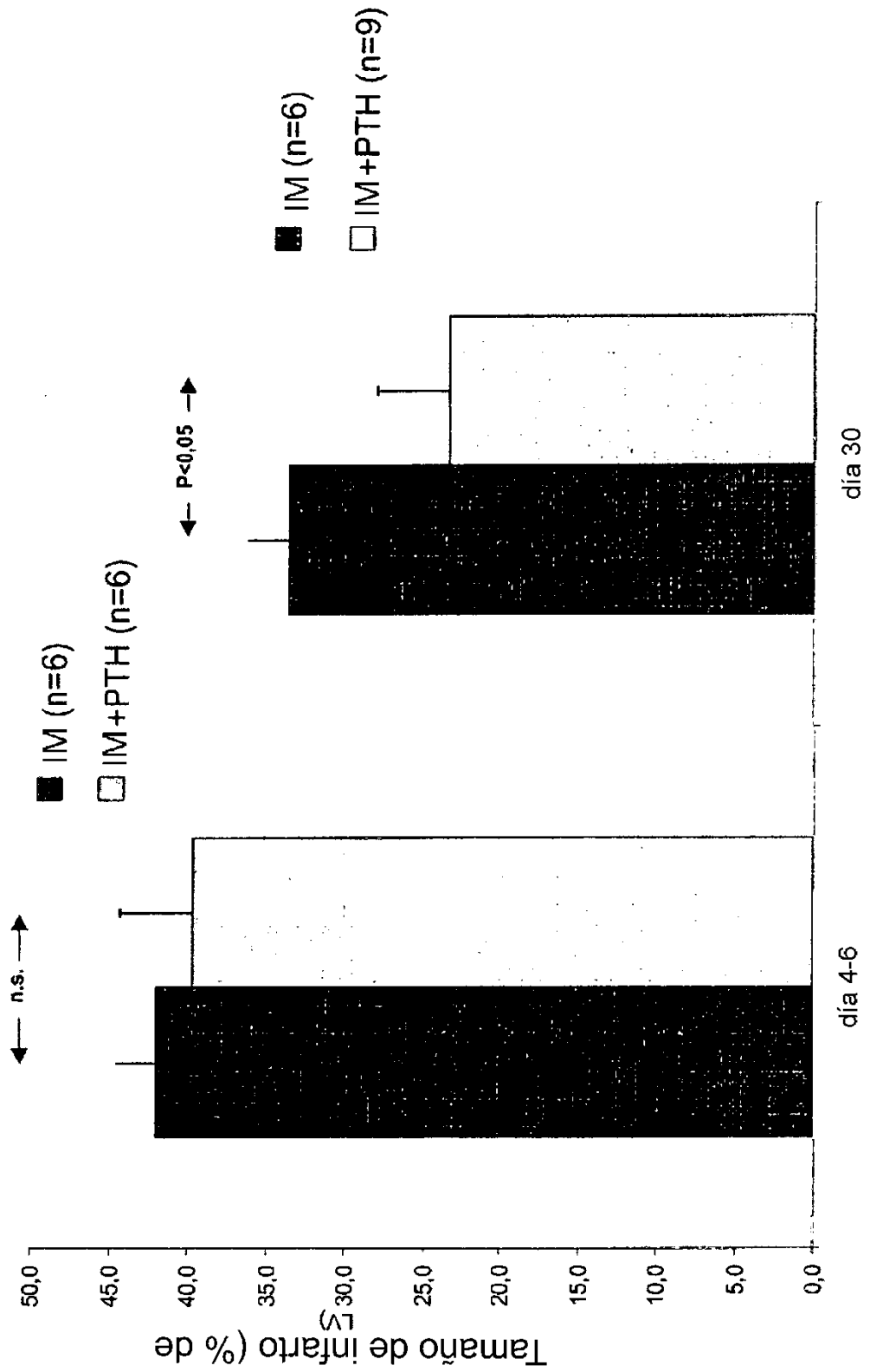


Fig. 12

Número de células en el área de infarto/mm²

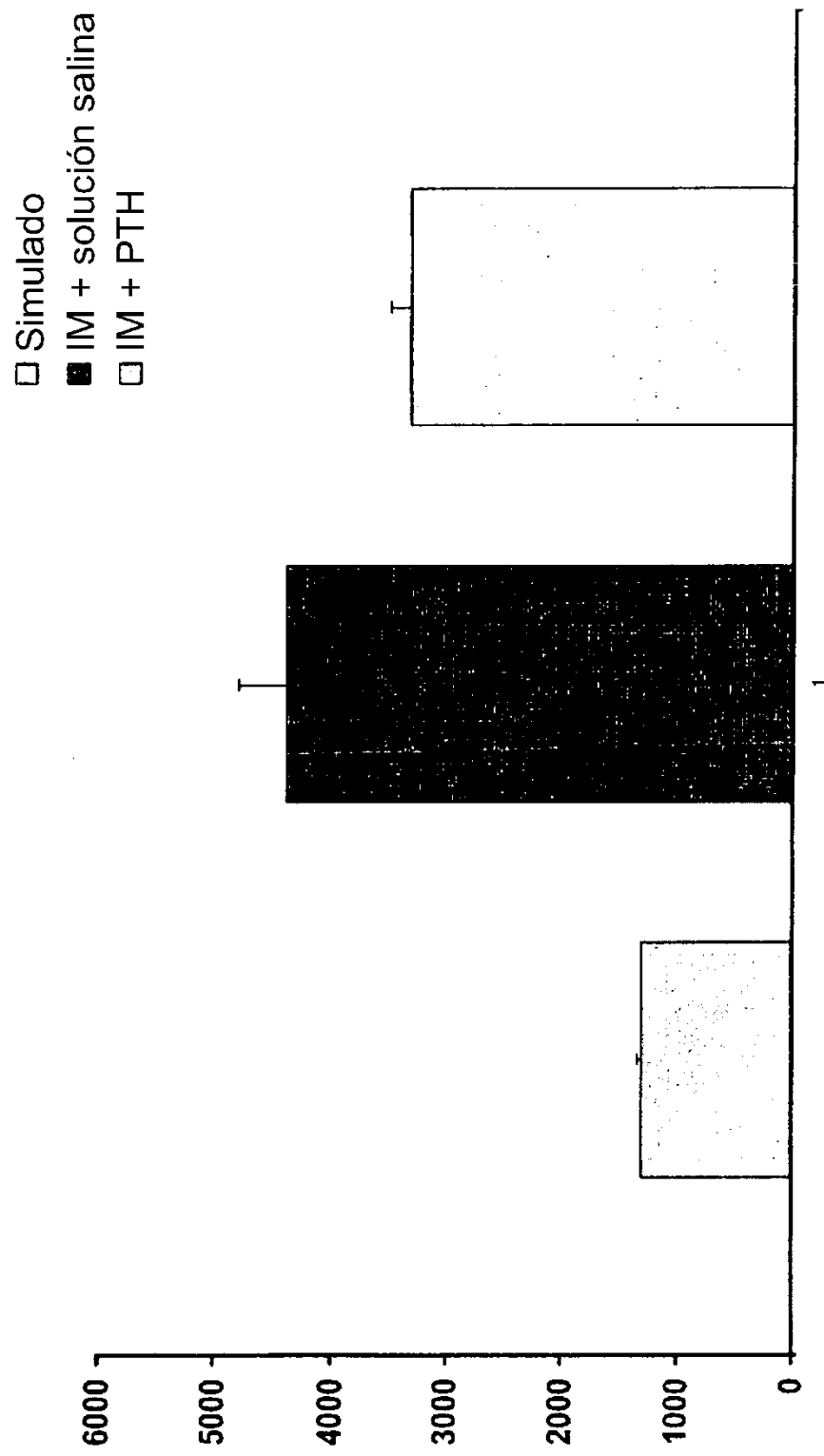


Fig. 13 Grosor de pared (pared anterior de VI)

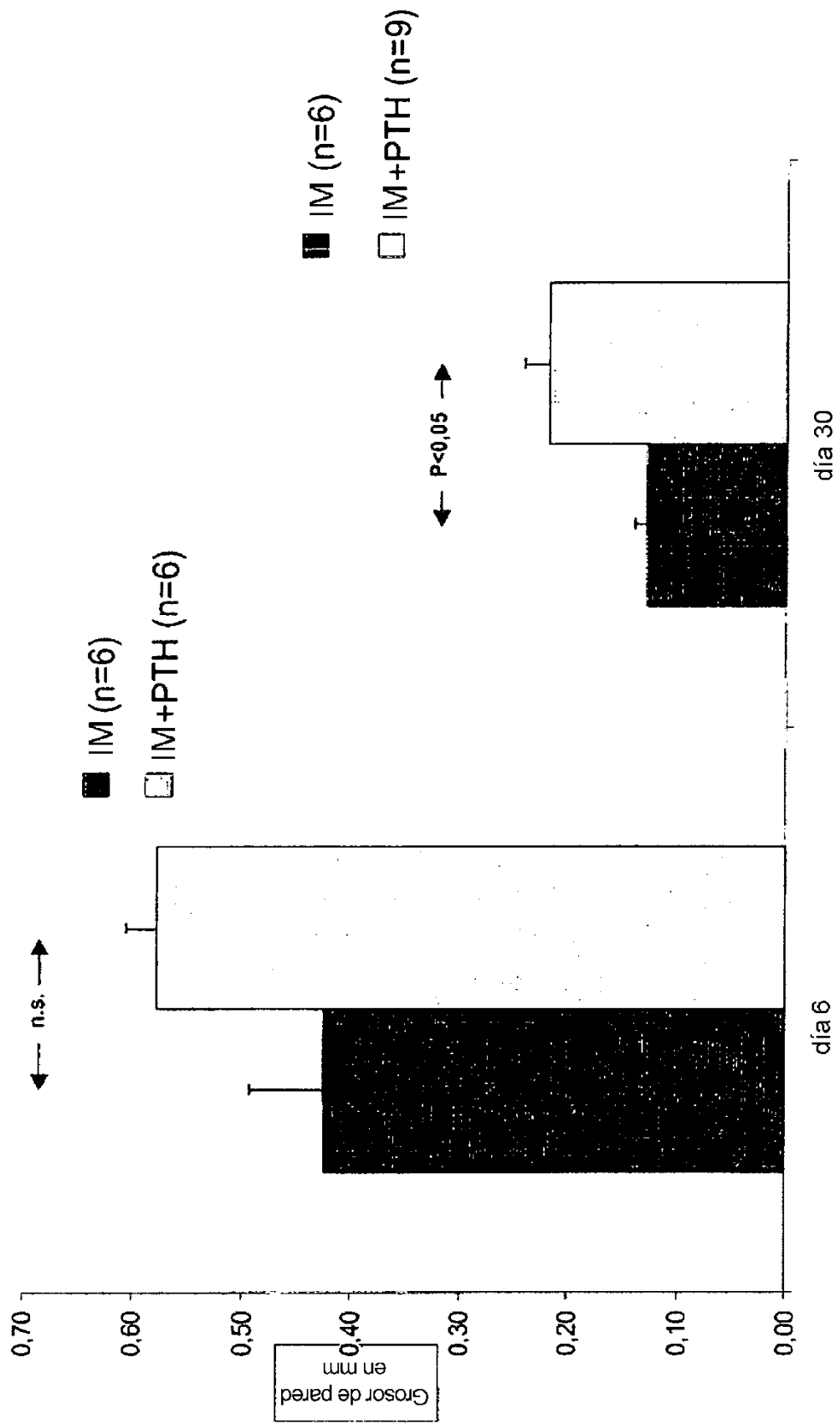


Fig. 14

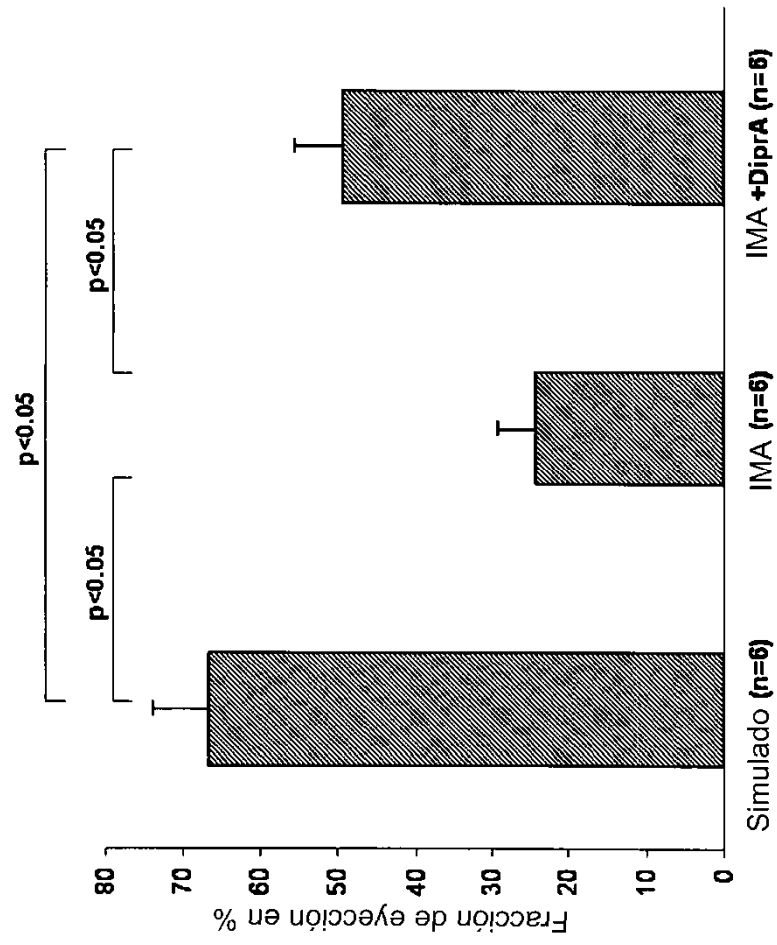
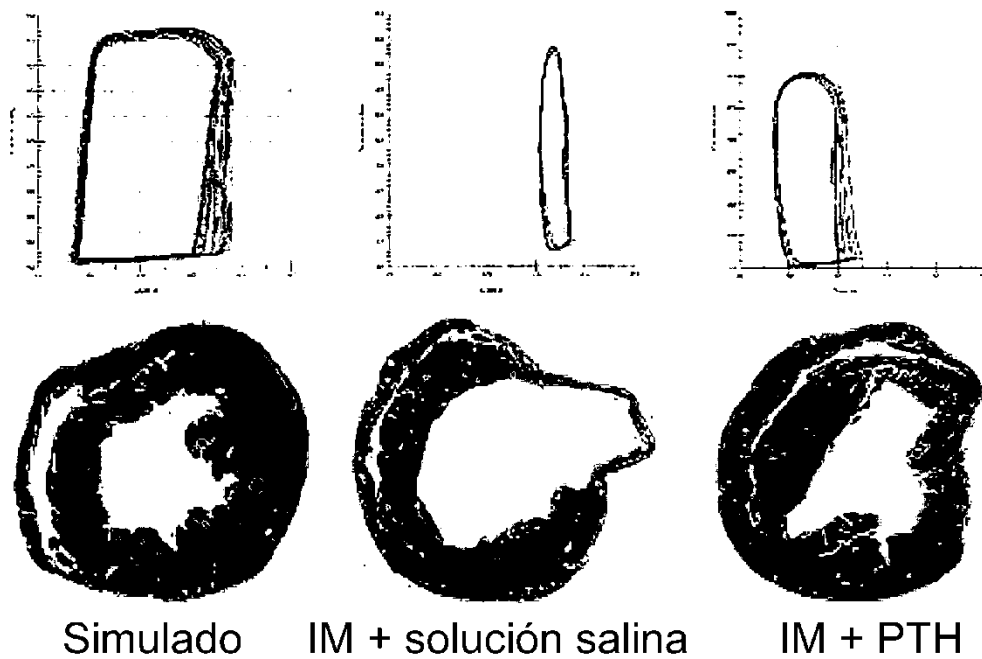


Figura 15

A Bucles de presión-volumen



B

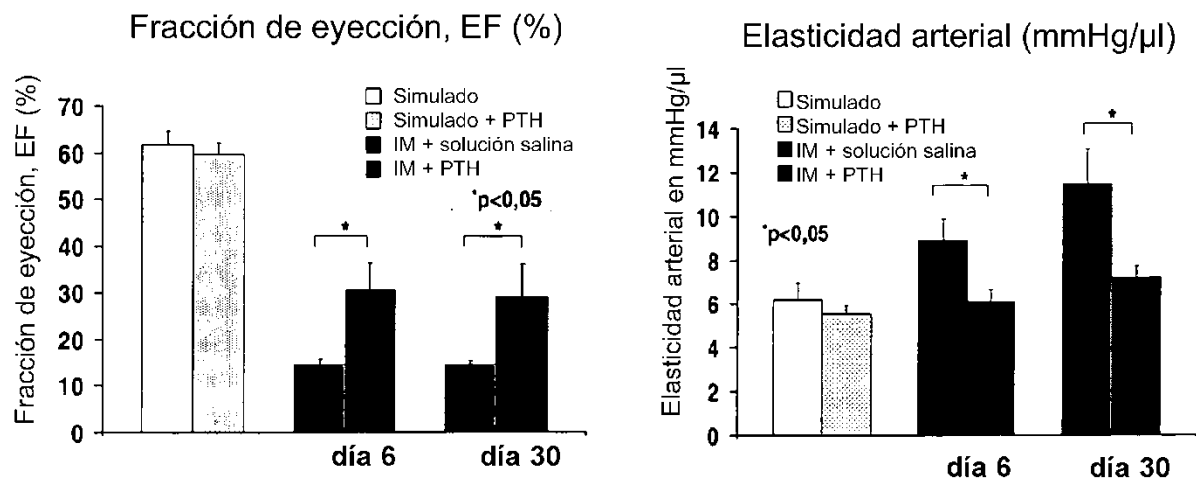
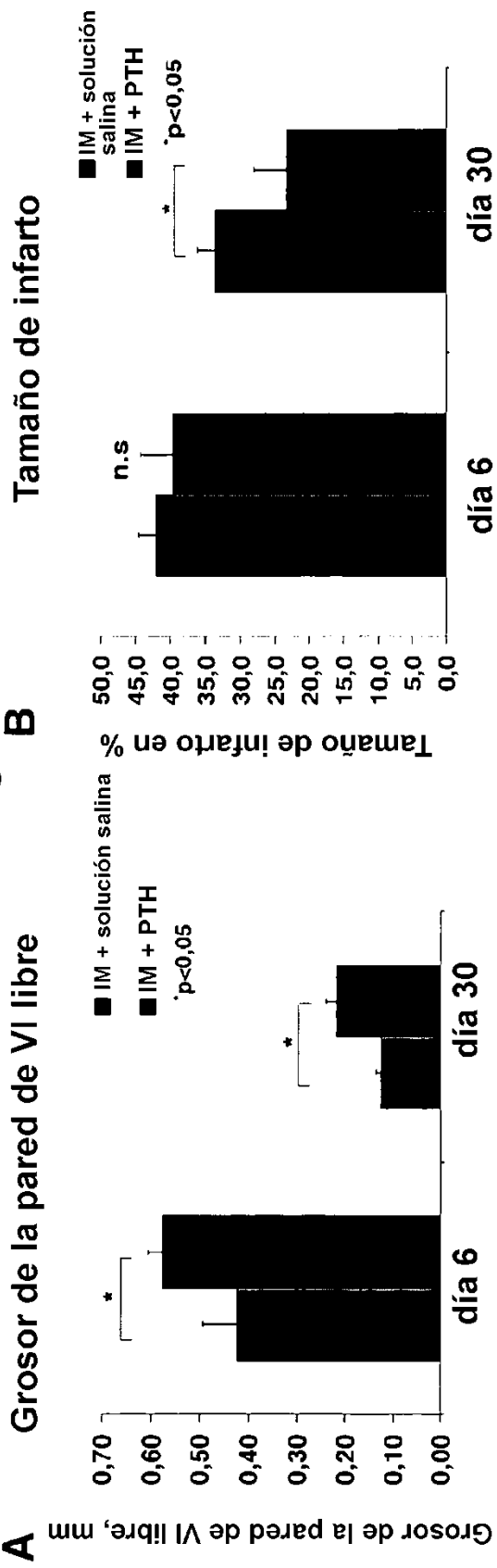


Figura 16



IM + solución salina

IM + PTH

día 6

día 30

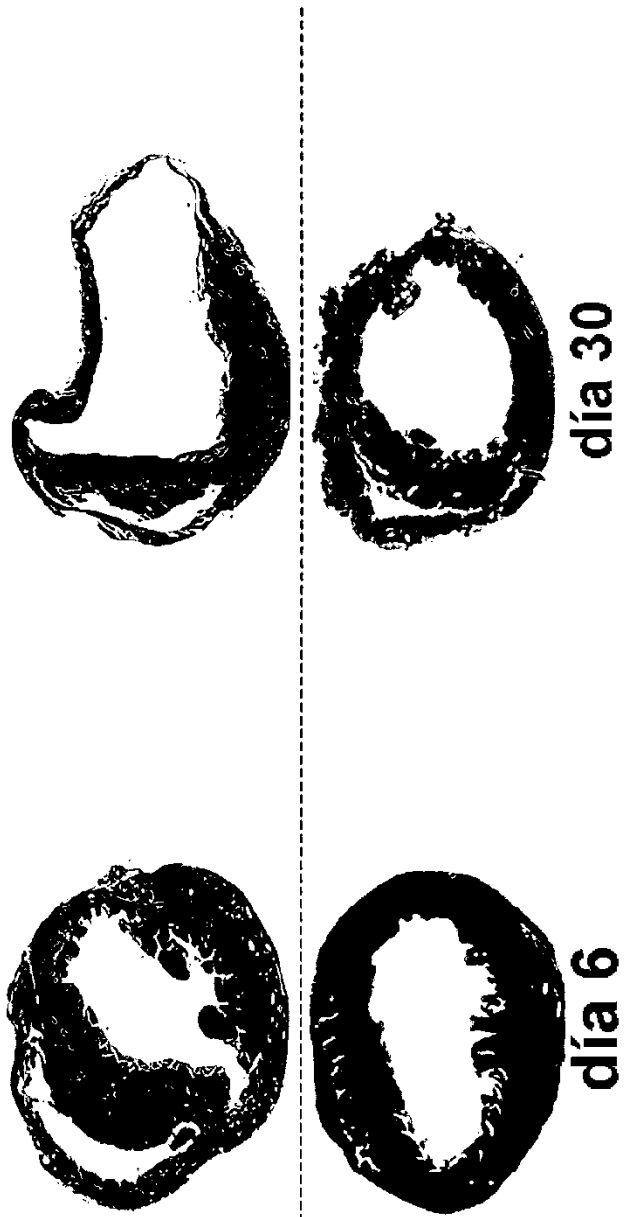
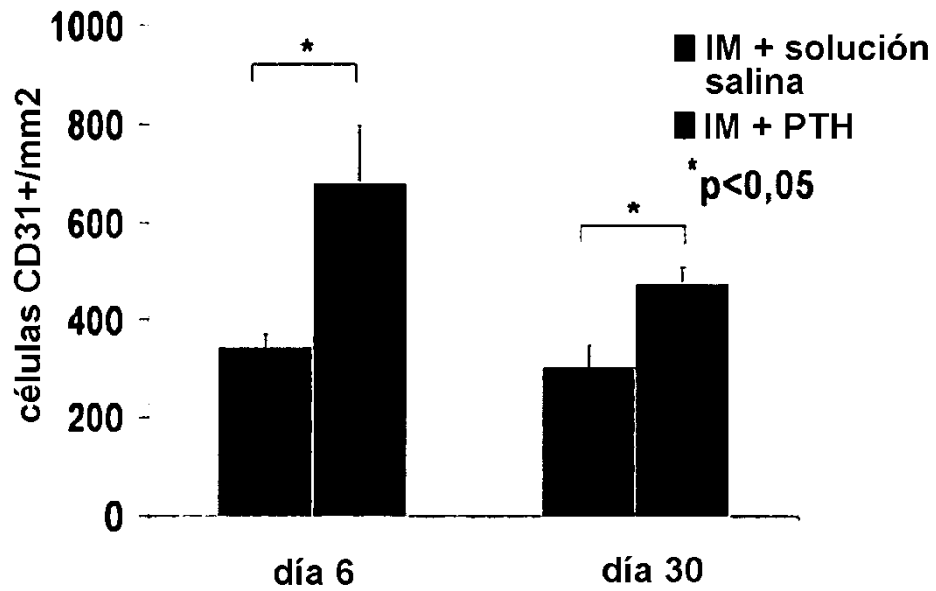


Figura 17

A

Vasos CD31⁺ en la zona de límite de infarto



B

capilares CD31⁺

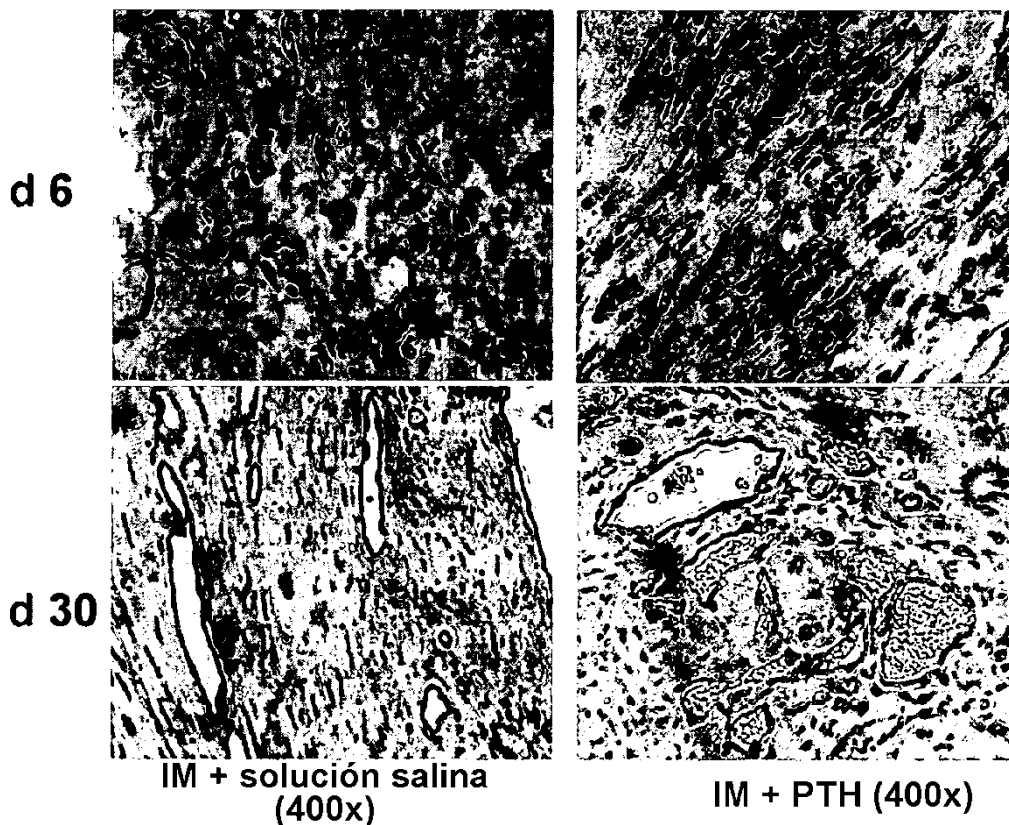


Figura 18

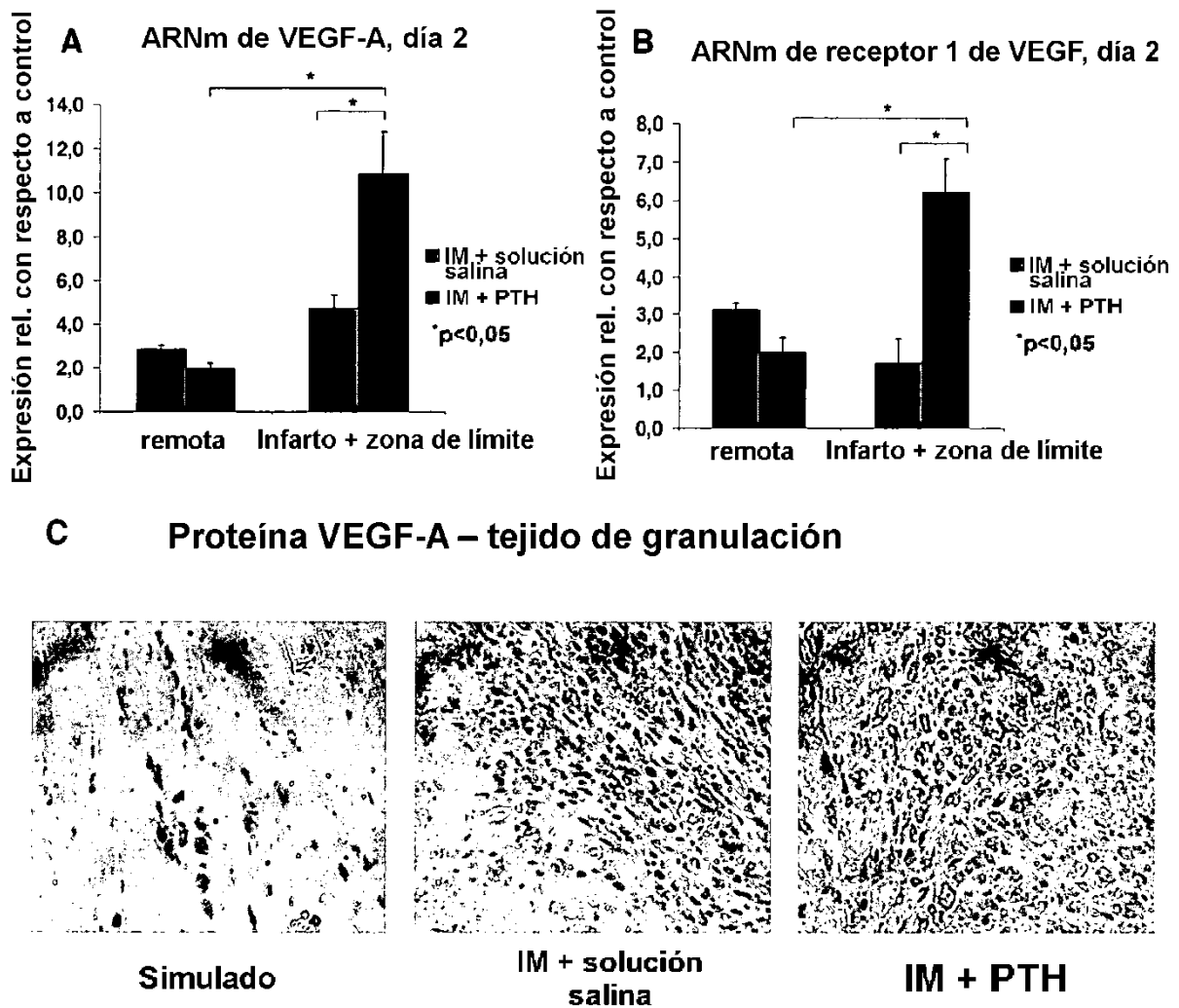


Figura 19

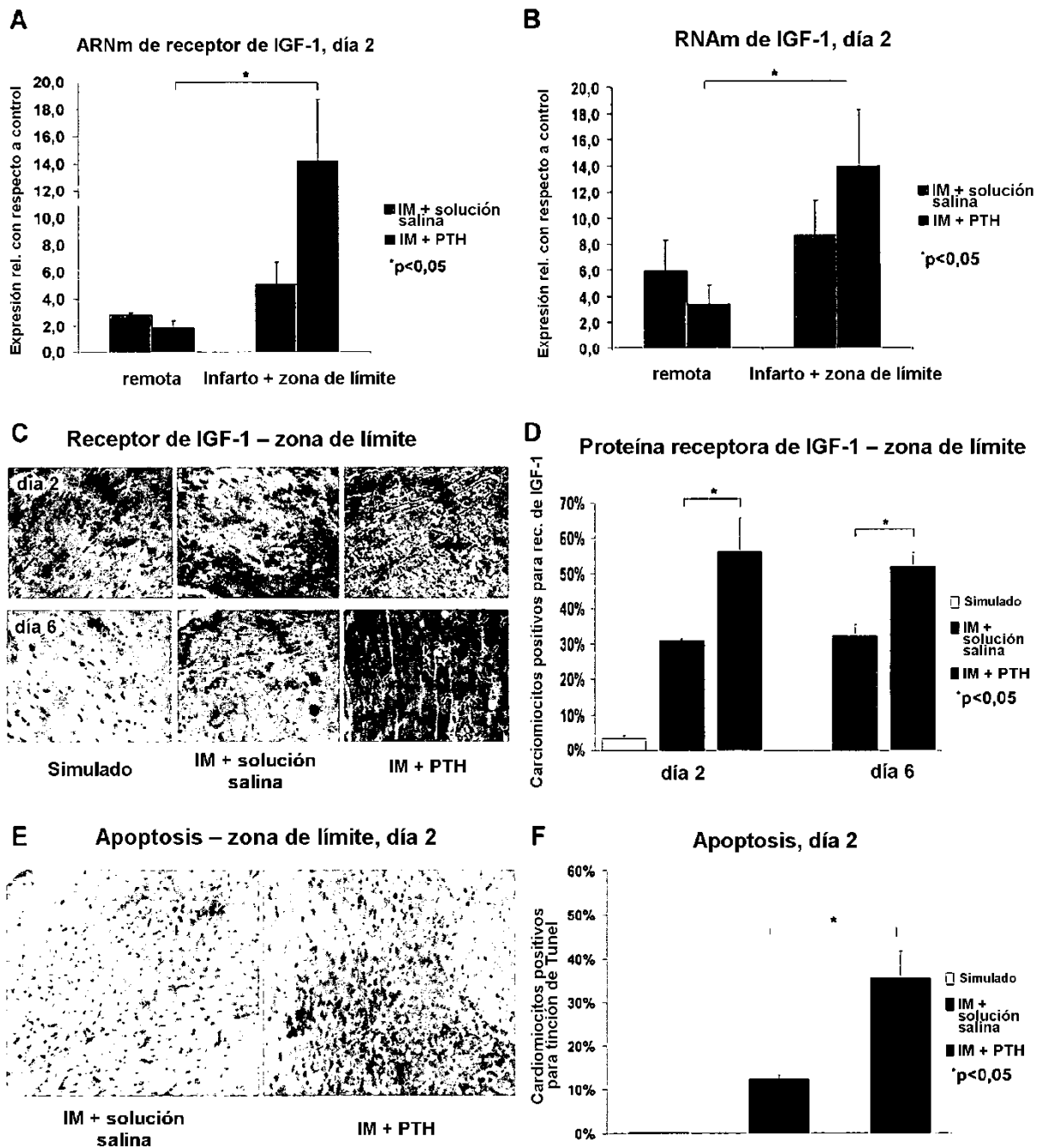
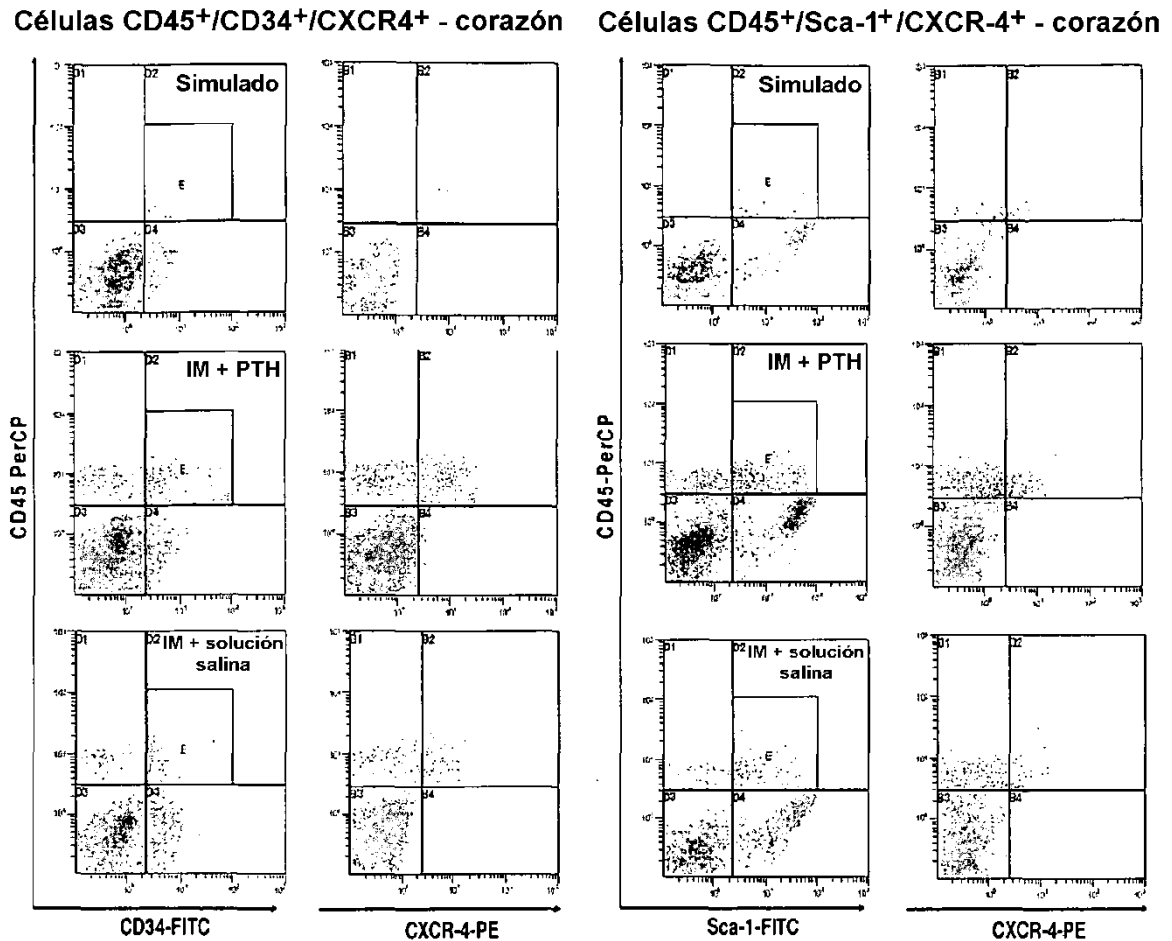


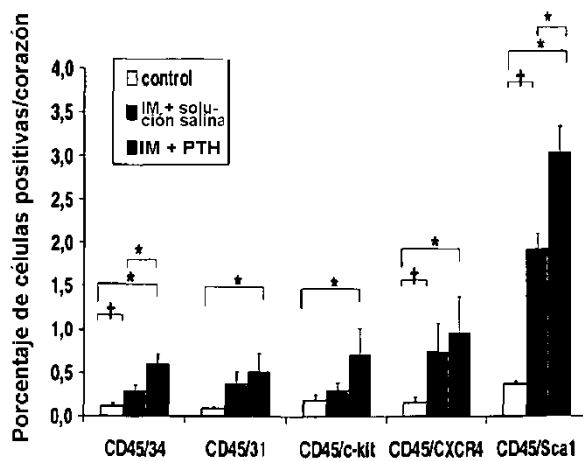
Figura 20

A



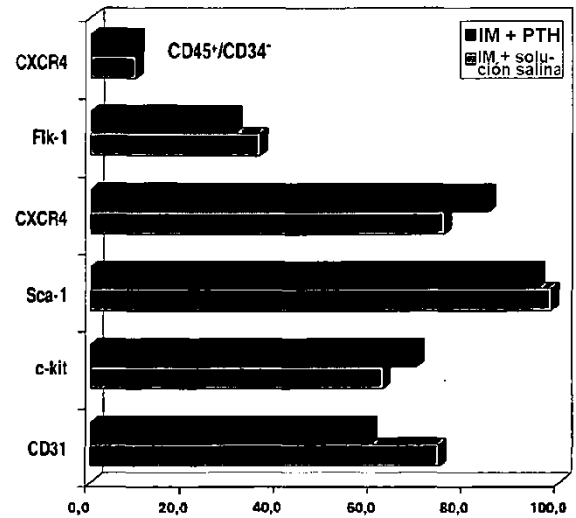
B

Migración celular de células positivas para CD45 al corazón

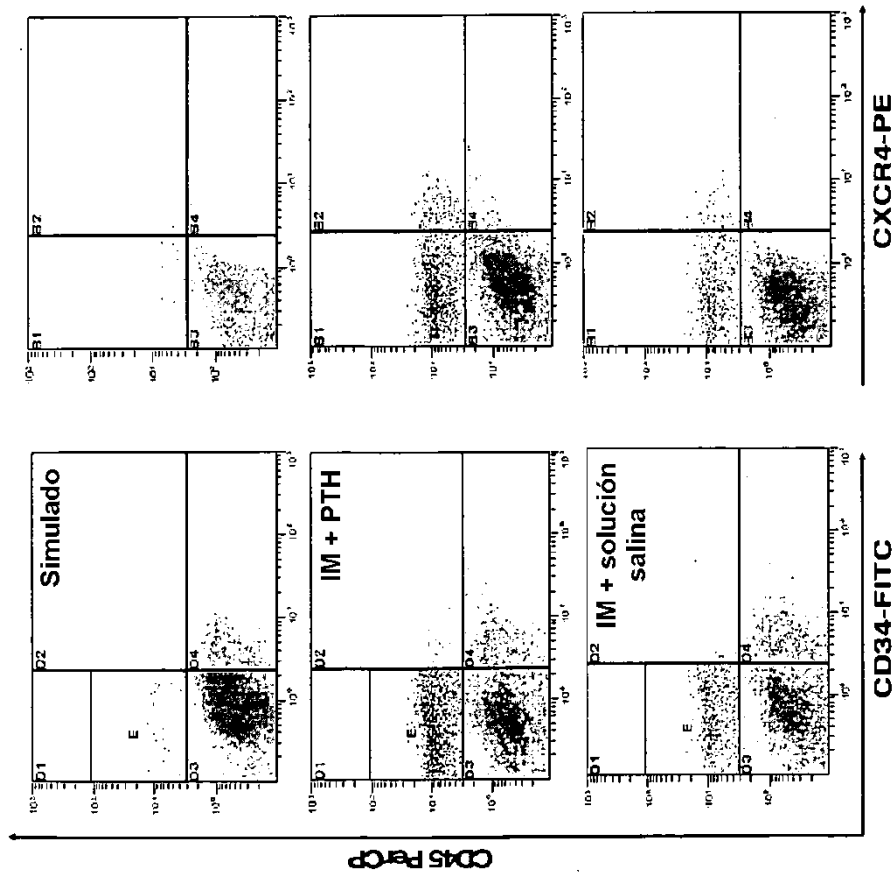


C

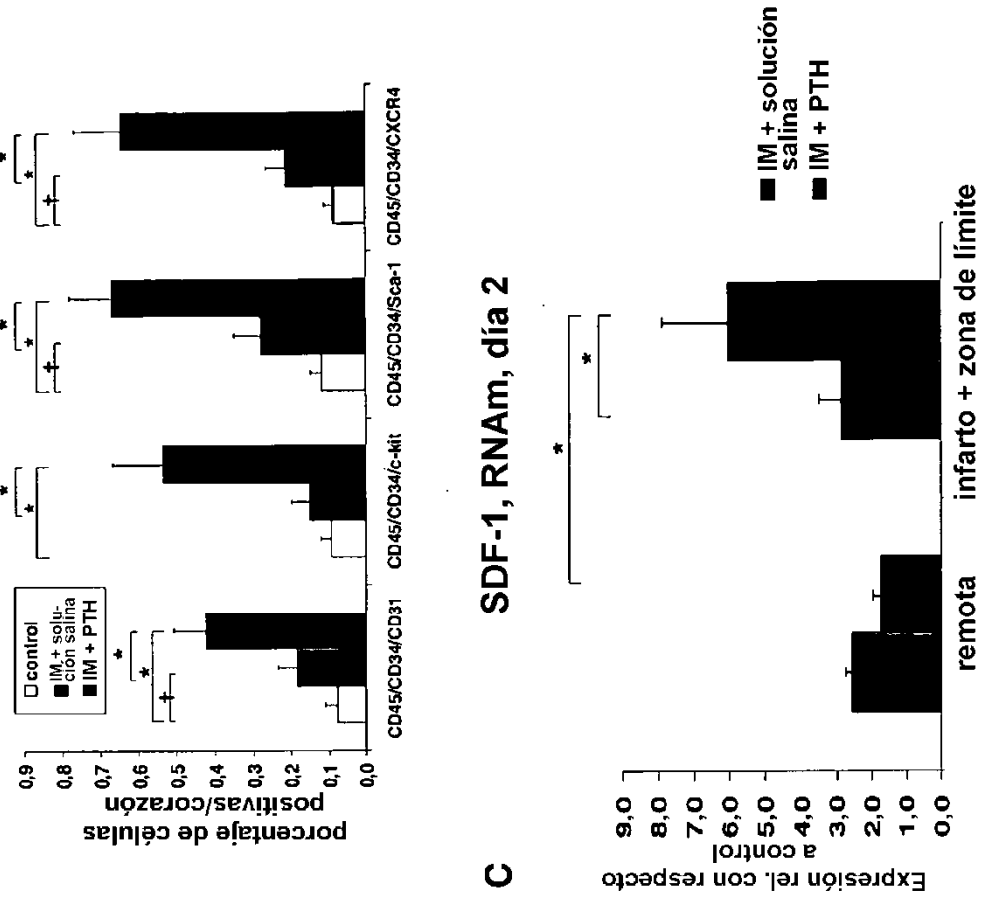
Porcentaje de marcadores de células madre en células CD45⁺/CD34⁺



A Células CD45⁺/CD34⁺/CXCR4⁺ - corazón **B**



B Migración de células CD45⁺/CD34⁺ al corazón



C SDF-1, RNAm, día 2