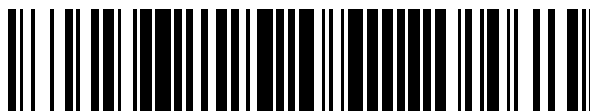


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 877**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2015** **PCT/EP2015/057987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015** **WO15158667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2015** **E 15717456 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3132041**

54 Título: **Vectores AAV para terapia génica vascular en cardiopatía coronaria e isquemia periférica**

30 Prioridad:

14.04.2014 DE 102014207153

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

06.11.2020

73 Titular/es:

KUPATT, CHRISTIAN (50.0%)

Aberlestrasse 12

81366 München, DE y

HINKEL, RABEA (50.0%)

72 Inventor/es:

KUPATT, CHRISTIAN y

HINKEL, RABEA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 791 877 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

Vectores AAV para terapia génica vascular en cardiopatía coronaria e isquemia periférica

5 **Campo de la invención**

La invención se encuentra en el campo de la terapia génica. Más específicamente, la invención trata la provisión de una terapia génica para cardiopatía coronaria e isquemia periférica en mamíferos.

10 **Antecedentes**

La cardiopatía coronaria es en los países industrializados, a pesar de una terapia mejorada como la revascularización de un vaso coronario ocluido, ahora como antes, la principal causa de muerte (Lloyd-Jones et al., Circulation 2010, 121:e46-e215). Además de la manifestación de la cardiopatía coronaria como infarto de miocardio agudo, la oclusión lenta crónica de un vaso coronario también puede conducir a isquemia miocárdica, que en la evolución lleva a una insuficiencia cardíaca hasta fallo cardíaco (Suero et al., J Am Coll Cardiol 2001, 38:409-14).

La enfermedad isquémica crónica del músculo cardíaco o músculo periférico se trata actualmente mediante medidas quirúrgicas o intervencionistas, para revascularizar redes vasculares estrechadas u ocluidas. Aunque en los últimos años pudo mejorarse claramente la terapia medicamentosa después de reabrir el vaso cerrado y, por lo tanto, la supervivencia libre de eventos de los pacientes, algunos pacientes aún desarrollan una insuficiencia cardíaca (Levy et al., N Engl J Med 2002, 347:1397-402). En una población de pacientes creciente, estrategias terapéuticas convencionales están agotadas y se esperan beneficios clínicos de terapias de neovascularización adyuvantes (angiogénesis/arteriogénesis).

Estudios preclínicos (Kupatt et al., J Am Coll Cardiol 2010, 56: 414-22) y estudios clínicos anteriores (Rissanen y Ylä-Herttuala, Mol Ther 2007, 15: 1233-47) no pudieron demostrar un aumento de la perfusión, cuando la angiogénesis (crecimiento capilar) se forzaba en ausencia de maduración microvascular, es decir, reclutamiento de pericitos y células de músculo liso (Jain, Nat Med 2003, 9:685-693; Potente et al., Cell 2011, 146:873-887). Además, la angiogénesis (crecimiento colateral), un elemento esencial de mejora del flujo, no prolongó el tiempo de marcha en pacientes con isquemia de las extremidades crítica, cuando se empleó tratamiento de apoyo de GM-CSF sin inducción del crecimiento y estabilización microvascular (van Royen et al., Circulation 2005, 112:1040-6). En contraposición a esto, la colateralización adaptativa (Schierling et al., J Vasc Res 2009, 46:365-374,) tuvo lugar cuando se combinó un factor proangiogénico como VEGF-A con los factores de maduración PDGF-B (Kupatt et al., J Am Coll Cardiol 2010, 56:414-22) o angiopoyetina-1 (Smith et al., J Am Coll Cardiol 2012, 59: 1320-8). Por otro lado, la inhibición de señalización de NF-κB, que inhibe la expresión de VEGF-A y PDGF-B, llevó a una red colateral hiperramificada e inmadura (Tirziu et al., Circulation 2012, 126:2589-600). En consecuencia, es necesario un aumento de microvasos estables y regulados para inducir neovascularización funcional.

La supervivencia libre de eventos de los pacientes podría mejorarse claramente mediante una terapia génica para la angiogénesis, arteriogénesis y la función cardíaca mejorada. Sin embargo, para ello es necesario usar el vector de terapia génica correcto y las moléculas diana correctas. La presente invención resuelve este problema proporcionando vectores AAV para la terapia génica vascular en la cardiopatía coronaria.

Hinkel et al. (Cardiovasc. Res. 2012, 93(S1):S117) divulga vectores AAV que codifican timosina B4 para el tratamiento de miocardiopatía isquémica.

SUMARIO

En una forma de realización, la invención se refiere a un vector viral adenoasociado (vector AAV) que comprende un gen que codifica para un factor de transcripción relacionado con miocardina A (MRTF-A).

El vector AAV puede ser AAV2/9 o un vector AAV pseudotipado con proteínas de envuelta de AAV9, preferentemente AAV2.9, AAV1.9 o AAV6.9.

En una forma de realización, el gen se encuentra bajo el control de un promotor cardiospecífico. En una forma de realización, el gen se encuentra bajo el control de un promotor de CMV, de un promotor de MRC2, de un promotor de MyoD o de un promotor de troponina.

Además, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un vector AAV de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención comprende también un vector AAV de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En una forma de realización, el vector AAV de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención sirve para su uso en el tratamiento de cardiopatía coronaria o isquemia periférica en un mamífero, preferentemente en un ser humano, un ratón, un conejo

o un cerdo. La cardiopatía coronaria puede ser un infarto de miocardio agudo, isquemia miocárdica, angina de pecho estable y/o miocardio hibernante.

En una forma de realización, el mamífero es un paciente humano sin opción.

Descripción de las figuras

Figura 1: Angiogénesis inducida mediante activación de MRTF y translocación en el núcleo celular a través de activación de CCN1 y CCN2

(a,b) La transfección con MRTF-A aumentó la migración de células endoteliales en una prueba de rascado de herida *in vitro* (área delimitada = área descubierta); y (c,d) Formación de tubos de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) *in vitro* (lpf = campo de baja potencia). La sobreexpresión de Tβ4 mostró efectos similares, si no se administró conjuntamente ARNhc de MRTF o se usó un mutante de Tβ4 (Tβ4m), que carece del motivo de unión de actina G KLKKTET (barra de tamaño: 200 μm). (e) La transfección de Tβ4 de células HL-1 miocíticas permitió la translocación al núcleo celular (fluorescencia azul) de MRTF-A (fluorescencia verde), un efecto que faltó cuando el constructo de Tβ4m se usó sin el sitio de unión a actina G (barra de tamaño: 20 μm). (f) La transfección de Tβ4 de células HL-1 indujo un indicador de luciferasa sensible a MRTF-SRF (que comprende tres copias del sitio de unión a SRF c-fos = p3DA.Luc, véase Posern et al., Mol. Biol. Cell 2002, 13:4167-78), en contraposición a la transfección con mutante de Tβ4. (g) La formación de tubos inducida por Tβ4 se eliminó en el caso de cotransfección de ARNhc del gen objetivo de MRTF-SRF CCN1 (Cyr61) (barra de tamaño: 200 μm). (h,i) Maduración de tubos, evaluado como reclutamiento de pericitos (PC, fluorescencia verde) en anillos endoteliales (anillos EC, fluorescencia roja; barra de tamaño: 200 μm), se indujo mediante MRTF-A y Tβ4. La cotransfección de ARNhc contra el gen objetivo MRTF CCN2 (CTGF) eliminó el efecto de Tβ4 (promedio ± desviación estándar, n = 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 2: La cascada de señalización de Tβ4-MRTF-A induce angiogénesis *in vitro*

(a) La transfección de Tβ4 de células HL-1 de cardiomiocitos permite la translocación de MRTF en el núcleo celular, un efecto que falta cuando se usó un constructo de Tβ4m sin sitio de unión a actina. (b) El análisis del nivel de proteína de MRTF-A en el núcleo celular por medio de inmunotransferencia de tipo Western mostró un nivel de proteína de MRTF-A elevado después de la sobreexpresión de Tβ4 en células HL-1. Tβ4m no aumentó el nivel de MRTF-A. (c,d) qRT-PCR muestra que CCN1/2-ARNhc evitó el enriquecimiento de transcritos de CCN1/2 después de la expresión de Tβ4. (e,f) Las células HL-1 cardiomiocíticas transducidas con rAAV.Tβ4 indujeron angiogénesis (formación de tubos) en células endoteliales cocultivadas con células HL-1, cuando no se cotransdujo ningún ARNhc de MRTF, mientras que rAAV.Tβ4m no tuvo ningún efecto (barra de tamaño: 200 μm). (g,h) Los niveles de expresión de ARNm de MRTF-A- (g) así como los niveles de proteína de MRTF-A (h) no se vieron afectados por la sobreexpresión de Tβ4, sino que aumenta significativamente después de la transfección de MRTF-A. (i,j) La formación del tubo después de la liberación de Tβ4 de células HL-1 transducidas con rAAV.Tβ4 se alteró mediante el ARNhc de CCN1 (barra de tamaño: 200 μm). (k,l) La cotransfección de rAAV.Tβ4 y ARNhc de CCN2 no afectó la formación de tubos inducida por Tβ4. Además, ARNhc de CCN1 no cambió el reclutamiento inducido por Tβ4 de células similares a pericitos (promedio ± desviación estándar, n = 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 3: Importancia de la señalización de MRTF para la neovascularización *in vivo*

(a) El análisis de qRT-PCR mostró un aumento de MRTF-A en la pata trasera isquémica transducida con rAAV.MRTF-A. (b) rAAV.MRTF-A indujo genes objetivo MRTF/SRF CCN1 y CCN2 *in vivo*. (c,d) La transducción de rAAV.MRTF-A aumentó la relación de capilares-fibras musculares (c/fm), similar al activador de MRTF Tβ4. rAAV.Tβ4m, un mutante sin el dominio de unión a actina G, o la aplicación conjunta de Tβ4 y rAAV.MRTF-ARNhc, no tuvieron ningún efecto (tinción de PECAM-1, barra de tamaño: 100 μm). (e,f) Transducción mejorada funcionalmente con rAAV.MRTF-A y -Tβ4, pero no rAAV.Tβ4m o rAAV.Tβ4 + ARNhc de MRTF la perfusión de la pata trasera el día 3 y el día 7. (g) Después de la delección de MRTF-B inducida por vector de rAAV.Cre en ratones deficientes en MRTF-A (Mrtfa^{-/-}/b^{flox/flox}+rAAV.Cre = MRTF-A/B^{-/-}Vi) la transducción de Tβ4 no pudo inducir angiogénesis, en contraposición a ratones Mrtfa^{+/-}/b^{flox/flox} (= MRTF-A/B^{+/-}). (h) La perfusión aumentada con rAAV.Tβ4 se suprimió en ratones MRTF-A/B^{-/-}Vi. (i,j) En ratones CCN1^{-/-}Vi (= CCN1^{flox/flox}+rAAV.Cre) se suprimió el aumento en la relación de fibras capilares-musculares (tinción de PECAM-1, barra de tamaño: 100 μm), como también el aumento en la perfusión de la pata trasera (k,l) (promedio ± desviación estándar, n = 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 4: Crecimiento vascular inducido por MRTF-A en isquemia de la pata trasera del ratón

(a) Protocolo de isquemia de pata trasera en el ratón. La administración de rAAV intramuscular (i.m.) se llevó a cabo el día -14 y la arteria femoral se ligó el día 0. Las siguientes mediciones de flujo Doppler con láser (LDF) se llevaron a cabo los días 0, 3 y 7. (b) La inyección i.m. de rAAV.Cre indujo transducción muscular homogénea, indicado por un cambio de fluorescencia de Tomato (rojo) a fluorescencia de GFP (verde) en ratones con gen indicador Tomato. (c) La inyección i.m. de rAAV.LacZ (3x10¹² partículas de virus) llevó a una transducción homogénea (tinción azul) de la pata trasera prevista, pero no de la contraria. (d) Detección por qRT-PCR de Tβ4 en las patas traseras isquémicas transducidas con rAAV.Tβ4, pero no en las patas traseras transducidas por rAAV.LacZ. (e) El análisis por HPLC mostró un aumento de la concentración de proteína Tβ4 en las patas

trazeras isquémicas transducidas con rAAV.T β 4. **(f)** Genes objetivo de MRTF CCN1 y CCN2 inducidos por rAAV.T β 4 *in vivo*. **(g)** La maduración inducida por T β 4 de los capilares (revestimiento pericitico, tinción con NG2) se había suprimido en patas traseras MRTF-A/B^{-/-}Vi. **(h,i)** Tanto en ratones MRTF-A^{-/-}/B^{fllox/fllox} (MRTF-A desactivados) y ratones MRTF-A^{+/-}/B^{fllox/fllox} (MRTF-B desactivados) la transducción de rAAV.T β 4 provocó un aumento de la densidad capilar (h) y la perfusión (i). Sin embargo, el efecto de rAAV.T β 4 en ratones de tipo salvaje (MRTF-A^{+/-}/B^{fllox/fllox}) fue el más alto. Además, no hubo ninguna diferencia significativa entre ratones desactivados MRTF-A y MRTF-B (promedio $\pm$ desviación estándar, n = 4, * p<0,05 frente al control).

Figura 5: Maduración microvascular inducida por T β 4/MRTF-A: papel esencial para el crecimiento colateral y perfusión mejorada

(a) El análisis por HPLC mostró un aumento significativo de proteína T β 4 después de la transducción con rAAV.T β 4 de patas traseras de conejo isquémicas, mientras que T β 4-Ala específico de conejo se mantuvo sin cambios. **(b-d)** La administración de rAAV.MRTF-A o rAAV.T β 4 aumentó la densidad capilar (tinción de PECAM-1) así como el revestimiento pericitico (tinción de NG2, barra de tamaño: 50 μ m), ambos se eliminaron mediante aplicación conjunta de angiopoyetina 2 (rAAV.Ang2). **(e,f)** Las angiografías de las patas traseras isquémicas el día 35 mostraron una formación colateral elevada en animales tratados con rAAV.MRTF-A y rAAV.T β 4 (las flechas indican el sitio de la escisión de la arteria femoral). La aplicación conjunta de rAAV.Ang2 eliminó este efecto, **(g)** rAAV.MRTF-A y rAAV.T β 4 indujeron un crecimiento en la perfusión en las patas traseras isquémicas, siempre que no se aplicaran conjuntamente rAAV.Ang2 o L-NAME, que inhibe la formación de óxido de nitrógeno (promedio $\pm$ desviación estándar, n = 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 6: Crecimiento vascular inducido por T β 4-MRTF-A en conejos

(a) Protocolo de un modelo para la isquemia de la pata trasera de conejo (escisión de la arteria femoral). **(b)** Tinción de β -galactosidasa 5 semanas después de inyección i.m. de rAAV.LacZ en la pata trasera de conejo. **(c,d)** qRT-PCR de T β 4 (c) y angiopoyetina 2 (d), normalizado con respecto a GAPDH, en animales control y de tratamiento (n = 3). **(e,f)** La sobreexpresión de T β 4 solo en la parte inferior de la pata (rAAV.T β 4 LL) aumentó la densidad capilar (tinción de PECAM-1) en la parte inferior de la pata, mientras que la transducción de T β 4 solo en el muslo (rAAV.T β 4 UL) no influyó en la capilarización en la parte inferior de la pata (barra de tamaño: 50 μ m). **(g,h)** La colateralización aumentó en el grupo de rAAV.T β 4 UL y en un grado aún mayor en el grupo de rAAV.T β 4 LL, mientras que la perfusión (i) aumentó solo en el grupo de rAAV.T β 4 LL y no en el grupo de rAAV.T β 4 UL. **(j)** En comparación con los conejos transducidos con rAAV.T β 4, la administración conjunta de L-NAME no redujo la relación NG2/PECAM-1, lo que indicó un crecimiento microvascular robusto y equilibrado. Por el contrario, el tratamiento con L-NAME o rAAV.Ang2 solo no pudo aumentar la relación NG2-PECAM-1 tanto como rAAV.T β 4. **(k,l)** El aumento dependiente de T β 4 de la colateralización y perfusión se redujo significativamente cuando se coadministró L-NAME (promedio $\pm$ desviación estándar, n = 5, ** p<0,01).

Figura 7: MRTF-A mejora la formación colateral y la perfusión en miocardio hibernante de cerdos

(a-c) En miocardio de cerdo hibernante (véase la figura 8a) la transducción de rAAV.MRTF-A así como la sobreexpresión ubicua de T β 4 (T β 4tg, véase la figura 9) indujeron proliferación capilar (tinción de PECAM-1, barra de tamaño: 50 μ m) y revestimiento de pericitos (tinción de NG2). **(d,e)** Se demostró además el crecimiento colateral en corazones transducidos con rAAV.MRTF-A, similar a los corazones de T β 4tg. **(f)** La reserva de flujo regional, obtenida por estimulación auricular rápida (130 latidos por minuto), se elevó en corazones transducidos con rAAV-MRTF-A y transgénicos T β 4. **(g)** Función miocárdica regional, medida por el acortamiento del segmento subendocárdico en reposo y con estimulación auricular (130 y 150 latidos por minuto), mostró una reserva funcional mejorada o bien por transducción de rAAV.MRTF-A o bien en corazones T β 4tg. **(h)** La fracción de eyección, un parámetro de la función miocárdica global, se mejoró en animales transducidos con rAAV.MRTF-A el día 56 en comparación con el día 28. Por el contrario, los animales que sobreexpresan constitutivamente (T β 4tg) no mostraron pérdida de función el día 28. **(i)** Mecanismos de neovascularización terapéutica mediada por MRTF: La transducción de MRTF-A o T β 4 induce una cantidad elevada de MRTF-A no unida a actina G, que interactúa con SRF después de la translocación al núcleo celular e induce, por ejemplo, CCN1 y CCN2 como genes diana. CCN1 permite el crecimiento capilar (angiogénesis), mientras que CCN2 aumenta el revestimiento del pericitos (maduración vascular). Juntos, estos mecanismos inducen el crecimiento colateral de una manera dependiente de óxido de nitrógeno, lo que lleva a neovascularización terapéutica (promedio $\pm$ desviación estándar, n = 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 8: Eficiencia funcional del eje T β 4-MRTF-A en corazones de cerdo isquémicos crónicos

(a) Protocolo del modelo de cerdo para miocardio hibernante. **(b)** Detección por RT-PCR de MRTF-A y T β 4 en cerdos control en comparación con corazones de cerdo transgénicos rAAV.T β 4 y T β 4 (T β 4tg). **(c)** Ejemplos de tinción de LacZ (azul) después de retroinfusión de rAAV.LacZ (5x10¹² partículas de virus) en el corazón de cerdo, **(d)** Antes del tratamiento (el día 28), el análisis de retención de microesferas fluorescentes en reposo mostró un flujo sanguíneo reducido en el área isquémica de corazones rAAV.LacZ y rAAV.MRTF-A, pero no en corazones T β 4tg, similar a la reserva de flujo **(e)** a una frecuencia cardíaca rápida (130 lpm). **(f)** A las 4 semanas después del tratamiento (día 56), el flujo sanguíneo miocárdico regional en reposo mejoró en animales rAAV.MRTF-A y T β 4tg. **(g)** Además, el valor de Rentrop mostró una colateralización elevada en el día 56 en corazones transducidos con rAAV.MRTF-A o T β 4tg. **(h)** Ejemplos de análisis de MRT en el día 56 para corazones de cerdo control (izquierda) y tratados con rAAV.MRTF-A, **(i)** La presión diastólica final en el ventrículo izquierdo (LVEDP)

aumentó en corazones isquémicos desde el día 28 hasta el día 56, cuando MRTF-A no se sobreexpresó. Corazones Tβ4tg, que sobreexpresaron constitutivamente Tβ4, no mostraron ninguna variación del día 28 al día 56 (promedio ± desviación estándar, n= 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 9: Producción de cerdos transgénicos Tβ4

Se aislaron y cultivaron fibroblastos de cerdos donantes. pCMV-Tβ4 se transfectó por medio de electroporación y las células se cultivaron durante 14 días. Después de la detección de la transfección estable de Tβ4, se realizó una transferencia de núcleo celular somático en ovocitos de cerdo. A continuación se analizó la expresión de Tβ4 y se cultivaron fibroblastos de animales que expresan Tβ4 y a continuación se usaron para una segunda transferencia nuclear somática. Después del genotipado, se usaron animales de esta generación para el modelo de cerdo de isquemia crónica.

Figura 10: Los MRTF son necesarios para la cardioprotección inducida por Tβ4

(a,b) El crecimiento capilar inducido por rAAV.Tβ4 (tinción de PECAM-1) y **(c)** revestimiento de pericitos (tinción de NG2, barra de tamaño 50 μm), en caso de que la administración conjunta de rAAV.MRTF-ARNhc no impida ambos procesos. **(d,e)** El crecimiento colateral se demostró en animales transducidos con rAAV.Tβ4, pero no después de la administración conjunta de rAAV.MRTF-ARNhc. **(f)** Los valores de Rentrop mostraron una colateralización elevada después de la transducción de rAAV.Tβ4, excepto en el caso de la administración conjunta de MRTF-A ARNhc. **(g)** Flujo sanguíneo miocárdico regional con reserva de flujo (estimulación auricular 130/min) mejorado en animales tratados con rAAV.Tβ4, pero no en corazones rAAV.Tβ4 + ARNhc de MRTF. **(h)** El análisis de la fracción de eyección mostró una función mejorada de miocardio sistólica en animales transducidos con rAAV.Tβ4 (día 56), en comparación con el día 28 (día de la transducción). No se observó ninguna mejora de la fracción de eyección en corazones tratados con rAAV.Tβ4+ARNhc de MRTF. **(i)** Imágenes de MRT de corazones transducidos con rAAV.Tβ4 sin (izquierda) o con (derecha) coadministración de rAAV.MRTF-ARNhc. **(j)** Función miocárdica regional, medida por el acortamiento del segmento subendocárdico en reposo y con estimulación auricular (130 y 150 lpm) muestra una reserva funcional aumentada tras transducción con rAAV.Tβ4, pero no con rAAV.Tβ4+ARNhc de MRTF (promedio ± desviación estándar, n= 5, * p<0,05, ** p<0,001).

Figura 11: Producción y fenotipado cardiaco de cerdos transgénicos INS^{C94Y} (diabetes mellitus tipo I)

(a) Proceso de producción de cerdos transgénicos INS^{C94Y}. **(b)** Niveles de glucosa en sangre de cerdos de tipo salvaje y diabéticos. **(c)** Tinción de fluorescencia de células endoteliales (células PECAM-1 positivas, rojo) y pericitos (células NG-2 positivas, verde). **(d)** Número de células endoteliales en el miocardio de cerdos de tipo salvaje y diabéticos. **(e)** Presión diastólica final ventricular izquierda en animales con diabetes mellitus tipo I y animales de tipo salvaje.

Figura 12: Caracterización del modelo de miocardio isquémico crónico con factores de riesgo cardiovascular

(a) Protocolo del modelo de cerdo miocardio hibernante con diabetes mellitus tipo I o hipercolesterolemia. **(b)** Concentración de glucosa en sangre de los grupos individuales de animales durante la duración de ensayo: Control de tipo salvaje; tipo salvaje tratado con rAAV.Tβ4; control con diabetes; diabetes tratada con rAAV.Tβ4. **(c,d)** Niveles de triglicéridos y colesterol en suero en animales con hipercolesterolemia (alimentación alta en grasas) y alimentación normal.

Figura 13: Influencia de la aplicación de rAAV.Tβ4 en animales con diabetes mellitus tipo I en angiogénesis y arteriogénesis

(a) Tinción de fluorescencia de células endoteliales (células PECAM-1 positivas, rojo) y pericitos (células NG-2 positivas, verde) en miocardio de cerdo hibernante de animales diabéticos y de tipo salvaje. **(b,c)** Número de células endoteliales y pericitos. **(d)** Número de colaterales formados. **(e)** Puntuación de Rentrop.

Figura 14: Eficiencia funcional de una aplicación de rAAV.Tβ4 en animales con diabetes mellitus tipo I

(a,b) Presión ventricular izquierda-diastólica final en los días 28 y 56 así como su variación entre estos tiempos. **(c,d)** Fracción de eyección en los días 28 y 56 así como su variación entre estos tiempos.

Figura 15: Influencia de los niveles elevados de colesterol en la angiogénesis y arteriogénesis mediada por Tβ4

Número de **(a)** células endoteliales, **(b)** colaterales y **(c)** puntuación de Rentrop en el área isquémica de animales control hipercolesterolémicos y animales tratados con rAAV-Tβ4.

Figura 16: Eficiencia funcional de una aplicación de rAAV.Tβ4 en animales con hipercolesterolemia

(a,b) Presión diastólica final ventricular izquierda en los días 28 y 56 así como su variación entre estos tiempos en animales control hipercolesterolémicos y animales tratados con rAAV-Tβ4. **(c,d)** Fracción de eyección en los días 28 y 56 así como su variación entre estos tiempos en animales control hipercolesterolémicos y animales tratados con rAAV-Tβ4. **(e)** La función miocárdica regional, medida como acortamiento del segmento subendocárdico en reposo y con frecuencia cardiaca aumentada (130 y 150 latidos por minuto).

Figura 17: pretratamiento con rAAV.Tβ4 y rAAV.MRTF-A en un modelo de ratón de septicemia

(a) Protocolo de ensayos de septicemia en ratones. **(b)** Esquema de puntuación de la evaluación de síntomas de

septicemia en ratones y establecimiento de los criterios de terminación. (c) Valores de presión arterial periférica después de 12 y 24 horas en animales con septicemia tratados con diferentes rAAV. (d) Puntuaciones de los síntomas de los animales con septicemia en los grupos de ensayo. (e) Supervivencia acumulativa después de septicemia inducida por LPS.

Figura 18: Papel de MRTF-A y Tβ4 para la integridad vascular en la septicemia

(a, b) Análisis histológicos de las células endoteliales (células positivas para PECAM-1) y los pericitos (células positivas para NG-2) en el corazón y en la musculatura periférica de ratones con septicemia. (c, d) Imágenes de ejemplo y análisis cuantitativo para una medición de permeabilidad por medio de dextrano de alto peso molecular marcado con fluorescencia 6 horas después de la inducción de septicemia.

Descripción detallada de la invención

En nuestros experimentos (véanse los ejemplos) hemos descubierto que la combinación de un vector de acción prolongada y la sobreexpresión de un factor de crecimiento vasoactivo efectivo representa una opción terapéutica para pacientes con enfermedades isquémicas crónicas en el tejido esquelético o muscular cardíaco. La combinación de un vector viral adenoasociado y el transgén de β4 (Tβ4) o MRTF-A de timosina conduce a una neovascularización terapéutica robusta en tres especies (ratón, conejo y cerdo). Esta neovascularización terapéutica a su vez conduce a una perfusión claramente mejorada en los modelos de enfermedad oclusiva arterial periférica así como isquemia miocárdica crónica. En el modelo de miocardiopatía isquémica crónica en el cerdo, también conduce a una la función cardíaca aumentada. Este efecto específico también se puede lograr en animales grandes con factores de riesgo cardiovascular adicionales (niveles de azúcar o lípidos aumentados).

Una característica clave de la activación de MRTF-A es la translocación al núcleo celular después de reducir los niveles de actina G y la exportación desde el núcleo, cuando aumenta la cantidad de actina G (Miralles et al., Cell 2003, 113:329-42; Vartiainen et al., Science 2007, 316:1749-52). La expresión forzada de MRTF-A o Tβ4, un péptido que activa el MRTF-A por la unión de actina G (figura 1), inicia una respuesta de crecimiento microvascular y macrovascular orquestada en el caso de isquemia crónica de células periféricas (figura 3.5) y de músculo cardíaco (figura 7). De acuerdo con esto, la disfunción crónica de miocardio de cerdo hibernante se desencadenó mediante sobreexpresión directa de MRTF-A como activación de MRTF-A por medio de Tβ4 (figura 7). La noción de que la señalización de MRTF-A-SRF proporciona miofilamentos es de particular interés dado que una pérdida del citoesqueleto de actina es un sello distintivo del miocardio hibernante, que se provoca por hipoperfusión coronaria crónica (Bito et al., Circ Res 2007, 100:229-37). Por lo tanto, MRTF-A se encuentra en el sitio de corte de regeneración de miocitos y vascular en el miocardio hibernante. Tβ4, el péptido de unión a actina G más frecuente del citosol, puede afectar al crecimiento vascular a través de la migración endotelial y la proliferación (Grant et al., J Cell Sci 1995, 108:3685-94; Smart et al., Nature 2007, 445:177-82). Se descubrió un papel esencial de MRTF-A en la señalización de Tβ4 *in vitro* e *in vivo*, dado que el ARNhc de MRTF-A pudo suprimir la migración endotelial y la proliferación (figuras 1b,d), así como el crecimiento micro- y macrovascular (figura 3d,f) y la mejora funcional del corazón (figura 10). En consecuencia, la deficiencia específica del endotelio en MRTF provocó el desarrollo incompleto del plexo vascular primario en la retina en desarrollo (Weinl et al., J Clin Invest 2013, 123:2193-206). Además, SRF, el objetivo principal de MRTF-A, se identificó recientemente como esencial para el comportamiento de las células parietales en angiogénesis proliferativa después de la estimulación con VEGF-A (Franco et al., Development 2013, 2321-33; Andoh et al., J Biochem 2006, 140:483-9). Sin embargo, VEGF-A conduce al crecimiento de capilares inmaduros e inestables (Dor et al., EMBO J. 2002, 21:1939-47), en contraposición a Tβ4-MRTF-A, lo que indica una diferencia en la señalización de los dos factores de crecimiento vascular.

Tomados en conjunto, nuestros datos muestran que la activación de Tβ4/MRTF mejora el flujo sanguíneo colateral en el corazón isquémico y la pata trasera mediante inducción de CCN1/CCN2. A nivel celular, esta respuesta va acompañada de la proliferación endotelial mediante CCN1 (CYR61) y maduración, es decir, revestimiento de pericitos, mediante CCN2 (CT-GF), lo que conduce a una red vascular estable y funcional, que puede portar flujo sanguíneo colateral y mejorar la conductividad. El revestimiento de pericitos es esencial en este sentido, dado que Ang-2 al eliminar el revestimiento de pericitos (Ziegler et al., J Clin Invest 2013, 123:3436-45) eliminó los efectos positivos ejercidos por la señalización de Tβ4 MRTF (figura 5). Este hallazgo muestra el papel central de la maduración vascular y el crecimiento vascular equilibrado y proporciona nuevas rutas terapéuticas para la neovascularización funcional.

Por lo tanto, en una primera forma de realización, la invención comprende un vector viral adenoasociado (vector AAV) que comprende un primer gen que codifica para un factor de transcripción relacionado con miocardina A (MRTF-A). Los vectores AAV son en este sentido partículas que presentan la envuelta de un virus adenoasociado, mientras comprenden en su interior un ADN monocatenario, que codifica un gen de interés. El gen de interés puede introducirse en la célula diana por infección de una célula diana con el vector AAV.

El MRTF-A puede proceder de un ser humano, un ratón, un conejo, un cerdo, o cualquier otro mamífero.

Se prefiere especialmente el uso de un vector AAV, que presenta proteínas de envuelta, en particular la proteína cap, de AAV9. AAV9 presenta un tropismo del músculo cardíaco y, por lo tanto, ofrece una expresión homogénea y

estable en el músculo cardíaco de una pluralidad de especies. Sin embargo, también puede usarse un vector AAV pseudotipado con AAV9. Por este se entiende un vector que presenta proteínas de envuelta de AAV9, proteínas expresadas de otra manera de otra cepa y también elementos genómicos, por ejemplo, las repeticiones terminales internas (ITR) de esa otra cepa. Por ejemplo, AAV2.9 es un vector AAV2 pseudotipado con proteínas de envuelta de AAV9. Para la presente invención se ofrecen AAV2.9, AAV1.9 y AAV6.9 como vectores pseudotipados. Mediante el uso de un vector trópico de músculo cardíaco se garantiza que la expresión de MRTF-A tiene lugar en el músculo cardíaco, donde puede iniciar la neovascularización terapéutica.

Como alternativa, en particular para el tratamiento de isquemia periférica, puede usarse también un vector AAV con tropismo del músculo esquelético. Ejemplos de ello son AAV6, AAV1, AAV9, o vectores pseudotipados con estas cepas.

El gen MRTF-A en el vector de acuerdo con la invención se encuentra preferentemente bajo el control de un promotor cardiospecífico, es decir, de un promotor que permite la expresión principalmente en el músculo cardíaco. Promotores cardiospecíficos a modo de ejemplo son el promotor de MLC2, el promotor de la cadena pesada de α -miosina (promotor de α -MHC) y el promotor de troponina I (promotor de TnI). Sin embargo, también pueden usarse otros promotores constitutivos o inducibles, por ejemplo, un promotor de CMV o un promotor de MyoD. El gen MRTF-A también puede encontrarse bajo el control de varios promotores.

Procedimientos para la producción de vectores AAV para la transferencia de genes específicos de interés son conocidos en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Bell et al., J Clin Invest 2011, 121:2427-35). Un procedimiento consiste en la transfección triple de una línea celular productora adecuada, por ejemplo, U293, y posterior purificación con gradientes de cloruro de cesio, tal como se describe en la sección "material y métodos" a continuación. En este sentido se transfectan células productoras con tres vectores: En un primer vector está codificado el gen de interés, flanqueado por señales de empaquetamiento correspondientes; en un segundo vector están codificadas las proteínas AAV necesarias, en particular *rep* y *cap*; y un tercer vector proporciona funciones auxiliares adenovirales, sin las que no es posible la producción de partículas de AAV.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el vector de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede estar destinada a cualquier tipo de administración conocida por el estado de la técnica. Se prefieren composiciones para inyección intravenosa o intramuscular. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente sales, tampones, estabilizadores, colorantes, aglutinantes, saborizantes, etc.

La invención se refiere también al vector AAV de acuerdo con la invención o a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En particular, puede tener lugar el uso en un mamífero para el tratamiento de cardiopatías coronarias o isquemia periférica. Mamíferos preferidos son ser humano, cerdo, conejo y ratón.

En este sentido, por una "enfermedad coronaria" se entiende una enfermedad de los vasos coronarios. La cardiopatía coronaria puede ser isquemia miocárdica, infarto cardíaco agudo (infarto de miocardio), angina de pecho estable y/o miocardio hibernante, pero también arritmias cardíacas y/o insuficiencia cardíaca. En el caso de una "isquemia periférica" se trata de un riego sanguíneo insuficiente o una pérdida completa de riego sanguíneo de un tejido u órgano fuera del corazón, mientras que una "isquemia miocárdica" afecta al músculo cardíaco en sí.

Los vectores de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de los denominados pacientes "sin opción". En tales pacientes, se han agotado todas las posibilidades intervencionistas y quirúrgicas de una terapia. En general se intenta ralentizar la progresión de la enfermedad por medio de terapia medicamentosa. Sin embargo, esto tiene como objetivo una reducción de lípidos e inhibición plaquetaria, pero no la neovascularización. La neovascularización terapéutica puede superar este obstáculo, siempre que se usen rutas de señalización moleculares, que conducen a una neovascularización equilibrada. MRTF-A y también T β 4 son dos moléculas que inducen este tipo de neovascularización equilibrada (capilares, maduración microvascular y la formación colateral) en el tejido isquémico, y esto en ausencia simultánea de efectos secundarios no deseados.

Asimismo, los vectores de acuerdo con la invención son especialmente adecuados para el tratamiento de sujetos que están cargados con factores de riesgo cardiovasculares adicionales. En este sentido puede tratarse de diabetes mellitus, en particular diabetes mellitus tipo I o tipo II. El factor de riesgo puede ser también una concentración elevada de colesterol en la sangre (hipercolesterolemia), tal como puede provocarse, por ejemplo, por una alimentación demasiado rica en grasa. La concentración de colesterol elevada puede ser una concentración de colesterol LDL elevada o una concentración de colesterol HDL elevada.

Ejemplos

Ejemplo 1: Inducción de los rasgos distintivos de la angiogénesis por MRTF-A *in vitro*

Se encontró (figuras 1a-d) que MRTF-A indujo rasgos distintivos de la angiogénesis, es decir, migración y formación

de tubos de células endoteliales microvasculares humanas cultivadas, en un grado similar a T β 4. El efecto proangiogénico de MRTF-A dependía del motivo de unión a actina G de T β 4, dado que la mutación de este dominio y la supresión de la unión a actina G eliminó el efecto de T β 4 sobre el crecimiento vascular, al igual que un ARNhc, que al mismo tiempo interfería con la transcripción de MRTF-A y -B (ARNhc de MRTF; Leitner et al., J Cell Sci 2011, 124:4318-31). De acuerdo con esto, T β 4 aumentó la translocación de MRTF-A al núcleo celular (figura 1e, figura 2a-b), así como la transcripción de un gen indicador dependiente de MRTF/SRF, que contenía tres sitios de unión a SRF del promotor de c-fos (p3DA.Luc, figura 1f; Geneste et al., J Cell Biol 2002, 157:831-8). Tanto MRTF-A como T β 4 indujeron la expresión de genes que están implicados en el crecimiento microvascular, en particular CCN1, que media la angiogénesis (Hanna et al., J. Biol. Chem. 2009, 284:23125-36), y CCN2, que es relevante para la atracción de células similares a pericitos 10T1/2 (figuras 2c-g; Hall-Glenn et al., PLoS ONE 2012, 7:e30562). Se observa que la transfección de T β 4 no afectó el contenido de MRTF-A (figura 2h), en contraposición a la transfección de MRTF-A. De acuerdo con el hecho de que los CCN1/2 MRTF están aguas abajo y son relevantes para la vascularización, evitó la interrupción con la formación de tubos inducida por T β 4 de ARNhc de CCN1 (figura 1 g), mientras que ARNhc de CCN2 interrumpió la unión de una línea celular de tipo pericito murino (C3H/10T1/2) a los tubos endoteliales *in vitro* (figuras 1i-j).

Ejemplo 2: Tratamiento de la isquemia de la pata trasera en el ratón con terapia génica de MRTF-A basada en AAV

Para mostrar adicionalmente la relevancia de la señalización de MRTF-A *in vivo*, se usó un modelo de ratón con isquemia de la pata trasera. Inyección intramuscular de vectores AAV recombinantes (rAAV, figuras 4a-c) aumentó la concentración tisular de proteínas diana en la pata tratada (figura 3a) y los niveles de transcrito de los mediadores posteriores CCN1 y CCN2 (figura 3b; figuras 4d-f). De acuerdo con esto, rAAV.MRTF-A indujo crecimiento capilar (figuras 3c,d) y aumento de la perfusión en el día 7 (figuras 3e-f). Como activador aguas arriba, T β 4 tuvo un efecto similar sobre el crecimiento y función vascular (figuras 2c-f), siempre que no faltara el motivo de unión a la acción G (T β 4m) o se coadministrara un rAAV.MRTF-ARNhc. Este vector codifica un ARNhc, que se dirige tanto contra MRTF-A como MRTF-B y tiene la secuencia 5'-GAUCCCCGCAUGGAGCU GGUGGAGAAGAAUUCAGAGAUUCUCCACCAGCUCCA UGUUUUUGGAAA-3' (SEQ ID NO:1). Para investigar más a fondo la relevancia de los MRTF en el crecimiento vascular inducido por T β 4, se administró rAAV.Cre en patas traseras de *Mrif^{-/-}Mrtf^{flox/flox}*, para generar deficiencia doble MRTF-A/B. En los MRTF-A/B-desactivados inducidos por Cre, T β 4 no pudo, el día 7 después de la inducción de isquemia, estimular el crecimiento capilar (figura 3 g) y el reclutamiento de pericitos (figuras 4 g-h) y mejorar la perfusión (figura 3 h, figura 4i). De manera similar, las patas traseras mostraron cuando rAAV.Cre se administró en ratones CCN1^{flox/flox}, ningún aumento mediado por T β 4 de los capilares (figuras 3i,j) o perfusión en el día 7 (figuras 3k,l). Por lo tanto, la transducción de MRTF-A o la activación de MRTF mediante secuestro de actina G mediado por T β 4 estimula la transcripción de CCN1, para mediar la regeneración vascular funcional.

Ejemplo 3: Tratamiento de la isquemia de la pata trasera en el conejo con terapia génica de MRTF-A basada en AAV

La interdependencia del crecimiento microvascular y arteriogénesis para la mediación para la restauración del flujo se examinó en un modelo de conejo con patas traseras isquémicas (figura 6a), que es compatible con la separación tópica del área de crecimiento microvascular (parte inferior de la pata) y el área de colateralización (muslo). Transducción regional del músculo sóleo isquémico con MRTF-A o T β 4 (figuras 5a, 6b-d) llevó a una neovascularización funcional que incluye proliferación capilar CD31⁺ (figuras 5b,c), revestimiento de pericitos NG2⁺ (figuras 5b,d) y crecimiento colateral (figuras 5e,f). En particular, la activación de MRTF a través de transducción de T β 4 de la región de la cadera, aunque no pudo inducir crecimiento colateral moderado, no aumentó la perfusión, mientras que la limitación de la activación de MRTF a través de T β 4 a la región de la pantorrilla fue suficiente para estimular significativamente el crecimiento micro- y macrovascular así como la perfusión (figuras 6e-i). El desprendimiento de pericitos microvasculares por la expresión forzada de angiopoietina-2 (figuras 5b-d) abolió la colateralización mediada por T β 4 y la mejora del flujo (figuras 5e-g). Además el bloqueo de vasodilatación inducida por flujo por administración oral de L-NAME, un inhibidor no selectivo de óxido nítrico sintasa, no influyó en el crecimiento y maduración capilar (figura 6j), pero impidió la formación de colaterales y perfusión elevada (figuras 6k,l). Por lo tanto, el óxido nítrico parece después del crecimiento y maduración microvascular, mediar el crecimiento colateral. Esta observación se complementa con el hallazgo de que la inyección de T β 4 directa en el área del crecimiento colateral (muslo) no mejora la perfusión en la medida en que la inyección remota de rAAV.T β 4 en la parte inferior de la pata, el sitio del crecimiento microvascular (figuras 6e-i). Estos hallazgos sugieren que la maduración microvascular y la señalización de óxido nítrico son procesos que tienen que tener lugar en la secuencia de crecimiento vascular mediado por MRTF-A, para lograr la neovascularización funcional.

Ejemplo 4: Tratamiento del miocardio hibernante en cerdo con terapia génica de MRTF-A basada en AAV

Aunque las arterias periféricas y coronarias perfunden ambos tejidos musculares, su actividad de contracción permanente es una característica única del músculo cardíaco que necesita un suministro de oxígeno constante. Una caída crónica del suministro de oxígeno cambia la composición celular de cardiomiocitos vivos en el área isquémica, lo que conduce a una pérdida regional de fuerza de contracción, que se denomina miocardio hibernante (Heusch y Schulz, J Mol Cell Cardiol 1996, 28:2359-72; Nagueh et al., Circulation 1999, 100:490-6). Dentro de los cardiomiocitos, los rasgos distintivos del miocardio hibernante son un contenido reducido de miofilamentos (Bito et

al., Circ Res 2007, 100:229-37) y mitocondrias, así como un contenido de glucógeno elevado (St. Louis et al., Ann Thoracic Surg 2000, 69:1351-7). En este caso, se examinó el potencial de MRTF-A, de resolver la disfunción en miocardio hibernante, que se generó mediante implantación percutánea de un stent reductor en corazones de cerdo (Kupatt et al., J Am Coll Cardiol 2007, 49:1575-84), lo que conduce a una oclusión gradual de la rama circunfleja (RCx, figura 8a). El día 28 después de la administración de rAAV.MRTF-A al área isquémica, lo que aumentó significativamente el contenido de MRTF-A en el tejido (figura 8b), se encontró un grado significativamente mayor de densidad capilar y cobertura de pericitos (figuras 7a-c). El crecimiento colateral y la perfusión a una frecuencia cardíaca rápida (130/min) todavía estaban deteriorados el día 28, es decir, antes de la transducción de LacZ y MRTF-A (figuras 8c-f), pero mejoraron en el día 56, es decir, 4 semanas después de la transducción de MRTF-A, pero no después de la transducción de LacZ (figuras 7d-f).

La perfusión colateral elevada (figura 8 g) generó una reserva funcional mejorada del área isquémica con una frecuencia cardíaca rápida (130 y 150 latidos por minuto, figura 7 g). Al mismo tiempo, se encontró una fracción de eyección mejorada como marcador de la función sistólica global (figura 7h) y una caída de la presión diastólica final en el ventrículo izquierdo (figura 8i), un marcador pronóstico de inicio de insuficiencia cardíaca.

Cerdos transgénicos, que expresan T β 4 de forma ubicua y constitutiva (figura 9), mostraron un crecimiento y maduración capilar similar (figuras 7a-c). En el día 56, se aumentó la reserva de flujo sanguíneo en el área isquémica (figura 7f) y la reserva funcional de la región isquémica (figura 7 g) o del corazón completo (figura 7h) se habían elevado como en los corazones tratados con rAAV.MRTF-A. En particular, debido a la sobreexpresión constitutiva de T β 4 desde el día 0 hasta el día 28, los animales T β 4tg no experimentaron una pérdida significativa de perfusión o función miocárdica en reposo o con una frecuencia cardíaca rápida (Figura 7 g, figuras 8d-g, i).

Además, se suprimieron el crecimiento micro- y macrovascular inducido por rAAV.T β 4 y los aumentos posteriores de la reserva de perfusión, cuando se administró conjuntamente un ARNhc de MRTF-A inhibidor (figuras 10a-f). Se eliminó la ganancia en función miocárdica global (figura 10 h, ejemplos en la figura 10i) y la función miocárdica regional (figura 10j), cuando la transducción de T β 4 se combinó con la inhibición de MRTF-A por un ARNhc apropiado.

En este caso con el uso de un planteamiento genético y fisiológico combinado en modelos de ratón, conejo y cerdo, se mostró que los MRTF estimulan el crecimiento y la maduración de microvasos así como el aumento del flujo sanguíneo colateral después de la oclusión de la arteria en las redes de pata trasera y coronarias. Mecanicamente se muestra que la timosina β 4 coactiva la translocación de MRTF aguas abajo SRF e induce CCN1/CCN2, lo que conduce a angiogénesis elevada y al reclutamiento de células del músculo liso vasculares y a la formación de vasos funcionales, que pueden llevar flujo colateral (figura 7i).

Ejemplo 5: Tratamiento del miocardio hibernante en cerdos diabéticos con terapia génica de T β 4 basada en AAV

Producción y fenotipado cardíaco de cerdos transgénicos INS^{C94Y} (diabetes mellitus tipo I)

La producción de cerdos transgénicos con la mutación C94Y en el gen de insulina (INS^{C94Y}) está representada en la Figura 11. Esta mutación también se describe en Renner et al. Diabetes 2013, 62:1505-1511. La mutación C94Y conduce a un plegamiento incorrecto de la proteína de la insulina en las células β del páncreas y a una acumulación de la insulina mal plegada en el retículo endoplasmático (ER). El estrés de ER conduce a la apoptosis de las células β y, con ello, en última instancia, a diabetes mellitus tipo I.

En primer lugar se introdujo en fibroblastos de cerdo un vector de expresión de INS^{C94Y} por medio de nucleotransfección. Después de la selección de los fibroblastos, se llevó a cabo una primera ronda de transferencia nuclear somática en ovocitos. A continuación se analizaron la descendencia por medio de técnica de Southern y los animales con niveles de glucosa en sangre elevados y crecimiento retardado se usaron para una nueva clonación (véase también Renner et al. 2013). Estos animales se usaron entonces para los exámenes posteriores a una edad de 3-4 meses.

Después de suspender el tratamiento con insulina, los animales mostraron un nivel de glucosa en sangre claramente elevado (figuras 11c y d). Análisis de tejido cardíaco para células endoteliales (células PECAM-1 positivas, rojo) y para pericitos (células NG-2 positivas, verde) mostraron ya sin estrés adicional una reducción clara del número de células endoteliales y pericitos. El análisis de la presión diastólica final ventricular izquierda muestra en animales con diabetes mellitus tipo I un aumento significativo como expresión de una función cardíaca global reducida ya en un estadio temprano (figura 11 e; promedio $\pm$ desviación estándar; n= 4, * p <0,05, **p<0,001).

La figura 12 muestra otros efectos de diabetes mellitus tipo I o una dieta rica en grasas sobre el miocardio de cerdos. La figura 12 a ilustra el protocolo de prueba del modelo de cerdo hibernar miocardio hibernante con diabetes mellitus tipo I o hipercolesterolemia. En comparación con los grupos control (ts $\pm$ rAAV.T β 4), los animales transgénicos con INS^{C94Y} con diabetes mellitus tipo I (control tg y rAAV.T β 4 tg) mostraron niveles de glucosa en sangre elevados durante toda la duración del ensayo (figura 12 b). Sin embargo, no hubo diferencia entre el grupo tratado con rAAV.T β 4 y el grupo control, ni para el grupo de tipo salvaje ni para los animales transgénicos (figuras 12c, d).

Tampoco es de esperar una influencia de T β 4 o MRTF-A sobre el nivel de glucosa en sangre. En los animales con hipercolesterolemia, se mostraron valores de triglicéridos y colesterol claramente elevados en suero después de 9 semanas de alimentación rica en grasas (promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, ** $p<0,001$).

5 Efecto de la administración de rAAV. T β 4 en animales con diabetes mellitus tipo I

En el miocardio de cerdo hibernante, una transducción de rAAV.T β 4 induce una proliferación capilar (tinción de PECAM-1, rojo) y un reclutamiento de pericitos (tinción de NG-2, verde) en ambos grupos (tipo salvaje y diabetes); figura 13a-c. Además, mediante la sobreexpresión de T β 4 por medio de rAAV se indujo un crecimiento colateral claro (figura 13 d) y pudo medirse un llenado claramente mejor del vaso sanguíneo distal por medio de una puntuación de Rentrop (figura 13 e). También en este caso pudo medirse el efecto en ambos grupos, tipo salvaje y diabetes, (promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

La presión diastólica final ventricular izquierda, un parámetro para la función miocárdica global, que continuó aumentando del día 28 al día 56 en los animales control de ambos grupos, había disminuido claramente en los animales con transducción de rAAV.T β 4 (figura 14a,b). La fracción de eyección, otro parámetro para la función miocárdica global, mostró una disminución adicional de los valores del día 28 al día 56 en los animales control, mientras que el valor después de la sobreexpresión de T β 4 mejoró claramente en ambos grupos (tipo salvaje y diabetes) (figuras 14c,d; promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

Ejemplo 6: Efectos de terapia génica de T β 4 en miocardio de cerdos con hipercolesterolemia

En animales control con 9 semanas de alimentación rica en grasas, se mostró una clara reducción de los capilares (células PECAM-1 positivas) en el área isquémica (figura 15 a). Mediante la administración de rAAV.T β 4 pudieron aumentarse claramente los capilares (células PECAM-1 positivas) en el área isquémica. Mediante la transducción de rAAV.T β 4 pudo aumentarse también el crecimiento colateral en animales con niveles de colesterol elevados (figura 15 b). Esto condujo también a un mejor llenado de la sección vascular distal en el área isquémica, tal como se muestra en la puntuación de Rentrop (figura 15 c; promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

La presión diastólica final ventricular izquierda, un parámetro para la función miocárdica global, que continuó aumentando del día 28 al día 56 en los animales control, había disminuido claramente en los animales con transducción de rAAV.T β 4 (figuras 16a, b). La fracción de eyección, otro parámetro para la función miocárdica global, mostró una caída de los valores del día 28 al día 56 en los animales control, mientras que el valor mejoró claramente después de la sobreexpresión de T β 4 (figuras 16c, d). La función miocárdica regional, medida como acortamiento del segmento subendocárdico en reposo y con frecuencia cardíaca aumentada (130 y 150 latidos por minuto) mostró una reserva funcional mejorada en animales con una terapia con rAAV.T β 4 (figura 16 e; promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

Ejemplo 7: Papel de MRTF-A y T β 4 para la integridad vascular en ratones con septicemia

La figura 17 a muestra el protocolo de los ensayos de septicemia en ratones. Se indujo septicemia 14 días después del tratamiento con rAAV (rAAV.MRTF-A o rAAV.T β 4) mediante inyección de LPS. En siete puntos de tiempo después de la inducción de septicemia (12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) se efectuó una valoración de los síntomas por medio de la tabla representada en la figura 17b. La transducción de MRTF-A o T β 4 por medio de rAAV antes de la inducción de septicemia conduce a valores de la presión arterial periférica elevados después de 12 y 24 horas (figura 17 c). En el transcurso de hasta 36 horas después de la septicemia, los animales tratados con rAAV.T β 4 y rAAV.MRTF-A muestran puntuaciones de síntomas claramente más bajas en comparación con los animales control tratados con rAAV.LacZ (figura 17 d). La supervivencia acumulativa después de septicemia inducida por LPS está claramente mejorada por la sobreexpresión de T β 4 y MRTF-A (figura 17 e; promedio $\pm$ desviación estándar; $n=7-15$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

Los análisis histológicos de las células endoteliales (células PECAM-1 positivas) y los pericitos (células NG-2 positivas) mostraron en el corazón y en los músculos periféricos un número de células elevado (figuras 18a, b) en animales tratados con T β 4 en comparación con animales control, que se transdujeron con rAAV.LacZ. En las figuras 18c y d se muestran imágenes de ejemplo y un análisis cuantitativo para una medición de permeabilidad por medio de dextrano de alto peso molecular marcado con fluorescencia 6 horas después de la inducción de septicemia. En este sentido se mostró una salida claramente reducida del indicador después de la sobreexpresión de T β 4 en comparación con los animales control transducidos con LacZ (promedio $\pm$ desviación estándar; $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,001$).

Material y métodos

Los experimentos descritos en los ejemplos se llevaron a cabo con el uso de las técnicas que se describen a continuación.

Reactivos

Todos los medios de cultivo celular y productos químicos fueron adquiridos de SIGMA (Deisenhofen), a menos que se indique lo contrario. El agente de contraste Solustrast 370 fue suministrado por Byk Gulden (Konstanz).

5 Vectores virales adenoasociados

Los vectores recombinantes rAAV.MRTF-A, rAAV.T β 4, rAAV.T β 4m, rAAV.LacZ, rAAV.Cre y rAAV.MRTF-ARNhc se produjeron por medio de transfección triple de células U293. Un plásmido codificó para el transgén bajo el control de un promotor de CMV, que estaba flanqueado por repeticiones de AAV2 terminales internas que actúan en cis. En el caso de rAAV.MRTF-A, este fue el plásmido pAAV-CMV-mMRTF-A (SEQ ID NO: 16). Sin embargo, también puede usarse un plásmido que codifica el MRTF-A humano, por ejemplo, pAAV-CMV-hMRTF-A (SEQ ID NO: 17). Un segundo plásmido proporcionó AAV2 rep y AAV9 cap en trans (Bish et al., Hum. Gene Ther. 2008, 19:1359-68), mientras que un tercer plásmido (delta F6) complementó funciones auxiliares adenovirales. Se recogieron células 48 horas después y se purificaron vectores por medio de gradientes de cloruro de cesio tal se describió anteriormente (Lehrke et al., Cell Metab 2005, 1:297-308). Los títulos virales se midieron por medio de PCR en tiempo real frente a la cola de poliA de la bGH del vector (secuencias de cebador, véase Tabla 1). Plásmidos trans y auxiliares se proporcionaron amablemente por James M. Wilson, Universidad de Pensilvania.

Cultivo celular

SatisFection (TPP AG, Trasadingen, Suiza) se usó para la transfección de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC), células endoteliales murinas (bEnd.3) y la línea celular miocítica HL-1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 100 μ l de medio DMEM libre de suero y de antibiótico con 3 μ l de reactivo de transfección SatisFection.

Formación de tubos in vitro y experimentos de cocultivo

Para los experimentos de Matrigel se transfectaron HMEC con pcDNA, MRTF-A, T β 4 $\pm$ ARNhc de MRTF, T β 4m (que carecía del motivo de unión a actina G KLKKTET; Bednarek et al., J. Biol. Chem. 2008, 283:1534-44) o T β 4 $\pm$ ARNhc de CCN1. Las células (8000 células por pocillo) se sembraron sobre Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San José, EE. UU.) en medio de crecimiento endotelial basal con una adición de suero de ternera fetal al 5 % y se tomaron fotografías después de 18 horas. Se cuantificó el número de anillos por campo de baja potencia.

En experimentos de cocultivo, se transdujeron células HL-1 con rAAV.T β 4 $\pm$ ARNhc de CCN1, rAAV.MRTF-ARNhc o rAAV.T β 4m (1x10⁶ partículas de AAV6 por célula). HL-1 y HMEC incrustadas en Matrigel (8.000 por pocillo) se separaron físicamente por una membrana semipermeable. Después de 18 h, se retiraron las células HL-1 y se cuantificó la formación de anillos por campo de baja potencia.

La atracción de células periciticas CH3/10T1/2 a las células endoteliales murinas (bEnd.3) se probó después de la transfección del compartimento endotelial con pcDNA, MRTF-A o T β 4 $\pm$ ARNhc de CCN2 por medio de SatisFection (Agilent, Böblingen). Se tiñeron células endoteliales con DiD (rojo, Vybrant®, Life Technologies) y se sembraron sobre Matrigel (12.000 células por pocillo). Después de 6 h se agregaron células de tipo pericito teñidas con DiO (Vybrant®, Life Technologies) (2.000 células por pocillo) y se permitió la migración a los tubos durante 2 h. Entonces, por medio de microscopía láser confocal (Carl Zeiss, Jena) se realizaron fotografías de cocultivo.

Prueba de migración

Las HMEC se transfectaron con los transgenes indicados tal como se describe anteriormente. Se cultivaron 60.000 células en pocillos con un inserto en forma de tira (ibidi GmbH, Planegg) hasta confluencia. Después de 48 horas, los núcleos celulares se tiñeron con Syto62. Entonces se fijaron las células con PFA al 2 %, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo anti-MRTF-A (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.) y un anticuerpo secundario (acoplado con Alexa 488, Invitrogen, Karlsruhe). Las fotografías se hicieron con microscopía láser confocal (Carl Zeiss, Jena) y la intensidad de fluorescencia media del área de 100 núcleos celulares, identificada a través de Syto62, se evaluó automáticamente con el navegador de imágenes LS5.

Análisis por HPLC

La determinación de T β 4 se llevó a cabo como se describió anteriormente (Huff et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007, 1112:451-7). A este respecto se destruyeron muestras de tejido mediante adición de ácido perclórico 4 M con tiodietanol al 1 % hasta una concentración final de 0,4 M. Las mezclas se homogeneizaron, se incubaron durante 30 min a 4 °C y se centrifugaron durante 10 min a 20.000 g. El sobrenadante se analizó por cromatografía de fase inversa. En conejos se diferenciaron T β 4 endógena y exógena mediante detección de T β 4-Ala específica de conejo.

Prueba de luciferasa

Para determinar la actividad de luciferasa dependiente de MRTF, se transfectaron HMEC y células HL-1 con p3DA.Luc (= un constructo de un promotor sintético con tres copias del sitio de unión a c-fos-SRF y una caja TATA de actina de tipo 5 *Xenopus* más un sitio de inicio de la transcripción insertado en pGL3; Posern et al., Mol. Biol. Cell 2002, 13:4167-78), un gen indicador de SRF, y 930 ng de pcDNA, Tβ4 o Tβ4m. Se garantizaron eficiencias de transfección comparables mediante cotransfección de 50 ng de ptkRL (indicador de luciferasa de renilla). Se obtuvieron pellas de las células y se lisaron, se purificaron adicionalmente mediante centrifugación durante 10 min a 4 °C y 13.000 rpm y se usaron para la determinación de la actividad luciferasa de luciérnaga y la actividad luciferasa de renilla. Se calculó la relación de actividad luciferasa de luciérnaga/renilla.

10 *Modulación y detección de ARN*

Se llevaron a cabo PCR en tiempo real (RT-PCR) con colorante verde SYBR (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad, Múnich) y se midieron en un ciclador iQ (Bio-Rad, Múnich). Los cebadores están expuestos en la Tabla 1. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a GAPDH y se representaron como múltiplo de la situación de control de pcDNA. El procedimiento de 2-DDCt comparativo se llevó a cabo como se describió anteriormente (Pfosser et al., Cardiovasc Res 2005, 65:728-36).

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de MRTF-A

Para el análisis de proteína MRTF-A total, se homogeneizaron muestras de cultivo celular y de tejido en 1 ml de tampón de lisis que contenía Tris 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 140 mM, Nonidet P-40 (NP-40) al 1 %, leupeptina 0,005 mg/ml, aprotinina 0,01 mg/ml, PMSF 1 mM, pH 7,5. Se separaron 60 µg de extractos de proteína total mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10 % (SDS-PAGE). Después de la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, EE. UU.), se bloquearon con leche desnatada al 5 % en tampón PBS con Tween 20 al 0,1 % (PBS-T) y se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios frente a MRTF-A (C-19; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.). Después de lavar la membrana, se incubó con un anticuerpo secundario (IgG de burro anti-cabra, conjugado con HRP; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.) y se desarrolló con un reactivo quimioluminiscente (ECL; GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Para el análisis del contenido de proteína de MRTF-A en el núcleo celular o el citosol, se llevó a cabo una separación con los reactivos Ne-Per® para la extracción citoplasmática y del núcleo celular (Thermo Scientific, Rockford, EE. UU.) de acuerdo con las directrices del fabricante. Entonces se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió anteriormente. Como control de proteína se usó o bien α-tubulina (6A204; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA) o, para la fracción de núcleo celular, Lamin B1 (ZL-5; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.).

Ensayos en animales

El cuidado de los animales y todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de las directrices alemanas y NIH para animales y fueron aprobados por la Comisión de Bienestar Animal del Gobierno de la Alta Baviera (AZ 55.2-1-54-2531-26/09, 130/08, 140/07). Todos los ensayos en animales se llevaron a cabo en el Centro Walter Brendel de Medicina Experimental en Múnich.

Isquemia de pata trasera de ratón

Se produjo isquemia unilateral en la pata trasera de la pata derecha en ratones C56B16 machos de la misma edad (Charles River, Sulzfeld) así como en ratones MRTF-A^{+/-}/B^{flox/flox}, MRTF-A^{-/-}/B^{flox/flox}, MRTF-A^{+/-}/B^{-/-}Vi- (= MRTF-A^{+/-}/B^{flox/flox} + 3x10¹² rAAV.cre), MRTF-A^{-/-}/B^{-/-}Vi- (= MRTF-A^{-/-}/B^{flox/flox} + 3x10¹² rAAV.cre) (Weinl et al., J. Clin. Invest. 2013, 123:2193-226) y ratones CCN1^{-/-}Vi (= Cyr61^{flox/flox} + 3x10¹² rAAV.Cre; en el laboratorio de Ralf Adams en el Instituto Max Planck de Biomedicina Molecular en Münster) tal como se describió anteriormente (Limboung et al., Nat. Protocols 2009, 4:1737-48). Antes de la inducción de isquemia (día -14) se administraron 3x10¹² partículas de virus AAV9 tal como se describe (Qin et al., PLoS ONE 2013, 8:e61831) por vía intramuscular en la pata derecha. El día 0, la pata izquierda se sometió a una operación simulada, mientras que la pata derecha se ligó la arteria femoral. Las mediciones para la recuperación del flujo sanguíneo posisquémico se llevaron a cabo mediante citometría de flujo Doppler con láser (Moor Instruments, Devon, Inglaterra). Se tomaron mediciones justo antes y después de la operación, en el día 3 y el día 7. Los resultados se están indicados como relación de pata derecha con respecto a izquierda, incluida la resta del valor de tejido de fondo. El análisis de RT-PCR y HPLC se llevaron a cabo el día 5 después de la inducción de isquemia; Se extrajo tejido de patas tratadas y no tratadas. Análisis de la densidad capilar y de la maduración vascular se llevaron a cabo el día 7 en todos los grupos por medio de PECAM-1-(sc1506, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.) y tinción de NG2 (en ratones MRTF-A^{+/-}/B^{flox/flox}; Chemicon, Nuremberg) en muestras de tejido congeladas del músculo gastrocnemio y músculo aductor.

Isquemia de pata trasera de conejo

El día 0, se extrajo la arteria femoral completa de la pata derecha en conejos de Nueva Zelanda (Pfosser et al., Cardiovasc. Res. 2005, 65: 728-736) y administración de rAAV (5x10¹² partículas de virus) por medio de inyección intramuscular en la pata trasera derecha, tal como se indica. En el día 7 y 35, se llevó a cabo la angiografía mediante

inyección de medio de contraste (Solutrast 370, Byk Gulden, Konstanz) en la pata isquémica con un inyector automático (Harvard Apparatus, Freiburg). Además se usaron microesferas fluorescentes (15 µm, Molecular Probes®, Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.) para mediciones de flujo sanguíneo en tejido isquémico y no isquémico. Para el análisis del flujo sanguíneo, las muestras de tejido se digirieron tal como se describió previamente (Thein et al., Comput. Methods Programs Biomed. 2000, 61:11-21; Kupatt et al., J Am Coll Cardiol 2010, 56:414-22). El análisis de fluorescencia se llevó a cabo con un lector de placas de microtitulación Tecan Sapphire 2 a las longitudes de onda de emisión de 680 nm, 638 nm, 598 nm, 545 nm, 515 nm, 468 nm y 424 nm, dependiendo del colorante fluorescente usado. Se llevaron a cabo cálculos tal como se describió anteriormente (Lebherz et al., Endothelium 2003, 10:257-65). El análisis de la densidad capilar y la maduración vascular se llevó a cabo con PECAM-1-(sc1506, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.) y tinción de NG2 (en ratones MRTF-A^{+/-}/B^{flax/flax}, Chemicon, Nuremberg) en muestras de tejido congeladas de la pata isquémica y no isquémica.

Isquemia miocárdica crónica en cerdos

Los cerdos fueron anestesiados y tratados tal como se describió anteriormente (von Degenfeld et al., J. Am. Coll. Cardiol. 2003, 42:1120-8). Para ello, se implantó un stent de estrechamiento recubierto con una membrana de PTFE en el RCx proximal, lo que condujo a una reducción del 75 % del flujo sanguíneo. La localización correcta del stent y la permeabilidad del vaso distal se garantizaron mediante la inyección de medio de contraste. En el día 28, las mediciones de línea de base para la función miocárdica global (presión diastólica final en el ventrículo izquierdo = LVEDP, fracción de eyección = FE) y perfusión miocárdica (microesferas fluorescentes, 15 µm, Molecular Probes®). Entonces se llevó a cabo una retroinfusión selectiva regulada por presión en la vena cardiaca grande que drena el miocardio perfundido con RCx para 5×10^{12} partículas de virus rAAV.MRTF-A y rAAV.Tβ4±rAAV.MRTFA-ARNhc. En el día 56, se repitieron las mediciones para la función miocárdica global y el flujo sanguíneo y se determinó la función miocárdica regional del área isquémica y no isquémica (en reposo y con estimulación cardiaca rápida, 130 y 150 lpm).

Se llevó a cabo una angiografía póstuma para el cálculo del valor colateral y el análisis por medio de puntuación de Rentrop (0 = sin llenado, 1 = llenado de rama lateral; 2 = llenado de vaso principal parcial; 3 = llenado de vaso principal completo). Se extrajo tejido para análisis del flujo sanguíneo miocárdico regional e inmunohistología.

Función miocárdica global

El día 28 y el día 56, se examinó la función miocárdica global (LVEDP) mediante un catéter de punta de presión Millar (Sonometrics, Ontario, Canadá). Un angiograma del ventrículo izquierdo para la función miocárdica global se llevó a cabo el día 28 y el día 56. La fracción de eyección se obtuvo por planimetría de las imágenes de angiograma telesistólicas y telediasistólicas (Imagen J 1.43u, National Institute of Health, EE. UU.).

Función miocárdica regional

El día 56 después de la inducción de isquemia, se llevó a cabo una esternotomía y se colocaron cristales de ultrasonido de manera subendocárdica en el área no isquémica (región de control de LAD) y en el área isquémica (región perfundida con Cx) de manera estandarizada. El acortamiento del segmento subendocárdico (SES, Sonometrics, Ontario, Canadá) se examinó en reposo y con una frecuencia cardiaca aumentada (reserva funcional, frecuencia 130 y 150) y se evaluó fuera de línea en función de ECG.

Flujo sanguíneo miocárdico regional

El análisis del flujo sanguíneo miocárdico regional se llevó a cabo el día 28 (antes del tratamiento con rAAV) y el día 56 (28 días después del tratamiento con AAV) por medio de microesferas fluorescentes (Molecular Probes®). Las microesferas (15 µm, 5×10^6 partículas por inyección) se inyectaron en el ventrículo izquierdo a través de un catéter flexible. Las mediciones del flujo sanguíneo se llevaron a cabo en reposo y a una frecuencia cardiaca aumentada (130 lpm). El contenido de fluorescencia se analizó por medio de un lector de placas de microtitulación Tecan Sapphire 2 y se llevó a cabo un cálculo del flujo sanguíneo miocárdico regional, o bien como ml/g de tejido absoluto o como relación con respecto a la región no isquémica en reposo (% de flujo sanguíneo no isquémico; Kupatt et al., J Am Coll Cardiol 2010, 56:414-22).

Histología

Las muestras de tejido del área isquémica y no isquémica se examinaron para determinar la densidad capilar (células PECAM-1 positivas, rojo) y revestimiento de pericitos (células NG2 positivas, verde). La tinción de capilares se llevó a cabo con un anticuerpo anti-CD31 (SC1506, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, EE. UU.) y un anticuerpo secundario marcado con rodamina, mientras que la maduración vascular se cuantificó mediante tinción conjunta de pericitos (anticuerpos anti-NG2 AB5320, Millipore, Billerica, EE. UU.). Se tomaron fotografías de la región isquémica y no isquémica con una ampliación de campo de alto potencia (40 veces), y se cuantificaron 5 imágenes independientes por región (isquémica y no isquémica) y animal.

Eficiencia de transducción de rAAV

Para la evaluación de la eficiencia de transducción de rAAV, se trataron los ratones, conejos y cerdos control con rAAV.LacZ. Se hicieron secciones de criostato de los animales transducidos con LacZ y se tiñeron para determinar la β -galactosidasa (tinción azul). Además, se llevó a cabo RT-PCR para los distintos transgenes con el uso de los cebadores descritos en la Tabla 1 y se analizó tal como se describió anteriormente.

Ratón con gen indicador Tomato

Estos ratones que expresan homocigotos mT/mG (Jackson Laboratory, Bar Harbor, EE. UU.) expresan sitios loxP en ambos lados de un tdTomato (mT) dirigido a membrana y un eGFP dirigido a membrana (Muzumdar et al., Genesis 2007, 45:593-605). La expresión de Cre a través de rAAV.Cre para la determinación de la eficiencia de transducción de virus deletó mT (fluorescencia roja) en las células y permitió la expresión de eGFP (fluorescencia verde) en las mismas células (figura 4b).

Procedimientos estadísticos

Los resultados se indican como valores medios $\pm$ desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el uso de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cada vez que se encontró un efecto significativo ($p < 0,05$), se realizaron múltiples pruebas comparativas entre los grupos con el procedimiento de Student-Newman-Keul (IBM SPSS 19.0; IBM, Chicago, EE. UU.). Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas en $p < 0,05$.

Tabla 1

Secuencias de cebador usadas para PCR:		
BGH en sentido 5'	5'-TCT AGT TGC CAG CCA TCT GTT GT-3'	SEQ ID NO:2
BGH en sentido 3'	5'-TGG GAG TGG CAC CTT CCA-3'	SEQ ID NO:3
GAPDH en sentido 5'	5'-AAT TCA ACG GCA CAG TCA AG-3'	SEQ ID NO:4
GAPDH en sentido 3'	5'-ATG GTG GTG AAG ACA CCA GT-3'	SEQ ID NO:5
T β 4 en sentido 5'	5'-TCA TCG ATA TGT CTG ACA AAC-3'	SEQ ID NO:6
T β 4 en sentido 3'	5'-CAG CTT GCT TCT CTT GTT CAA-3'	SEQ ID NO:7
MRTF-A en sentido 5'	5'-AAT CCA TGG GTC GAC GGT ATC GAT-3'	SEQ ID NO:8
MRTF-A en sentido 3'	5'-ATA CCA TGG TCA GGC ACC GGG CTT-3'	SEQ ID NO:9
CCN1 (CYR61) en sentido 5'	5'-GCT AAA CAA CTC AAC GAG GA-3'	SEQ ID NO:10
CCN1 (CYR61) en sentido 3'	5'-GGC TGC AAC TGC GCT CCT CTG-3'	SEQ ID NO:11
CCN2 (CTGF) en sentido 5'	5'-CCC TAG CTG CCT ACC GAC T-3'	SEQ ID NO:12
CCN2 (CTGF) en sentido 3'	5'-CAT TCC ACA GGT CTT AGA ACA GG-3'	SEQ ID NO:13
Ang2 en sentido 5'	5'-TCG AAT ACG ATG ACT CGG TG-3'	SEQ ID NO:14
Ang2 en sentido 3'	5'-GTT TGT CCC TAT TTC TAT C-3'	SEQ ID NO:15

<110> KUPATT, Christian HINKEL, Rabea

<120> VECTORES AAV PARA TERAPIA GÉNICA VASCULAR EN CARDIOPATÍA CORONARIA E ISQUEMIA PERIFÉRICA

<130> 233-001DE

<150> DE 10 2014 207 153.4

<151> 14-04-2014

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 69

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 791 877 T3

	<400> 1		
	gaucocccgca uggagcuggu ggagaagaau ucaagagauu cuucuccacc agcuccaugu		60
	uuuuggaaa		69
5	<210> 2 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<400> 2 tctagttgcc agccatctgt tgt	23	
15	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<400> 3 tgggagtggc acctcca	18	
25	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<400> 4 aattcaacgg cacagtcaag	20	
35	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
40	<400> 5 atggtggtga agacaccagt	20	
45	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<400> 6 tcatcgatat gtctgacaaa c	21	
55	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<400> 7 cagcttgctt ctctgttca a	21	
	<210> 8 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<400> 8 aatccatggg tcgacggtat cgat	24	
	<210> 9 <211> 24 <212> ADN		

ES 2 791 877 T3

	<213> Secuencia artificial	
5	<400> 9 ataccatggt caggcaccgg gctt	24
10	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<400> 10 gctaaacaac tcaacgagga	20
15	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<400> 11 ggctgcaact gcgctcctct g	21
25	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<400> 12 ccctagctgc ctaccgact	19
35	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<400> 13 cattccacag gtcttagaac agg	23
45	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<400> 14 tcgaatacga tgactcgggtg	20
50	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<400> 15 gtttgtccct atttctatc	19
55	<210> 16 <211> 7890 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<400> 16	

ES 2 791 877 T3

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	60
acgacagggt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	180
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccagattta	240
attaaggctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc	300
gacctttggt cggccggcct cagtgagcga gcgagcgcg cagagaggag tggccaactc	360
catcactagg ggttccttgt agttaatgat taaccgcga tgctacttat ctacgtagcc	420
atgctctagg aagatcggaa ttcgccctta agctagctag ttattaatag taatcaatta	480
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg	540
gcccgcctgg ctgaccgcc aacgacccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc	600
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa	660
ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgccccct attgacgtca	720
atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg ccagtagcat gaccttatgg gactttccta	780
cttggcagta catctacgta ttagtcacg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt	840
acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact caccggggatt tccaagtctc caccacattg	900

acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttcacaaa tgctcgtaaca	960
actccgcccc attgacgcaa atgggoggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca	1020
gagctgggtt agtgaaccgt cagatcctgc agaagttggt cgtgaggcac tgggcaggta	1080
agtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga gaccaataga aactgggctt gtcgagacag	1140
agaagactct tgcgtttctg ataggcacct attggtctta ctgacatcca ctttgccttt	1200
ctctccacag gtgtccaggc ggccgctcaa acagacacca taacatgctg ccccttccg	1260
tcattgctgt gaatgggctg gacggaggag gggctggcga aaatgacgac gagccagtgc	1320
tcctgtctct gtctgcggcc ccagaccccc agagcgaagc tgttgccaat gaactgcagg	1380
agctgtccct gcagcccgag ctgactctag gcctccatcc tgggaggaaac cccaatttac	1440
ctccacttag tgagcgggaag aatgtgctgc agttgaagct ccagcagcgg cggacccggg	1500
aggaactggt gagccaaggg atcatgccgc ctttgaaaag ccccgctgca tttcatgagc	1560
agagaagaag cctggagcgg gccaggaccg aggactattt gaaacggaag atccgttccc	1620
ggcccagag agcagagctg gtcaggatgc acattctgga agagacctcg gctgagcctt	1680
cgctccaggc caagcagctg aagctgaaga gagccaggct ggctgatgac ctcaatgaaa	1740
agattgcaca gaggcctggc cccatggagc tgggtggagaa gaatatcctg cctgtggagt	1800
ccagcctgaa ggaggctatc attgtgggcc aggtaaatta cccaaaggta gcagacagtt	1860
cctccttcga cgaggacagc agcgatgcc tgtctcctga gcagcctgcc agccatgagt	1920
cccagggttc agtgccatca cccttggagt cccgagtcag tgatccactg cccagtgcc	1980
cctccatata acccaactcag gttctttctc aactcccaat ggctccggat cctggagaga	2040
cgctttttct ggagagcag cctcctctgc ctcccgacc tctgctgcc ccaagcctag	2100
ccaatggaag catcgctccc actgccaaag ctgctccac actcatcaag caaagccaac	2160
ccaagtctgc cagcgagaaa tcacagcgca gcaagaaggc caaggagctg aagccaaagg	2220
tgaagaagct caagtaccac cagtacatcc ccccgacca gaagcaggac aagggggcgc	2280
ccgccatgga ctccctctat gccaaagatcc tgcagcagca gcagctcttc ctgcagctgc	2340
agatcctcaa ccagcagcag cagcagcagc agcaacagca ctacaactac caggccatcc	2400
tgctgcccc tcccaagccc tgggtgaga ctctggaag cagtgcctt accccatcac	2460
gcagcctctc caccagtagc agccccagct caggcacccc agggcccagc gggctggcac	2520
gccagagcag caccgcacta gctgccaaac caggagccct gccagccaac ctggatgaca	2580
tgaagggtgg agagctgaag caagaactga agttgcggtc ctttcccgtc tcaggcacca	2640
agacagagct gatagaacgc ctgcgtgcct accaagacca agtcagccca gctccaggag	2700
ccccaaggc ccctgccacc acctctgtgc tgtccaaggc tgggtaggta gtggtcgct	2760

tccctgcggc	cctgctaagc	acagggctcag	ctcttgtaac	agcaggcctt	gcaccagctg	2820
agatgggtgg	ggccacagta	accagcaatg	gcatgggtgaa	gtttggcagc	acaggctcca	2880
caccccccg	gtctcccacc	ccttcagagc	gctcactgct	cagcacgggt	gatgagaatt	2940
ccacacctgg	ggatgccttt	ggtgaaatgg	tgacatcgcc	gctgacacag	ctcaccctgc	3000
aggcctcccc	actgcagatc	gtgaaggagg	agggtgcccc	tgctgcgctc	tgctgtctaa	3060
gccctgggtg	tcgggctgag	ctggagggac	tggacaagga	ccagatgctg	caggagaagg	3120
acaagcagat	tgaggagctg	acccgaatgc	tccaacagaa	gcagcagctg	gttgagctgc	3180
tgcggtctaca	gctggagcag	cagaagcggg	cccagcagcc	agccccagcc	agcagccctg	3240
tgaagaggga	aagtggtttc	tccagttgcc	agctgagctg	ccagccccag	ggctctgccc	3300
atgcttttgg	ctctggccta	gtggttccca	ctaccaacca	tggagacact	caggccccag	3360
cgccagagtc	cccacctgtg	gtggtgaagc	aggaagctgg	gccacctgag	ccagatctgg	3420
ccccagctc	ccagctgctc	ttgggctccc	agggcaccag	cttcctcaag	agggtcagcc	3480
ctcctaccct	ggtcactgac	tctacagga	ctcacctcat	cctcactgtg	accaataaga	3540
gtgctgatgg	ccctggcttg	cctgcaggga	gccccagca	gcccttgctc	cagcctggtt	3600
ctccagcccc	tggtccacct	gccagatgg	acctggagca	cccacctcag	cctccgtttg	3660
caacccccac	atctctgctg	aagaaggagc	cccctggtta	tgaagagact	gtgaccagc	3720
agcctaagca	gcaggaaaat	ggctcctcca	gtcagcacat	ggatgatctg	tttgatattc	3780
ttattcagag	tggagagatt	tcagcagatt	tcaaagagcc	accatcccta	ccaggcaagg	3840
aaaagtcacc	tccagcagca	gcagcgtatg	ggcctccatt	gacaccacaa	ccctgcctt	3900
tgagtgaact	cccccaagct	gctcctccac	caggttcccc	cacctccca	gggcgccttg	3960
aagacttcct	ggagagcagc	acagggctgc	ccctgctgac	aagtgggcac	gagggaccag	4020
aacccctttc	cctcattgat	gacctccaca	gccagatgct	gagcagctcc	gccatcctgg	4080
accaccccc	atcacccatg	gacacctctg	aattgcactt	tgctcctgag	cccagcagtg	4140
gtatgggcct	ggacctggct	gttggccacc	tggacagcat	ggactggctg	gagctgtcgt	4200
ctggtggccc	tgtgctcagc	ctggctcccc	tcagcactgc	agccccagc	ctcttctcga	4260
tggacttcct	ggatggacac	gacttgacgc	tccactggga	ttcctgcttg	taccatacgc	4320
acgtgccaga	ctagaagctt	ggatccaatc	aacctctgga	ttacaaaatt	tgtgaaagat	4380
tgactgggat	tcttaactat	gttgctcctt	ttacgctatg	tggatacgtc	gctttaatgc	4440
ctttgtatca	tgctattgct	tcccgtatgg	ctttcatttt	ctcctccttg	tataaatcct	4500
ggttgctgtc	tctttatgag	gagttgtggc	ccgttgctcag	gcaacgtggc	gtggtgtgca	4560
ctgtgtttgc	tgacgcaacc	cccactgggt	ggggcattgc	caccacctgt	cagctccttt	4620
ccgggacttt	cgctttcccc	ctccctattg	ccacggcgga	actcatcgcc	gcctgccttg	4680

cccgtgctg	gacaggggct	cggtctgttg	gcaactgacaa	ttccgtgggtg	ttgtcgggga	4740
agctgacgtc	ctttccatgg	ctgctcgccct	gtgttgccac	ctggattctg	cgcgggacgt	4800
ccttctgcta	cgtcccttcg	gccctcaatc	cagcggacct	tccttcccgc	ggcctgctgc	4860
cggctctgcg	gcctcttccg	cgtcttcgag	atctgcctcg	actgtgcctt	ctagttgcca	4920
gccatctgtt	gtttgcccct	cccccgtagc	ttccttgacc	ctggaaggtg	ccactcccac	4980
tgtcctttcc	taataaaatg	aggaaattgc	atcgcatgtt	ctgagtaggt	gtcattctat	5040
tctggggggg	gggggtggggc	aggacagcaa	gggggaggat	tgggaagaca	atagcaggca	5100
tgctggggac	tcgagttaag	ggcgaattcc	cgattaggat	cttcctagag	catggctacg	5160
tagataagta	gcatggcggg	ttaatcatta	actacaagga	acccctagt	atggagttgg	5220
ccactccctc	tctgcgcgct	cgctcgctca	ctgaggccgg	gcgaccaaag	gtcgcccgac	5280
gcccgggctt	tgcccgggcg	gcctcagtga	gcgagcgagc	gcgcagcctt	aattaaccta	5340
attcactggc	cgtcgtttta	caacgtcgtg	actgggaaaa	ccctggcggt	acccaactta	5400
atcgcccttg	agcacatccc	cctttcgcca	gctggcgtaa	tagcgaagag	gcccgcaccg	5460
atcgcccttc	ccaacagttg	cgcagcctga	atggcgaatg	ggacgcgccc	tgtagcggcg	5520
cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgtacactt	gccagcgccc	5580
tagcgcgccg	tcctttcgct	ttcttccctt	cctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	5640
gtcaagctct	aaatcggggg	ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcacctcg	5700
acccccaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtagtgg	gccatcgccc	cgatagacgg	5760
tttttcgccc	tttgacgctg	gagttcacgt	tcctcaatag	tggactcttg	ttccaaactg	5820
gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	ataagggatt	tttccgattt	5880
cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	tttaacaaaa	5940
tattaacggt	tataatttca	ggtggcatct	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	acccctattt	6000
gtttattttt	ctaaatacat	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	6060
tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccctta	6120
ttcccttttt	tgcggcattt	tgcttccctg	tttttgctca	cccagaaacg	ctggtgaaag	6180
taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	gatctcaata	6240
gtggttaagat	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	agcactttta	6300
aagttctgct	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	6360
gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	gaaaagcatc	6420
ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	gcagtgtctg	cataaccatg	agtgataaca	6480
ctgcggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gctttttttgc	6540

acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcggtggga accggagctg aatgaagcca 6600
 taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagtaat ggtaacaacg ttgcgcaaac 6660
 tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg 6720
 cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg ttatttctg 6780
 ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg 6840
 gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac 6900
 gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc 6960
 aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct 7020
 aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc 7080
 actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 7140
 gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg 7200
 atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 7260
 atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 7320
 ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tggcagtggc gataagtcgt 7380
 gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa 7440
 cgggggggtc gtgcacacag cccagcttg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 7500
 tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 7560
 cggtaagcgg cagggctcga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct 7620
 ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 7680
 gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 7740
 tggccttttg ctgcggtttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg 7800
 ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc 7860
 gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaaag 7890

<210> 17
 <211> 7596
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<400> 17

agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 acgacagggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
 tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccagattta 240
 attaaggctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccc ggcgtcgggc 300

gacctttggt	cgcccgccct	cagtgagcga	gcgagcgcg	agagagggag	tggccaactc	360
catcactagg	ggttccttgt	agttaatgat	taaccgcgca	tgctacttat	ctacgtagcc	420
atgctctagg	aagatcgga	ttcgccctta	agctagctag	ttattaatag	taatcaatta	480
cggggtcatt	agttcatagc	ccatatatgg	agttccgagt	tacataactt	acggtaaagt	540
gcccgcctgg	ctgaccgccc	aacgaccccc	gcccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	600
ccatagtaac	gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggaggagtat	ttacggtaaa	660
ctgcccactt	ggcagtacat	caagtgtatc	atatgccaa	tacgccccct	attgacgtca	720
atgacggtaa	atggcccgcc	tggcattatg	cccagtacat	gaccttatgg	gactttccta	780
cttggcagta	catctacgta	ttagtcatcg	ctattaccat	ggatgatgcg	ttttggcagt	840
acatcaatgg	gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	cacccattg	900
acgtcaatgg	gagtttgttt	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctgtaaca	960
actccgcccc	attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	1020
gagctggttt	agtgaaccgt	cagatcctgc	agaagttggg	cgtgaggcac	tgggcaggta	1080
agtatcaagg	ttacaagaca	ggtttaagga	gaccaataga	aactgggctt	gtcgagacag	1140
agaagactct	tgcgtttctg	ataggcacct	attggtctta	ctgacatcca	ctttgccttt	1200
ctctccacag	gtgtccaggc	ggccgctcaa	acagacacca	taacatgccg	cctttgaaaa	1260
gtccagccgc	atttcatgag	cagagaagga	gcttgagcgc	ggccaggaca	gaggactatc	1320
tcaaacggaa	gattcgttcc	cggccggaga	gatcggagct	ggtcaggatg	cacattttgg	1380
aagagacctc	ggctgagcca	tccctccagg	ccaagcagct	gaagctgaag	agagccagac	1440
tagccgatga	cctcaatgag	aagattgcac	agaggcctgg	ccccatggag	ctgggtggaga	1500
agaacatcct	tcctgttgag	tccagcctga	aggaagccat	cattgtgggc	caggtgaact	1560
atcccaaagt	agcagacagc	tcttccttcg	atgaggacag	cagcgatgcc	ttatcccccg	1620
agcagcctgc	cagccatgag	tcccaggggt	ctgtgccgtc	accctggag	gcccaggtca	1680
gcgaaccact	gctcagtgcc	acctctgcat	ccccaccca	ggttgtgtct	caacttccga	1740
tgggccggga	ttccagagaa	atgcttttcc	tggcagagca	gcctcctctg	cctccccac	1800
ctctgctgcc	tcccagcctc	accaatggaa	ccactatccc	cactgccaag	tccaccccc	1860
cactcattaa	gcaaagccaa	cccaagtctg	ccagtgagaa	gtcacagcgc	agcaagaagg	1920
ccaaggagct	gaagccaaag	gtgaagaagc	tcaagtacca	ccagtacatc	ccccggacc	1980
agaagcagga	caggggggca	cccccatgg	actcatccta	cgccaagatc	ctgcagcagc	2040
agcagctctt	cctccagctg	cagatcctca	accagcagca	gcagcagcac	cacaactacc	2100
aggccatcct	gcctgccccg	ccaaagtcag	caggcgaggc	cctgggaagc	agcgggaccc	2160
cccagtagc	cagcctctcc	actaccaata	gcagctccag	ctcgggcgcc	cctgggcctt	2220

gtgggctggc	acgtcagaac	agcacctcac	tgactggcaa	gccgggagcc	ctgccggcca	2280
acctggacga	catgaaggtg	gcagagctga	agcaggagct	gaagttgcga	tactgcctg	2340
tctcgggcac	caaaactgag	ctgattgagc	gccttcgagc	ctatcaagac	caaactcagc	2400
ctgtgccagg	agcccccaag	gccccctgcc	ccacctctat	cctgcacaag	gctggcgagg	2460
tgggtggtagc	cttcccagcg	gcccggctga	gcacggggcc	agccctggtg	gcagcaggcc	2520
tggctccagc	tgaggtggtg	gtggccacgg	tggccagcag	tggggtggtg	aagtttggca	2580
gcacgggctc	cacgcccccc	gtgtctccca	ccccctcgga	gcgctcactg	ctcagcacgg	2640
gcgatgaaaa	ctccaccccc	ggggacacct	ttgggtgagat	ggtgacatca	cctctgacgc	2700
agctgaccct	gcaggcctcg	ccactgcaga	tctctgtgaa	ggaggagggc	ccccgggccc	2760
ggtcctgttg	cctgagccct	ggggggcggg	cggagctaga	ggggcgcgac	aaggaccaga	2820
tgctgcagga	gaaagacaag	cagatcgagg	cgtgacgcg	catgctccgg	cagaagcagc	2880
agctggtgga	gcggctcaag	ctgcagctgg	agcaggagaa	gcgagcccag	cagcccgcgc	2940
ccgccccgc	ccccctcggc	acccccgtga	agcaggagaa	cagcttctcc	agctgccagc	3000
tgagccagca	gccccctggc	cccgctcacc	cattcaacct	cagcctggcg	gccccagcca	3060
ccaaccacat	agacccttgt	gctgtggccc	cggggccccc	gtccgtggtg	gtgaagcagg	3120
aagccttgca	gcctgagccc	gagccggtcc	ccgcccccca	gttgcttctg	gggcctcagg	3180
gccccagcct	catcaagggg	gttgcacctc	ccacctcat	caccgactcc	acagggacct	3240
accttgtcct	caccgtgacc	aataagaatg	cagacagccc	tggcctgtcc	agtgggagcc	3300
cccagcagcc	ctcgtcccag	cctggctctc	cagcgccctg	ccccctctgc	cagatggacc	3360
tggagcaccc	actgcagccc	ctctttggga	ccccacttc	tctgctgaag	aaggaaccac	3420
ctggctatga	ggaagccatg	agccagcagc	ccaaacagca	ggaaaatggt	tcctcaagcc	3480
agcagatgga	cgacctgttt	gacattctca	ttcagagcgg	agaaatttca	gcagatttca	3540
aggagccgcc	atccctgcc	gggaaggaga	agccatcccc	gaagacagtc	tgtgggtccc	3600
ccctggcagc	acagccatca	ccttctgctg	agctccccc	ggctgcccc	cctcctccag	3660
gctcacccctc	cctccctgga	cgcctggagg	acttcctgga	gagcagcacg	gggctgcccc	3720
tgctgaccag	tgggcatgac	gggcccagagc	ccctttccct	cattgacgac	ctccatagcc	3780
agatgctgag	cagcactgcc	atcctggacc	accccccgtc	acccatggac	acctcggaat	3840
tgcactttgt	tcctgagccc	agcagcacca	tgggcctgga	cctggctgat	ggccacctgg	3900
acagcatgga	ctggctggag	ctgtcgtcag	gtggctccgt	gctgagccta	gccccctca	3960
gcaccacagc	ccccagcctc	ttctccacag	acttcctcga	tggccatgat	ttgcagctgc	4020
actgggattc	ctgctttag	aagcttggtg	ccaatcaacc	tctggattac	aaaatttgtg	4080

aaagattgac	tggtattcct	aactatgttg	ctccttttac	gctatgtgga	tacgctgctt	4140
taatgccttt	gtatcatgct	attgcttccc	gtatggcttt	cattttctcc	tccttgtata	4200
aatcctgggt	gctgtctctt	tatgaggagt	tgtggcccg	tgtcaggcaa	cgtggcgtgg	4260
tgtgcactgt	gtttgctgac	gcaaccccc	ctggttggg	cattgccacc	acctgtcagc	4320
tcctttccgg	gaacttctgt	ttccccctcc	ctattgccac	ggcggaaactc	atcgccgcct	4380
gccttgcccg	ctgctggaca	ggggctcggc	tgttgggcac	tgacaattcc	gtggtgttgt	4440
cggggaagct	gaagtccttt	ccatggctgc	tcgcctgtgt	tgccacctgg	attctgcgcg	4500
ggacgtcctt	ctgctacgtc	ccttcggccc	tcaatccagc	ggaccttctt	ccccgcggcc	4560
tgctgccggc	tctgcggcct	cttccgcgtc	ttcgagatct	gcctcgactg	tgccttctag	4620
ttgccagcca	tctgttgttt	gccccctccc	cgtgccttcc	ttgaccttgg	aaggtgccac	4680
tccactgtc	ctttccta	aaaatgagga	aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	4740
ttctattctg	gggggtgggg	tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	4800
caggcatgct	ggggactcga	gttaagggcg	aattcccgat	taggatcttc	ctagagcatg	4860
gctacgtaga	taagtagcat	ggcgggttaa	tcattaacta	caaggaaccc	ctagtgatgg	4920
agttggccac	tcctctctg	cgcgctcgt	cgtcactga	ggccgggcga	ccaaaggtcg	4980
cccgacgccc	gggctttgcc	cgggcgccct	cagtgagcga	gcgagcgcg	agccttaatt	5040
aacctaattc	actggccgtc	gttttacaac	gtcgtgactg	ggaaaaccct	ggcgttaccc	5100
aacttaatcg	ccttgacgca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaatagc	gaagaggccc	5160
gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatgggac	gcgccctgta	5220
gcggcgcat	aagcgcgcg	ggtgtggtgg	ttacgcgcag	cgtgaccgct	acacttgcca	5280
gcgccctagc	gcccgtcct	ttcgctttct	tccttctctt	tctcgccacg	ttcgccggct	5340
ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	ccgatttagt	gctttacggc	5400
acctcgaccc	caaaaaactt	gattaggggtg	atggttcacg	tagtgggcca	tcgccccgat	5460
agacggtttt	tcgccccctt	acgctggagt	tcacgttcct	caatagtggg	ctcttgttcc	5520
aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	tgatttataa	gggatttttc	5580
cgatttcggc	ctattgggtt	aaaaatgagc	tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaatttta	5640
acaaaatatt	aacgtttata	atttcagggtg	gcacctttcg	gggaaatgtg	cgcgggaaccc	5700
ctatttgttt	atttttctaa	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	5760
gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	5820
cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccga	gaaacgctgg	5880
tgaaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	5940
tcaatagtgg	taagatcctt	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	6000

cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccggg caagagcaac	6060
tccgtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa	6120
agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg	6180
ataaactgc gcccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt	6240
ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg	6300
aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agtaatggt acaacgttgc	6360
gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga	6420
tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta	6480
ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc	6540
cagatggtaa gccctcccg atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg	6600
atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt	6660
cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa	6720
ggatctaggt gaagatcctt ttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt	6780
cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt	6840
ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt	6900
tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggttcagc agagcgcaga	6960
taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag	7020
caccgcctac atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata	7080
agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg	7140
gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga	7200
gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca	7260
ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa	7320
acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttccgccact ctgacttgag cgtcgatttt	7380
tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac	7440
ggttcctggc cttttgctgc ggttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt	7500
ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgcgc agccgaacga	7560
ccgagcgcag cgagtcagt agcgaggaag cggaag	7596

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral adenoasociado (vector AAV), que comprende un gen que codifica para un factor de transcripción relacionado con miocardina A (MRTF-A).
- 5 2. El vector AAV de acuerdo con la reivindicación 1, siendo el vector AAV un AAV9 o un vector AAV pseudotipado con proteínas de envuelta de AAV9, preferentemente AAV2.9, AAV1.9 o AAV6.9.
- 10 3. El vector AAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, encontrándose el gen bajo el control de un promotor cardiospecífico.
4. El vector AAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, encontrándose el gen bajo el control de un promotor de CMV, de un promotor de MRC2, de un promotor de MyoD o de un promotor de troponina.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un vector AAV de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Un vector AAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso como medicamento.
7. Un vector AAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de cardiopatía coronaria o isquemia periférica en un mamífero, preferentemente en un ser humano, un ratón, un conejo o un cerdo.
- 25 8. El vector AAV o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde la cardiopatía coronaria es infarto de miocardio agudo, isquemia miocárdica, angina de pecho estable y/o miocardio hibernante.
9. El vector AAV o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el mamífero es un paciente humano sin opción.

FIG. 1 a-d

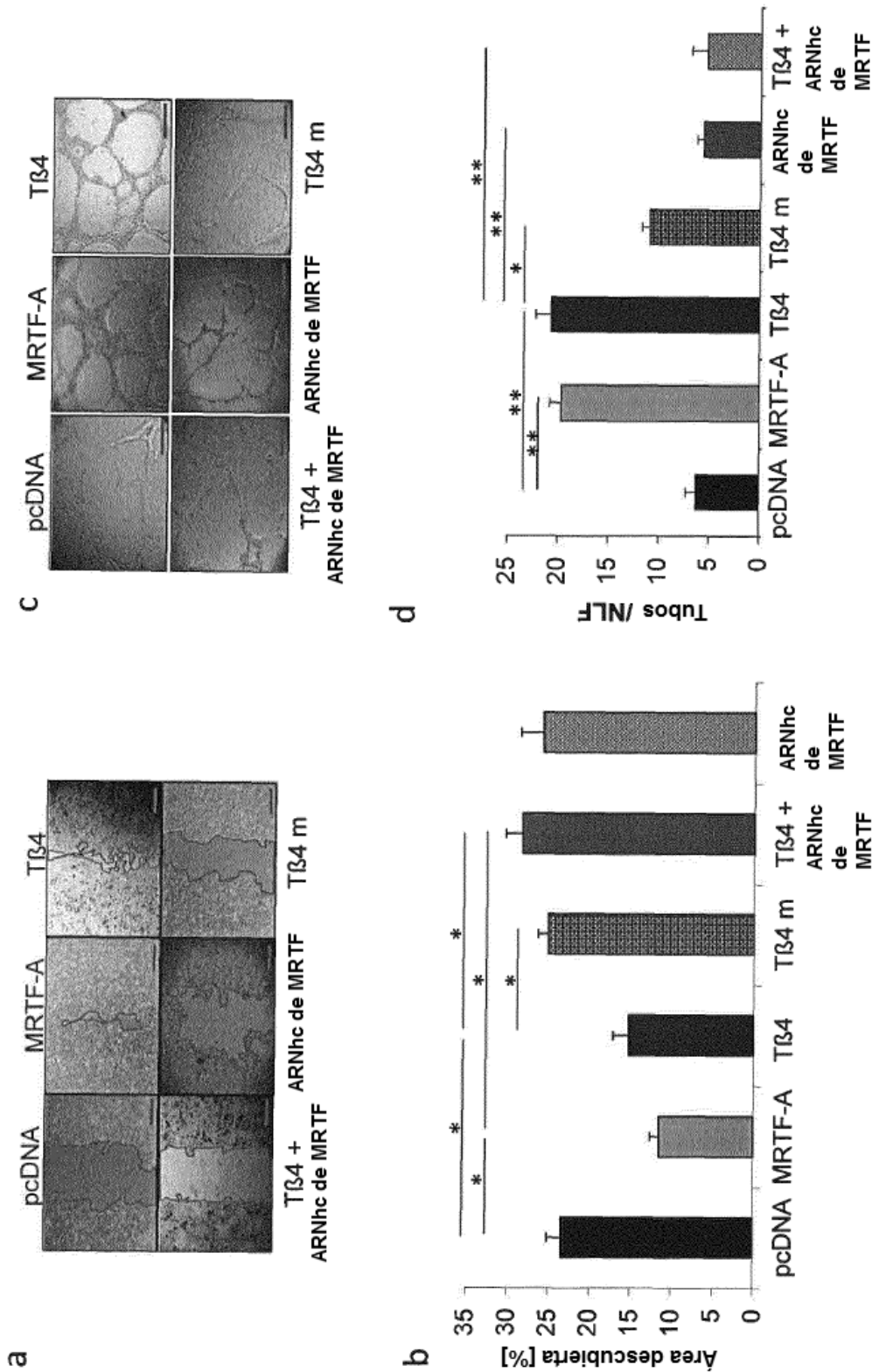


FIG. 1 e-h

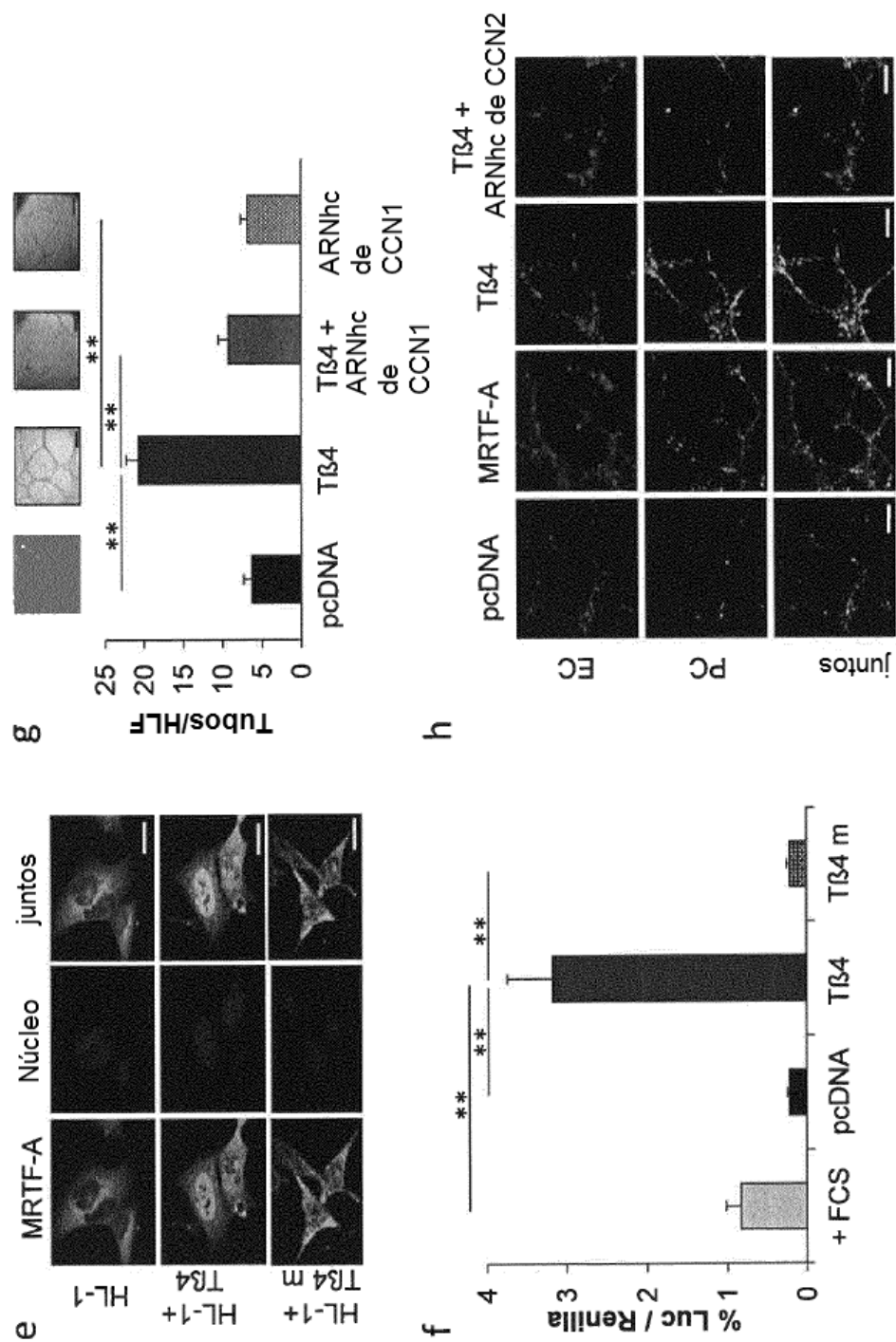


FIG. 1i

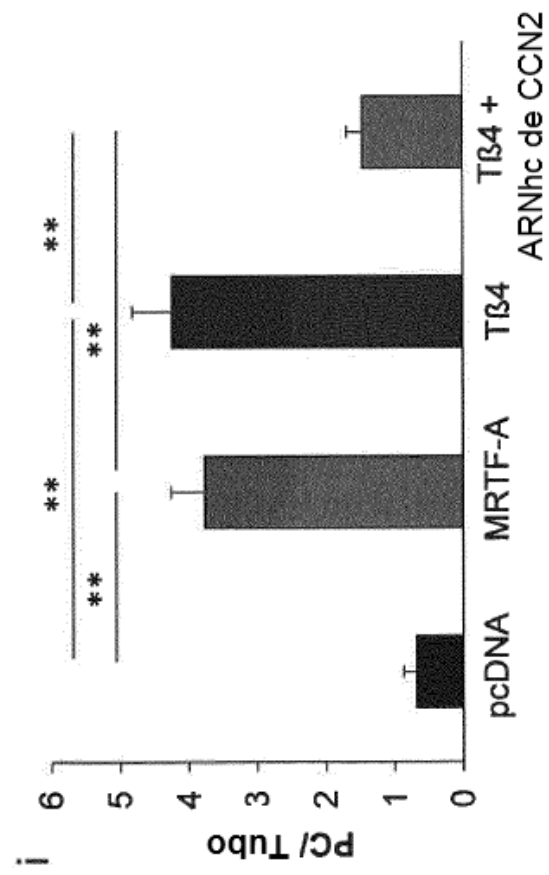


FIG. 2 a-b

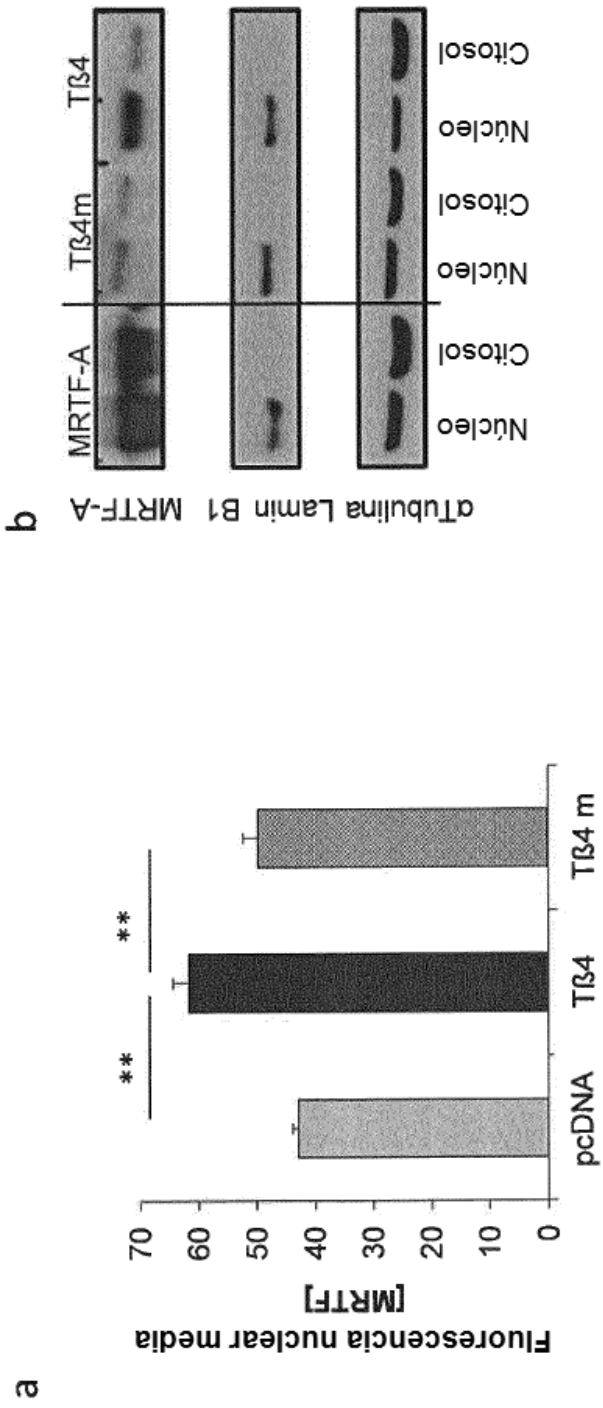


FIG. 2 c-d

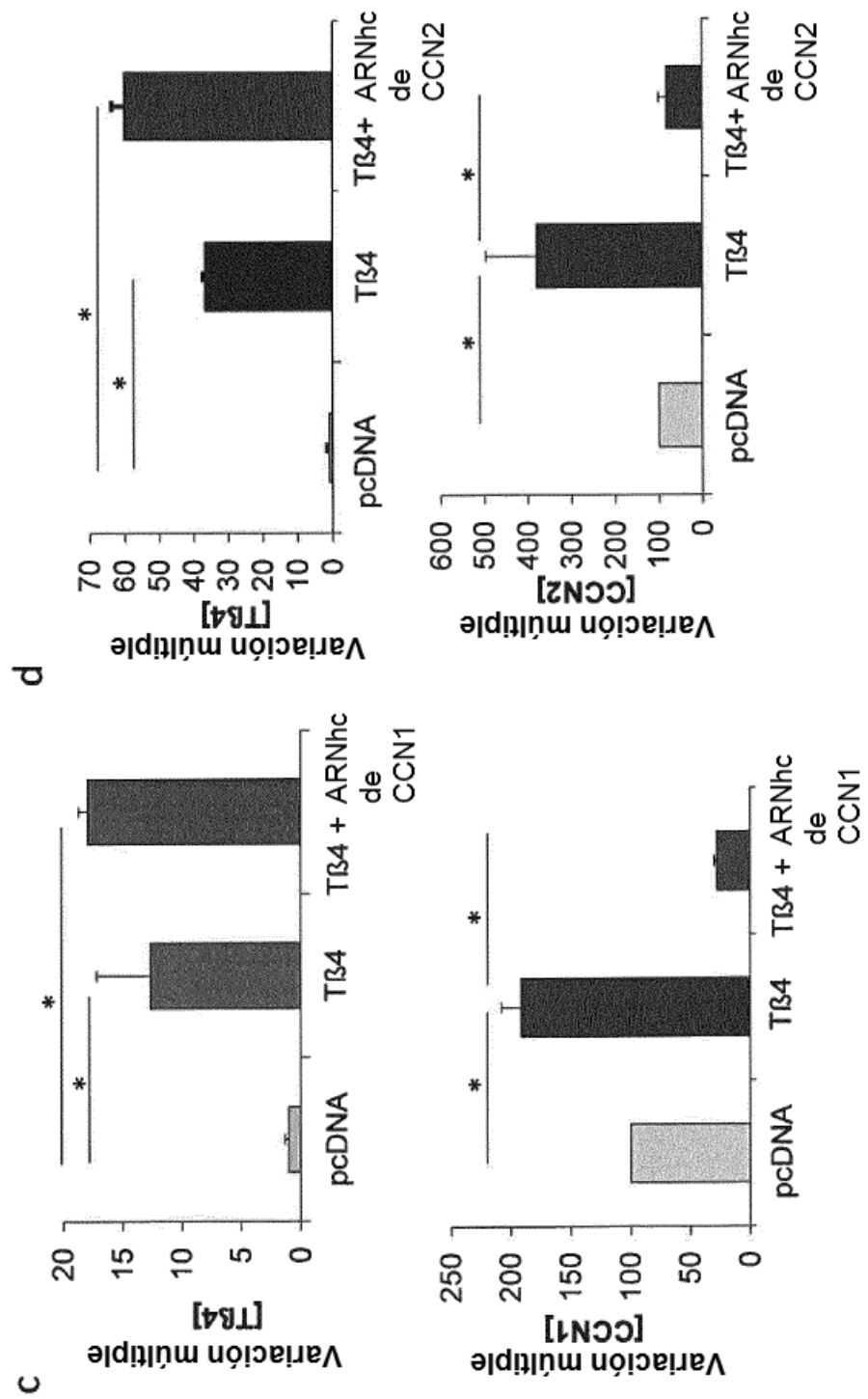


FIG. 2 e-h

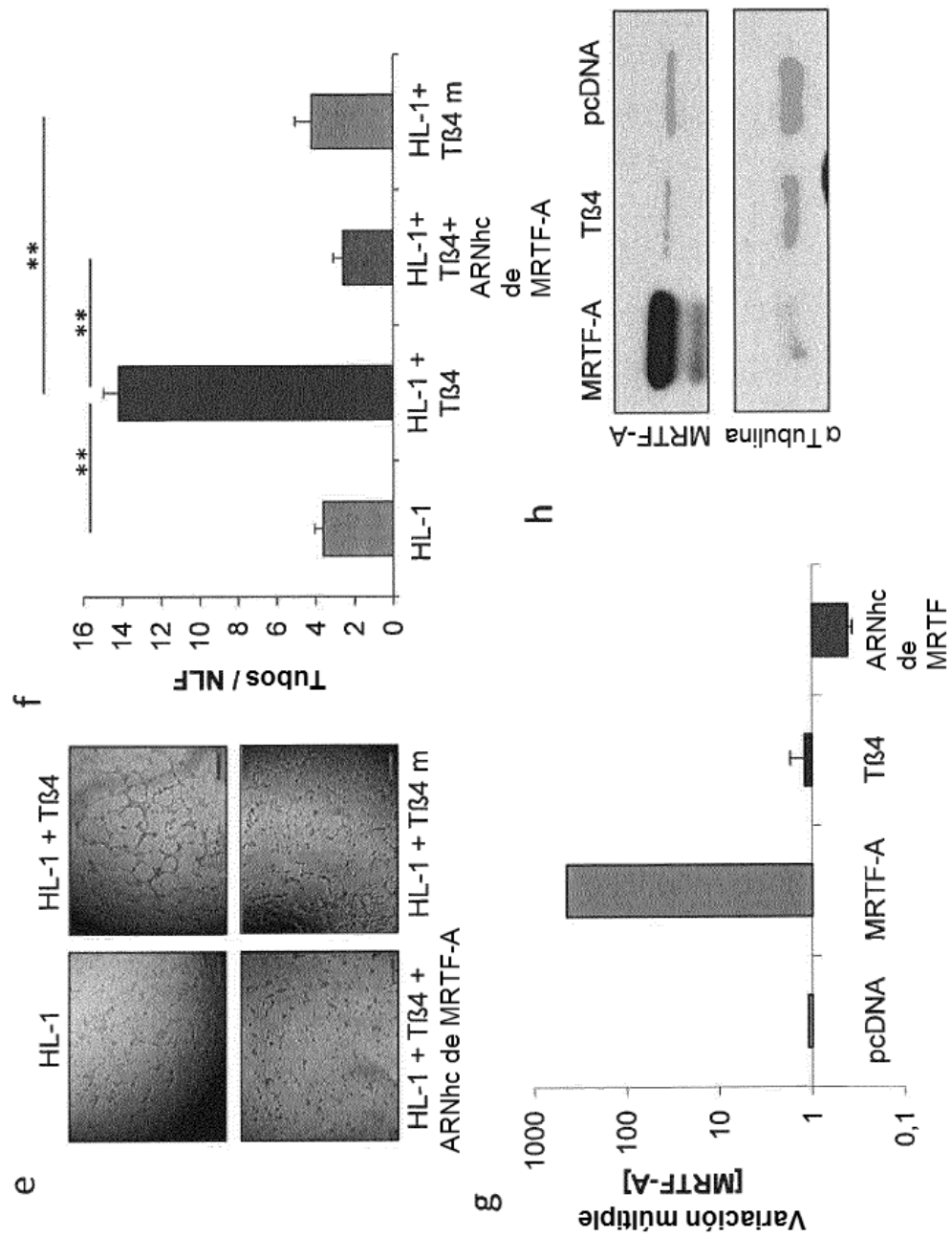


FIG. 2 i-i

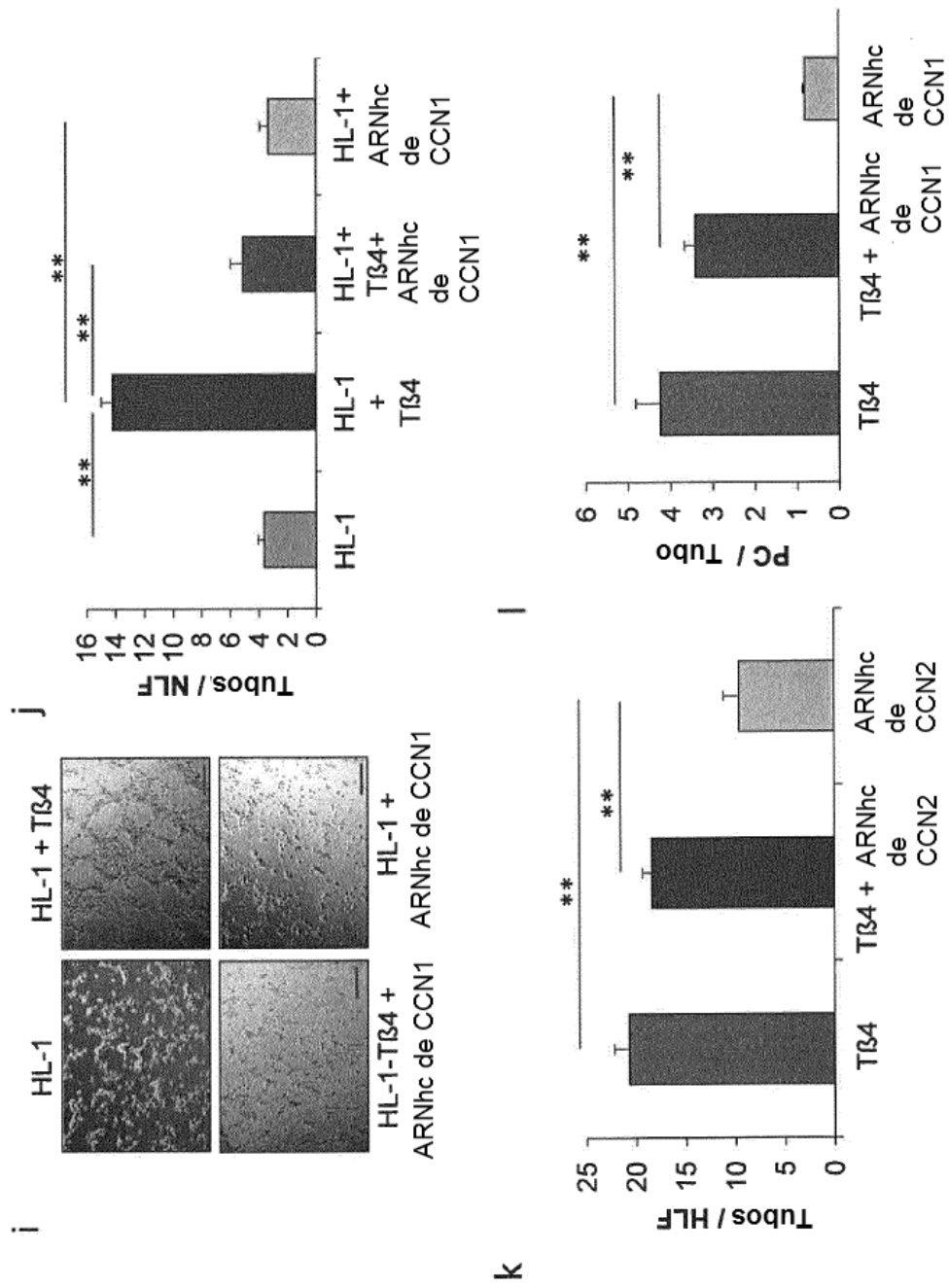


FIG. 3 a-b

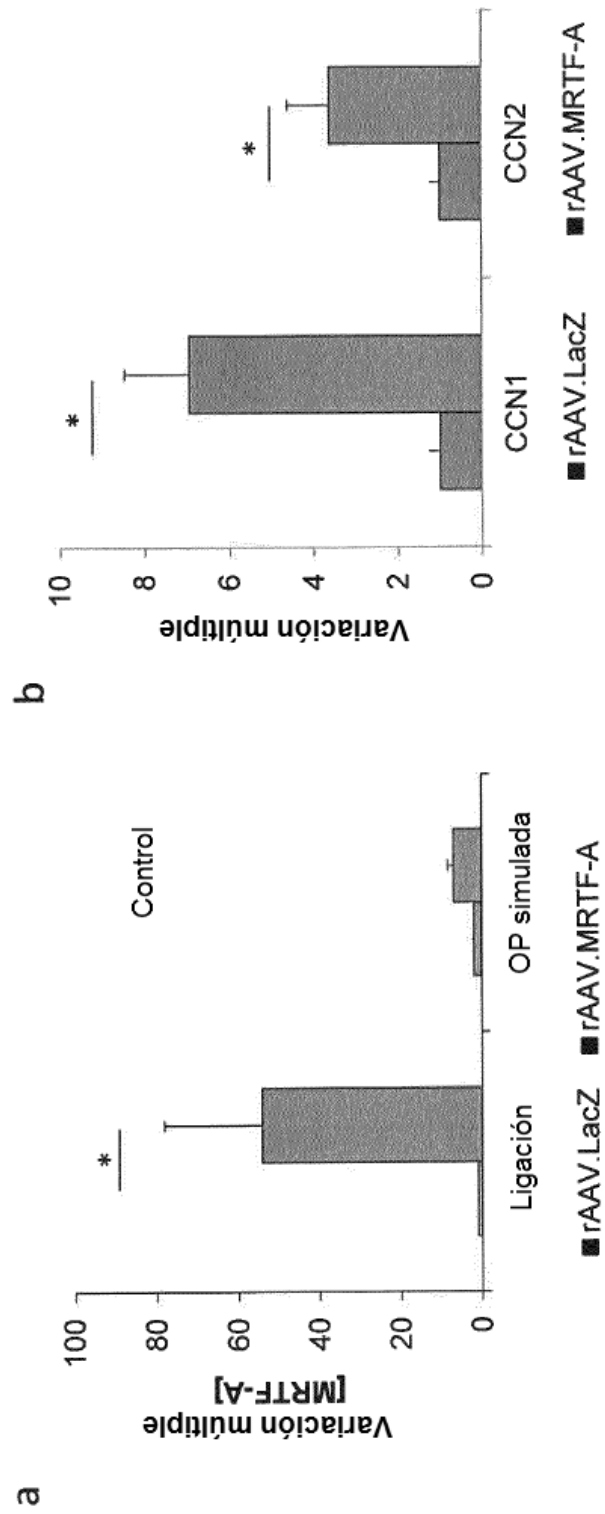


FIG. 3 c-d

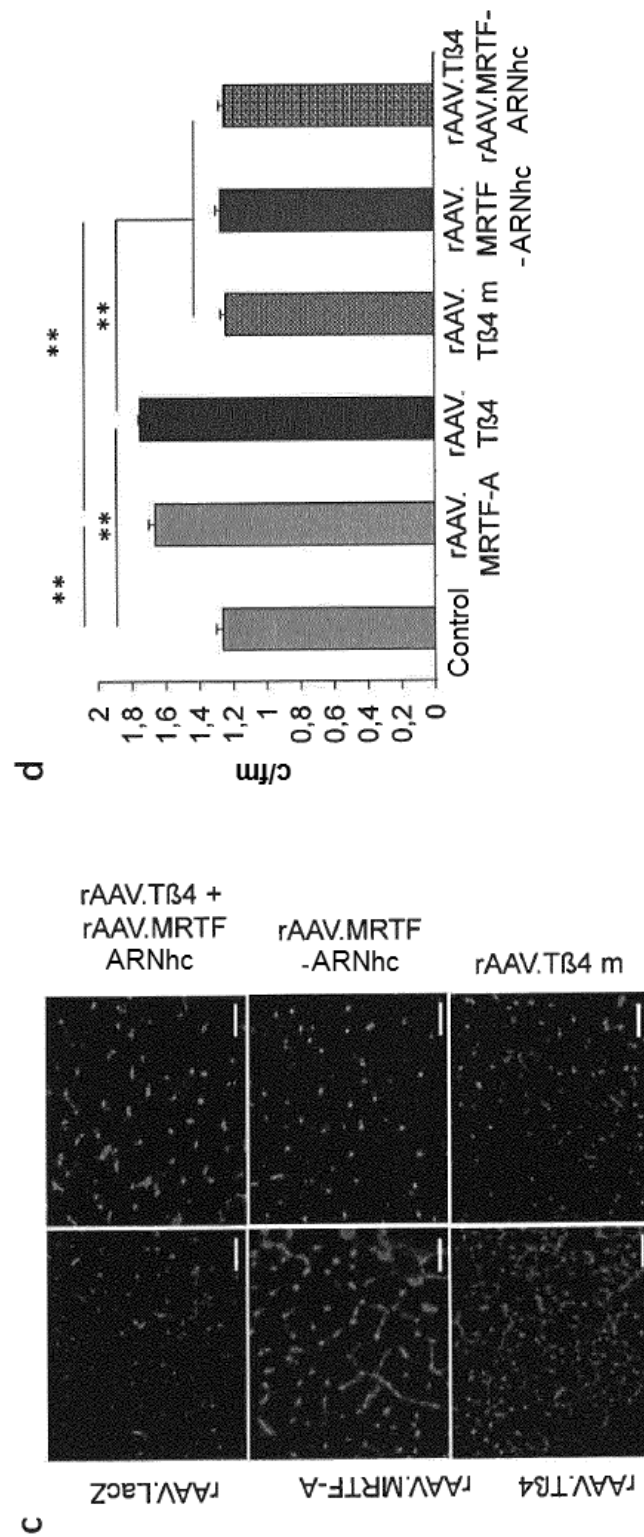


FIG. 3 e-f

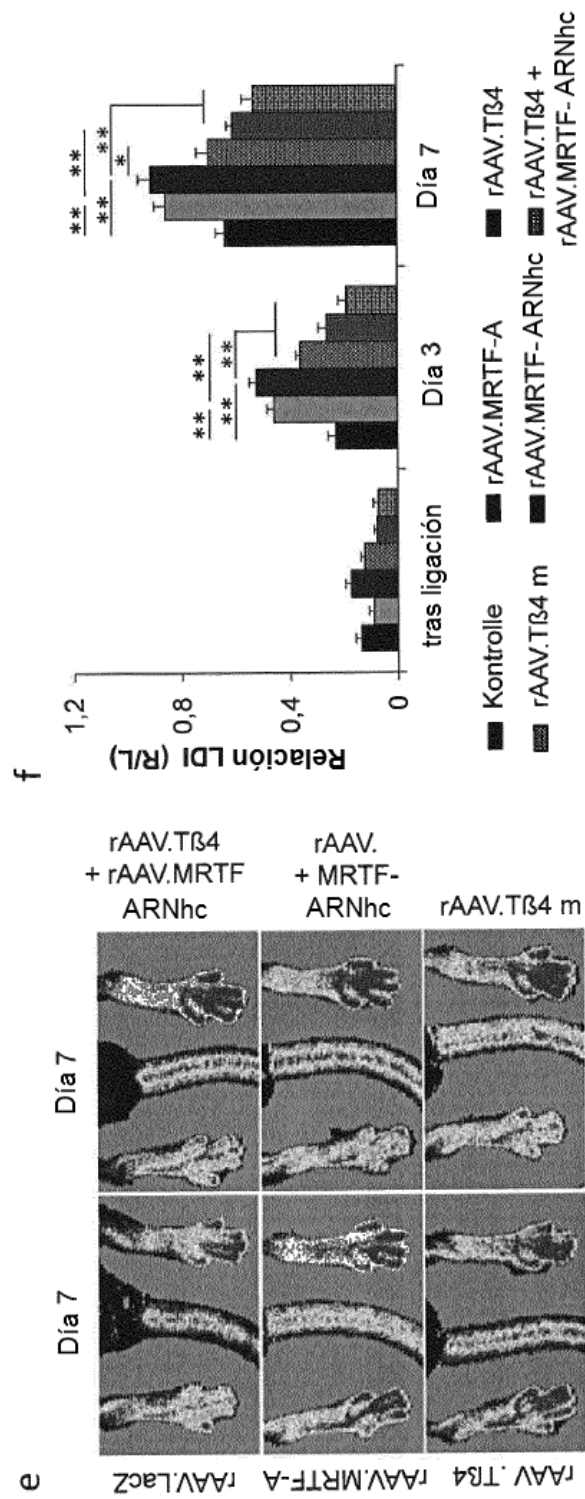


FIG. 3 g-h

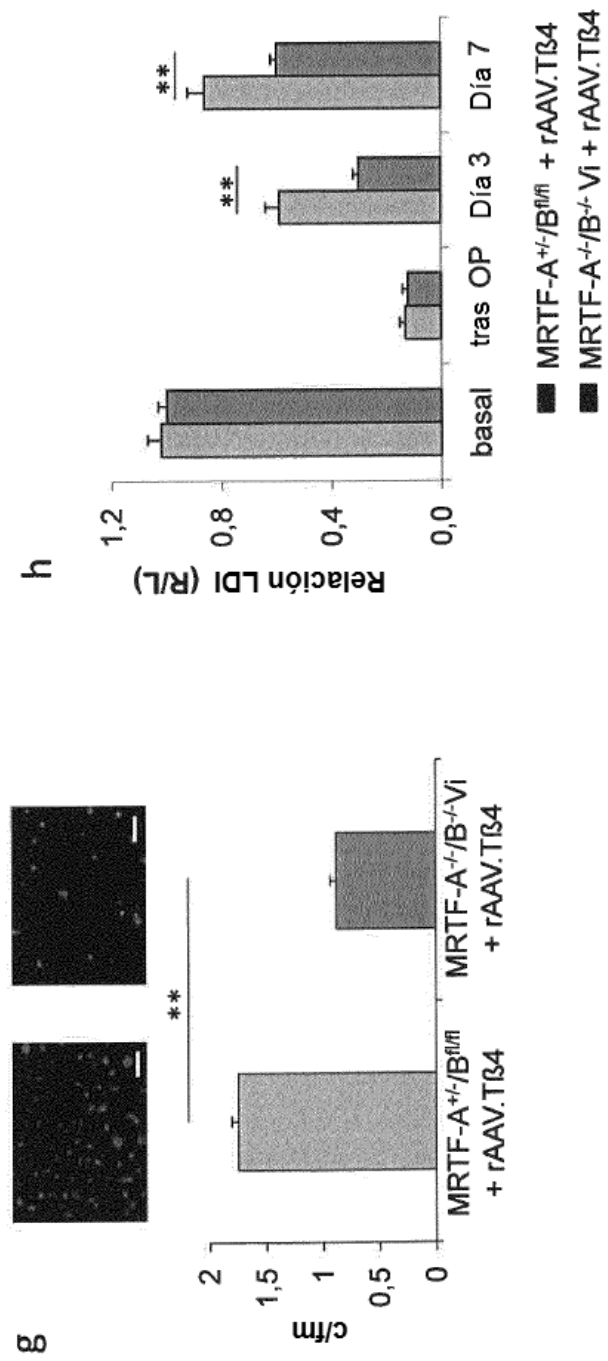


FIG. 3 i-l

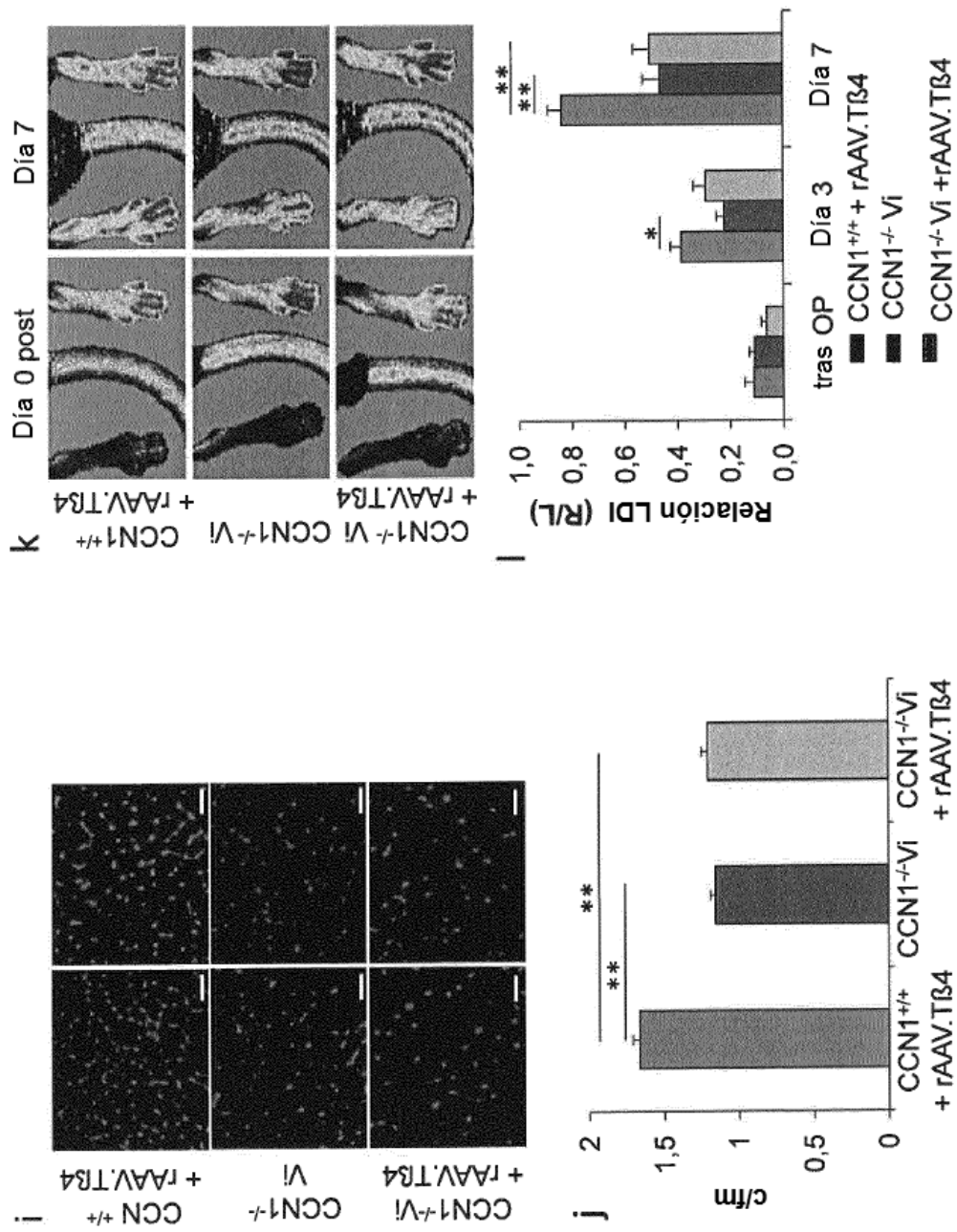


FIG. 4a

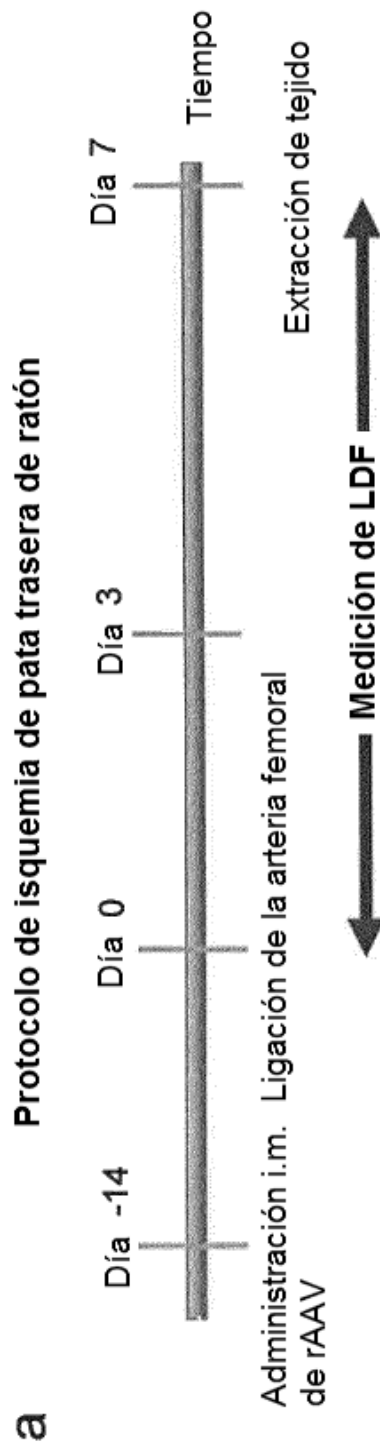
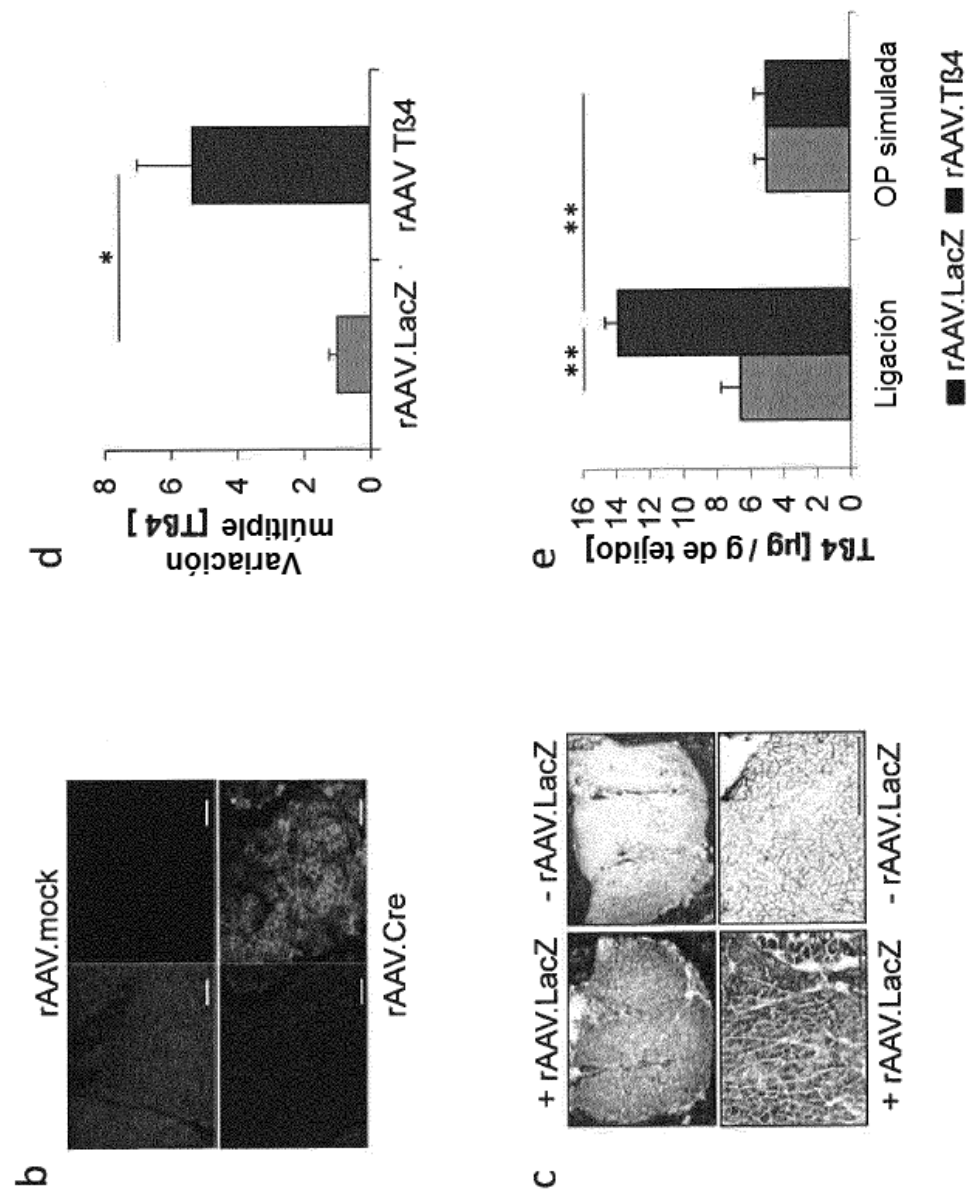


FIG. 4 b-e



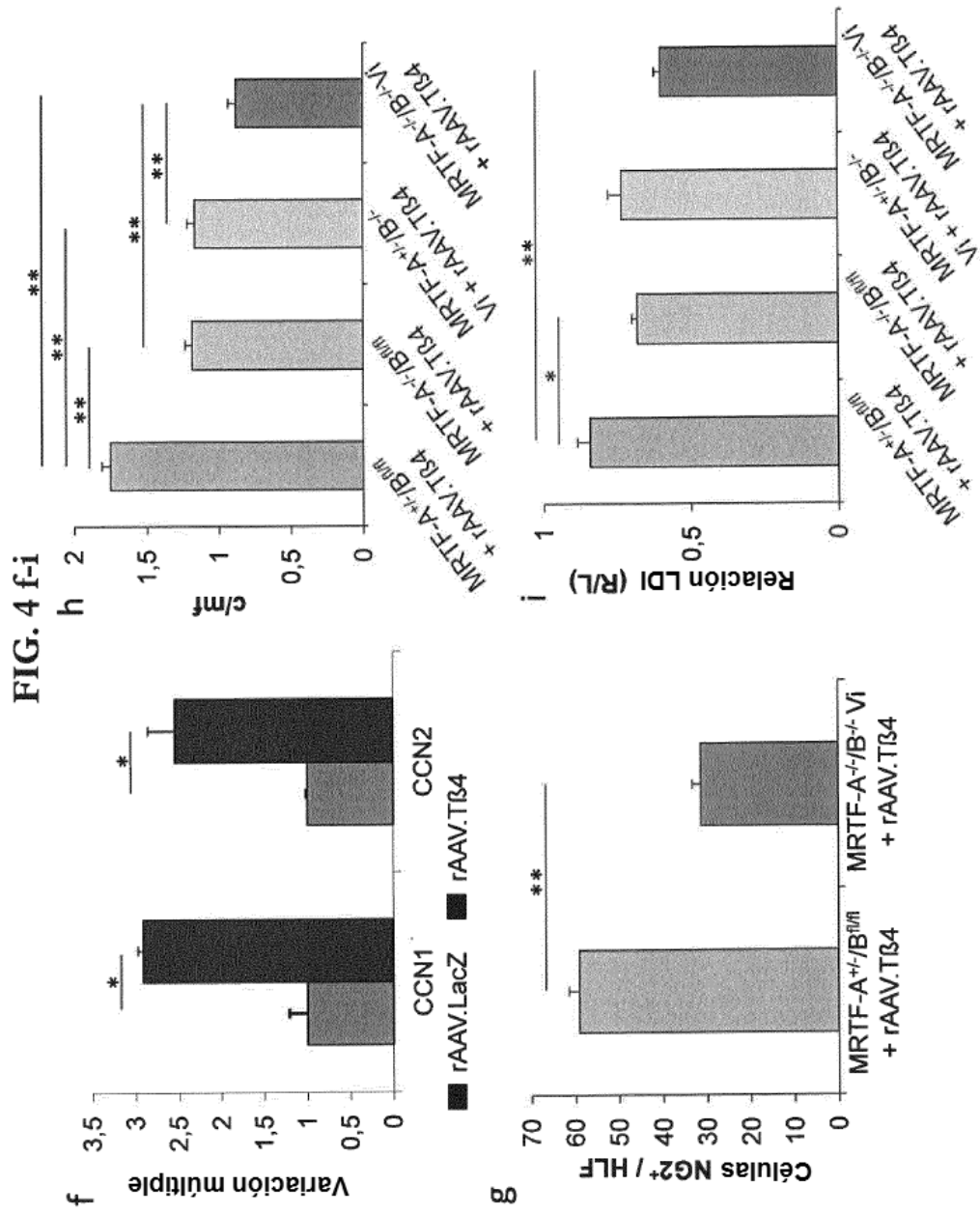


FIG. 5 a-b

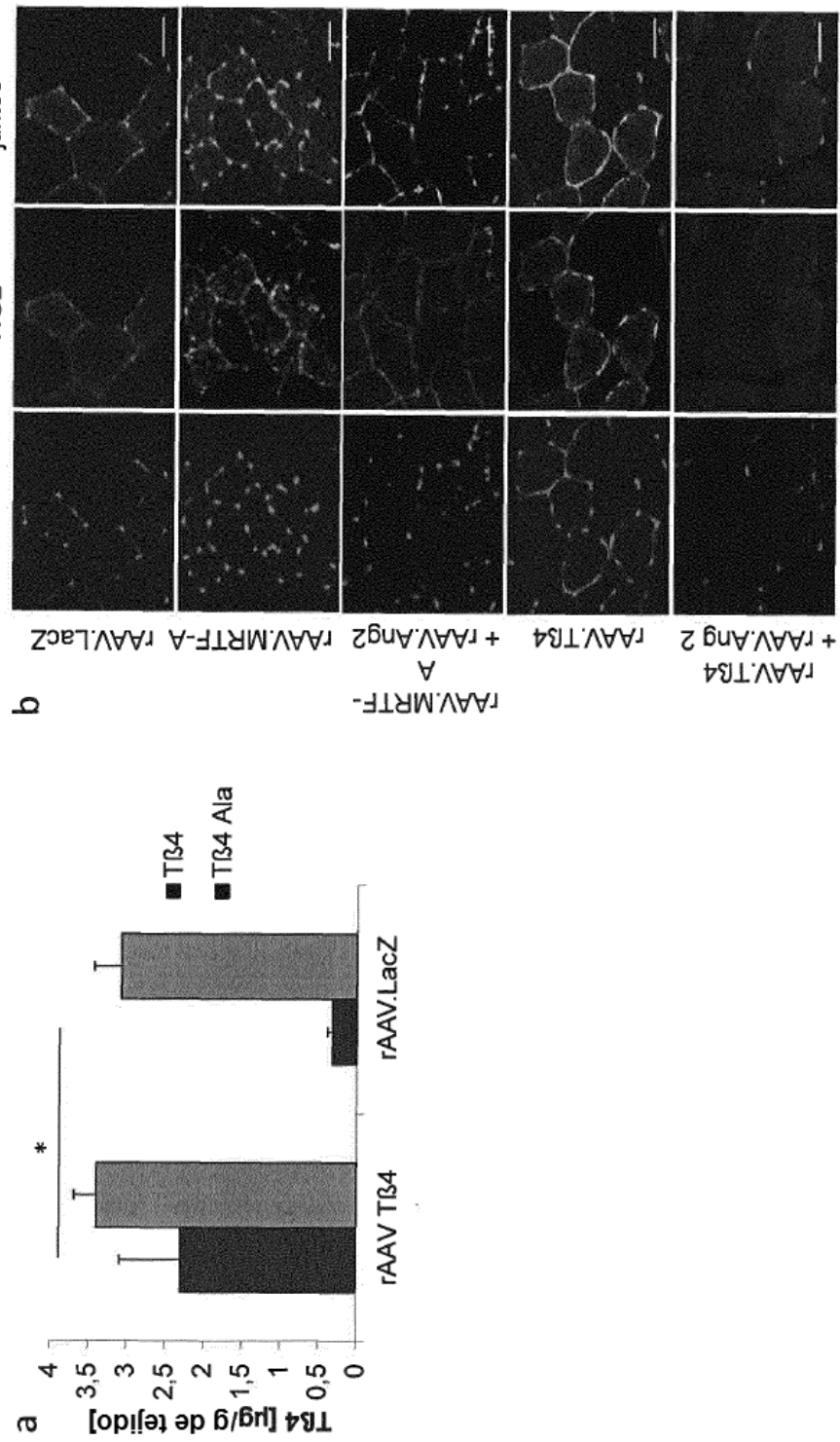


FIG. 5 c-e

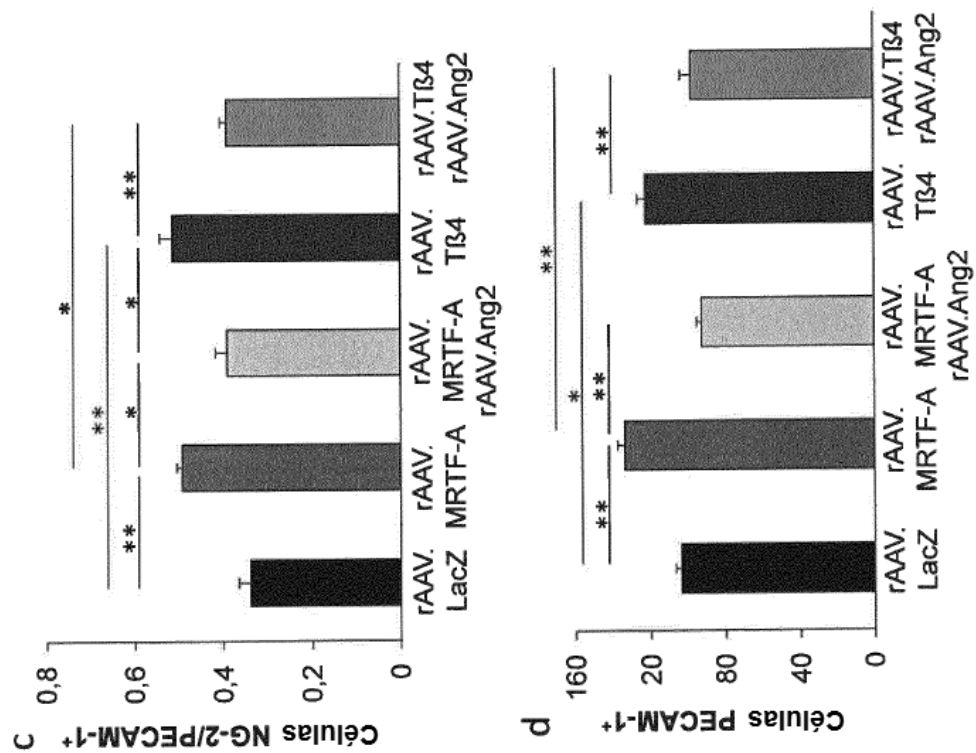


FIG. 5 f-g

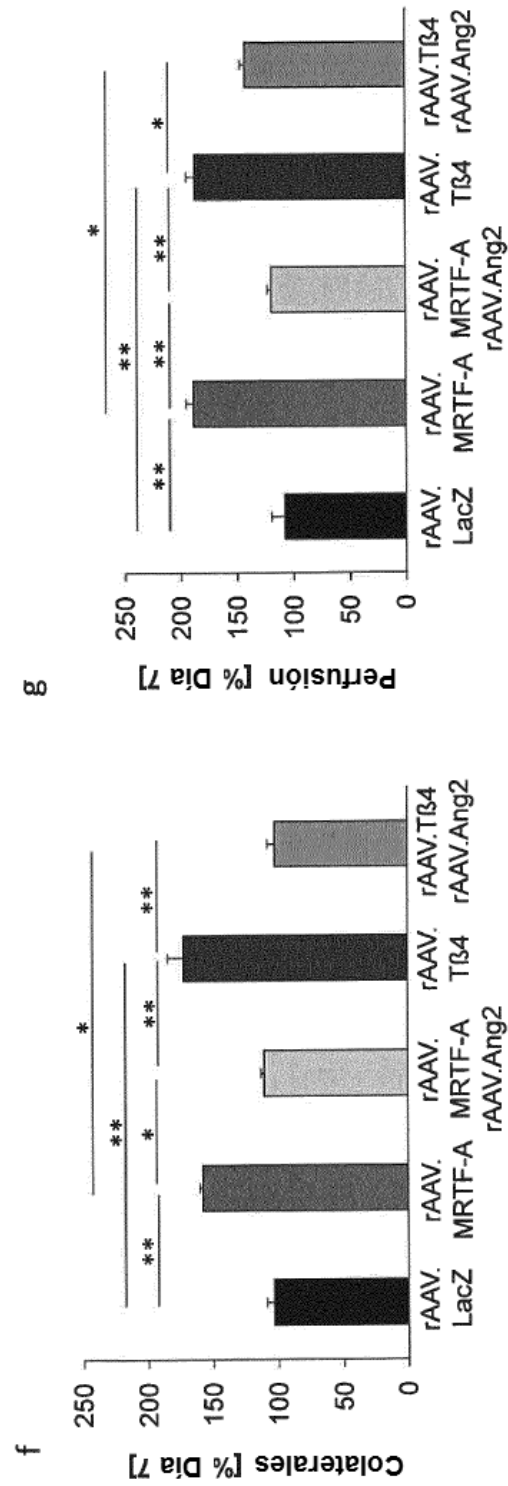


FIG. 6 a-d
Protocolo de isquemia de pata trasera de ratón

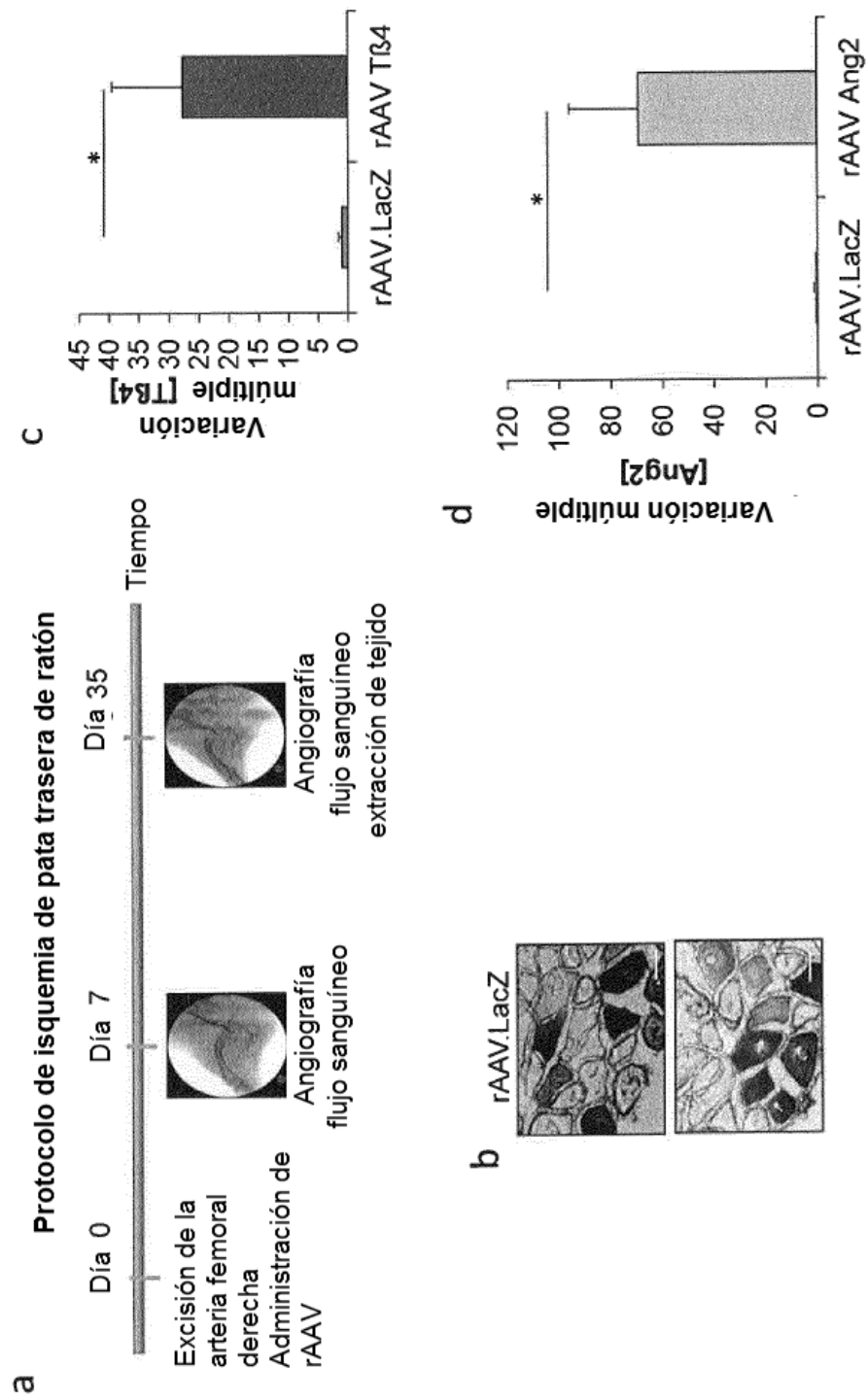


FIG. 6 e-h

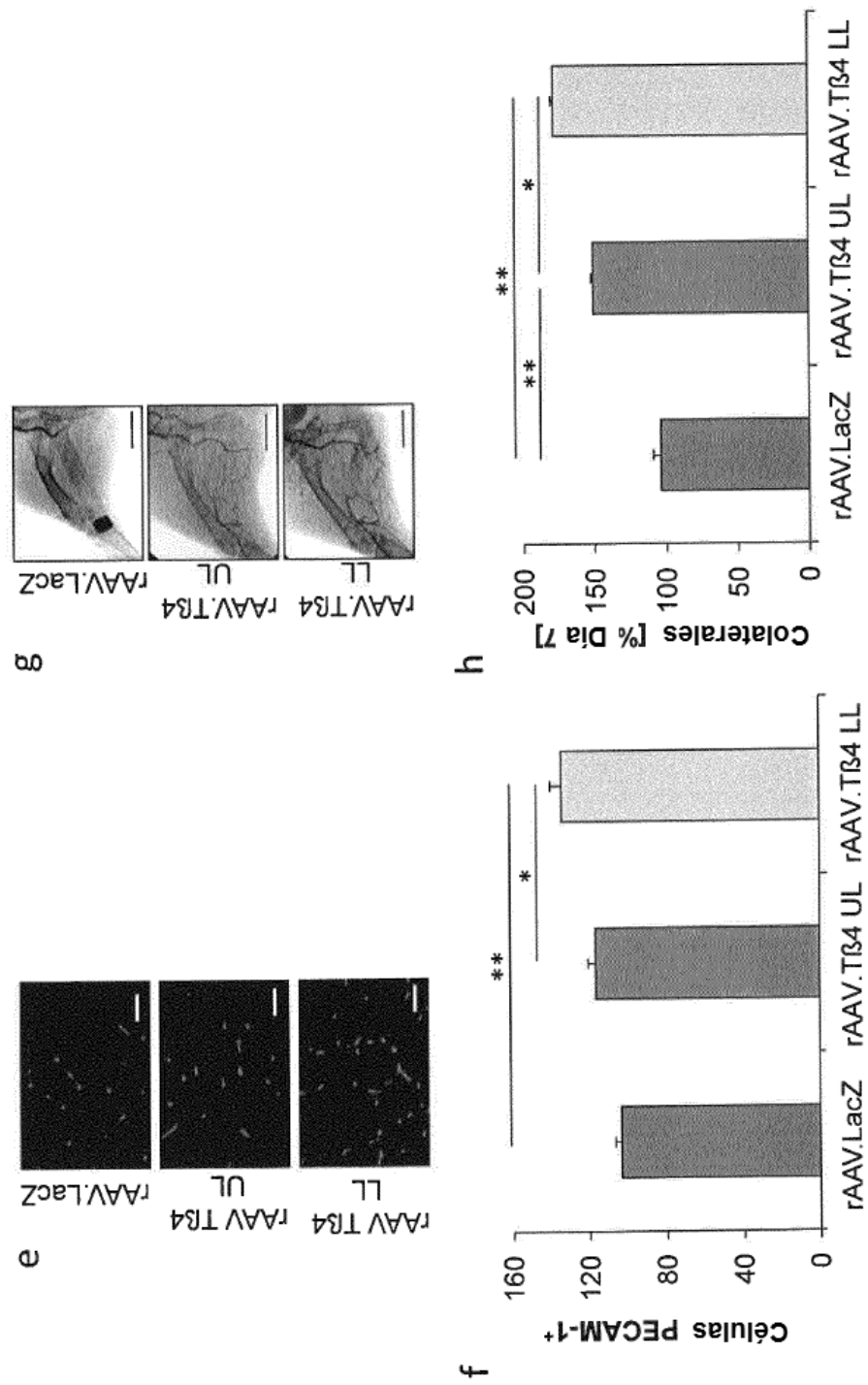


FIG. 6 i-l

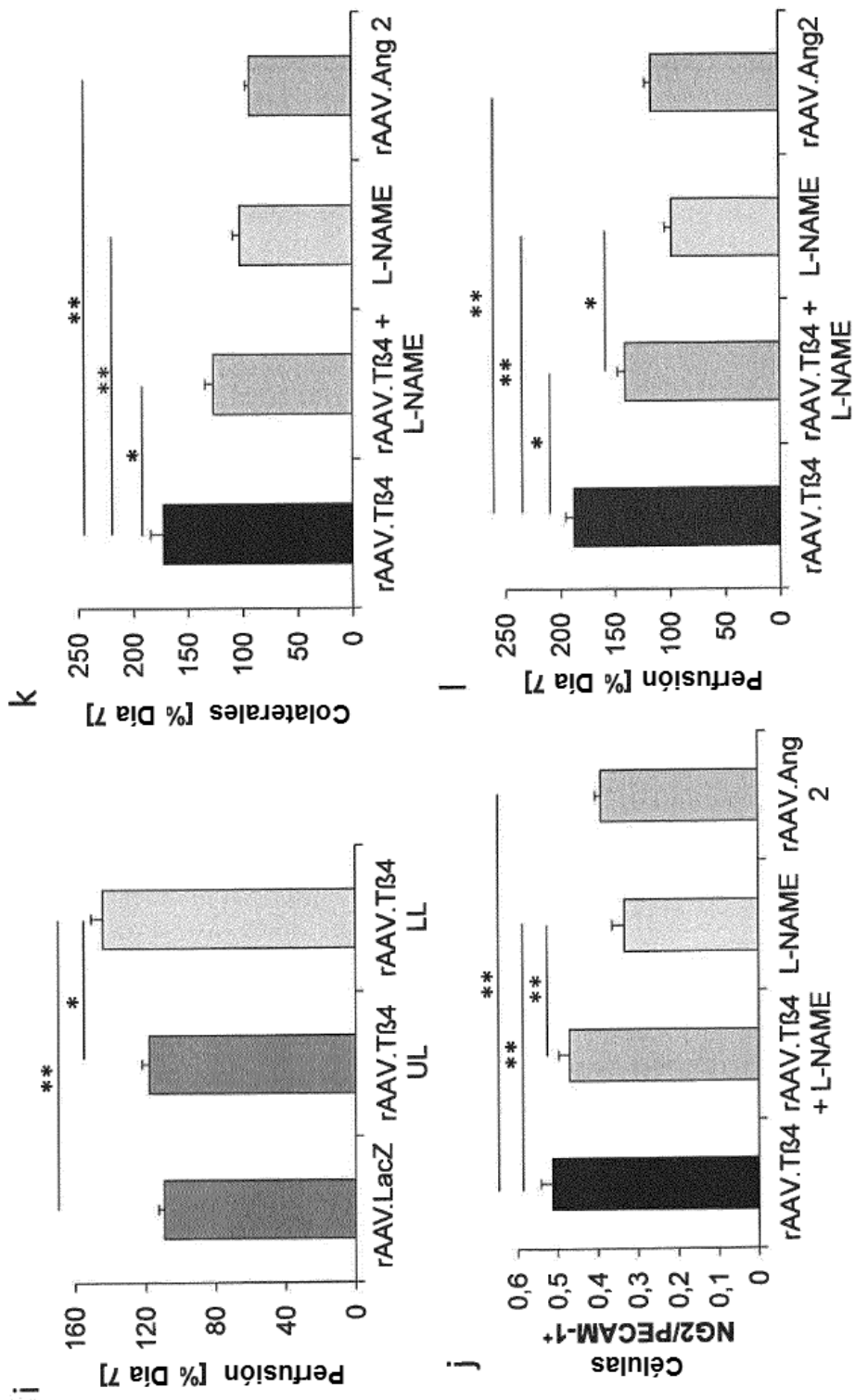


FIG. 7 a-c

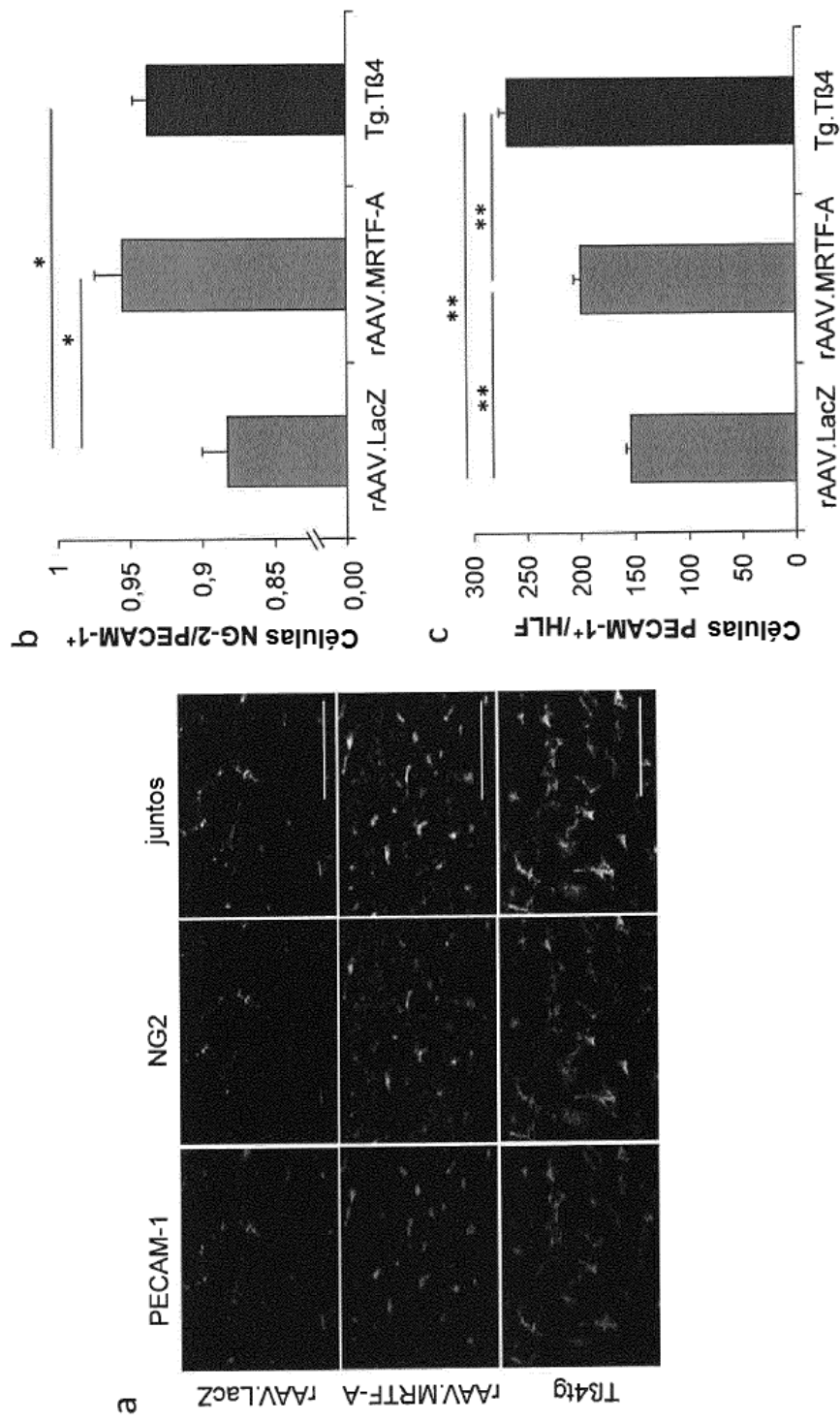


FIG. 7 d-f

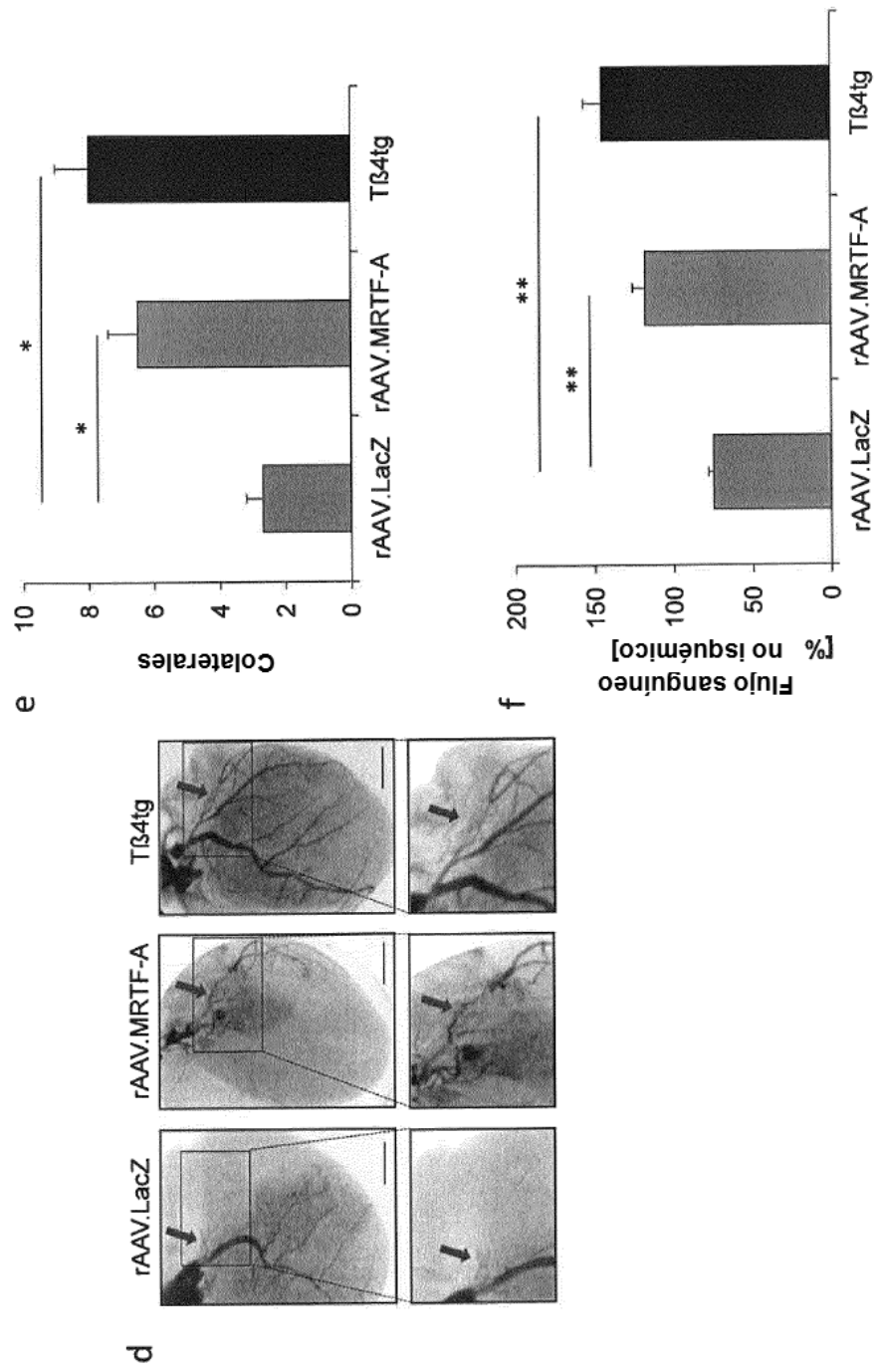


FIG. 7 g-h

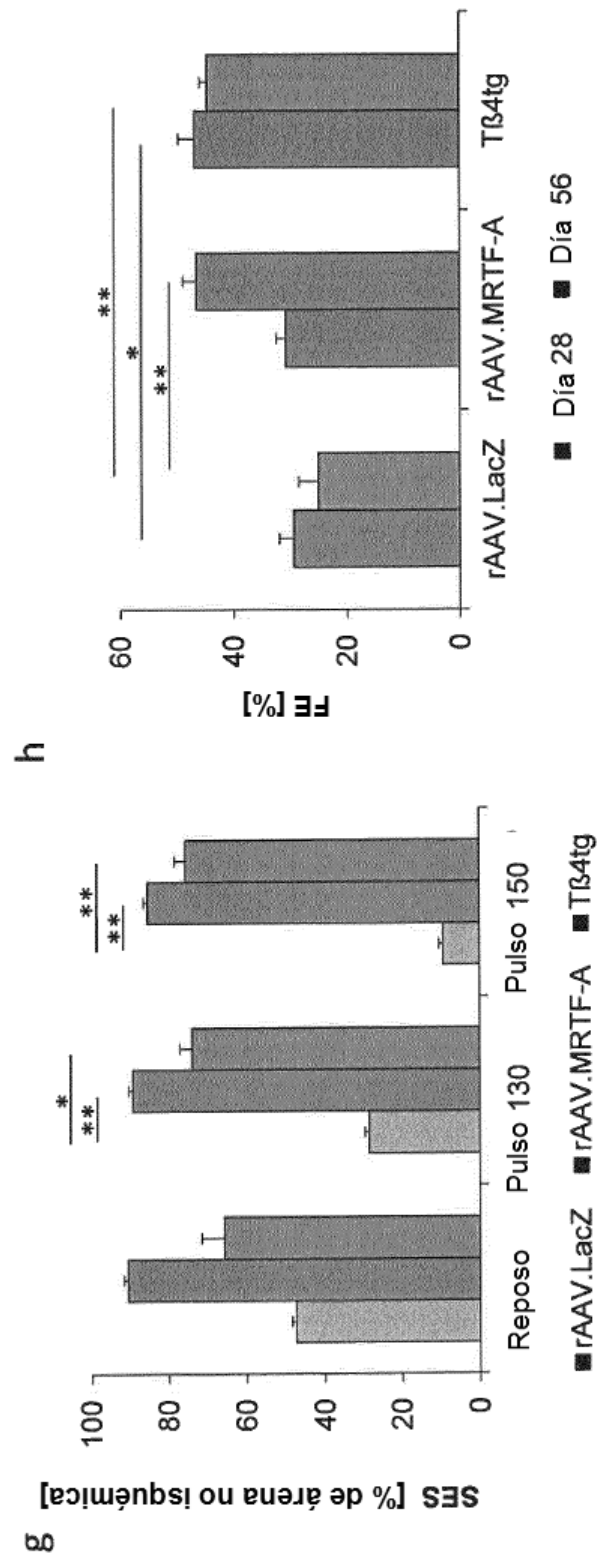


FIG. 7i

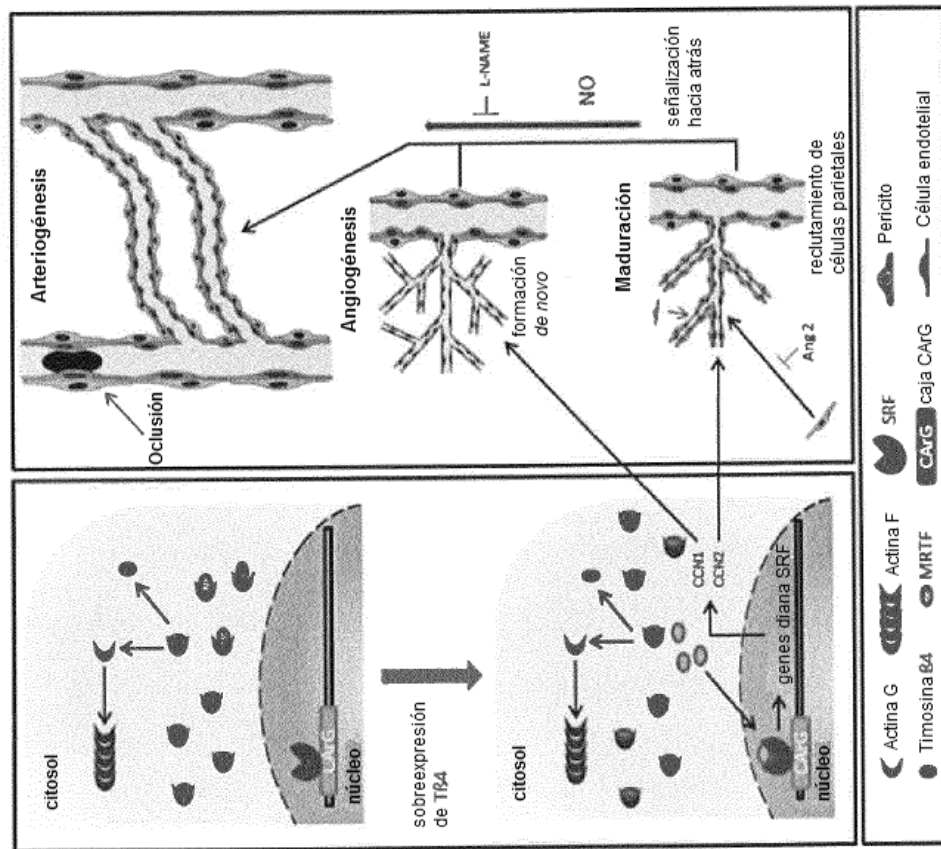


FIG. 8 a-b

a Protocolo para isquemia miocárdica crónica en cerdos

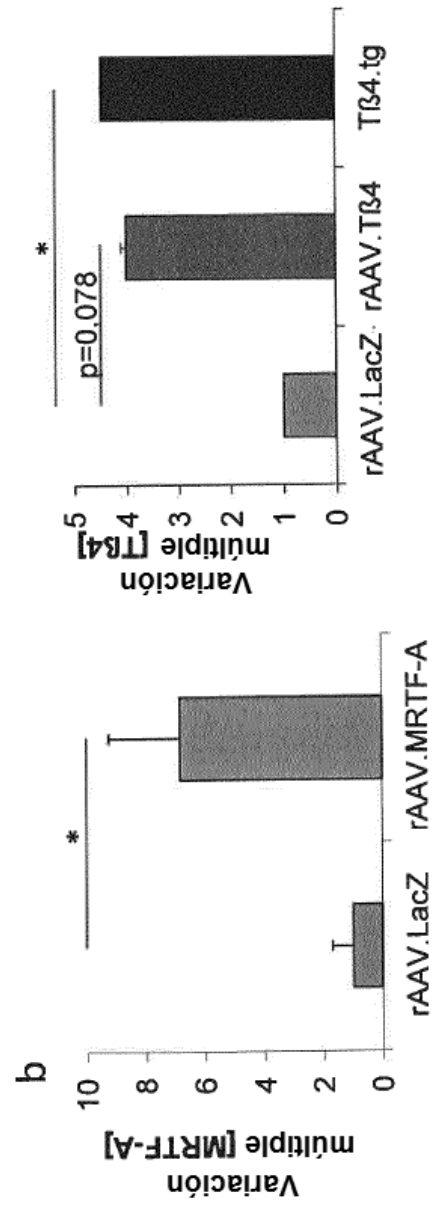
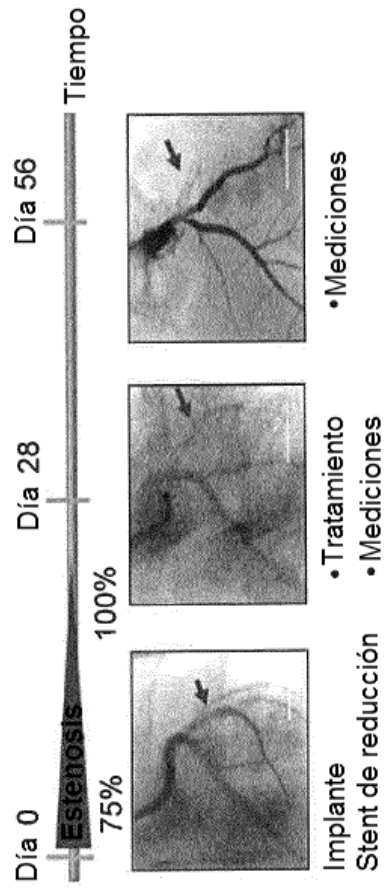


FIG. 8 c-f

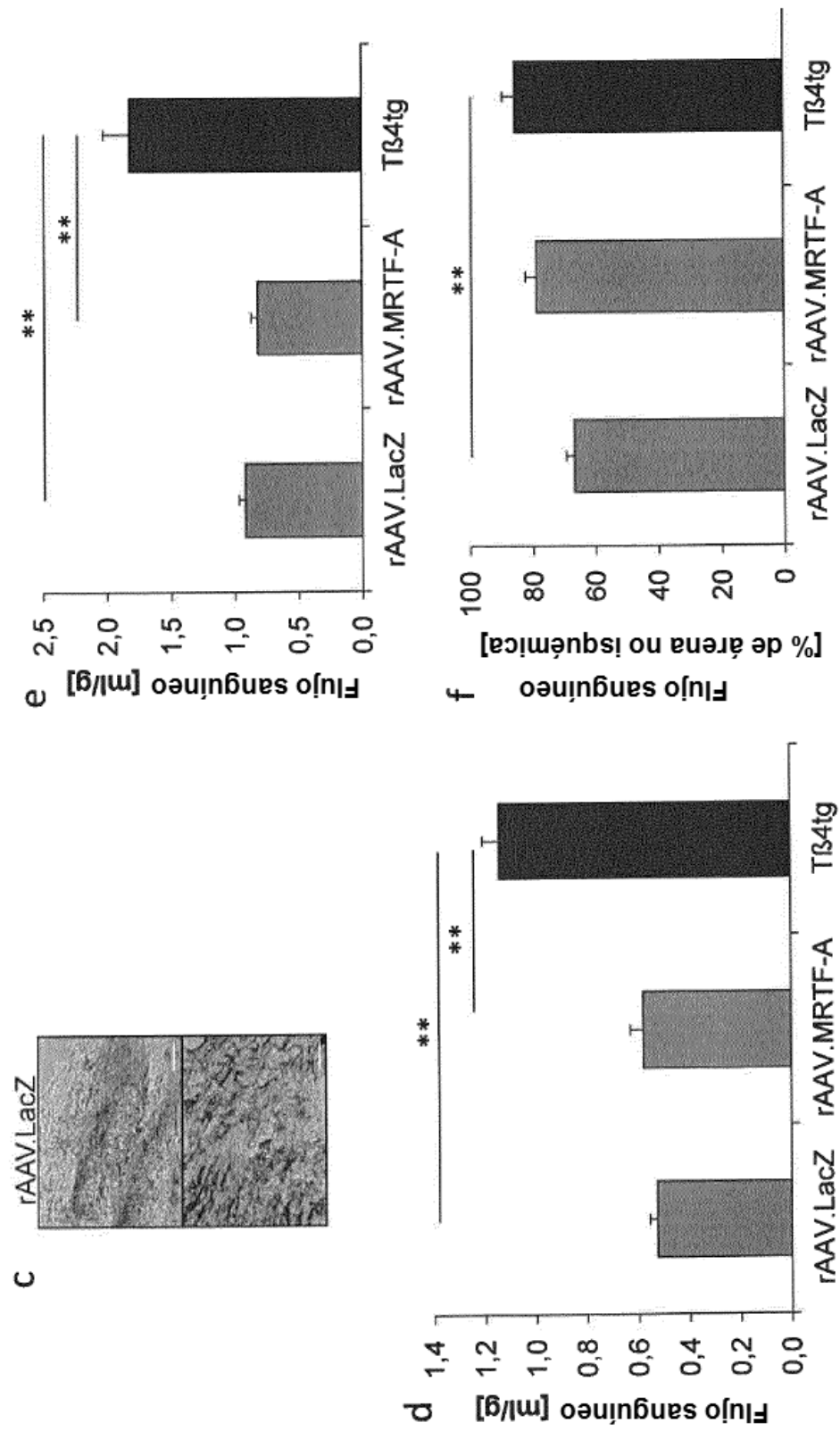


FIG. 8 g-i

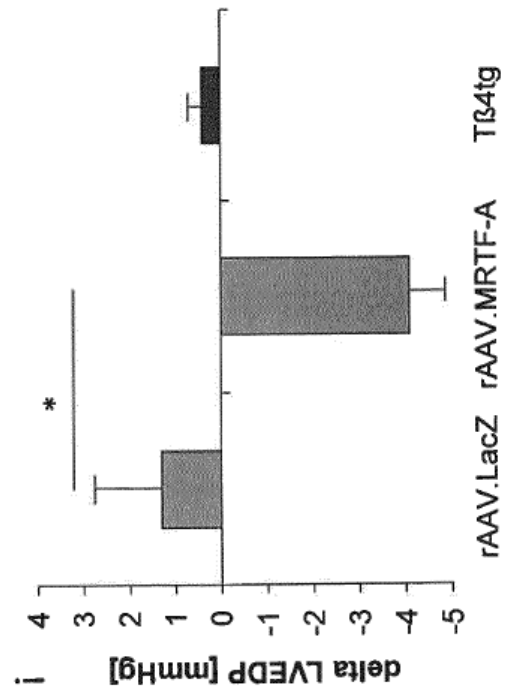
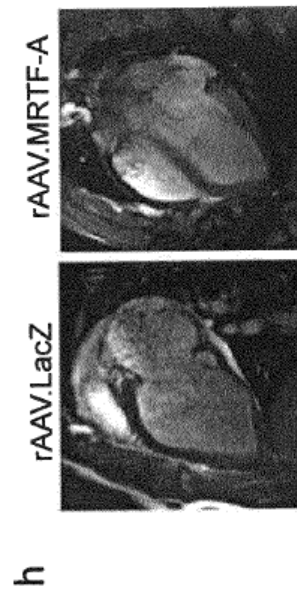
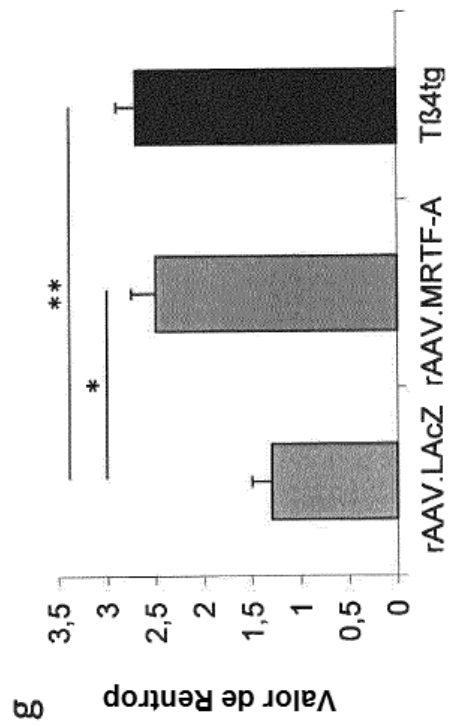
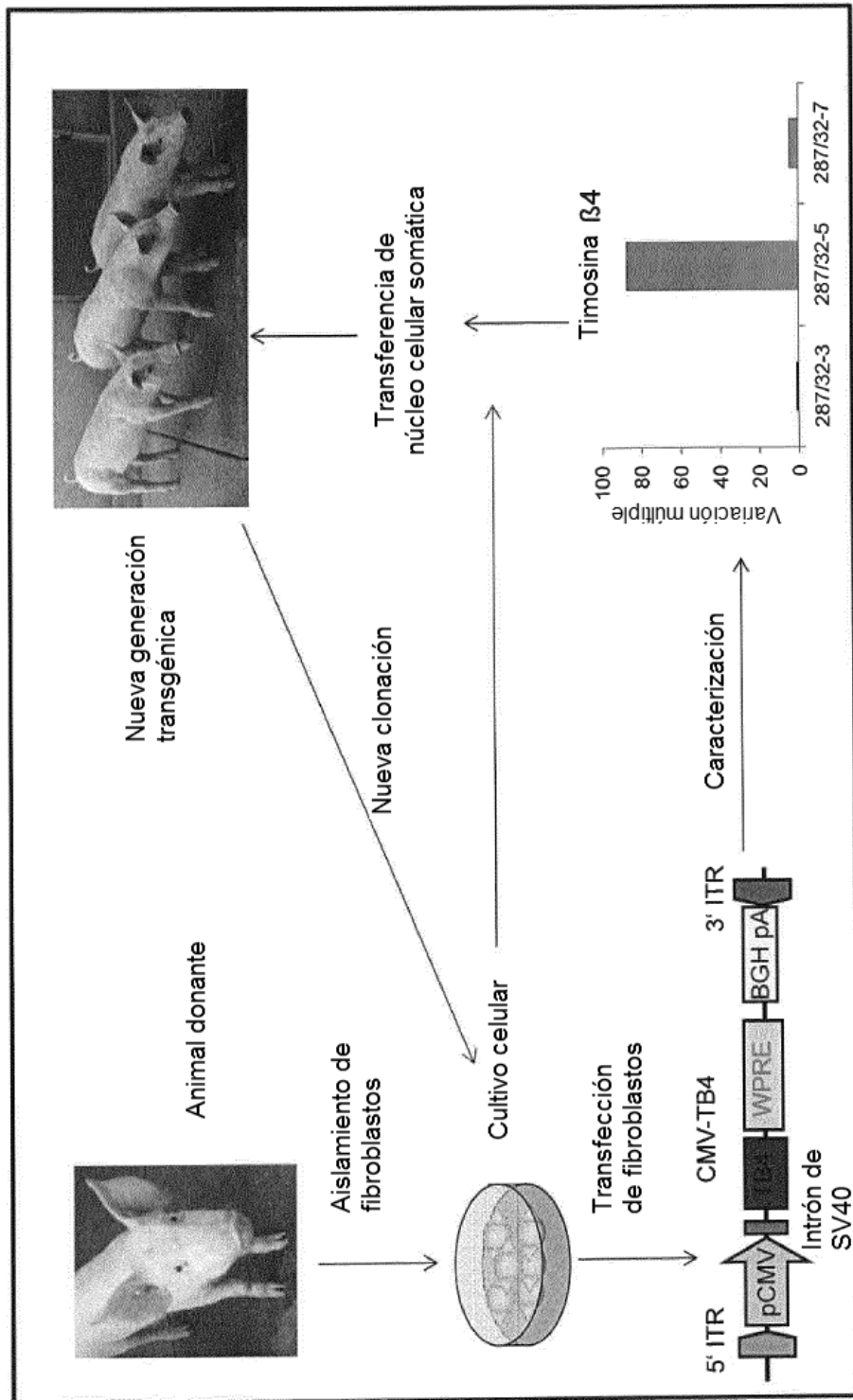


FIG. 9



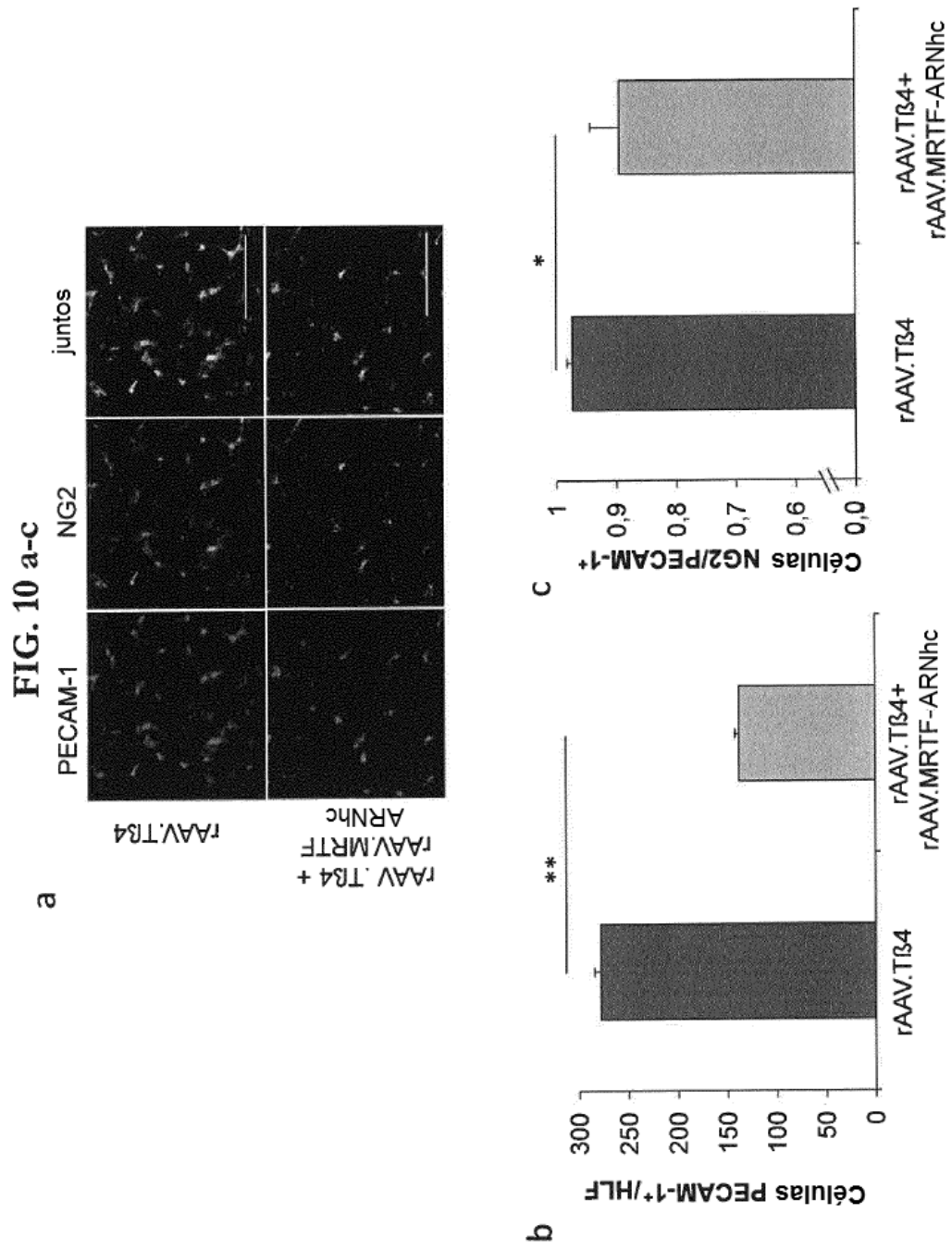


FIG. 10 d-f

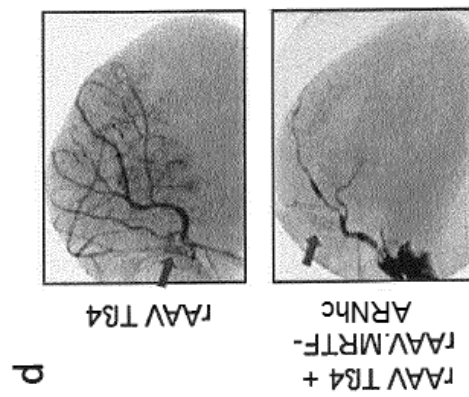
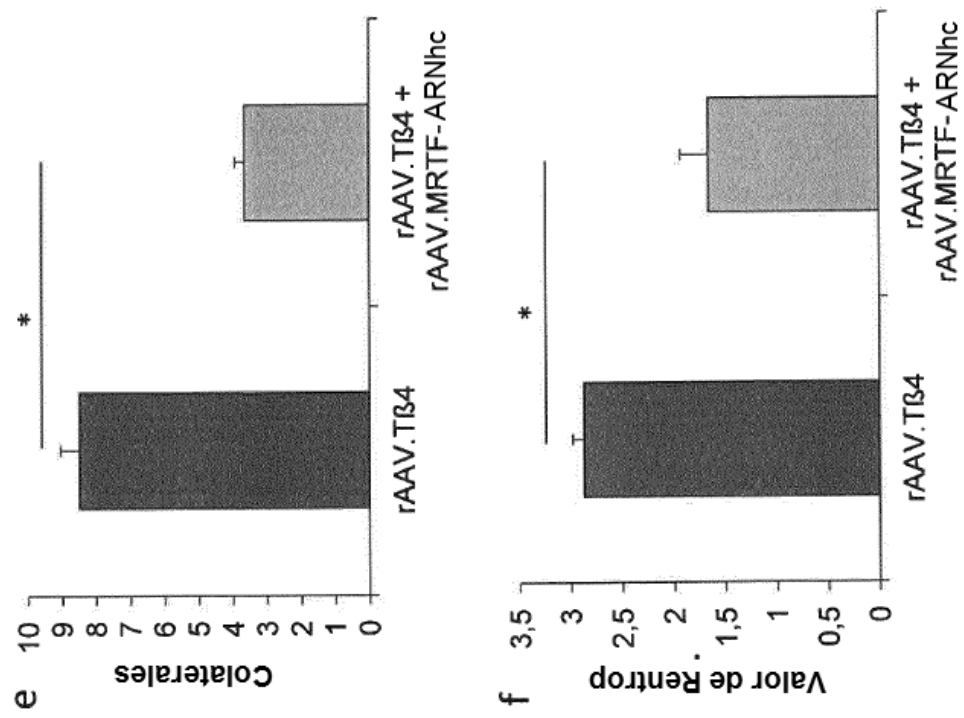
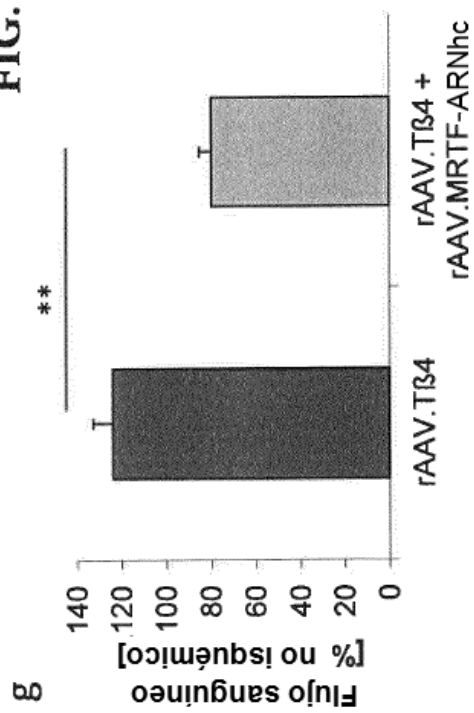
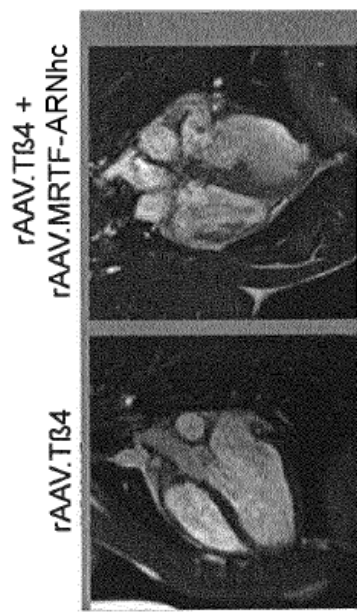
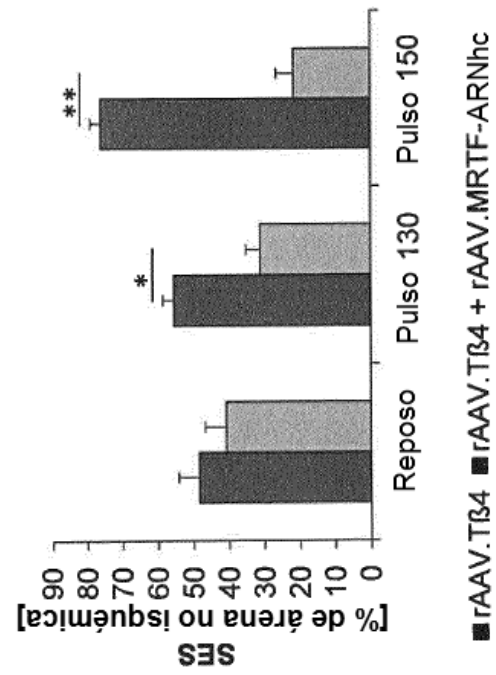
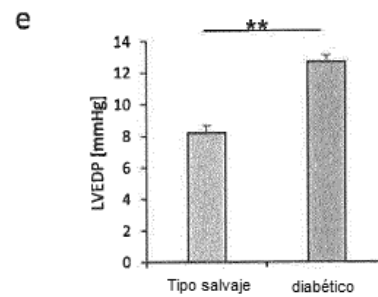
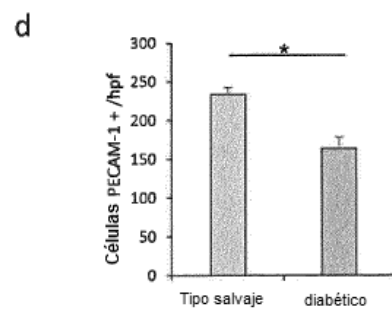
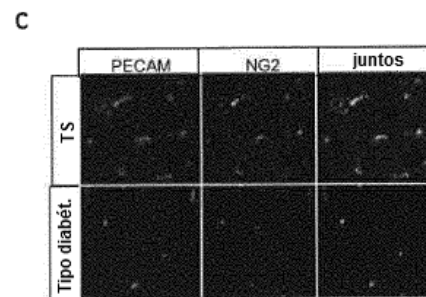
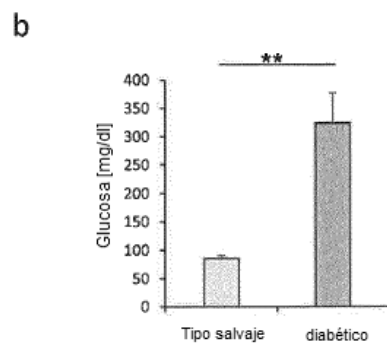
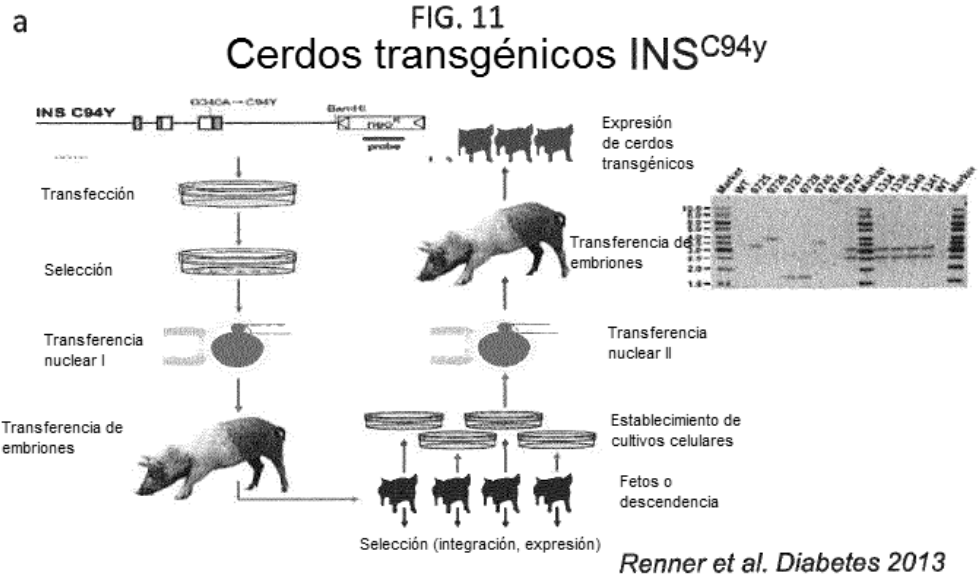


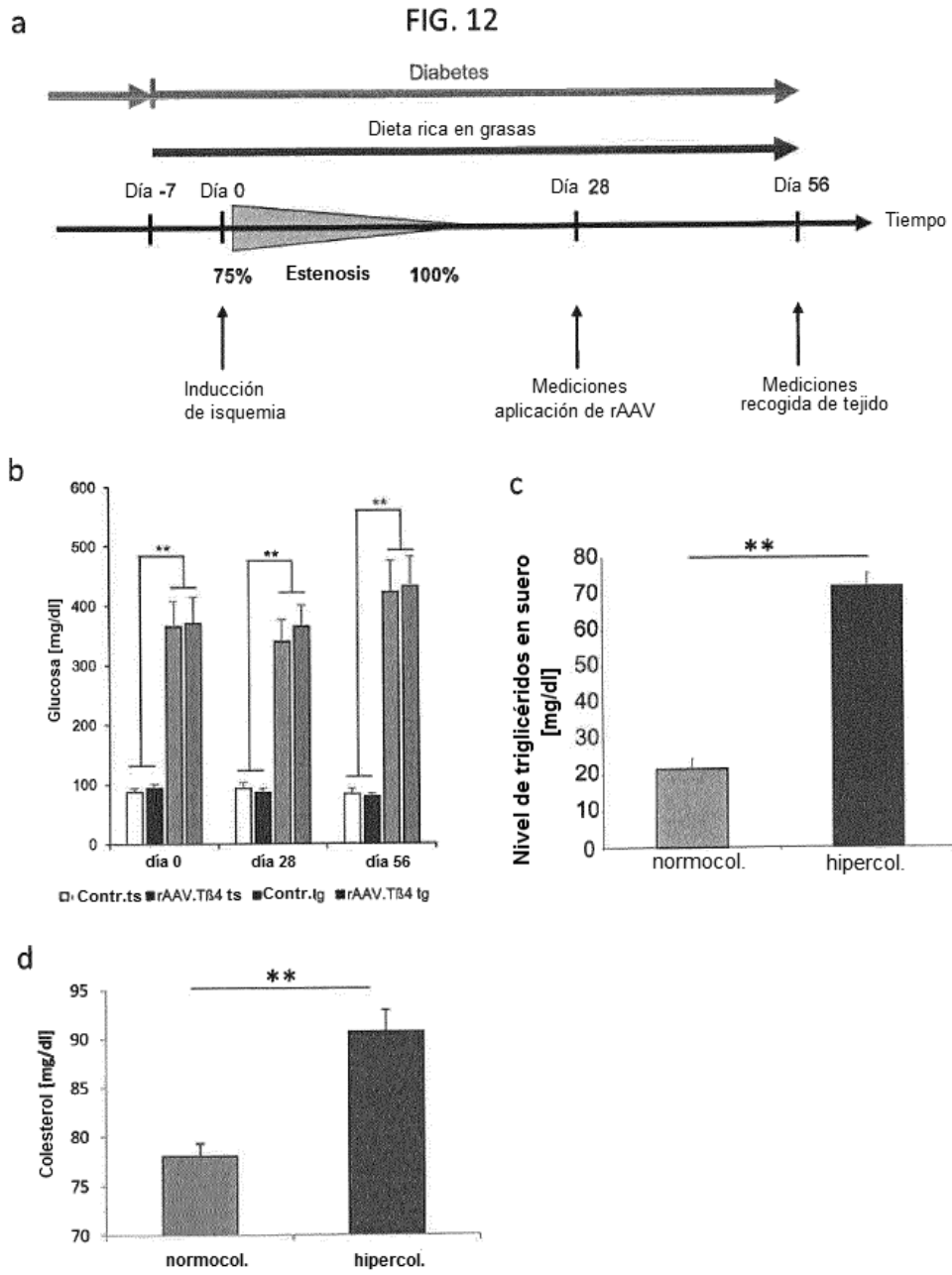
FIG. 10 g-j



j







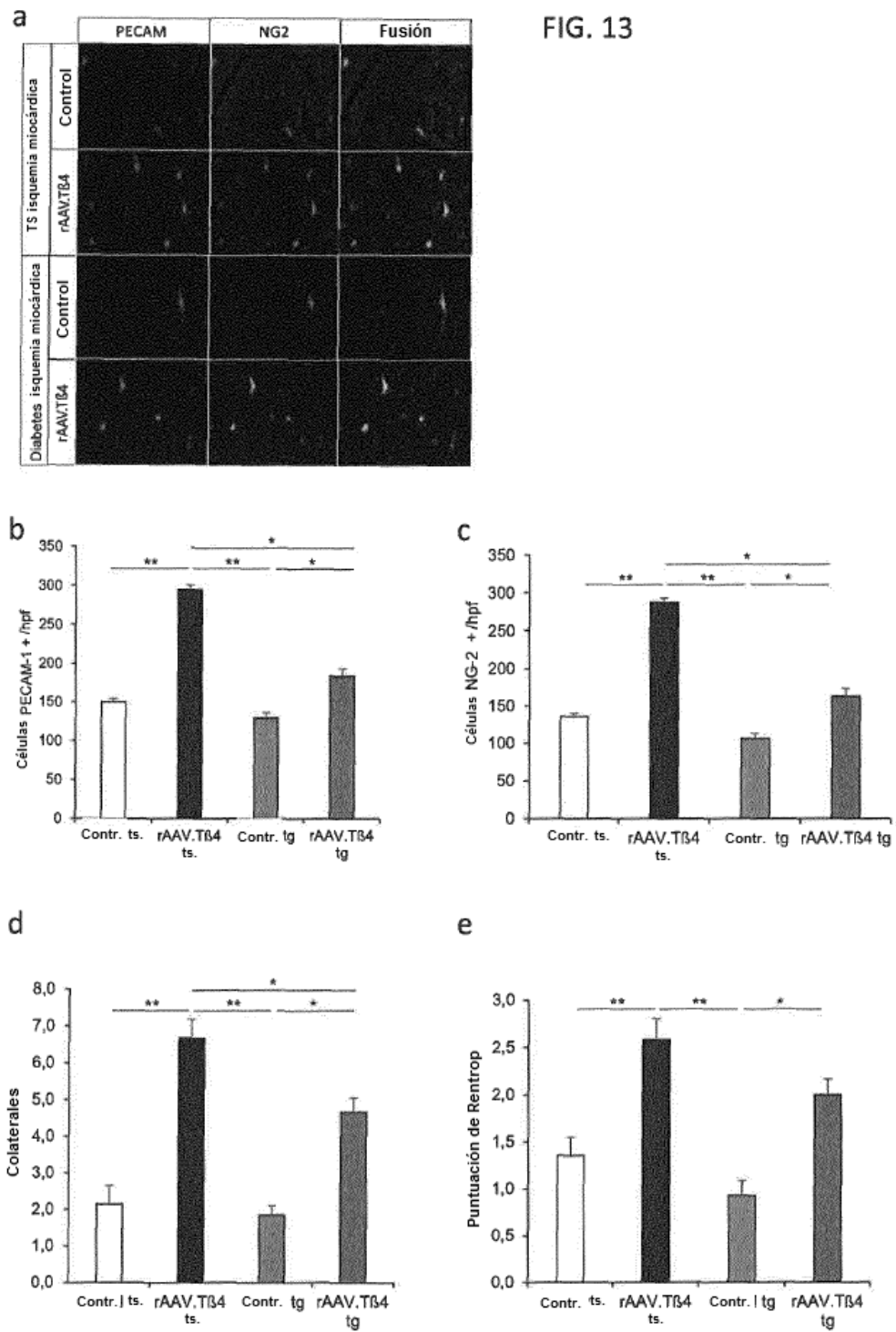


FIG. 14

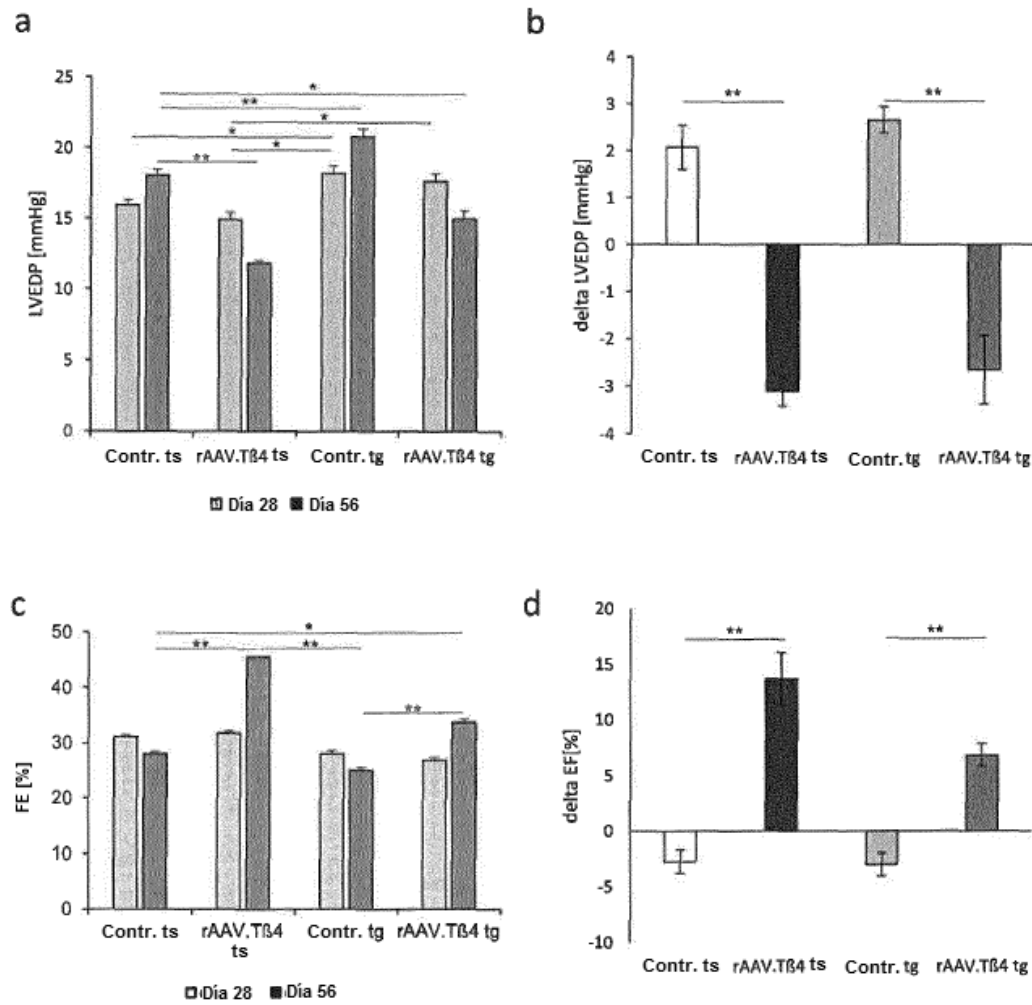


FIG. 15

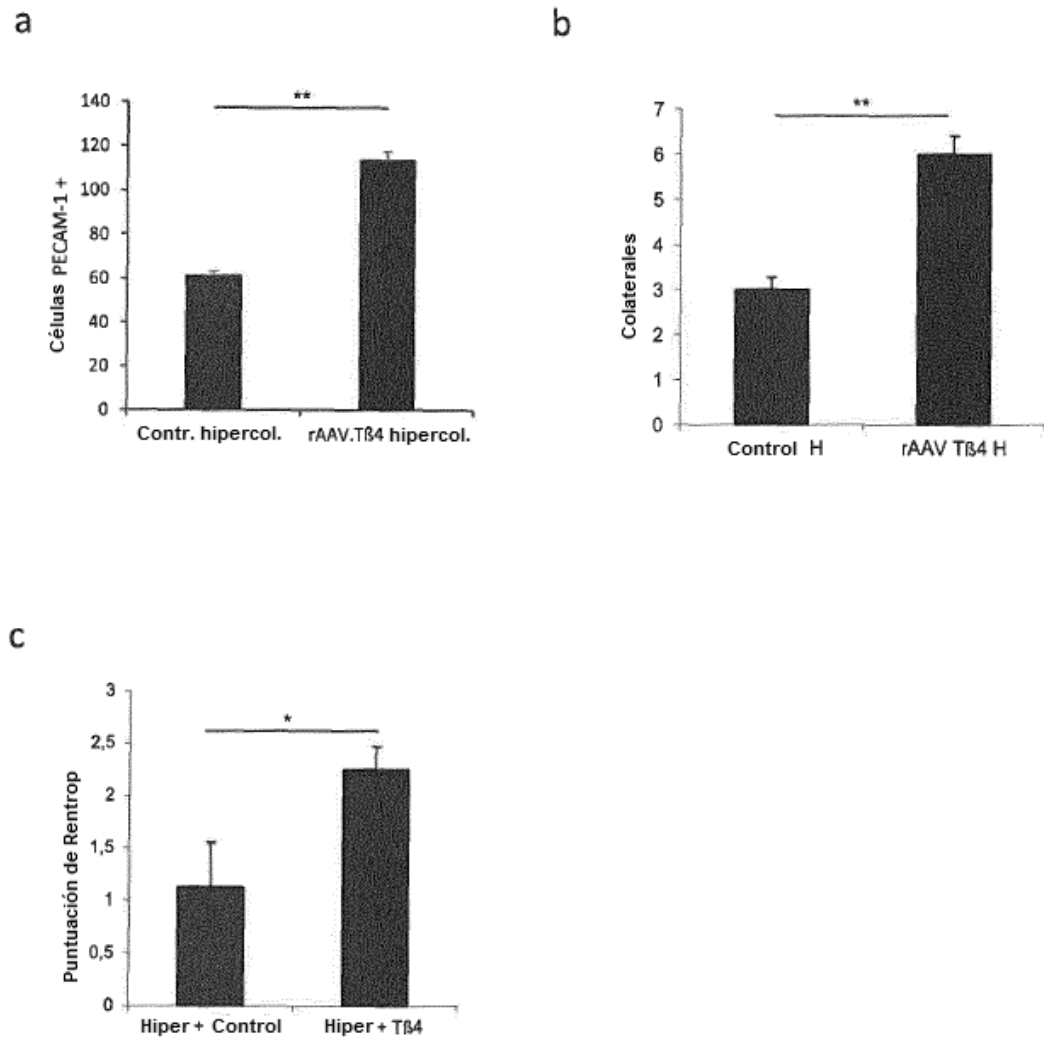
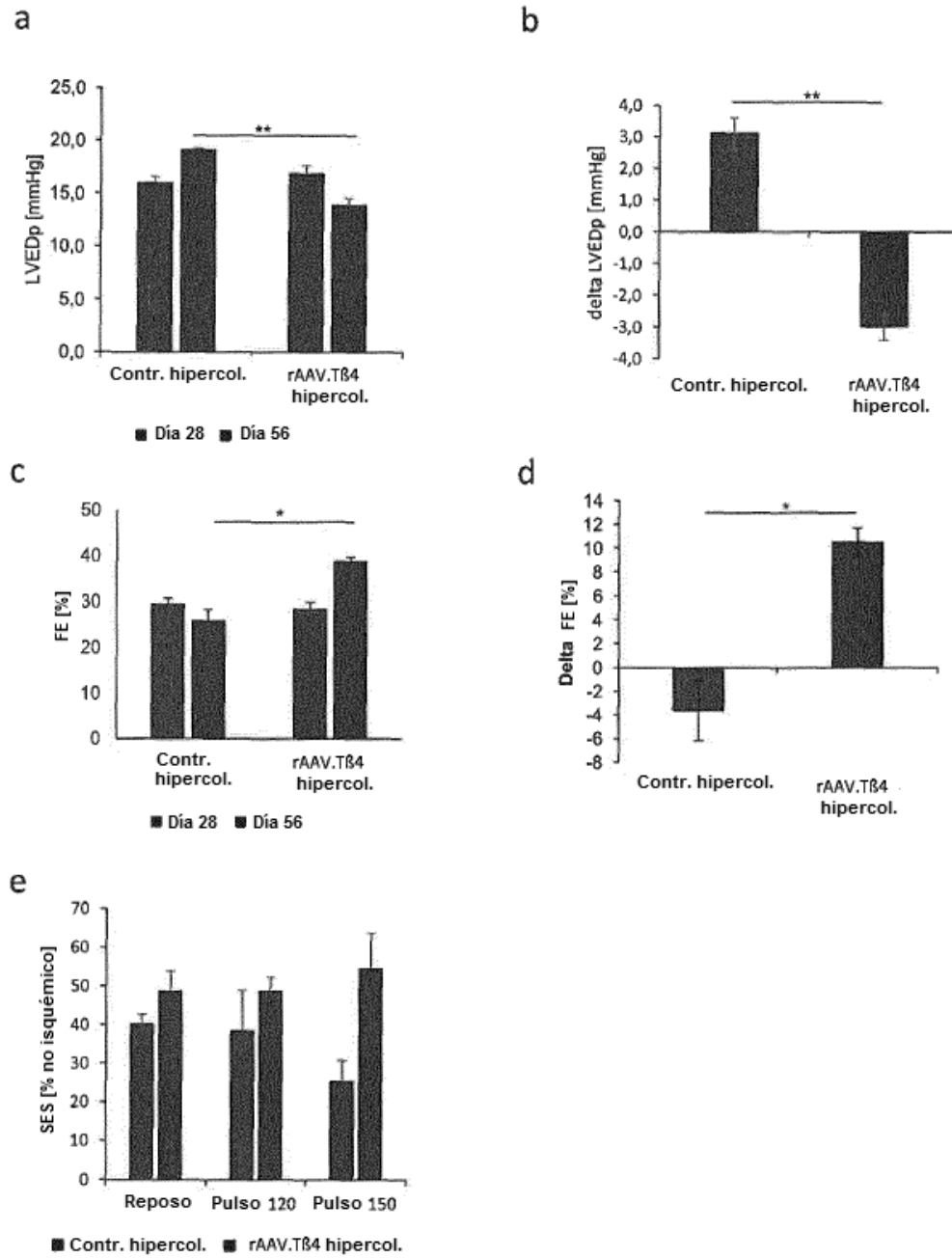
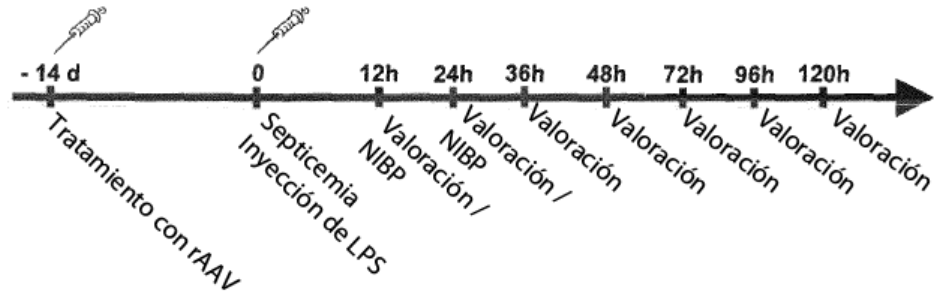


FIG. 16



a

FIG. 17



b

Puntos	0	5	10	20
Comportamiento/ Perjuicios	normal	ligero	moderado	comatoso
Pérdida de peso	0 - 5 %	5 - 10%	10 - 15%	> 15%
Dolor	no	bajo	medio	fuerte
Ascitis	no	bajo	medio	fuerte
Disnea	no	bajo	medio	fuerte

c

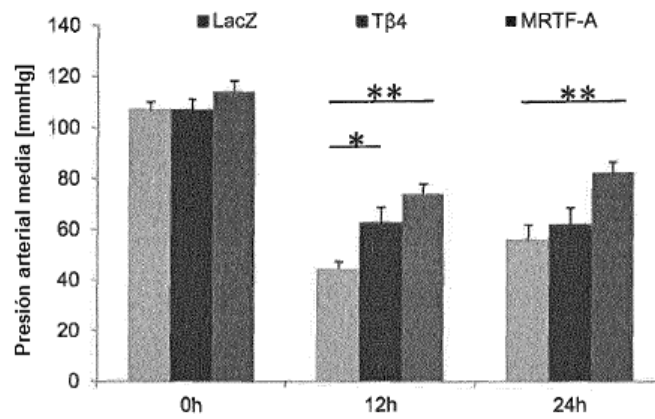


FIG. 17

