

USO DE TRIENTINA PARA EL SUMINISTRO DE COBRE A UN TEJIDO**ISQUÉMICO**REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente internacional N° PCT/CN2015/090528 presentada el 24 de septiembre de 2015, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por

10 referencia en su totalidad.

ENTREGA DEL LISTADO DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

El contenido de la siguiente entrega en archivo de texto

15 ASCII se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad: una forma leíble por computadora (CRF) del Listado de Secuencias (nombre de archivo: OP160744.160921.sequence listing.txt).

20 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la reparación y la regeneración del tejido isquémico mediante el uso de una composición que comprende una tetramina, tal como trientina.

25

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La activación de factores inducibles por la hipoxia (HIF) es la primera e inicial respuesta molecular del cuerpo

30 humano a la agresión hipóxica o isquémica. El factor de transcripción HIF-1 pertenece a la familia de HIF y gobierna

la expresión de distintos genes (tales como el VEGF) que está implicado en múltiples respuestas adaptativas celulares frente a la hipoxia y/o isquemia, incluyendo la angiogénesis. El HIF-1 comprende dos subunidades, a saber, HIF-1 α y HIF-1 β .

5 En condiciones hipóxicas/isquémicas, el HIF-1 α se acumula en el núcleo celular para formar un heterodímero con HIF-1 β , que inicia la transcripción de genes corriente abajo.

Sin embargo, en condiciones isquémicas miocárdicas
10 crónicas, el miocardio lesionado se caracteriza comúnmente por una disminución de la densidad capilar y una angiogénesis deprimida. Los mecanismos de defensa, tal como los que induce la acumulación de HIF-1 α en agresiones isquémicas agudas, no funcionan en condiciones isquémicas crónicas debido a la
15 movilización del cobre desde el miocardio desencadenada por la isquemia prolongada. Se había demostrado anteriormente que la actividad transcripcional de HIF-1 necesita la participación del elemento traza cobre. En pacientes con cardiomiopatía isquémica crónica, aunque los niveles de HIF-
20 1 α están elevados persistentemente en el tejido miocárdico, los genes que regulan la expresión del HIF-1, tales como el VEGF, están deprimidos. La pérdida de cobre cardíaco bloquea la activación del HIF-1 α acumulado, y el agotamiento de cobre cardíaco se correlaciona bien con el grado de disfunción
25 cardíaca en dichos pacientes. Además, la disminución del contenido en cobre cardíaco se acompaña con un alto nivel de cobre sanguíneo en los pacientes con enfermedades cardíacas isquémicas. Por lo tanto, se cree que el cobre se libera del miocardio a la circulación sanguínea en una forma que el
30 miocardio isquémico es incapaz de reutilizar. Se cree que este vertido drástico del cobre miocárdico en la circulación

de forma no disponible es una causa que da lugar a la depresión de la actividad transcripcional de HIF-1 α que acompaña a la isquemia miocárdica prolongada. En consecuencia, la regulación positiva de los genes controlados por HIF-1, que es una etapa importante para la reparación y regeneración tisular, puede que no exista en pacientes con enfermedades miocárdicas isquémicas, debido a la pérdida del cobre disponible. Por lo tanto, la promoción de una distribución tisular apropiada de cobre podría servir como una estrategia eficaz para tratar distintas enfermedades y afecciones isquémicas.

La trientina es un agente quelante de cobre bien conocido útil para la detoxicación de cobre. El dihidrocloruro de trientina es una sal farmacéuticamente aceptable de trientina que se ha empleado ampliamente para unir y eliminar el exceso de cobre en el cuerpo para tratar la enfermedad de Wilson, particularmente en pacientes intolerantes a la penicilamina. Cooper y col., han descrito el uso de la trientina y otros compuestos antagonistas del cobre para tratar distintos trastornos, incluyendo diabetes mellitus y sus complicaciones (por ejemplo, cardiomiopatía diabética), enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración, y enfermedades relacionadas con mitocondrias. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 7.459.446, Patente de EE. UU. N°. 7.928.094, Publicación de solicitud internacional N° WO 2003077901 A1, Publicación de solicitud internacional N° WO 2005058294 A1, y Publicación de solicitud internacional N° WO 2007055598 A1.

Las divulgaciones de todas las publicaciones, patentes,

y solicitudes de patente a las que se hace referencia en el presente documento se incorporan de esta manera en el presente documento por referencia en su totalidad.

5 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente divulgación proporciona procedimientos para aumentar el nivel intracelular de cobre o inducir la reparación tisular de un tejido isquémico en un individuo
10 administrando una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como trientina).

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular
15 en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina). También se proporciona el uso de una composición
20 que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la fabricación de un medicamento para el aumento del nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, y una composición que comprende una tetramina
25 quelante de cobre (tal como trientina) que se utiliza para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona
30 un procedimiento de suministro específico de cobre en las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una

lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como trientina). También se proporciona el uso de una composición

5 que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como trientina) en la fabricación de un medicamento para suministrar específicamente cobre en las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, y una composición que comprende una tetramina
10 quelante del cobre (tal como trientina) que se utiliza para suministrar específicamente cobre en las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

15 En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un procedimiento de inducción de al menos dos eventos de reparación tisular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una
20 composición que comprende una tetramina quelante del cobre. También se proporciona el uso de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la fabricación de un medicamento para la inducción de al menos dos eventos de reparación tisular en un
25 tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, y una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) que se utiliza para inducir la migración de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular
30 isquémica.

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al
5 individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre. También se proporciona el uso de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la fabricación de un medicamento para la inducción de la
10 migración de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, y una composición que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) que se utiliza para la inducción de la migración de células madre a un tejido isquémico de un
15 individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un procedimiento de promoción de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un
20 tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre. También se proporciona el uso de una composición que comprende una tetramina quelante del
25 cobre (tal como la trientina) en la fabricación de un medicamento para la promoción de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, y una composición que comprende una tetramina
30 quelante del cobre (tal como la trientina) que se utiliza para promover las actividades transcripcionales de HIF-1

dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, el individuo tiene un sistema de reparación tisular comprometido. En algunas realizaciones, el individuo no tiene un sistema de reparación tisular comprometido.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido de extremidades isquémico.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, en los que la tetramina quelante del cobre es la trientina.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la composición comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones el complejo de la tetramina quelante del cobre y el ion de cobre es cristalino. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una

geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición no forma un complejo con la tetramina quelante
5 del cobre.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al
10 individuo de una cantidad eficaz de un ion de cobre.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la cantidad eficaz de la composición es insuficiente para disminuir el
15 nivel de cobre extracelular en el individuo.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la composición se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la
20 cantidad eficaz de la composición comprende aproximadamente de 80 mg a aproximadamente 450 mg (incluyendo, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 80 a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg, de
25 aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, o
30 aproximadamente 400 mg) de tetramina quelante de cobre por día. En algunas realizaciones, la composición se administra

al menos dos veces al día (incluyendo, por ejemplo, aproximadamente una cualquiera de dos veces, tres veces, o cuatro veces al día). En algunas realizaciones, la composición se administra durante al menos aproximadamente un
5 mes (incluyendo, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 o más meses).

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la
10 administración de la composición da lugar a aproximadamente 0,005 mg/l (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de 0,01 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, 3,0 mg/l, 4,0 mg/l, o 5 mg/l) de la tetramina quelante del cobre en la sangre. En algunas realizaciones, la
15 administración de la composición da lugar a al menos aproximadamente 0,005 mg/l de la tetramina quelante del cobre en la sangre durante al menos aproximadamente 1 semana (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 12
20 meses o más).

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende adicionalmente el control del nivel
25 de cobre intracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el ajuste de la dosis (incluyendo, por ejemplo, la cantidad eficaz, la frecuencia de administración, y una combinación de las mismas) de la composición basada en el nivel intracelular
30 de cobre en el individuo.

En otro aspecto de la presente solicitud, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina.

5 En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre se quela por los cuatro grupos amina de trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones
10 cloruro y una molécula de agua.

En algunas realizaciones de acuerdo con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, la composición farmacéutica se formula como un comprimido,
15 una cápsula o una píldora.

También se proporcionan composiciones, kits y artículos de fabricación útil para los procedimientos descritos en el presente documento.

20

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluye "que consiste" y/o "consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

25

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones dirigidas a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la
30 descripción de "X".

La expresión "aproximadamente X-Y" que se utiliza en el presente documento tiene el mismo significado que "aproximadamente X a aproximadamente Y".

5 Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un, o "una", y "el" incluyen las referencias en plural a menos de que el contexto indique claramente otra cosa.

10 Como es evidente para un experto en la técnica, un individuo evaluado, seleccionado para, y/o que recibe tratamiento es un individuo que tiene necesidad de dichas actividades.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 representa una estructura cristalina de un complejo de trientina y un ion de cobre, que se asocia adicionalmente con dos iones de cloruro y una molécula de
20 agua. Los átomos no marcados son átomos de hidrógeno.

La FIG. 2 enumera un conjunto de longitudes de enlace, ángulos de enlace, y ángulos torsionales de la estructura cristalina de la FIG. 1.

25

La FIG. 3 enumera los datos de refinamiento del cristal y la estructura de un cristal ejemplar de la FIG. 1.

Las FIG. 4A-4C enumera las coordenadas atómicas y los
30 parámetros anisotrópicos de átomos en la estructura cristalina refinada de la FIG. 3. La FIG. 4A enumera las

coordenadas atómicas fraccionales y los parámetros de desplazamiento isotrópico equivalentes de átomos no hidrógeno. La FIG. 4B enumera los parámetros de desplazamiento anisotrópico de átomos no hidrógeno. La FIG. 4C enumera las coordenadas y parámetros de desplazamiento isotrópico de átomos de hidrógeno.

La FIG. 5 muestra un gráfico de flujo del procedimiento experimental del Ejemplo 2.

La FIG. 6 muestra concentraciones de cobre intracelular de cardiomiocitos neonatales primarios de rata en diferentes grupos experimentales del Ejemplo 2.

La FIG. 7 muestra un gráfico de flujo del procedimiento experimental del Ejemplo 3.

La FIG. 8A muestra los cambios morfológicos detectados ecocardiográficamente en la profundidad del septo interventricular (IVSD) de ratas en los grupos de operación de constricción aórtica ascendente (AAC) y falsos con o sin el tratamiento con trientina.

La FIG. 8B muestra los cambios morfológicos detectados ecocardiográficamente en la profundidad de la pared ventricular posterior izquierda (IVPWD) de ratas en los grupos de operación de AAC y falsos con o sin el tratamiento con trientina.

La FIG. 9A muestra los cambios funcionales detectados ecocardiográficamente en la fracción de eyección (EF)

ventricular izquierda (IVPWD) de ratas en los grupos de operación de AAC y falsos con o sin el tratamiento con trientina.

5 La FIG. 9B muestra los cambios funcionales detectados ecocardiográficamente en la fracción de acortamiento (FS) ventricular izquierdo (IVPWD) de ratas en los grupos de operación de AAC y falsos con o sin el tratamiento con trientina.

10

La FIG. 10A muestra las concentraciones medias de cobre en los tejidos cardíacos de ratas en el grupo de control falso, y en grupos de AAC no tratados y tratados con trientina.

15

La FIG. 10B muestra la media de concentraciones de cobre en el plasma de ratas en el grupo de control falso, y en los grupos de AAC no tratados y tratados con trientina. Un alto nivel inicial de la concentración de cobre en el plasma en
20 ratas con AAC se redujo con el tratamiento con trientina en el grupo tratado con trientina a altas dosis (AAC-Tr(H)) y el grupo tratado con trientina a bajas dosis (AAC-Tr(L)).

25

La FIG. 11 muestra un gráfico de flujo del procedimiento experimental del Ejemplo 4.

30

La FIG. 12 muestra los cambios detectados ecocardiográficamente en la fracción de eyección (EF) ventricular izquierda de monos Rhesus con fallo cardíaco en los grupos no tratados y tratados con trientina.

La FIG. 13 muestra las concentraciones de cobre en distintas muestras de tejido de monos Rhesus con fallo cardíaco en grupos no tratados y tratados con trientina.

5 La FIG. 14 muestra un gráfico de flujo del procedimiento experimental del Ejemplo 5.

La FIG. 15 muestra los cambios detectados ecocardiográficamente en la fracción de eyección del
10 ventrículo izquierdo (LVEF) de ratones con infarto de miocardio en grupos no tratados y tratados con trientina.

La FIG. 16 muestra concentraciones en distintas muestras de tejidos De ratones con infarto de miocardio en grupos no
15 tratados y tratados con trientina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente solicitud proporciona procedimientos y
20 composiciones para la reparación y regeneración de tejido isquémico que promueven la distribución y reutilización tisular de cobre. En particular, se describen procedimientos para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular
25 isquémica administrando una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como trientina) y opcionalmente una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre. La invención descrita en el presente documento se basa en el hallazgo sorprendente de que
30 una tetramina quelante del cobre (tal como una trientina), utilizada anteriormente para retirar iones de cobre y para

reducir niveles de cobre, puede promover la redistribución de cobre entre el miocárdico isquémico y la circulación sanguínea, cuando se utilizan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la presente solicitud. La trientina, por ejemplo, se puede unir específicamente a un tejido isquémico y sirve para cargar cobre en las células en el tejido isquémico. Por lo tanto, la trientina y otras tetraminas quelantes del cobre con propiedades similares son útiles para aumentar el nivel de cobre intracelular en el miocardio isquémico, restaurando de esta manera las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre, promoviendo la reparación tisular, e invirtiendo el infarto miocárdico isquémico. Por lo tanto, los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para tratar distintas enfermedades y afecciones isquémicas.

Procedimientos para aumentar los niveles intracelulares de cobre

La presente solicitud en un aspecto proporciona un procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende tetramina quelante del cobre (a la que también se hace referencia de aquí en adelante como "composición de tetramina"). En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones el ion de cobre de la

composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo de trientina cristalino y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en la que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua.

En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no está formando un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones la composición promotora de cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas

realizaciones la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre, y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede

5 cambiar la distribución de cobre entre los orgánulos celulares. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran

10 secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300

15 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un

20 procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y la

25 administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas

30 realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas

realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre aumentan el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que el individuo se ha administrado anteriormente con una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones se ha administrado al individuo una composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas,

4 semanas o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

10

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado al individuo previamente una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición promotora del cobre aumenta el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora del cobre aproximadamente una o más de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a

aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

5

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de suministro de ion de cobre en las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al
10 individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En
15 algunas realizaciones el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en la que el ion de cobre está quelado por los cuatro
20 grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en la que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones de cloruro y una molécula de agua.

En algunas realizaciones, el ion de cobre en la
25 composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas
30 realizaciones, la cantidad eficaz de una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre

extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de suministro de ion de cobre en las células de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y 15 la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel extracelular de cobre del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina.

20 En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición 25 de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En 30 algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente

450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

5

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de suministro de cobre en las células de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y la administración al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de composición promotora del cobre aumenta el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de suministro de ion de cobre en las células de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado con anterioridad al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel extracelular de cobre del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre, y disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo una composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de suministro de ion de cobre en las células de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión

tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado con anterioridad al individuo una

5 cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de

10 composición promotora de cobre aumenta el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4

15 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450

20 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de la redistribución y reutilización tisular de cobre en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de

30 tetramina que comprende un tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la

trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma complejos con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de la redistribución y reutilización tisular del cobre en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de

tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre, y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de la redistribución y reutilización tisular de cobre en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante de cobre es

la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre aumenta el nivel extracelular de cobre en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de la redistribución y reutilización tisular de cobre en un individuo que tiene una lesión isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se había administrado anteriormente al individuo una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel extracelular de cobre del individuo. En algunas realizaciones la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre, y/o disminuir la toxicidad

del zinc. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de la redistribución y reutilización tisular del cobre en un individuo que tienen una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado anteriormente al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de composición promotora de cobre aumenta el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones se ha administrado al individuo una composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4

semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

10

En algunas realizaciones, el nivel intracelular de cobre aumenta más de aproximadamente uno cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en el tejido isquémico del individuo en comparación con el nivel intracelular de cobre del tejido isquémico del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el nivel de cobre (tal como el nivel de cobre total) del tejido isquémico del individuo está aumentado más de aproximadamente uno cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con el nivel de cobre del tejido isquémico del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el procedimiento no disminuye el nivel de cobre extracelular (tal como el nivel de cobre en el suero) en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento no disminuye el nivel de cobre extracelular (tal como el nivel de cobre en el suero) en el individuo más de aproximadamente uno cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con el nivel extracelular de cobre del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el procedimiento no

disminuye el nivel total de cobre en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento no disminuye el nivel total de cobre en el individuo más de aproximadamente uno cualquiera de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con el nivel total de cobre del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, al administrar la composición de tetramina, el individuo tiene al menos aproximadamente cualquiera de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más del nivel total medio de cobre en el suero de individuos sanos.

Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente puede comprender adicionalmente el control (incluyendo la medición y determinación) del nivel de cobre en el individuo, y ajustando el plan de tratamiento basándose en el nivel de cobre. En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de cobre extracelular del tejido isquémico. En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de cobre en el suero del individuo. En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de cobre intracelular del tejido isquémico. En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel total de cobre, que incluyen los niveles tanto de Cu^{1+} y Cu^{2+} . En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de Cu^{2+} . En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de Cu^{1+} . En algunas realizaciones, el nivel de cobre es el nivel de cobre libre (es decir, no unido). En algunas realizaciones, el nivel de cobre comprende el nivel de cobre tanto libre como unido a proteínas. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el control del nivel de cobre intracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el

ajuste de la dosificación (incluyendo por ejemplo, la cantidad eficaz, la frecuencia de administración, y la combinación de las mismas) de la composición de tetramina basada en el nivel de cobre intracelular del individuo.

5

Los distintos niveles de cobre se pueden controlar individualmente o en combinación antes de y/o después de cada etapa de administración, y los niveles de cobre correspondientes antes y después de la administración de las composiciones de tetramina se puede comparar para determinar si el nivel de cobre ha aumentado o disminuido por el plan de tratamiento actual. En algunas realizaciones, el nivel de cobre medido después de la administración de la composición de tetramina se compara con un nivel de cobre predeterminado para determinar si el nivel de cobre necesita aumentarse adicionalmente. El nivel de cobre predeterminado puede ser un nivel de cobre mínimo (tal como un nivel de cobre intracelular, o un nivel de cobre extracelular) que es necesario para promover las actividades de HIF dependiente de cobre y/o para inducir uno o más eventos de reparación del tejido isquémico. El plan de tratamiento se puede ajustar (incluyendo, por ejemplo, si administrar una composición promotora de cobre, dosis, frecuencia, y duración de la composición de tetramina y opcionalmente la composición promotora de cobre, etc.) basándose en uno cualquiera de entre el nivel de cobre extracelular del tejido isquémico, el nivel de cobre en el suero del individuo, el nivel de cobre intracelular del tejido isquémico, otros niveles de cobre del individuo, y combinaciones de los mismos. Además, la extensión de la reparación de la lesión del tejido isquémico se puede controlar para evaluar el plan de tratamiento. Los

procedimientos para controlar la reparación de la lesión del tejido isquémico se describen en la sección de "Procedimientos de inducción de la reparación tisular", que puede incluir, pero no se limitan a, evaluaciones de marcadores patológicos, histológicos o moleculares asociados con la lesión tisular isquémica.

En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (incluyendo los procedimientos de la sección "Procedimientos de inducción de reparación tisular), el procedimiento comprende adicionalmente el control del nivel intracelular de cobre en un individuo. En algunas realizaciones, el nivel de cobre intracelular del individuo necesita aumentarse adicionalmente después de la administración de la composición de tetramina, si el nivel de cobre intracelular es al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más menos que el nivel de cobre intracelular predeterminado. En algunas realizaciones, en las que el nivel de cobre intracelular necesita aumentarse adicionalmente, el plan de tratamiento del individuo se ajusta por cualquiera o una combinación de los siguientes: (a) la administración continua de la composición de tetramina; (b) administrar la composición de tetramina a una dosis alta; o (c) administrar la composición de tetramina a una frecuencia de dosificación. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el ajuste de la dosificación (incluyendo, por ejemplo, la cantidad eficaz, la frecuencia de administración, y una combinación de las mismas) de la composición de tetramina basándose en el nivel de cobre del individuo. En algunas

realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente el control del nivel extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el nivel de cobre extracelular del individuo necesita aumentarse, si el nivel de cobre extracelular disminuye al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más después de la administración de la composición de tetramina o si el nivel de cobre extracelular del individuo es al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más por debajo de un nivel de cobre extracelular pre-determinado. En algunas realizaciones, en el que el nivel de cobre extracelular del individuo necesita aumentarse, el plan de tratamiento del individuo se ajusta adicionalmente por cualquiera o una combinación de lo siguiente: (a) administrar una composición de tetramina que comprende un ion de cobre, cuando la composición de tetramina del plan de tratamiento actual no comprende un ion de cobre; (b) administrar una composición promotora de cobre, cuando el plan de tratamiento actual no comprende la administración de una composición promotora de cobre; (c) aumento de la dosis de la composición promotora de cobre; (d) aumento de la frecuencia de dosis de la composición promotora de cobre; (e) administrar una composición promotora de cobre diferente; o (f) detener la administración de la composición de tetramina al individuo.

Los niveles de cobre se pueden determinar y/o controlar utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el nivel de cobre se puede determinar cuantitativamente por espectrometría de absorción atómica, por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente

(ICPMS), o por microscopía de emisión de rayos-x inducida por proteína (PIXE). Véase, por ejemplo, Cooper G.J.S. y col. Diabetes (2004) 53: 2501-2508; Lu J. y col. Drug Metabolism and Disposition (2007) 35(2): 221-227; y Publicación de Patente de EE. UU. N° 20100160428A1. Por ejemplo, el nivel total de cobre en una muestra de tejido isquémico puede medirse utilizando una muestra homogeneizada de un tejido isquémico (tal como un tejido isquémico homogeneizado con ácido nítrico), que incluye tanto los contenidos intracelular y extracelular del tejido isquémico. El nivel de cobre intracelular en una muestra de tejido isquémico puede medirse utilizando una muestra de fluidos corporales, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, linfa, y mucus. En algunas realizaciones, el suero sanguíneo se utiliza para controlar el nivel de cobre extracelular en un individuo. En algunas realizaciones, se utiliza una biopsia de hígado para determinar el nivel de cobre metabolizado en un individuo. La espectroscopia por resonancia electrónica paramagnética, por ejemplo, se puede utilizar para detectar el estado de oxidación (Cu^{1+} vs. Cu^{2+}) de cobre en la muestra, y para proporcionar un porcentaje de cada estado de oxidación del cobre en la muestra. El nivel de Cu^{2+} se puede calcular de esta manera utilizando el porcentaje de Cu^{2+} en la muestra y el nivel total de cobre que incluye tanto Cu^{1+} y Cu^{2+} . De manera similar, el nivel de Cu^{1+} se puede calcular utilizando el porcentaje de Cu^{1+} en la muestra y el nivel total de cobre que incluye tanto Cu^{1+} y Cu^{2+} . En algunas realizaciones, se mide la ceruloplasmina, y/o la concentración proteica de seroalbúmina, por ejemplo, utilizando procedimientos basados en anticuerpos (por ejemplo, transferencia de Western, ELISA, y similares) para

controlar el nivel de cobre que está disponible para la captación y/o reutilización por el tejido isquémico. En algunas realizaciones, se puede utilizar un corte de sección transversal de una muestra de tejido isquémico para medir el nivel de cobre tanto intracelular como extracelular utilizando procedimientos de creación de imágenes fluorescentes por rayos X (XRF).

Los procedimientos descritos en el presente documento son aplicables en general para la redistribución de cobre (incluyendo, por ejemplo, el aumento del nivel de cobre intracelular y/o suministro de cobre a las células) en una variedad de tejidos isquémicos. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico.

Procedimientos de inducción de reparación tisular

La presente solicitud en un aspecto proporciona un procedimiento de inducción de al menos un evento (incluyendo, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) de reparación tisular de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de

tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En 5 algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina está formando un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los 10 cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición de tetramina no forma un complejo con la 15 tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas 20 realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se 25 administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de al menos un evento (incluyendo, por ejemplo, al menos cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) 30 de reparación tisular de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la

administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que pueden aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre no comprende un ion de cobre.

En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuye la excreción de cobre y/o disminuye la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de al menos un evento (incluyendo, por ejemplo, al menos cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) de reparación tisular de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas

realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición promotora es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora de cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para inducir al menos un evento (incluyendo por ejemplo al menos cualquiera de entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) de reparación tisular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre.

En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la

excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1
5 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a
10 aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para inducir al menos un evento (incluyendo por ejemplo al menos cualquiera de entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) de reparación tisular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la
20 administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas
25 realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre 1 día, 2 días, 3
30 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición

de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

10 En algunas realizaciones de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos de inducción de reparación tisular como se ha descrito anteriormente, el al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la inducción de la migración de células madre hacia el tejido

15 isquémico, incluyendo pero sin limitarse a las células mesenquimáticas (MSC), células madre mesenquimáticas de médula ósea (BMSC), células madre multipotenciales, células madre pluripotenciales inducidas (iPS), o células madre derivadas de distintos tejidos. En algunas realizaciones, el

20 al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la inducción de la diferenciación de células madre en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la

25 inducción de regeneración tisular en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la inversión del daño en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el al menos un evento (tal como al menos dos

30 eventos) de reparación tisular comprende la reconstrucción del microambiente de células neurofibrilares y células

neurosecretoras en el tejido tisular. En algunas realizaciones, el al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la inducción de una molécula de señalización que desencadena la regeneración tisular. En algunas realizaciones, el al menos un evento (tal como al menos dos eventos) de reparación tisular comprende la promoción las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre en el tejido isquémico.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden utilizar para inducir eventos de reparación tisular (incluyendo por ejemplo, la promoción de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre, y/o inducción de migración de células madre hacia el tejido isquémico) en distintos tipos de tejidos isquémicos. En algunas realizaciones el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido musculoesquelético isquémico (tal como tejido isquémico de extremidades). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico.

25

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración (es decir, la migración dirigida) de células madre hacia un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que

30

comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En

5 algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro
10 grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada -plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del
15 cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la
20 composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

25

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para la inducción de la migración (es decir, la migración dirigida) de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que
30 comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una

tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

20

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración (es decir, la migración dirigida) de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En

30

algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran

5 secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300

10 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un

15 procedimiento de inducción de la migración (es decir, la migración dirigida) de células madre a un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una

20 tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la

25 trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas

30 realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre 1

día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por

5 vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la

10 composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración (es decir, la migración dirigida) de células madre a un tejido isquémico de

15 un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de una

20 composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la

25 composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por

30 vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a

aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

5

En algunas realizaciones, la célula madre es una célula madre mesenquimática (MSC), una célula madre mesenquimática de médula ósea (BMSC), una célula madre multipotencial, una célula madre pluripotencial inducida (iPS), o una célula madre derivada de un tejido. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de un tejido es una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre derivada de tejido cardíaco, o una célula madre derivada del tejido del cordón umbilical. En otras realizaciones, la célula madre es una célula madre de adulto. En aspectos particulares, la célula madre de adulto es una célula madre hematopoyética, una célula madre mamaria, una célula madre intestinal, una célula madre mesenquimática de la placenta, tejido adiposo, pulmón, médula ósea, sangre, gelatina de Wharton del cordón umbilical, o de los dientes (tal como del nicho perivascular de la pulpa dental y el ligamento periodontal), una célula madre endotelial, una célula madre neural, una célula madre de adulto olfatoria, una célula madre de la cresta neural, o una célula madre de la línea germinal (por ejemplo, una célula madre del testículo).

En algunas realizaciones, las células madre migran *in vivo* desde un órgano o compartimento tisular a un sitio de lesión isquémica en otro órgano o compartimento tisular que tiene una lesión tisular isquémica. Por ejemplo, las MSC pueden migrar desde la médula ósea (BM), sangre del cordón

umbilical (UCB), estroma del cordón umbilical (gelatina de Wharton), placenta, y tejido adiposo (AT). En otras realizaciones, se pueden aislar las MSC de un órgano o compartimento tisular, enriquecerse y/o tratarse *in vitro*, y entonces utilizarse *in vivo* para la migración hacia el sitio de la lesión en un tejido u órgano.

Los ensayos para la medición de la migración celular que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, biomarcadores, bioluminiscencia, fluorescencia, tomografía de emisión de positrones (PET)/CT, y creación de imágenes por resonancia magnética (MRI) *in vivo*. Los ensayos *in vivo* se pueden validar y corroborar con otros procedimientos, por ejemplo, IHC sobre secciones tisulares.

In vivo, las técnicas de creación de imágenes no invasivas para ensayar la migración de células madre incluyen, partículas revestidas de oro-dextrano de creación de imágenes que se cargan en las MCR, que se pueden visualizar utilizando rayos x, espectroscopia de Raman, tomografía computarizada (CT) o modalidades de ultrasonidos (US). En algunas realizaciones, se cargan construcciones de nanopartículas biocompatibles, rastreadores, o partículas superparamagnéticas en las células madre tales como las MSC con propiedades que hacen posible la visualización celular mediante rayos x, CT, US, PER o MRI. En algunas realizaciones, la migración de las células madres se pueden ensayar utilizando técnicas tales como la ligadura y punción cecal (CLP). Por ejemplo, llevando a cabo la CLP en un ratón GFP quimérico se permite observar el comportamiento de las BMSC en un cuadro de sepsis abdominal. Se puede utilizar la

FACS, citometría de flujo e inmunohistoquímica para rastrear la migración de las BMSC en la sangre periférica, pulmón, hígado, heridas cutáneas, y en el sitio primario de la lesión isquémica. El comportamiento de las BMSC puede correlacionarse con el tiempo de la lesión, así como con los niveles locales y sistémicos (utilizando RT-PCR) de citocinas y quimiocinas. El rastreo de la migración de las células madre puede ayudar a aclarar la contribución de las BMSC a la reparación y regeneración tisular y de un órgano local y distante después de una lesión tisular isquémica.

En algunas realizaciones, la migración de células madre se puede controlar utilizando células marcadas que se administran al individuo. Se utilizan estrategias, tales como marcado isotópico y coloración para marcar las células madre. En algunas realizaciones, las estrategias de marcado incluyen: inyectar las células madre de animales macho a hembras, ya que el cromosoma Y podría ser el rastreador; inyectar células madre de una especie A en una especie B, de manera que los genes específicos de la especie A podría ser el rastreador celular; marcar las células madre con pKH26, BrdU u otros colorantes, de manera que las células madre se podrían rastrear por los colorantes o las reacciones enzimáticas específicas para el rastreador.

En algunas realizaciones, se utiliza el marcado isotópico para rastrear las células madre *in vivo*. Las células madre se podrían rastrear mediante los isótopos que marcan las células, pero es de señalar que se tienen que considerar los problemas de seguridad y la semivida radioactiva. Otras estrategias de rastreo *in vivo* de células

madre incluye, pero no se limitan a: coloración celular mediante colorantes celulares tales como DID, creación de imágenes vivas de las células de la superficie corporal mediante microscopía de fluorescencia excitada por dos
5 fotones, creación de imágenes vivas de las células de superficie del cuerpo específicas de animales transgénicos mediante microscopía de fluorescencia excitada por dos fotones, marcado de las células con SPIO y rastreando el rastreador mediante MRI, etc. Las células madre se podrían
10 marcar por múltiples colorantes fluorescentes, y después se inyectan en animales. Poco antes del experimento de rastreo, se pueden congelar los órganos, cortarlos y observarlos directamente con microscopía de escáner de laser confocal. Esta estrategia de rastreo no toma demasiadas células
15 marcadas (10^6 células/conejo), de manera que las células autólogas se pueden rastrear en el contexto natural de los órganos y tejidos.

Se puede conseguir el marcado de las células madre, por
20 ejemplo, mediante un solo rastreador, tal como pKH26. El pKH26 es un marcador liposoluble, y el marcado no permite que el pKH26 penetre la membrana celular. Por lo tanto, el pKH26 es adecuado para la creación de imágenes vivas. El proceso de rastreo que se describe en el presente documento puede
25 implicar el marcado múltiple por 2 o 3 colorantes. En algunas realizaciones, el rastreador del núcleo (DAPI, Hoeschst) más el rastreador de membrana se utiliza para el marcado múltiple. El rastreador del núcleo afirma el núcleo de las células, y da un eco del rastreador de membrana pKH26 al
30 mismo tiempo, En algunas realizaciones, se utilizan 2 rastreadores de membrana, por ejemplo, Dio (3) y pKH26, para

el marcado múltiple. Estos rastreadores marcan las células mediante mecanismo similares, pero tienen distintas longitudes de onda de excitación y emisión, permitiendo la confirmación simultánea de la migración (es decir, la migración dirigida) de las células madre (tales como las BMSC) de 2 señales fluorescentes diferentes. En este procedimiento de rastreo, solamente las señales solapadas de diferentes longitudes de onda (tal como señales rojas y verdes) se consideran las señales de migración dirigida.

10

Muchos tipos de tejidos animales son auto-fluorescentes, y la fluorescencia más común de los tejidos de la fluorescencia verde. Las células cardíacas tienen una fluorescencia relativamente baja, pero su fluorescencia es suficientemente fuerte como para interferir las observaciones. El extremo de corte de las lonchas siempre tiene la fluorescencia más fuerte. Para hacer frente a la interferencia, solo las señales verdes y rojas solapadas se podrían reconocer como señales de rastreo. La fluorescencia roja es más adecuada para el análisis estadístico con el valor IOD por su especificidad (excepto la inexactitud obvia de las señales fluorescentes rojas).

15
20

En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de inducción de la diferenciación de células a madre en el tejido isquémico, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En

25
30

algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición de tetramina no forma complejos con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es suficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre.

En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la célula madre es capaz de diferenciarse en un tipo de células mesenquimática, incluyendo osteoblastos, adipocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales,

enterocitos, osteocitos, neurocitos, hepatocitos, nefrocitos, miocitos (de músculo esquelético y músculo liso), y cardiomiocitos. En otras realizaciones, la célula madre es capaz de diferenciarse en células de origen no mesodérmico incluyendo células beta, hepatocitos, y neuronas. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

Se pueden utilizar ensayos conocidos en la técnica que se pueden utilizar para aclarar el proceso de diferenciación de células madre y los fenotipos de células madre diferenciadas (tal como MSC, por ejemplo, BMSC), incluyendo, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina y tinción con alizarina roja S para los osteoblastos, tinción con aceite rojo O, y tinción por azul alcian para la condrogénesis. La diferenciación de las células madre tales como las MSC en distintos tipos celulares se pueden ensayar también por perfil de expresión genética. Por ejemplo, el perfil de transcripción ha identificado genes específicos implicados en la diferenciación osteogénica (FHL2, ITGA5, Fgf18), condrogénesis (FOXO1A) y tenogénesis (Smad8). En algunas realizaciones, las MSC pueden dar lugar a un alto número de células mediante expansión a gran escala.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la regeneración tisular que comprende la administración al individuo de una cantidad

eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende

5 adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el

10 que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un

15 complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración al individuo de una composición

20 promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se ha administrado previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la

25 composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la

30 toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas

realizaciones, el procedimiento induce la proliferación celular en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la angiogénesis en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la

5 maduración de los vasos sanguíneos en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la maduración de vasos sanguíneos en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el procedimiento da como resultado dos o más de los efectos descritos anteriormente. En algunas

10 realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se

15 administra dos veces al día.

La regeneración tisular desvelada en el presente documento se puede ensayar, por ejemplo, en un organismo en el que una parte de un tejido está dañado o se elimina. Una

20 composición de tetramina como se describe en el presente documento se administra entonces al organismo y se determina la tasa de regeneración tisular. La tasa de regeneración tisular se puede comparar con la tasa observada cuando se administra al organismo un control o no se trata. Otros

25 parámetros que se puede determinar durante el ensayo de la regeneración tisular incluyen, pero no se limitan a, los síntomas o resultados tales como el dolor o marcadores del dolor, signos o síntomas de inflamación, grado final de regeneración, y calidad de la regeneración. En algunas

30 realizaciones, un ensayo de regeneración tisular del presente documento comprende la evaluación de uno o más parámetros

funcionales de un órgano, tal como uno o más marcadores funcionales cardíacos, uno o más marcadores funcionales renales, y uno o más marcadores funcionales cerebrales.

5 En algunas realizaciones, se pueden utilizar uno o más de los siguientes parámetros en el análisis de la regeneración y reparación cardíaca para la evaluación de los procedimientos descritos en el presente documento: (1) cantidad de tejido reconstituido o masa de miocardio y
10 sistema vascular coronario; (2) número y tamaño de los miocitos y vasos restaurados; (3) integración de los miocitos y los vasos recién formados; (3) integración de los miocitos y vasos recién formados con el miocardio circundante; y (4) origen de las estructuras miocárdicas regeneradas. En un
15 aspecto, se puede llevar a cabo una creación de imágenes por resonancia magnética (MRI) para estudiar el área de cicatrización, la función ventricular izquierda global, la función regional (movimiento de la pared y grosor) y perfusión ventricular regional. En un aspecto, se utiliza la
20 MRI para detectar y/o confirmar la presencia de nuevos vasos, tejidos o células que mejoran la función ventricular. En otro aspecto más, se puede llevar a cabo la histopatología para determinar el área de la cicatriz y la identificación y cuantificación de las células madre cardíacas positivas a c-
25 kit. La histopatología también proporciona datos de la distribución, tamaño y densidad de los nuevos vasos y cardiomiocitos. La histopatología permite la documentación del proceso de reparación a nivel tisular y celular. Por ejemplo, se llevan a cabo ensayos para evaluar, en las
30 secciones infartadas, la densidad de microvasos (vasos positivos a vWF/mm²), células positivas a BrdU y células

positivas a c-kit. La cuantificación de la densidad de microvasos utilizando el factor de von Willebrand (vWF) permite determinar la cantidad de nuevos vasos sanguíneos creados en la zona de infarto. Las células positivas a BrdU

5 representan la proliferación de células, incluyendo las células cardíacas. Los ensayos de las células positivas a c-kit muestra la cantidad de células madre en las secciones infartadas seleccionadas.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento para invertir el daño en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una

15 tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo

20 con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y

25 en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento

30 comprende adicionalmente la administración al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel

de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones se administra previamente al individuo la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede

5 aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a

10 aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

15 La inversión de daño tisular se puede ensayar por cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, por detección de marcadores celulares de homeostasis tisular normal y/o daño tisular persistente (por ejemplo, por inmunohistoquímica o midiendo al ADN y niveles de transcripción), medir el área

20 de daño o volumen de daño, o evaluar cualquiera de los indicadores clínicamente relevante. Por ejemplo, la inversión del daño cardíaco del tejido infartado se puede medir mediante la cuantificación del número de células, tal como el número de miocitos, fibroblastos, o cantidad de cicatriz, o

25 con ensayos funcionales en cuanto a aspectos de rendimiento o estructurales de la función cardíaca que incluyen, LVEDP, LVDP, dp/dt máx., dp/dt mín., peso de LV, volumen de cámaras y tensión diastólica de la pared. En general, un procedimiento desvelado en el presente documento se dice que

30 invierte el daño del tejido isquémico si da como resultado un cambio significativo (por ejemplo, al menos 2 veces) de

cualquiera de dichas evaluaciones clínicas o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el procedimiento invierte la fibrosis en el tejido isquémico. La fibrosis es la acumulación anormal de tejido fibroso que puede producirse como parte del proceso de cicatrización de heridas en un tejido dañado. Dicho daño tisular puede ser el resultado de una lesión física, inflamación, infección, exposición a toxinas, y otras causas.

Los tejidos fibróticos se acumulan en el corazón y los vasos sanguíneos como resultado de la hipertensión, enfermedad cardíaca congestiva, aterosclerosis, e infarto de miocardio. La presión sanguínea alta, o hipertensión, puede producirse por una variedad de factores y a menudo da lugar al desarrollo de enfermedad cardíaca hipertensiva (HHD) con una progresión a paro cardíaco e infarto de miocardio. De manera similar, la aterosclerosis y otras enfermedades cardíacas isquémicas a menudo también dan como resultado el paro cardíaco. Estas enfermedades cardiovasculares presentan una acumulación de matriz extracelular o depósito fibrótico que dan como resultado la rigidez del sistema vascular y la rigidez del propio tejido cardíaco. Este depósito de material fibrótico es una respuesta al daño inducido por el estado hipertensivo y/o esclerótico, pero los efectos de esta respuesta también dan como resultado efectos negativos de rigidez vascular y cardíaca, así como agrandamiento ventricular. En algunos casos, el aumento de la fibrosis cardíaca destruye o altera las señales transmitidas por los cardiomiocitos mediante el armazón tisular del corazón, dando lugar a la destrucción de la función cardíaca eficaz y la promoción del paro cardíaco y el infarto de miocardio.

De acuerdo con la presente divulgación, los perfiles de expresión de genes regulados diferencialmente durante el daño tisular se pueden utilizar para evaluar la inversión del daño tisular en un procedimiento de tratamiento desvelado en el presente documento. Por ejemplo, el análisis basado en micromatrices de la expresión genética se puede basar en el análisis de células humanas (tales como fibroblastos o cardiomiocitos) sometidos a un estímulo seleccionado que da como resultado cambios en la acumulación y proliferación de colágeno extracelular, distintivos de la fibrosis. Los estímulos se pueden seleccionar para imitar los del proceso de fibrosis específico de tejido. Los perfiles de expresión genética asociados con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis de tejido cardiaco, nefropatía diabética, y fibrosis renal) se pueden utilizar entonces para ensayar la fibrosis y la inversión del daño fibrótico en el tejido. En otras realizaciones, los perfiles de expresión genética asociados con inversión del a fibrosis (por ejemplo, con un tratamiento conocido porque al menos invierte la fibrosis parcialmente) se pueden utilizar para ensayar la fibrosis y la inversión del daño fibrótico del tejido.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de reconstrucción del microambiente de células neurofibrilares y células neurosecretoras en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la

trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas, se ha administrado previamente al individuo una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora de cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300

mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

5 El microambiente es una red intrincada de células estructurales e inflamatorias, citocinas, proteínas, y factores de crecimiento. En el caso de la isquemia asociada con enfermedades o afecciones fibróticas cardíacas, el corazón comprende células estructurales residentes tales como

10 los cardiomiocitos, células epiteliales, fibroblastos, y progenitores de cardiomiocitos residentes y células secretoras de citocinas. Estas células interactúan con factores fibróticos durante la patogénesis de la fibrosis. En ciertos aspectos los fibroblastos y miofibroblastos tienen un

15 importante papel en la creación de un ambiente fibrótico, ya que secretan un exceso de colágeno y materiales de la matriz que dan lugar a una cicatrización irreversible. Las moléculas de adhesión célula-a-célula y los ligandos de la matriz extracelular son factores importantes en el microambiente

20 fibrótico y promueve la fibrosis y la diferenciación de fibroblastos. En algunas realizaciones, la señalización mediada por la adhesión se ensaya en el microambiente tisular. Por ejemplo, la diferenciación y migración se produce en respuesta a pistas mecánicas desde el

25 microambiente, tal como la rigidez de la matriz circundante. En un aspecto, la elasticidad del tejido o las matrices de células madre mesenquimáticas (MSC) cultivadas se ensayan y modulan para promover la migración dirigida de las células madre hacia el tejido lesionado isquémicamente, la

30 diferenciación de las células madre en el sitio de la lesión isquémica, la reparación tisular, y/o la inversión del daño

tisular. En una realización, las matrices blandas dan como resultado la diferenciación de las MSC en las células tipo neuronas, mientras que las matrices rígidas dan como resultado la diferenciación de MSC en miogénicas. En un
5 aspecto, la matriz extracelular y sus componentes del sitio de la lesión isquémica se ensayan para indicar si el microambiente promueve la migración de la célula madre hacia el sitio, la diferenciación de la célula madre en el sitio de la lesión isquémica, reparación tisular, y/o inversión del
10 daño tisular.

En algunas realizaciones, los cambios en las células en el contexto de su ambiente natural, se miden para indicar la eficacia y/o toxicidad de un procedimiento terapéutico
15 desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, el microambiente de las células madre de un tejido u órgano donante (tal como la médula ósea) y de un sitio de la lesión isquémica se ensayan y/o modulan para promover la migración hacia el sitio, la diferenciación de células madre en el
20 sitio de la lesión, la reparación tisular, y/o la inversión del daño tisular. El microambiente tisular local se puede ensayar por tinción proteica (IHC e IF) y la tinción de ARN con cualquiera de ISH cromogénicos o fluorescentes. Por ejemplo, el microambiente hipóxico se puede indicar por la
25 tinción de un marcador hipóxico, tinción por un marcador celular endotelial, análisis de la densidad de microvasos, y análisis de proximidad. El microambiente tisular también puede estudiarse utilizando cultivos de órganos o cultivos organotípicos como se desvela en Benbrook, 2006, Drug
30 Discovery Today: Disease Models, 3(2): 143-148.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de una molécula de señalización que desencadena la regeneración tisular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, se ha administrado previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se

administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

Las moléculas de señalización adecuadas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a HIF-1, VEGF, SDF-1, CXCR4, CXCL12 (también denominado SDF-1 α), MMP, HGF/c-met, TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5, CXCR6, CD44, CD54, CD56, CD106, E-caderina, P-selectina, integrinas tales como integrina-beta1 y CD49a, b, c, e, f (integrinas α 1, 2, 3, 4, 6), y ligandos de integrina tales como VCAM y ICAM.

El eje SDF-1/CXCR4 es uno de los mecanismos más importantes de la migración dirigida de las células madre. El SDF-1 (factor 1 derivado de células estromáticas o CXCL12), pertenece a la familia de quimiocinas CXC, es una proteína secretada molecular pequeña. La expresión de SDF-1 se regula por el HIF-1 (factor-1 inducible por hipoxia). El HIF-1 está compuesto por HIF-1 α y HIF-1 β /ARNT (translocalizador nuclear aril hidrocarbano, ARNT). El HIF-1 β es estable en el citoplasma, de manera que la expresión y acumulación de HIF-1 α determina la actividad del HIF-1. En la normoxia, la proteína HIF-1 α se sintetiza y se degrada rápidamente por el sistema ubiquitina-proteasoma. Las prolil hidroxilasas (PHD) hidroxilan el HIF-1 α y el HIF-1 α hidroxilado es reconocido por la proteína supresora tumoral de Hippel-Lindau (pVHL),

que constituye una ubiquitina-proteína ligasa que se dirige al HIF-1 α para la degradación proteica. En la lesión tisular isquémica, la región dañada es hipóxica, lo cual inhibe la actividad de las PHD, haciendo posible la acumulación de HIF-1 α y su translocación al núcleo, donde el HIF-1 α se dimeriza con el HIF-1 β para formar el HIF-1, que se combina con otros factores e inicia la transcripción de genes diana. Los tejidos lesionados expresan un alto nivel de SDF-1 y liberan SDF-1 en la circulación, que construye un gradiente de concentración desde la región lesionada hasta el extremo más lejano de la circulación. El gradiente por lo tanto atrae las células madre que expresan el CXCR4, incluyendo las BMSC, hacia los tejidos lesionados.

15 Cuando el corazón se encuentra en isquemia crónica, la sangre de las arterias coronarias no puede satisfacer la demanda del miocardio. La isquemia crónica puede inducir fibrosis miocárdica, disminuir la densidad de microarterias, afectar el bombeo de sangre, y finalmente da como resultado el infarto cardíaco isquémico. En la isquemia crónica, la actividad de HIF-1 está limitada, dando como resultado la inhibición de la expresión de los factores angiogénicos que se regulan por el HIF-1. El suministro de sangre podría por tanto no restaurarse, y se produciría un infarto.

25 Habitualmente, la actividad de HIF-1 en los tejidos isquémicos lesionados está temporalmente limitada. Tanto los experimentos con animales como los ensayos clínicos han demostrado que, en la isquemia cardíaca, el HIF-1 α se acumula en los tejidos lesionados inmediatamente después de la lesión, pero disminuye gradualmente después. La actividad de

HIF-1 decae incluso más rápido que el nivel de HIF-1, dando como resultado la disminución de la expresión de factores regulados por el HIF-1, tales como el VEGF y SDF-1, después del aumento transitorio. Debido a la regulación mediante el HIF-1, la expresión de SDF-1 tiene un pico en el primer o segundo día después del infarto cardíaco. La expresión de SDF-1 disminuye entonces gradualmente, y se reduce al nivel de la línea base aproximadamente en un mes. Debido a que el SDF-1 es uno de los movilizadores de migración dirigida de células madre, la disminución del nivel de SDF-1 da lugar a al retroceso e incluso a la desaparición de la migración dirigida de células madre.

De manera importante, la defensa de los mecanismos inducidos por el HIF-1 α que se activa en condiciones isquémicas agudas funciona de manera diferente en condiciones isquémicas prolongadas. En condiciones isquémicas a largo plazo, los niveles de proteína HIF aumentan en el miocardio isquémico, mientras que los genes regulados por el HIF (tal como el VEGF) se suprimen, lo que da lugar a una disminución de la revascularización y regeneración alterada. La privación de cobre reduce la unión del HIF-1 α a la secuencia HRE de los genes diana y al P300, un componente del complejo transcripcional de HIF-1. Además, el cobre se moviliza sustancialmente desde el miocardio a la sangre después de una isquemia prolongada. Esta movilización de cobre en el flujo coronario sigue sensiblemente a la isquemia cardíaca prolongada pero no corta. La pérdida de cobre se correlaciona con el grado de pérdida de funciones cardíacas. En consecuencias, incluso en condiciones de un nivel proteico de HIF elevado, la regulación positiva de los genes regulados

por HIF no se produce debido a la pérdida de cobre del miocardio. Los elementos trazan tales como el cobre puede dar lugar a la activación de HIF-1, incluyendo la síntesis de HIF-1 α , la estabilización, la translocación desde el citosol al núcleo, la unión a la secuencia HER de los genes diana, y la formación del complejo transcripcional de HIF-1. Por lo tanto, las actividades transcripcionales de HIF-1 pueden tener importantes papeles en la reparación de los tejidos isquémicos. Los procedimientos descritos en el presente documento son útiles para la inducción de una o más moléculas de señalización, tal como el HIF-1 α y los genes diana del HIF-1 dependientes de cobre (tal como el HIF-1 α).

En un aspecto de la presente solicitud, se proporciona un procedimiento de promoción de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de la trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones de cloruro y una molécula de agua. En

algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la expresión de al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento reprime la expresión de al menos un gen diana de HF-1 dependiente de cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre se selecciona de entre el grupo que consiste en VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 y BNIP3. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de las actividades de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que pueden aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones,

la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En

5 algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la expresión de al
10 menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento reprime la expresión de al menos un gen diana de HF-1 dependiente de cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el al menos un gen
15 diana de HIF-1 dependiente del cobre se selecciona de entre el grupo que consiste en VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 y BNIP3. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente
20 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un
25 procedimiento de promoción de las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que
30 comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que pueden

aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la expresión de al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento reprime la expresión de al menos un gen diana de HF-1 dependiente de cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre se selecciona de entre el grupo que consiste en VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 y BNIP3. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de

una composición promotora de cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora del cobre aproximadamente una o más de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la expresión de al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento reprime la expresión de al menos un gen diana de HF-1 dependiente de cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre se selecciona de entre el grupo que consiste en VEGF, GAPDH, GLUT1, PGK1 y BNIP3. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de promoción de las actividades

transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que

5 comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado previamente al individuo una cantidad eficaz de una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la

10 composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, se ha administrado al individuo la composición promotora del cobre aproximadamente una o más de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, o más antes de la

15 administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el procedimiento induce la expresión de al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas

20 realizaciones, el procedimiento reprime la expresión de al menos un gen diana de HF-1 dependiente de cobre en un tejido isquémico de un individuo. En algunas realizaciones, el al menos un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre se selecciona de entre el grupo que consiste en VEGF, GAPDH,

25 GLUT1, PGK1 y BNIP3. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la

30 composición de tetramina se administra dos veces al día.

Los genes diana de HIF-1 se han descrito en la técnica. Véase, por ejemplo, Benita Y. y col, (2009) Nucleic Acids Research, 37 (14): 4587-4602; Shen C. y col, (2008) J. Biol. Chem., 280: 20580-20588; Elvidge G.P. y col, (2006) J. Biol. Chem., 281: 15215-15266; Manalo DJ. y col, (2005) Blood, 105: 659-669; los genes diana de HIF-1 descritos en las referencias se incorporan en el presente documento por referencia. La regulación transcripcional por HIF-1 de un subconjunto de los genes diana de HIF-1 por HIF-1 es independiente del cobre. Véase, por ejemplo, Zhang Z. y col, (2014) Metallomics 6(10): 1889-93. Los genes diana del HIF-1 dependiente del cobre ejemplares incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), transportador 1 de glucosa (GLUT1), fosfoglicerato cinasa 1 (PGK1) y proteína 3 que interactúa con BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa (BNIP3).

Las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre que se contemplan en la presente solicitud incluyen la inducción o represión (es decir, la regulación transcripcional) de la expresión de los genes diana del HIF-1 en un tejido isquémico. En algunas realizaciones, la actividad transcripcional del HIF-1 dependiente del cobre (por ejemplo, las veces de inducción o represión de un gen diana del HIF-1 dependiente del cobre) se reduce al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en un tejido isquémico del individuo antes de recibir el tratamiento, en comparación con un nivel del control. En algunas realizaciones, la actividad transcripcional de HIF- 1

dependiente del cobre (por ejemplo, veces de inducción o represión de un gen diana de HIF-1 dependiente del cobre) en el tejido isquémico del individuo se recupera al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del nivel del control, después de que el individuo reciba el tratamiento. Un nivel del control de la actividad transcripcional del HIF-1 dependiente del cobre puede basarse en las veces de inducción o represión de un gen diana del HIF-1 en un tejido sano en condiciones de isquemia aguda, o en condiciones de un nivel comparable de condiciones hipóxicas, con respecto a condiciones normales (por ejemplo, sin daños, o normóxicas). La actividad transcripcional del HIF-1 puede determinarse comparando el nivel de expresión (por ejemplo, el nivel de ARN y/o el nivel proteico) de un gen diana del HIF-1 dependiente del cobre en un tejido isquémico con respecto al nivel de expresión del gen diana del HIF-1 dependiente del cobre en un tejido sano. Los niveles de expresión de ARN se pueden medir utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, micromatrices, y procedimientos de secuenciación de ARN. Los niveles de expresión proteica se pueden medir utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos basados en anticuerpos (tales como transferencia de Western y ELISA), y procedimientos proteómicos cuantitativos (tales como espectrometría de masas cuantitativa).

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de al menos dos (incluyendo, por

ejemplo, al menos cualquiera de entre 3, 4, 5, 6, 7, o más) eventos de reparación tisular en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que al menos se seleccionan dos eventos de reparación tisular de entre el grupo que consisten en: inducción de la migración de células madre tales como células madre mesenquimáticas de médula ósea hacia el tejido isquémico, inducción de la diferenciación de células madre en el tejido isquémico, inducción de la regeneración del tejido isquémico, inducción de una molécula de señalización que desencadena la regeneración tisular, inversión del daño en el tejido isquémico, reconstrucción del microambiente de células neurofibrilares y células neurosecretoras en el tejido isquémico, y promoción de las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al

individuo de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración de células madre (tales como MSC, por ejemplo BMSC) hacia el tejido isquémico y la inducción de la diferenciación de las células madre en el tejido isquémico, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de inducción de la migración de células madre (tales como MSC, por ejemplo, BMSC) hacia el tejido isquémico y la inducción de la regeneración tisular en el tejido isquémico, que comprende la administración al individuo de una cantidad

eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la migración de células madre (tales como MSC, por ejemplo BMSC) hacia el

5 tejido isquémico, y la inducción de la regeneración tisular en el tejido isquémico, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es

10 trientina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina

15 de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas

20 realizaciones, la cantidad eficaz de una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora del cobre que puede

25 aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de

30 cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones,

la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En

5 algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de
10 tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación de un tejido isquémico (o mejora de la función del tejido isquémico) de un
15 individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas
20 realizaciones, la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una
25 geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de
30 una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas

realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación del tejido isquémico (o mejora de la función del tejido isquémico) de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel extracelular de cobre del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción

de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación de un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y una cantidad eficaz de una composición promotora que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas

realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y la composición promotora del cobre se administran

5 secuencialmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido

10 pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas

15 realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a

20 aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación de un tejido

25 isquémico (o mejora de la función del tejido isquémico) de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, en el que se ha administrado

30 previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del

individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora de cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones se ha administrado al individuo una composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación de un tejido isquémico (o mejora de la función del tejido isquémico) de un

individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre, y de una cantidad eficaz de una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es trientina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones se ha administrado al individuo una composición promotora de cobre aproximadamente uno cualquiera de entre, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más antes de la administración de la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

una enfermedad o una afección asociadas con la lesión tisular isquémica utilizando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de tratamiento del fallo cardíaco isquémico en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la
10 trientina). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de una composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la
15 composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día. En
20 algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra durante al menos aproximadamente 1 mes (tal como aproximadamente 3 meses o al menos aproximadamente 6 meses).

 En algunas realizaciones, el individuo tiene una función
25 de eyección ventricular (LVEF) de no más del 35 % de la línea base. En algunas realizaciones, el individuo tiene un fallo cardíaco de clase II o clase III (basándose en la clasificación funcional de la Asociación Cardíaca de Nueva York o NYHA).

30

Se puede tratar el fallo cardíaco de cualquiera clase o

estadio que tenga un origen isquémico (es decir, un fallo cardíaco isquémico) con los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase I según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase II según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase III según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase IV según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase A según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase B según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase C según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones el individuo tiene un fallo cardíaco Clase D según la NYHA, de origen isquémico. En algunas realizaciones, el individuo tiene uno o más síntomas de fallo cardíaco isquémico, tal como fatiga, palpitaciones, disnea, o limitación de la actividad física. En algunas realizaciones, el individuo tiene uno o más síntomas de enfermedad cardiovascular. En algunas realizaciones, el individuo se ha hospitalizado al menos aproximadamente uno cualquiera de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, 25, 30, o más días.

25

La eficacia de uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede determinar adicionalmente evaluando la extensión de la reparación del tejido isquémico. La reparación tisular se puede evaluar, por ejemplo, por el área del daño o el volumen del daño. La reparación del tejido dañado en un paciente se puede evaluar

30

utilizando cualquier referencia clínicamente relevante. Por ejemplo, la reparación del tejido infartado se puede mediar cuantificando el número de células, tal como el número de miocitos, fibroblastos, o la cantidad de cicatrización, o con
5 ensayos funcionales en cuanto al rendimiento o aspectos estructurales de la función cardíaca que incluyen, LVEDP, LVDP, dp/dt máx., dp/dt mín., peso del LV, volumen de cámara y estrés de la pared diastólico. En general, se dice que un procedimiento desvelado en el presente documento repara el
10 tejido dañado si da como resultado un cambio significativo (por ejemplo, al menos de 2 veces) en cualquiera de dichas evaluaciones clínicas o cualquier combinación de las mismas.

Cualquier procedimiento(s) apropiado se puede llevar a
15 cabo para ensayar la reparación tisular. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo procedimientos para evaluar la cicatrización celular, para evaluar la funcionalidad del tejido reparado, y para evaluar el crecimiento celular en el tejido. Para determinar la extensión de la cicatrización del
20 tejido, se puede llevar a cabo la histología y la tinción celular para detectar la propagación de las células sembradas y/o la apariencia histológica mejorada. En algunos casos, se pueden recolectar partes de tejido y tratarse con un fijador tal como, por ejemplo, formalina en un tampón neutro. Dichas
25 partes de tejido se pueden deshidratar, embeberlas en parafina, y seccionarse con un micrótomo para el análisis histológico. La pueden teñir las secciones con hematoxilina y eosina (H/E) y entonces se montan en portaobjetos de cristal para la evaluación microscópica de morfología y celularidad.
30 En algunos casos, los ensayos fisiológicos se pueden llevar a cabo para evaluar el movimiento tisular y la funcionalidad

después del tratamiento de acuerdo con los procedimientos y materiales proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos mecánicos *in vitro* para medir el trabajo de flexión (WOF) o ángulo de flexión del tejido tendinoso reparado o de una articulación reparada. Los ensayos *in vivo* pueden incluir la evaluación funcional de los órganos, evaluación de los síntomas, o técnicas de creación de imágenes.

En algunas realizaciones, se puede evaluar la función de tejidos y/u órganos antes, durante, o después de la administración de un procedimiento terapéutico desvelado en el presente documento mediante uno cualquiera o más de los siguientes procedimientos: análisis bioquímico de al menos un biomarcador indicativo de la función tisular mejorada mediante procedimientos tales como citometría de flujo, inmunofluorescencia, ELISA, marcado con fósforo, hibridación, amplificación de ácidos nucleicos, o transferencia de Western; ensayos de función celular, tal como ensayos de apoptosis celular, ensayos de necrosis, y ensayos de viabilidad celular, que incluyen la tinción con Anexina V mediante inmunofluorescencia o citometría de flujo, detección de la actividad de caspasa, ensayos de hipoxia, ensayo TUNEL, marcadores de ADN, número de célula en forma de bastón en respuesta al H_2O_2 , evaluación por qPCR de la expresión genética, y medición del área necrótica por tinción H/E; ensayos de formación de cicatriz, incluyendo la medición del número de células fibroblásticas en un área dañada o infartada, medición del depósito de colágeno y el nivel de otras proteínas de la matriz asociadas con la formación de la cicatriz; migración de células madre o células progenitoras

en el área dañada; y cualquier otro ensayo de la función del órgano clínicamente relevante.

En algunas realizaciones, se puede evaluar la función

5 cardíaca por uno o más de los siguientes parámetros: mecánica de miocitos y fusión celular, por ejemplo, frecuencia de la distribución del tamaño de los miocitos, pico de

acortamiento, velocidad del acortamiento y realargamiento, y evaluación de la fusión celular (número de cromosomas X);

10 rendimiento o aspectos estructurales de la función c cardíaca incluyendo LVEDP, LVDP, $+dp/dt$, peso del LV, volumen de cámaras, tensión de la pared diastólica, y comparación de sujetos tratados con MI y no tratados con MI; regeneración

miocárdica, tal como composición del miocardio regenerado,

15 evaluación de células positivas a BrdU en el área infartada en sujetos tratados frente a no tratados, y células positivas a miosina en el área infartada en sujetos tratados frente a no tratados; estructura cardíaca, tal como tamaño del infarto, cantidad de fibrosis, e hipertrofia de

20 cardiomiocitos. En ciertas realizaciones, un procedimiento desvelado en el presente documento comprende la medición de uno o más indicios de la función cardíaca, en el que dichos indicios de la función cardíaca son rendimiento cardíaco en el pecho (CO), índice cardíaco (CI), presión en cuña de la

25 arteria pulmonar % de acortamiento fraccional (%FS), fracción de eyección (EF), fracción de eyección ventricular izquierda (LEVF); diámetro diastólico final ventricular izquierdo (LVEDD), diámetro sistólico final ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (dp/dt), una disminución en

30 el funcionamiento auricular o ventricular, un aumento de la eficacia de bombeo, una disminución de la tasa de pérdida de

la eficacia de bombeo, una disminución en la pérdida de funcionamiento hemodinámico, o disminución en las complicaciones asociadas con cardiomiopatía, en comparación con un control.

5

En algunas realizaciones, se puede evaluar la función cerebral antes, durante, o después de la administración de un procedimiento terapéutico desvelado en el presente documento mediante un ensayo neurológico, o electrofisiológicamente, por ejemplo, por una relación entre la señal disminuida respecto al ruido, o bioquímicamente, por ejemplo, por análisis de al menos un biomarcador indicativo de la función del órgano, función tisular, y/o función celular del sistema nervioso central o periférico. Las técnicas electrofisiológicamente ejemplares incluyen, electroencefalografía (EEG), electrocardiografía (EKG), potenciales relativos a eventos (ERP), potenciales evocados (EP), magnetoencefalografía (MEG), y estudio de la condición nerviosa (NCS). En otras realizaciones, la función cerebral se puede evaluar por uno cualquiera o más de los siguientes procedimientos o parámetros: función intelectual en general, tal como la Escala de Inteligencia Abreviada de Weschler y la Escala III de Inteligencia de Adultos de Weschler; atención básica, tal como subensayos de Lapso Digital, Lapso Espacial de la Escala III de Memoria de Weschler; complejo de atención (memoria de trabajo), tal como Lapso Digital, Secuenciación de número de Letras y subensayos aritméticos de la Escala III de Inteligencia de Adultos de Weschler; funciones ejecutivas, tales como el Ensayo de Clasificación de Cartas de Wisconsin, Ensayo de fabricar un camino B, Ensayo de Stroop, Ensayo de la Torre de Londres, Ensayo de juego, Escala de

Comportamiento del Sistema Central, Escalas de Iowa de la Función del Lóbulo Frontal; memoria (visual y verbal), tal como las Escalas III de Memoria de Wechsler, Auditoria de Rey, Ensayo de Enseñanza Verbal, Ensayo II de Enseñanza, 5 Ensayo de Memoria Visual a corto plazo Revidado; que afectan la regulación, tal como, el test de personalidad multifásico Minnesota, ensayo afectivo de Stroop, Escala de comportamiento del sistema central, y Escalas Iowa de función del lóbulo frontal; interpretación de los estímulos de 10 emoción, tal como DANVA (Análisis de Diagnóstico de Comportamiento no verbal); velocidad de procesamiento, tal como índice de velocidad de procesamiento (Búsqueda de símbolos, Codificación) de la Escala III de inteligencia de adulto de Wechsler, ensayo de fabricación de camino, y ensayo 15 de modalidades de símbolos digitales; lenguaje, tal como ensayo de nombramiento Boston; ensayo de asociación oral de palabras controlado; ensayo de fluidez de palabras semántico; y examen de afasia multilingüe; ensayo visuo-construccional, tal como el ensayo de figuras complejas de Rey-Osterrieth, y 20 subensayos de ensamblaje de objetos de la Escala II de inteligencia de adulto de Wechsler; y ensayo visuo-espacial, tal como Matriz de Razonamiento del WAIS-III, y Ensayo de juicio de orientación lineal.

25 En algunas realizaciones, se ensaya la salud del músculo esquelético antes, durante, o después de la administración de un procedimiento terapéutico desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, la salud del músculo esquelético incluye mialgia, daño muscular, cambios 30 metabólicos con el ejercicio, y reorganización citoesquelética. La función del músculo esquelético puede ser

la fuerza muscular, resistencia muscular, adaptación al entrenamiento, un estado normal del músculo que permita el movimiento de las articulaciones, o el metabolismo fisiológico normal y la función del músculo esquelético en un mamífero sano. Se puede medir cualquier variable funcional del músculo esquelético, incluyendo la fuerza muscular (máxima fuerza generada en un movimiento específico), resistencia muscular (el número máximo de contracciones que se pueden llevar a cabo en un conjunto de frecuencia y fuerza), y potencia muscular (fuerza/tiempo, el efecto máximo generado por el músculo). Aunque no exhaustivamente, las funciones específicas del músculo típicas incluyen la diferenciación de mioblastos, determinación de mioblastos, desarrollo muscular, contracción muscular, cambios sarcoméricos, fusión de mioblastos, desarrollo muscular somático, y miogénesis.

En algunas realizaciones, se evalúa la fibrosis muscular esquelética. Hay disponibles varios procedimientos para determinar el estado de la fibrosis muscular esquelética, incluyendo la obtención de una biopsia de tejido muscular del paciente, y la evaluación de la biopsia con tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas sensibles para detectar la existencia de tejido fibrótico. Ejemplos de tinciones histoquímicas incluyen, por ejemplo, hematoxilina y eosina (H/E), tricromo y ATPasa (por ejemplo, a pH 4,3, 4,65 y 10,4). Los anticuerpos representativos que se pueden utilizar para marcar las fibras musculares por tinción inmunohistoquímica incluyen, por ejemplo, miosina, colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y distrofina. De manera alternativa, se puede emplear un procedimiento funcional de

determinación de la extensión con la que la fibrosis invade el músculo esquelético del paciente. El procedimiento funcional implica someter al paciente a uno o más de la batería de ensayos y mediciones físicas. Dichos ensayos y mediciones incluyen normalmente, ensayos de la fuerza neurológica, fuerza muscular, equilibrio, marcha, postura, evaluaciones de coordinación sensorial, y ensayos de función pulmonar, por ejemplo, capacidad vital y capacidad espiratoria forzada, los cuales se pueden llevar a cabo por procedimientos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la reparación tisular se puede evaluar basándose en el nivel(es) de expresión de una o más moléculas de señalización descritas en el presente documento. Los biomarcadores adecuados como indicadores de la reparación tisular incluyen, pero no se limitan a, un biomarcador del daño de ADN, un biomarcador de respuesta inflamatoria, un biomarcador de daño tisular, un biomarcador de reparación del daño tisular, o un marcador de un sustituto hematológico, tal como p53, p21, GADD45a, ATM, histona H2AX fosforilada, IL-6, CRP, SAA, IL-1, IL-5, IL-10, KC/GRO, IFN, IL-2, IL-4, TNF-alfa, IL-12, IL-3, IL-7, IL-6, beta-amilasa salivar, proteínas citrulinadas, S100B, SP-D, BPI, TSP, CA15-3, CDBB, CKMB, CKMM, FABP2, GFAP, NSE, CD5, CD-16b, CD20, CD177, CD26, CD27, CD40, CD45, Flt-3L, G-CSF, KFG, EPO, TPO, GM-CSF, o SDF-1 α .

El cobre (incluyendo el ion de cobre) es un regulador de uno o más factores (por ejemplo, factores transcripcionales) implicados en la reparación de daño tisular y/o regeneración tisular, y en consecuencia, se puede evaluar evaluando uno cualquiera o más de estos factores. Los factores regulados

por el cobre incluyen, pero no se limitan a: proteínas de homeostasis del Cu, tales como Ctr 1, Ctr 3, DMT1, Atox 1, ATP7A/7B, Cox 17, CCS, Sco 1/2, Cox 11, receptores del N-metil D-aspartato glutamatérgico (NMDAR), proteína precursora de amiloide (APP), domino MURR1 del gen del metabolismo del cobre (COMMD1), inhibidor de apoptosis unido a X (XIAP), homocisteína (Hcy), subunidad II de la citocromo C oxidasa (COXII), subunidad I de la citocromo C oxidasa (COXI), FGF-1, VEGF, angiopoyetina (tal como ANG1 o ANG2), fibronectina, colagenasa, MMP-TIMP, eslatina, PDGF, y eNOS; proteínas de unión al Cu intracelular, tales como Citocromo C oxidasa (CCO), superóxido dismutasa (SOD), metalotioneína (MT), Glutathión (GSH), Dopamina- β -monooxigenasa (DBH), Peptidilglicina- α -amidante monooxigenasa (PAM), tirosinasa, fenilalanina hidroxilasa, diamina oxidasa, Hefaestina, y glicoproteína de la matriz cartilaginosa; proteínas de unión al cobre extracelular, tales como ceruloplasmina (CP), Lisil oxidasa (LOX), Albúmina (ALB), Transcupreína, amina oxidasa, factores de coagulación sanguínea V y VIII, Ferroxidasa II, superóxido dismutasa extracelular, y metalotioneína extracelular. Se desvelan factores regulados por el cobre en Zheng y col., Role of copper in regression of cardiac hypertrophy, Pharmacol. Ther. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.014 (2014), que se incorporan en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, el cobre o ion de cobre regula la actividad transcripcional de uno o más de HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1, y las redes de señalización reguladas por estos factores transcripcionales.

En algunas realizaciones, el nivel y/o actividad de uno

o más factores regulados por el cobre desvelados en el presente documento se analiza en un individuo que sigue un tratamiento con una composición terapéutica o preventiva desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, se determina el nivel y/o actividad de uno o más de HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1, y después se correlacionan con la respuesta del individuo a la composición terapéutica o preventiva. En algunas realizaciones, la respuesta se detecta midiendo marcadores celulares de homeostasis tisular normal y/o daño tisular isquémico persistente (por ejemplo, por inmunohistoquímica o medición del ADN y los niveles de transcripción), medición el área de daño o volumen del daño, o evaluando cualquiera de los indicadores clínicamente relevantes. Por lo tanto, en ciertos aspectos, el nivel y/o actividad de uno o más factores regulados por el cobre (tales como HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1) se pueden utilizar como un biomarcador de punto vinal de la respuesta de un individuo a un régimen terapéutico o preventivo desvelado en el presente documento.

20

En algunas realizaciones uno o más factores regulados por el cobre desvelados en el presente documento se pueden utilizar en un ensayo pronóstico para analizar y predecir una respuesta a una composición de tetramina o procedimiento de tratamiento o preventivo desvelado en el presente documento. Por ejemplo, el nivel y/o actividad de uno o más de HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1 puede indicar una probabilidad de que un individuo responderá positivamente a una composición de tratamiento o preventiva desvelada en el presente documento, la composición de tratamiento o preventiva se puede administrar al individuo. Por el

30

contrario, si el nivel y/o actividad de uno o más de HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1 indica que un individuo probablemente no responderá o responderá negativamente a la composición terapéutica o preventiva, se puede prescribir un

5 curso de tratamiento alternativo. Una respuesta negativa se puede definir como la ausencia de una respuesta eficaz o la presencia de efectos secundarios tóxicos. La respuesta a un tratamiento terapéutico o preventivo se puede predecir en un estudio de fondo en el que los sujetos de cualquiera de las

10 siguientes poblaciones se han genotipado: una población que responde favorablemente a un régimen de tratamiento, una población que no responde significativamente a un régimen de tratamiento, y una población que responde de manera adversa al régimen de tratamiento. Por lo tanto, en algunas

15 realizaciones, el nivel y/o actividad de uno o más de HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS, y COMMD1 se puede utilizar como indicadores de respuesta de un individuo al régimen terapéutico o preventivo desvelado en el presente documento. Los indicadores de respuesta se pueden evaluar antes,

20 durante, y/o después de la administración del régimen terapéutico o preventivo. Por ejemplo, se pueden evaluar uno o más indicadores de respuesta durante los intervalos entre las dosis de una administración continua, para evaluar si es probable que el individuo se beneficie del tratamiento

25 continuo o es necesario un tratamiento alternativo.

Los ensayos pronósticos descritos anteriormente son aplicables a los ensayos clínicos. Se pueden identificar uno o más de los indicadores de respuesta (tal como HIF-1, SP1,

30 MT, Atox 1, CCS, y COMMD1) utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. Por lo tanto, los

potenciales participantes en los ensayos clínicos de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre y opcionalmente una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre puede explorarse para

5 identificar los individuos que responderán más probablemente a la composición de tetramina y excluye los que probablemente experimentarán efectos secundarios. De esta manera se puede medir la eficacia el tratamiento en los individuos que respondan positivamente a la composición de tetramina sin

10 disminuir la medición como resultado del a inclusión de individuos que probablemente no responderán positivamente en el estudio y sin el riesgo de problemas de seguridad indeseables.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación tisular en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica sin aumento de la expresión de VEGF en el sitio de la inyección, que comprende la administración al individuo de una cantidad

20 eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de inducción del crecimiento de vasos sanguíneos hacia el sitio de la lesión isquémica en un individuo, que comprende la administración al individuo de

25 una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones se proporciona un procedimiento de inducción del crecimiento de vasos sanguíneos hacia el sitio de la lesión isquémica en un individuo sin el aumento de la

30 expresión de VEGF en el sitio de la inyección que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una

composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de

5 cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones el complejo de la tetramina quelante del cobre y el ion de cobre es cristalino. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo

10 cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el

15 ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el

20 procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el

25 nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la

30 captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la

composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

La formación y crecimiento de vasos sanguíneos en un tejido puede producirse por angiogénesis y/o vasculogénesis. En algunas realizaciones, los vasos sanguíneos incluyen estructuras tipo capilares que son completamente funcionales para soportar el transporte de sangre. En algunas realizaciones, la angiogénesis incluye un proceso que implica el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, por angiogénesis de brotes, la formación de nuevos vasos sanguíneos que brotan de los existentes, o la angiogénesis por división (intususcepción), la formación de nuevos vasos sanguíneos por división de los existentes. En algunas realizaciones, la vasculogénesis incluye un proceso que implica la producción de nuevos vasos sanguíneos *de novo* por proliferación de células madre endoteliales, tal como la

formación de nuevos vasos sanguíneos en los que no había preexistentes.

En algunas realizaciones, la formación y crecimiento de
5 vasos sanguíneos necesita señales de los factores de
crecimiento y otras proteínas que controlan el proceso
directamente, tal como las angiopoyetinas (como Ang-1 y Ang-
2), efrina (Eph), factores de crecimiento endotelial vascular
(tales como VEGF-A y VEGF-C), factor de crecimiento derivado
10 de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos
(como FGF-1 y FGF-2), factor α de necrosis tumoral (TNF- α),
factores β de crecimiento transformante (como TGF- β 1, TGF- β 2,
TGF- β 3, y TGF- β 4), endostatina, vasohibina, quimiocinas,
trombospondina, angiostatina, moléculas de adhesión celular
15 vascular (como VCAM-1), metaloproteinasas de la matriz (como
MMP-2 y MMP-9), integrinas, caderinas, activadores de
plasminógeno e inhibidores de activadores de plasminógeno.

En algunas realizaciones se ensaya el crecimiento de
20 vasos sanguíneos midiendo la proliferación de células
endoteliales, que son necesarias para el desarrollo de
capilares en un animal intacto. En algunas realizaciones, la
acción de la administración de una composición de tetramina
que comprende una tetramina quelante del cobre sobre la
25 proliferación endotelial se puede evaluar por recuento
celular directo, síntesis de ADN, y/o actividad metabólica.
Por ejemplo, se pueden aislar células endoteliales del sitio
de la lesión isquémica y ensayar su tasa de proliferación
después del tratamiento con una composición de tetramina que
30 comprende una tetramina quelante del cobre. En otras
realizaciones, la proliferación de células endoteliales en el

sitio de la lesión isquémica se puede controlar marcado las células y midiendo los recuentos celulares, síntesis de ADN y/o actividad metabólica *in situ*. En otras realizaciones, las células endoteliales marcadas se pueden administrar a un individuo y la proliferación de las células endoteliales en el sitio de la lesión isquémica se puede controlar *in situ*. En algunas realizaciones, las células endoteliales se marcan con un radioisótopo, un resto fluorescente, o un marcador que se puede detectar específicamente, por ejemplo, mediante un anticuerpo. En realizaciones específicas, las células se marcan con [³H] timidina o bromodesoxiuridina (BrdU).

En algunas realizaciones, el crecimiento de vasos sanguíneos se ensaya midiendo la migración de células endoteliales, que degradan la membrana basal y migran a lo largo de gradientes químicos establecidos por los factores de crecimiento proangiogénicos, por ejemplo, durante la angiogénesis de brote. En ciertas realizaciones, las células endoteliales en el sitio de la lesión isquémica se marcan y se controla su migración *in vivo*. En otros aspectos, las células endoteliales marcadas se administran a un sujeto, y se controla su migración *in vivo* hacia el sitio de la lesión isquémica. En otros aspectos, las células endoteliales en el sitio de la lesión isquémica se pueden aislar y se pueden ensayar sus propiedades migratorias por varios ensayos *in vitro* que incluyen el ensayo en cámara de Boyden, ensayo bajo agarosa, ensayo de cicatrización de heridas, ensayo de barrera de Teflón, ensayo de rastro fagocinético, y ensayos similares.

En algunas realizaciones, el crecimiento de vasos

sanguíneos se ensaya midiendo las células endoteliales que forman tubos con luces para conducir el flujo de sangre, es decir, la tubulogénesis. En algunas realizaciones, el crecimiento de vasos sanguíneos se ensaya mediante un ensayo de anillo aórtico. Un ensayo de anillo aórtico para ensayar el crecimiento de vasos sanguíneos se desvela en Li y col., "Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor," Journal of Nutritional Biochemistry 25(2014) 44-49, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Los microvasos que brotan del anillo aórtico interactúan estrechamente con los macrófagos, pericitos, y fibroblastos residentes en una secuencia ordenada que emula la angiogénesis en el animal intacto. En algunas realizaciones, las células endoteliales no se han preseleccionado por pasaje y por lo tanto están en un estadio quiescente similar al del animal intacto. Otros ensayos de angiogénesis que incorporan funciones angiogénicas (tales como degradación de la matriz, migración, proliferación, formación de tubos) incluyen el ensayo embrioide, el ensayo metatarsiano de ratón, y ensayos similares.

En algunas realizaciones, se utiliza un ensayo *in vivo* para medir el crecimiento de vasos sanguíneos después de la administración de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. Estos ensayos incluyen y no se limitan al ensayo de angiogénesis corneal, ensayo de membrana corioalantoidea, y ensayo de tapón de Matrigel. Por ejemplo, la córnea es el único tejido del cuerpo que es avascular y transparente, haciéndolo ideal para la observación de angiogénesis. En algunas realizaciones, se

pueden implantar microgránulos o esponjas que contienen moléculas proangiogénicas (por ejemplo, una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre como se desvela en el presente documento) en bolsillos del estroma creados quirúrgicamente. El crecimiento de nuevos vasos a partir del sistema vascular del limbo periférico se puede controlar diariamente, permitiendo determinar las tasas de angiogénesis. En un ensayo de tapón de Matrigel, se puede implantar un Matrigel que contiene la composición de tetramina (con o sin el ion de cobre) como se desvela en el presente documento, en un individuo en o cerca del sitio de la lesión isquémica, y el tapón de matrigel se retira después para la visualización de los vasos sanguíneos. En algunas realizaciones, las células endoteliales se marcan con uno o más marcadores, y se ensayan *in vivo* su proliferación, migración, tubulogénesis, formación de vasos sanguíneos y/o crecimiento de vasos sanguíneos en el sitio de la lesión isquémica, por ejemplo, utilizando una técnica de creación de imágenes adecuada.

20

Terapia de combinación

La composición de tetramina y opcionalmente en combinación con la composición promotora de cobre que se ha descrito anteriormente se pueden utilizar como un agente único o como parte de una terapia de combinación con células madre o inductores de células madre para inducir la reparación de un tejido isquémico. En algunas realizaciones, se proporciona un procedimiento de inducción de la reparación tisular (o mejorar la función del tejido) en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende: a)

30

administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre; y b) administrar al individuo una cantidad eficaz de células madre (tales como células madre mesenquimáticas (MSC), por ejemplo células mesenquimáticas de médula ósea (BMSC)) o un inductor de células madre. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de células madre (tales como MSC, por ejemplo BMSC). En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de inductor de células madre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones el complejo de la tetramina quelante del cobre y el ion de cobre es cristalino. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora del cobre que puede

aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, la célula madre que se desvela en el presente documento es una célula madre mesenquimática (MSC), una célula madre mesenquimática de médula ósea (BMSC), una célula madre multipotencial, una célula madre

pluripotencial inducida (iPS), o una célula madre derivada de un tejido. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de un tejido es una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre derivada de tejido cardíaco, o una célula madre derivada del tejido del cordón umbilical. En otras realizaciones, la célula madre es una inductora de una célula madre de adulto. En algunas realizaciones, la célula madre de adulto es una célula madre hematopoyética, una célula madre mamaria, una célula madre intestinal, una célula madre mesenquimática de la placenta, tejido adiposo, pulmón, médula ósea, sangre, gelatina de Wharton del cordón umbilical, o de los dientes (tal como del nicho perivascular de la pulpa dental y el ligamento periodontal), una célula madre endotelial, una célula madre neural, una célula madre de adulto olfatoria, una célula madre de la cresta neural, o una célula madre de la línea germinal (por ejemplo, una célula madre del testículo).

En algunas realizaciones, el inductor de la célula madre desvelada en el presente documento es un inductor de una célula madre mesenquimática (MSC), una célula madre mesenquimática de médula ósea (BMSC), una célula madre multipotencial, una célula madre pluripotencial inducida (iPS), o una célula madre derivada de un tejido. En algunas realizaciones, la célula madre derivada de un tejido es una célula madre derivada de tejido adiposo, una célula madre derivada de tejido cardíaco, o una célula madre derivada del tejido del cordón umbilical. En otras realizaciones, el inductor de la célula madre es un inductor de una célula madre de adulto. En algunas realizaciones, el inductor de la célula madre es un inductor de una célula madre de adulto tal

como una célula madre hematopoyética, una célula madre mamaria, una célula madre intestinal, una célula madre mesenquimática de la placenta, tejido adiposo, pulmón, médula ósea, sangre, gelatina de Wharton del cordón umbilical, o de los dientes (tal como del nicho perivascular de la pulpa dental y el ligamento periodontal), una célula madre endotelial, una célula madre neural, una célula madre de adulto olfatoria, una célula madre de la cresta neural, o una célula madre de la línea germinal (por ejemplo, una célula madre del testículo).

En algunas realizaciones, las células madre o inductores de célula madre se administran sistémicamente. En algunas realizaciones, las células madre o inductor de células madre se administran localmente en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, las células madre o inductor de células madre se administran localmente en un sitio distinto del sitio de la lesión isquémica.

En algunas realizaciones, las células madre (o inductor de células madre), la composición de tetramina (con o sin el ion de cobre) y opcionalmente la composición promotora de cobre se administran simultáneamente. En algunas realizaciones, una célula madre desvelada en el presente documento (o un inductor de células madre) y la composición de tetramina (con o sin el ion de cobre) y opcionalmente la composición promotora del cobre se administran secuencialmente en cualquier orden adecuado.

Una vez que se administran las células madre (o inductor de células madre), la composición de tetramina (con o sin el

ion de cobre) y opcionalmente la composición promotora del cobre descritas en el presente documento, a un mamífero (por ejemplo, un ser humano), se controlan la presencia y/o actividad biológica de las células en algunas realizaciones mediante cualquiera de varios procedimientos conocidos.

Aunque los procedimientos descritos en el presente documento son aplicables en general a todos los aspectos de la reparación tisular, se tiene que entender que la combinación de los procedimientos de terapia se pueden utilizar con el fin de uno o más de los siguientes: inducir la migración de células madre mesenquimáticas de médula ósea hacia el tejido isquémico, inducir la diferenciación de las células madre en el tejido isquémico, inducir una molécula de señalización que desencadena la regeneración tisular, promover las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre, invertir el daño en el sitio de la lesión isquémica, y reconstruir el microambiente de células neurofibrilares y células neurosecretoras en el sitio de la lesión isquémica.

Procedimientos de prevención y uso profiláctico

También se proporcionan en el presente documento procedimientos de prevención del daño tisular isquémico en un individuo que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral isquémico, tejido pulmonar

isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido del tracto digestivo isquémico, y tejido muscular esquelético isquémico (tal como tejido isquémico de una extremidad). En algunas realizaciones, el tejido isquémico es

5 tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, el tejido isquémico es tejido cerebral isquémico. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones la composición de tetramina comprende adicionalmente un ion de cobre. En

10 algunas realizaciones, el ion de cobre de la composición forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones el complejo de la tetramina quelante del cobre y el ion de cobre es cristalino. En algunas realizaciones, la composición comprende un complejo

15 cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el

20 ion de cobre en la composición de tetramina no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, el

25 procedimiento comprende adicionalmente la administración al individuo de una composición promotora del cobre que puede aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones, se administra previamente al individuo una composición promotora del cobre que puede aumentar el

30 nivel de cobre extracelular del individuo. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre es un ion de

cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre y/o

5 disminuir la toxicidad del zinc. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente

10 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día.

En algunas realizaciones, se proporciona un

15 procedimiento de prevención del fallo cardíaco isquémico en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina). En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de

20 la composición de tetramina es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra por vía oral. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es de aproximadamente 80 mg a

25 aproximadamente 450 mg (tal como de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 350 mg) por día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se

30 administra durante al menos aproximadamente 1 mes (tal como al menos aproximadamente 3 meses o al menos aproximadamente 6

meses). En algunas realizaciones, el individuo tiene una función de eyección ventricular izquierdo (LVEF) de no más del 35 % en la línea base. En algunas realizaciones, el individuo tiene un fallo cardíaco de clase II o clase III (basado en la clasificación funcional de la Asociación Cardíaca de Nueva York o NYHA). En algunas realizaciones, el individuo tiene al menos 150 pg/ml de péptido natriurético tipo B plasmático (BNP). En algunas realizaciones, el individuo tiene no menos de aproximadamente 600 pg/ml de NT-proBNP (pro-BNP del extremo N).

"Prevención", como se utiliza en el presente documento, incluye la provisión de profilaxis con respecto a la existencia o recurrencia de una enfermedad en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado de la enfermedad. En algunas realizaciones, las células y las composiciones proporcionadas se utilizan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o enlentecer la progresión de una enfermedad tal como una lesión tisular.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación o vía de administración apropiadas dependen del tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y curso del a enfermedad, de si las células se administran con fines preventivos o terapéuticos, las terapias previas, y la historia clínica el individuo y la respuesta a las composiciones de tetramina y/o las células, y a discreción del médico encargado. Las composiciones de tetramina, composiciones promotoras del cobre, células madre, e inductores de células madre se administran adecuadamente en

algunas realizaciones al individuo al mismo tiempo o en una serie de tratamientos.

En algunas realizaciones, la presente divulgación
5 proporciona composiciones y procedimientos para el
tratamiento y prevención del daño tisular isquémico. En
algunas realizaciones, las composiciones de tetramina, las
composiciones promotoras del cobre, y/o las células
desveladas en el presente documento se administran antes,
10 durante, y/o después de un tratamiento que producirá o
probablemente producirá un daño tisular en un individuo, y la
administración evita o reduce el daño tisular isquémico
asociado con el tratamiento, tal como radioterapia y
quimioterapia del cáncer.

15

En algunas realizaciones, la composición de tetramina o
el procedimiento desvelado en el presente documento evita el
daño tisular isquémico o reduce el área, volumen, o duración
de un daño tisular isquémico, induciendo la migración (por
20 ejemplo, la migración dirigida) de una célula madre hacia el
tejido, incluso después de que el tejido del individuo haya
perdido de otra manera la capacidad inherente para reclutar
células madre espontáneamente. En las realizaciones, la
administración de la composición de tetramina y/o las células
25 de la presente divulgación desencadena una serie de otros
eventos que dan lugar al aumento de resistencia al daño
tisular isquémico, incluyendo, por ejemplo, la inducción de
diferenciación de células madre en el sitio del tejido,
inducción de la regeneración tisular en el sitio del tejido,
30 inducción de una molécula de señalización que desencadena la
regeneración tisular, promover las actividades

transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre, inversión del daño en el sitio de una lesión isquémica inicial antes de que se haga un daño adicional, y/o reconstrucción del microambiente de células microfibrilares y células neurosecretoras en el sitio del tejido.

Por ejemplo, la isquemia o infarto de miocardio puede dar lugar a la pérdida irreversible de tejido cardíaco funcional con un posible deterioro de la función de bombeo y la muerte. La oclusión de un vaso coronario da lugar a la interrupción del suministro sanguíneo del sistema capilar dependiente. Sin nutrición ni oxígeno, los cardiomiocitos mueren y sufren necrosis. Se produce una inflamación del tejido circundante con invasión de células inflamatorias y fagocitosis de los restos celulares. Se produce una cicatriz fibrótica, y la región afectada del corazón pierde la fuerza contráctil. Sin intervención, la única manera de que el músculo cardíaco compense la pérdida de tejido es la hipertrofia de los cardiomiocitos restantes (acumulación de proteína celular y elementos contráctiles dentro de la célula). Los agentes endocrinos, metabólicos (alcohol) o infecciosos (virus de miocarditis) y los agentes de tratamiento del cáncer también dan lugar a la muerte celular con una función miocárdica reducida en consecuencia. En algunas realizaciones, la composición de tetramina o procedimiento desvelado en el presente documento evita el daño tisular cardíaco isquémico o reduce el área, volumen, o duración del daño tisular cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, la composición de tetramina desvelada en el presente documento induce la migración (por ejemplo, la migración dirigida) y/o la retención de células madre

mesenquimáticas (por ejemplo, las BMSC) hacia el tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, en los casos de isquemia o infarto de miocardio, el músculo cardíaco puede compensar la pérdida de tejido mediante la diferenciación de las células madre en cardiomiocitos, evitando o reduciendo de esta manera la hipertrofia cardíaca y el daño adicional del tejido cardíaco.

Composiciones de tetramina

10

Adicionalmente se proporcionan en el presente documento composiciones de tetramina (que incluyen composiciones farmacéuticas) que comprenden una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) para aumentar del nivel de cobre intracelular, suministrar cobre a las células, inducir al menos uno (tal como al menos cualquiera de entre 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) eventos de reparación tisular, que inducen la migración de células madre, o promueven las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión isquémica. Se pueden utilizar cualquiera de las composiciones de tetramina, opcionalmente en combinación con composiciones promotoras y/o células madre (o inductor de células madre), en los procedimientos descritos anteriormente.

25

En algunas realizaciones, se proporciona una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. La tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) que se contempla en el presente documento incluye, pero no se limita a, al propio compuesto de tetramina quelante del cobre, sales

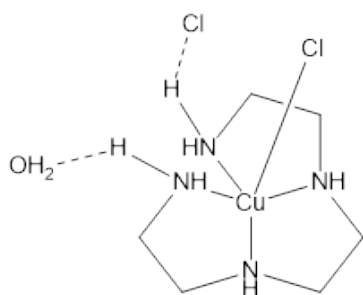
30

farmacéuticamente aceptables de la misma, metabolitos activos de la misma, profármacos de la misma, y derivados de la misma. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. En algunas realizaciones, la tetramina
 5 quelante del cobre es un análogo de la trientina, tal como una tetramina de Fórmula (ii) como se describe en la sección de "cobre y tetraminas quelantes del cobre". En algunas realizaciones, la composición de tetramina no comprende un elemento traza, tal como el cobre. En algunas realizaciones,
 10 la composición puede quelar el ion de cobre en la sangre y suministrar el ion de cobre en las células de un tejido isquémico.

En algunas realizaciones, se proporciona composición de
 15 tetramina que comprende una mezcla de una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende una mezcla de trientina y un ion de cobre. En algunas realizaciones, la relación relativa (mol por mol) de la tetramina quelante del cobre
 20 (tal como la trientina) con respecto al ion de cobre es aproximadamente una cualquiera de entre 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, o 1:100. En algunas realizaciones, la relación molar relativa de la tetramina quelante del cobre (tal como
 25 al trientina) con respecto al ion de cobre es aproximadamente uno cualquiera de entre 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1, o 1:10-
 30 10:1. En algunas realizaciones, al menos una fracción del ion de cobre forma un complejo con la tetramina quelante del

cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición de tetramina que comprende un complejo de una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo de trientina y un ion de cobre. En algunas realizaciones la estequiometría de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) con respecto al ion de cobre es aproximadamente de 1:1. En algunas realizaciones, el complejo de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) ion de cobre es cristalino. En algunas realizaciones, el complejo cristalino de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) y el ion de cobre es un polimorfo termodinámico. Se pueden describir diferentes polimorfos termodinámicos del complejo cristalino por un conjunto específico de estructuras geométricas, dimensiones celulares unitarias, grupos espaciales, y coordinados estructurales que se pueden determinar utilizando la experiencia conocida en la técnica, tal como cristalografía de rayos x. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada-plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro, y una molécula de agua. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende un complejo cristalino de Fórmula (I) como se muestra a continuación.



Fórmula (I)

en la que Cu es un ion de cobre y las líneas discontinuas
 denotan enlaces de hidrógeno. En algunas realizaciones, la
 composición de tetramina comprende un complejo cristalino de
 5 trientina y un ion de cobre, en el que el complejo cristalino
 tiene la estructura cristalina que se muestra en la FIG. 1.
 En algunas realizaciones, la estructura cristalina tiene
 longitudes de enlace, ángulos de enlace, y ángulos de torsión
 como se enumeran en la FIG. 2. En algunas realizaciones, el
 10 complejo cristalino comprende cristales con el grupo espacial
 y los parámetros que se enumeran en la FIG. 3. En algunas
 realizaciones, la composición de tetramina comprende un
 complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que
 la estructura cristalina del complejo cristalino se define
 15 por coordenadas atómicas como se enumera en las FIG. 4A-4C.

En algunas realizaciones, la composición de tetramina
 comprende un complejo de la tetramina quelante del cobre (tal
 como la trientina) y el ion de cobre, en el que el complejo
 20 no es cristalino. En algunas realizaciones, la composición de
 tetramina comprende adicionalmente el ion de cobre no
 formando un complejo con la tetramina quelante del cobre. En
 algunas realizaciones, la relación relativa (mol por mol) del
 ion de cobre que no forma complejos con la tetramina quelante
 25 del cobre con respecto al complejo es aproximadamente una
 cualquiera de entre 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20,
 1:50, o 1:100. En algunas realizaciones, la relación relativa
 (mol por mol) del ion de cobre que no forma complejos con la

tetramina quelante del cobre con respecto al complejo es aproximadamente una cualquiera de entre 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, o 1:10-1:1. En algunas realizaciones, el

5 porcentaje del cobre total en la composición de tetramina que forma un complejo con la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) es aproximadamente uno cualquiera de entre un 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 %. En algunas realizaciones, el porcentaje

10 de cobre total en la composición de tetramina que forma un complejo con la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) es aproximadamente uno cualquiera de entre un 1 %-5 %, 5 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, 90 %-100 %, 1 %-

15 10 %, 10 %-50 %, 50 %-80 %, o 80 %-100 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) total en la composición de tetramina que está formando un complejo con el ion de cobre es al menos aproximadamente uno cualquiera de entre un 1 %,

20 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 100 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de tetramina quelante del cobre (tal como trientina) total en la composición de tetramina que forma un complejo con el ion de cobre es aproximadamente uno cualquiera de entre un 1 %-5 %,

25 5 %-10 %, 10 %-20 %, 20 %-30 %, 30 %-40 %, 40 %-50 %, 50 %-60 %, 60 %-70 %, 70 %-80 %, 80 %-90 %, 90 %-100 %, 1 %-10 %, 10 %-50 %, 50 %-80 %, o 80 %-100 %. En algunas realizaciones, el ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) está presente como

30 una sal, tal como el sulfato de cobre, cloruro de cobre, óxido de cobre, nitrato de cobre, acetato de cobre, formato

de cobre, gluconato de cobre, quelados de aminoácidos con cobre, y similares.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre, en el que el ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende trientina y un ion de cobre, en la que el ion de cobre no forma un complejo con la trientina. En algunas realizaciones, el ion de cobre está presente como una sal, tal como el sulfato de cobre, cloruro de cobre, óxido de cobre, nitrato de cobre, acetato de cobre, formato de cobre, gluconato de cobre, quelados de aminoácidos con cobre, y similares. En algunas realizaciones, la relación relativa (mol por mol) de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) respecto al ion de cobre es aproximadamente una cualquiera de entre 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, o 1:100. En algunas realizaciones, la relación relativa (mol por mol) de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) con respecto al ion de cobre es aproximadamente una cualquiera de entre 50:1-100:1, 20:1-50:1, 10:1-20:1, 5:1-10:1, 4:1-5:1, 3:1-4:1, 2:1-3:1, 1:1-2:1, 1:2-1:1, 1:3-1:2, 1:4-1:3, 1:5-1:4, 1:10-1:5, 1:20-1:10, 1:50-1:20, 1:100-1:50, 1:100-1:10, 1:10-1:1, 1:1-10:1, 10:1-100:1, o 1:10-10:1.

Muchos factores de la composición de tetramina, incluyen, por no se limitan a, estructura química de la tetramina quelante del cobre, la relación de la tetramina quelante del cobre con respecto al cobre en la composición de

tetramina, interacciones del ion de cobre con la tetramina quelante del cobre (por ejemplo, que formen un complejo, que el complejo sea cristalino, etc.), pueden afectar la capacidad de la composición de tetramina para suministrar (tal como descargar) el cobre dentro de las células en un tejido isquémico. Por ejemplo, la tetramina quelante del cobre puede tener una conformación (incluyendo la denticidad del quelado, grupos de unión donantes, y tamaño de la cavidad) que promueve la unión reversible del ion de cobre.

10

En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende una tetramina quelante del cobre con una afinidad suficientemente baja para el ion de cobre en el interior de las células del tejido isquémico, en las que la composición de tetramina se disocia y descarga el ion de cobre dentro de las células. En algunas realizaciones, la composición de tetramina comprende compuesto y/o agentes adicionales que aumentan la descarga del ion de cobre dentro de las células del tejido isquémico.

20

Adicionalmente se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprende cualquiera de las composiciones de tetramina descritas en el presente documento y uno o más vehículos, excipientes, agentes estabilizantes, diluyentes, y/u otros agentes, que se conocen en la técnica, para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento.

25

En consecuencia, en un aspecto de la presente solicitud, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre. En algunas realizaciones, se proporciona una composición que comprende

30

trientina y un ion de cobre.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo de una tetramina
5 quelante del cobre y un ion de cobre. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo de trientina y un ion de cobre. En algunas realizaciones, el complejo de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) y el ion de cobre es
10 cristalino. En algunas realizaciones, el complejo cristalino de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) y el ion de cobre es un polimorfo termodinámico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que
15 el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos de trientina para adoptar una geometría cuadrada -plana, y en el que el complejo cristalino comprende además dos iones cloruro y una molécula de agua. En algunas realizaciones, el complejo de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) y
20 el ion de cobre no es cristalino.

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre, en la que al menos una parte (tal como al
25 menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende trientina y un ion de
30 cobre, en la que al menos una parte (tal como al menos aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %,

40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) del ion de cobre no forma un complejo con la trientina. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre, en el que el ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, el ion de cobre que no forma un complejo con la tetramina quelante del cobre está presente como una sal, tal como el sulfato de cobre, cloruro de cobre, óxido de cobre, nitrato de cobre, acetato de cobre, formato de cobre, gluconato de cobre, quelados de aminoácidos con cobre, y similares.

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden utilizar para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, induciendo al menos dos (tal como cualquiera de al menos 2, 3 ,4, 5, 6, 7, o más) eventos de reparación tisular, promoción de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre, y/o tratar (incluyendo prevenir) cualquier enfermedad o afección asociada con la lesión tisular isquémica.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden formular como soluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones, o complejos de inclusión tales como ciclodextrinas en disolventes o vehículos farmacéuticos adecuados, o como píldoras, comprimidos, comprimidos para chupar, supositorios, papelillos, grageas, gránulos, polvos,

polvos para reconstituir, o cápsulas junto con vehículos sólidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica para la preparación de distintas formas de dosificación. Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones se pueden administrar mediante una vía de suministro adecuada, tal como las vías oral, parenteral, rectal, nasal, tópico, u ocular, o por inhalación. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración parenteral (tal como la administración intravenosa).

Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede proporcionar en una forma sólida, tal como un comprimido o cápsula, o como una solución, emulsión, o suspensión. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula como un comprimido, una cápsula o una píldora. Los comprimidos orales pueden incluir el principio activo mezclado con excipientes compatibles farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes, agentes desintegrantes, agentes aglomerantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Las cargas inertes adecuadas incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico, lactosa, almidón, azúcar, glucosa, metilcelulosa, estearato magnésico, manitol, sorbitol, y similares. Los excipientes líquidos orales ejemplares incluyen el etanol, glicerol, agua, y similares. El almidón, polivinilpirrolidona (PVP), glicolato sódico almidón, celulosa microcristalina, y ácido algínico son agentes desintegrantes ejemplares. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente

lubricante, si está presente, puede ser estearato magnésico, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden revestir con un material tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal, o se pueden revestir con un revestimiento entérico. Las formulaciones orales pueden presentarse como unidades separadas tal como cápsulas, papelillos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar como un bolo, electuario o pasta.

15

Un comprimido se puede fabricar por compresión o modelado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetil celulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sodio, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada), un agente de superficie activa o de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden revestir o ranurar y se pueden formular de manera que proporcionen una liberación controlada o letra del principio activo

30

utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en distintas proporciones para proporcionar el perfil de liberación deseado.

5 Las cápsulas para administración oral incluyen las cápsulas de gelatina dura y blanda. Para preparar cápsulas de gelatina dura, se puede mezclar el principio activo con un diluyente sólido, semi-sólido, o líquido. Las cápsulas de gelatina blanda se pueden preparar mezclando el principio
10 activo con agua, un aceite tal como aceite de maní o aceite de oliva, parafina líquida, una mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos de cadena corta, polietilenglicol 400, o propilenglicol. Las cápsulas pueden contener también gelatina, óxidos de hierro, ácido esteárico, y dióxido de
15 titanio como ingredientes inactivos.

Los líquidos para la administración oral pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones o jarabes, o pueden estar liofilizados o presentarse como un producto seco
20 para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones líquidas pueden contener opcionalmente: excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, alginato sódico, gelatina,
25 hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, estearato de aluminio en gel y similares); vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite (por ejemplo, aceite de almendras o aceite de coco fraccionado), propilenglicol, alcohol etílico, o agua; conservantes (por ejemplo, metil o propil p-hidroxibenzoato o
30 ácido sórbico); agentes humectantes tales como lecitina; y si se desea, agentes saborizantes o colorantes.

Para su uso parenteral, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, o subcutánea, las composiciones de tetramina se pueden proporcionar en soluciones o suspensiones acuosas estériles, con un tampón a un pH apropiado e isotonicidad o en un aceite parenteralmente aceptable. Los vehículos acuosos adecuados incluyen la solución de Ringer y el cloruro sódico isotónico. Dichas formas se pueden presentar en una forma de dosis unitaria tal como ampollas o dispositivos de inyección desechables, en formas de multidosis tales como viales de los que se puede extraer la dosis apropiada, o en una forma sólida o pre-concentrada que se puede utilizar para preparar una formulación inyectable. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyendo la intravenosa incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del presunto receptor; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden estar presentes en una dosis unitaria o en envases multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y se pueden almacenar en una forma secada por congelación (liofilizada) que solo necesite la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de los tipos descritos anteriormente.

30 Dosificación y procedimientos de administración

Cuando se utilizan *in vivo* para uno cualquiera de los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento, la composición de tetramina (incluyendo la composición farmacéutica), y opcionalmente la composición promotora de cobre y/o células madre (o inductor de células madre) se administran al individuo en cantidades eficaces.

Una "cantidad eficaz" es al menos la mínima concentración necesaria para efectuar una mejora o prevención medible de la enfermedad o afección asociadas con la lesión tisular isquémica. Una cantidad eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como el grado de lesión isquémica del individuo, las características de la composición de tetramina particular, el ion de cobre y/o las células madre (o inductores de células madre) que se utilicen, por ejemplo, su índice terapéutico, el individuo (tal como la edad, género, peso e historia médica). Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del tratamiento sea superado por los efectos terapéuticos beneficioso. Para su uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, aminorar la gravedad, o retrasar la aparición de la enfermedad o afección, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad o afección, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad o afección.

Para su uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen los resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas que resultan de la

enfermedad o afección, el aumento de la calidad de vida a los que padecen la enfermedad, la disminución de la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, aumentar el efecto de otra medicación tal como el
5 direccionamiento, retraso de la progresión de la enfermedad, y/o prologar la supervivencia.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición
10 farmacéutica) y opcionalmente en combinación con la cantidad eficaz de la composición promotora del cobre son eficaces para dar como resultado un aumento de más de aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más del
15 nivel de cobre intracelular en el tejido isquémico del individuo en comparación con el nivel de cobre intracelular del tejido isquémico en el individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición
20 terapéutica) y opcionalmente en combinación con la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre son eficaces para dar como resultado un aumento de más de aproximadamente cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en
25 el nivel de cobre total de un tejido isquémico del individuo en comparación con el nivel de cobre total del tejido isquémico del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y
30 opcionalmente en combinación con la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre no disminuye el nivel de cobre

extracelular (tal como el nivel de cobre en la sangre) del individuo. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y opcionalmente en combinación con la cantidad

5 eficaz de la composición promotora de cobre no disminuye el nivel de cobre extracelular (tal como el nivel de cobre en la sangre) del individuo más de aproximadamente uno cualquiera de ente un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con el nivel de cobre extracelular del individuo

10 antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y opcionalmente en combinación con la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre no disminuye el nivel de cobre total en el individuo. En algunas

15 realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y opcionalmente en combinación con la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre no disminuye el nivel de cobre total en el individuo más de aproximadamente uno cualquiera

20 de entre un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más en comparación con el nivel de cobre total del individuo antes del tratamiento.

Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más

25 administraciones. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse en conjunción con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" se puede considerar en el contexto de

30 la administración de uno o más agentes terapéuticos, y un agente único puede considerarse que se da en una cantidad

eficaz si, en conjunción con uno o más agentes, se puede conseguir o se consigue un resultado deseado.

La cantidad eficaz, dosis y régimen de dosificación, de la composición de tetramina sola, o en combinación con la composición promotora de cobre (tal como el ion de cobre) y/o células madre (o inductor de células madre) se puede determinar durante los ensayos pre-clínicos y ensayos clínicos por procedimientos familiares para los médicos y clínicos. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la composición de tetramina es menor de aproximadamente una cualquiera de 0,5 mg, 5 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 80 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, o 1200 mg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la composición de tetramina es una cualquiera de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 10 mg a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 25 mg a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 50 mg a aproximadamente 75 mg, aproximadamente 75 mg a aproximadamente 100 mg, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 125 mg, aproximadamente 125 mg a aproximadamente 150 mg, aproximadamente 150 mg a aproximadamente 175 mg, aproximadamente 175 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 225 mg, aproximadamente 225 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 250 mg a aproximadamente 275 mg, aproximadamente 275 mg a aproximadamente 300 mg,

aproximadamente 300 mg a aproximadamente 350 mg,
aproximadamente 350 mg a aproximadamente 400 mg,
aproximadamente 400 mg a aproximadamente 500 mg,
aproximadamente 500 mg a aproximadamente 600 mg,
5 aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1200 mg,
aproximadamente 1200 mg a aproximadamente 2400 mg,
aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 50 mg,
aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg,
aproximadamente 10 mg a aproximadamente 125 mg,
10 aproximadamente 80 mg a aproximadamente 200 mg,
aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg,
aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg,
aproximadamente 300 mg a aproximadamente 600 mg,
aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 200 mg,
15 aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg, o
aproximadamente 80 mg a aproximadamente 400 mg, o
aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg. En algunas
realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de
tetramina es aproximadamente 80 mg a aproximadamente 450 mg
20 de tetramina quelante del cobre (tal como en forma de sal
dicloruro) por día para un paciente humano.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de
tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la
25 composición de tetramina (tal como la composición
farmacéutica) incluye al menos aproximadamente cualquiera de
entre 1 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 10 mg/kg, 15
mg/kg, o 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad
eficaz de la tetramina quelante del cobre (tal como la
30 trientina) en la composición de tetramina (tal como la
composición farmacéutica) incluye menos de aproximadamente

cualquiera de entre 35 mg/kg, 30 mg/kg, 25 mg/kg, 20 mg/kg, 18 mg/kg, 15 mg/kg, 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2,5 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0.5 mg/kg, o 0,1 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de tetramina quelante del cobre en la

5 composición de tetramina es una cualquiera de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg a

10 aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg a

15 aproximadamente 40 mg/kg, o aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es no mayor de aproximadamente 20 mg/kg por día, tal como aproximadamente 18 mg/kg por día para mono Rhesus. En algunas realizaciones, la

20 cantidad eficaz de la composición de tetramina es no mayor de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 35 mg/kg por día para un ratón.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la

25 tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la composición farmacéutica (por ejemplo, una forma de dosificación unitaria) está en el intervalo de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 300 mg, tal como aproximadamente 80 mg a aproximadamente 150 mg,

30 aproximadamente 80 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg, o

aproximadamente 80 mg a aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones, la concentración de la tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) en la composición farmacéutica se diluye (aproximadamente 0,1 mg/ml) o se concentra (aproximadamente 100 mg/ml), incluyendo, por ejemplo, una cualquiera de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml.

Las frecuencias de dosificación ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera de entre cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, diariamente, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, o semanalmente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se administra al menos aproximadamente una cualquiera de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, o 7x (es decir, diariamente) a la semana. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son menores de aproximadamente uno cualquiera de entre 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 6 horas, 4 horas, o 3 horas. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra diariamente. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra al menos dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra al menos una vez, incluyendo, por ejemplo, al menos cualquiera de 1x, 2x, 3x, o 4x al día.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina combinada con la frecuencia de

dosificación son suficientes para mantener una alta concentración de tetramina (tal como la trientina) en el individuo, tal como en la sangre o en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, una alta concentración de tetramina es

5 una concentración que promueve las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre, o para inducir al menos uno (incluyendo al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más) eventos de reparación tisular. En algunas realizaciones, la administración de la composición de tetramina (tal como la

10 composición farmacéutica) da lugar a al menos aproximadamente 0,005 mg/l (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de entre 0,01 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, 3,0 mg/l, 4,0 mg/l o 5,0 mg/l) de la tetramina quelante del cobre en la sangre. La

15 concentración de tetramina en una muestra biológica (tal como sangre o una biopsia de un tejido isquémico) se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tal como por espectroscopia de fluorescencia, espectrometría de masas, o procedimientos cromatográficos, o midiendo el

20 nivel de tetramina marcada.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina combinada con la frecuencia de dosificación son suficientes para mantener una alta

25 concentración de tetramina (tal como la trientina) en el individuo durante al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horas. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina combinada con la frecuencia de dosificación son suficientes para mantener una alta

30 concentración de la tetramina (tal como la trientina) en el individuo durante al menos aproximadamente 8 horas.

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es aproximadamente al menos de 1 mg/kg/día, 2 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 12 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 18 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, o más de trientina en la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es no mayor de cualquiera de 1 mg/kg/día, 2 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 12 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 18 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, o 50 mg/kg/día, de trientina en la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina se cualquiera de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, aproximadamente 2 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, aproximadamente 5 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 15 mg/kg/día, aproximadamente 15 mg/kg/día a aproximadamente 20 mg/kg/día, aproximadamente 20 mg/kg/día a aproximadamente 30 mg/kg/día, aproximadamente 30 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día, aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, aproximadamente 5 mg/kg/día a aproximadamente 15 mg/kg/día, aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, o aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 18 mg/kg/día de trientina en la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición de tetramina es aproximadamente de 1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día de trientina en la composición de tetramina.

La administración de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) puede ser durante un

periodo de tiempo extenso, tal como desde aproximadamente una cualquiera de una semana hasta aproximadamente varios años.

En algunas realizaciones, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se administra durante un

5 periodo de al menos aproximadamente uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, u 84 meses o más. En algunas realizaciones, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se administra durante al menos un mes, que incluye, por ejemplo, 10 aproximadamente cualquiera de entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 más meses. En algunas realizaciones, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se administra durante al menos un mes, y en el que la composición de tetramina se administra al menos una vez (tal 15 como dos veces, tres veces, o cuatro veces) al día. En algunas realizaciones, la administración de la composiciones de tetramina (incluyendo la composición farmacéutica) da lugar a al menos aproximadamente 0,005 mg/l (incluyendo, por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de entre 0,01 20 mg/l, 0,05 mg/l, 0,1 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, 3,0 mg/l, 4,0 mg/l o 5,0 mg/l) de la tetramina quelante del cobre en la sangre durante al menos 1 semana (incluyendo por ejemplo, al menos aproximadamente cualquiera de entre 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses 25 o más).

Cualquiera de las composiciones de tetramina (tal como las composiciones farmacéuticas) descritas en el presente documento se puede administrar a un individuo (tal como un 30 ser humano) mediante distintas vías, que incluyen, por ejemplo, la vía intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal,

intrapulmonar, oral, inhalación, intravesicular, intramuscular, intra-traqueal, subcutánea, intraocular, intratecal, transmucosa, transdérmica, intratumoral, inyección directa en la pared de los vasos sanguíneos,

5 intracraneal, o intra-cavitario. En algunas realizaciones, se puede utilizar una formulación de liberación continua de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica). En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra directamente en el tejido isquémico
10 (por ejemplo, utilizando procedimientos de suministro directo descritos anteriormente). En algunas realizaciones, la composición de tetramina se administra mediante un procedimiento de intervención tal como la angioplastia.

15 En algunas realizaciones, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se puede administrar con un segundo compuesto terapéutico y/o una segunda terapia. La dosis y frecuencia de dosificación de la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y el segundo
20 compuesto se pueden ajustar durante el curso del tratamiento basándose en el juicio del médico que los administra. En algunas realizaciones, la primera y segunda terapia se administra simultáneamente, secuencialmente, o concurrentemente. "Administración simultánea", como se
25 utiliza en el presente documento puede indicar que una primera terapia y una segunda terapia en una terapia de combinación se administran con una separación de tiempo de no más de aproximadamente 15 minutos, tal como no más de aproximadamente cualquiera de 10, 5 o 1 minuto. Cuando la
30 primera y segunda terapias se administran simultáneamente, la primera y segunda terapia puede estar contenida en la misma

composición (por ejemplo, una composición que comprende ambas terapias primera y segunda) o en composiciones separadas (por ejemplo, una primera terapia en una composición y una segunda terapia está contenida en otra composición). "Administración

5 secuencial" puede indicar que la primera terapia y la segunda terapia en una terapia de combinación se administran con una separación de tiempo de más de aproximadamente 15 minutos, tal como más de aproximadamente cualquiera de 20, 30, 40, 50, 60, o más minutos. Cualquiera de la primera terapia o la

10 segunda terapia se puede administrar primero. La primera y segunda terapias están contenidas en composiciones separadas, que pueden estar contenidas en el mismo o diferentes envases o kits. La administración concurrente puede indicar que la administración de la primera terapia y la de una segunda

15 terapia en una terapia de combinación se solapan entre ellas.

Cuando se administra por separado, la composición farmacéutica y el segundo compuesto se pueden administrar con una frecuencia de dosificación o intervalos diferentes. Por

20 ejemplo, la composición de tetramina (tal como la composición farmacéutica) se puede administrar diariamente, mientras que un segundo compuesto se puede administrar más o menos frecuentemente. En algunas realizaciones, se puede utilizar una formulación de liberación continua sostenida de la

25 composición de tetramina y/o el segundo compuesto. Se conocen en la técnica distintas formulaciones y dispositivos para conseguir la liberación sostenida. Se puede utilizar una combinación de las configuraciones de administración descritas en el presente documento. En algunas realizaciones,

30 el segundo compuesto es un ion de cobre (tales como sal de cobre o cobre quelado). En algunas realizaciones, la segunda

terapia comprende células madre o un inductor de células madre.

En algunas realizaciones, se administra adicionalmente una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre que se administra al individuo es suficiente para aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo aproximadamente uno cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, o más en comparación con el nivel de cobre extracelular del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición promotora del cobre que se administra al individuo es suficiente para aumentar el nivel de cobre total en el tejido isquémico del individuo aproximadamente uno cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, o más en comparación con el nivel de cobre total en el tejido isquémico del individuo antes del tratamiento.

20

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre que se administra al individuo es suficiente para aumentar el nivel de cobre extracelular del individuo aproximadamente uno cualquiera de entre un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, o más en comparación con el nivel de cobre extracelular del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de la composición promotora de cobre que se administra al individuo es suficiente para aumentar el nivel de cobre total del tejido isquémico el individuo aproximadamente uno cualquiera de entre un 10 %,

20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, o más en comparación con el nivel de cobre total del tejido isquémico del individuo antes del tratamiento. En algunas realizaciones, se puede utilizar una composición promotora del cobre que no comprende un ion de cobre para aumentar el nivel de cobre extracelular. Por ejemplo, la composición promotora del cobre puede aumentar la captación de cobre, disminuir la excreción de cobre, y/o disminuir la toxicidad del zinc.

10

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del ion de cobre en una composición promotora de cobre que comprende un ion de cobre se incluye en cualquiera de los siguientes intervalos: aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 0.1 mg, aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 0.5 mg, aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 1 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2 mg a aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3 mg a aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4 mg a aproximadamente 5 mg, aproximadamente 5 mg a aproximadamente 8 mg, aproximadamente 8 mg a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 1 mg, o aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 2.5 mg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del ion de cobre en la composición promotora del cobre que se administra al individuo incluye al menos aproximadamente una cualquiera de 5 mcg/kg, 10 mcg/kg, 20 mcg/kg, 30 mcg/kg, 50 mcg/kg, 100 mcg/kg, 200 mcg/kg, 300 mcg/kg, 400 mcg/kg, 500 mcg/kg, 600 mcg/kg, 700 mcg/kg, 800 mcg/kg, 900 mcg/kg, o 1000 mcg/kg. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del ion de cobre en la composición promotora del cobre que se administra al individuo incluye

menos de aproximadamente una cualquiera de entre 1000 mcg/kg, 900 mcg/kg, 800 mcg/kg, 700 mcg/kg, 600 mcg/kg, 500 mcg/kg, 400 mcg/kg, 300 mcg/kg, 200 mcg/kg, 100 mcg/kg, 50 mcg/kg, 30 mcg/kg, 20 mcg/kg, 10 mcg/kg, o 5 mcg/kg.

5

En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre se administra diariamente o dos veces al día. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre se administra con la misma frecuencia y duración de dosificación que la composición de tetramina. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre se administra con una frecuencia y/o duración de dosificación diferente de la composición de tetramina. En algunas realizaciones la composición promotora del cobre se puede determinar durante ensayos preclínicos o ensayos clínicos por procedimientos familiares a los médicos y clínicos.

Una vez que se produce la mejora de la enfermedad del paciente, la dosis se puede ajustar para el tratamiento preventivo o de mantenimiento. Por ejemplo, la dosificación o la frecuencia de la administración, o ambas, se puede reducir en función de los síntomas, a un nivel al que se mantenga el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Por supuesto, si los síntomas se han aliviado a un nivel apropiado, el tratamiento puede cesar. Los pacientes, sin embargo, pueden necesitar un tratamiento a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas. Los pacientes pueden necesitar también un tratamiento crónico a largo plazo.

Se conocen distintos procedimientos de suministro directo, y se pueden utilizar para administrar la composición

de tetramina (tal como la composición farmacéutica) y/o la composición promotora del cobre.

En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministran mediante una microburbuja. En algunas realizaciones, el ion de cobre se suministra mediante nanopartículas basadas en péptidos que comprenden cobre En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministra o se dirige al tejido isquémico pasivamente mediante un efecto físico que induce la liberación o suministro al tejido isquémico mediante una nanopartícula (o microesfera).

En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministran por administración directa de la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre que se desvela en el presente documento se administran por vía oral en el sitio de la lesión tisular isquémica. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se absorben mediante el tracto digestivo. En un aspecto, la composición y/o ion de cobre absorbidos se dirigen (por direccionamiento activo o direccionamiento pasivo) a un sitio de lesión isquémica, y se libera localmente en el sitio de la lesión isquémica para proporcionar una concentración local eficaz de la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre para la reparación tisular. En algunas realizaciones, el ion de cobre

suministrado por vía oral forma un compuesto o complejo con una proteína, péptido, aminoácidos, o mono, di o polisacárido. En algunas realizaciones, el cobre forma un compuesto o complejo con uno o más polímeros. En otras realizaciones, el ion de cobre está en un compuesto organometálico, tal como un compuesto organometálico de molécula pequeña.

En algunas realizaciones, una composición de suministro sostenido desvelada en el presente documento incluye inyectables de larga duración (por ejemplo, inyecciones basadas en aceite, suspensiones inyectables, microesferas inyectables, y sistemas inyectables *in situ*) que contienen la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre, agentes y polímeros para inyecciones de depósito, inyecciones de depósito disponibles en el mercado, y sistemas de suministro de liberación sostenida. En ciertas realizaciones, una composición de suministro sostenido en el presente documento comprende una matriz polimérica a partir de la cual se libera un agente por difusión y/o degradación de la matriz polimérica. Por lo tanto, el patrón de liberación del agente se determina principalmente por la matriz polimérica, así como por el porcentaje de carga y el procedimiento de fabricación. En algunas realizaciones, las preparaciones de liberación sostenida utilizan un polímero biodegradable. En este caso, las preparaciones de liberación sostenida no necesitan la retirada quirúrgica de las preparaciones del sujeto. Normalmente, dichas preparaciones se degradan lentamente y se absorben por el cuerpo del paciente, y en último término se desechan junto con otros productos metabólicos solubles de desecho.

En algunas realizaciones, se utiliza un sistema inyectable polimérico de depósito para suministrar un implante de formación *in situ* que contienen la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre en el sitio de la lesión isquémica. Los sistemas de implante de formación *in situ* se produce normalmente de productos biodegradables, que se pueden inyectar mediante una jeringa en el cuerpo, y una vez inyectado, se solidifica para formar un implante biodegradable sólido. En algunas realizaciones, el implante está formado por plastas termoplásticas, polímeros reticulados *in situ*, precipitación de polímeros *in situ*, gelificación inducida térmicamente, u organogeles que se solidifican *in situ*. El mecanismo de la formación de pastas termoplásticas de depósito es para formar un semisólido al enfriar la temperatura del cuerpo después de la inyección en el cuerpo en forma de líquido. Las redes de polímeros reticulados se pueden conseguir *in situ* de distintas maneras, formando sistemas de polímeros sólidos o geles. Los procedimientos para los sistemas reticulados *in situ* incluyen reacciones de radicales libres, habitualmente iniciados por calor o absorción de fotones, o interacciones iónicas entre cationes pequeños y aniones poliméricos. Las formaciones *in situ* se pueden producir produciendo la precipitación del polímero de la solución. Un polímero insoluble en agua y biodegradable se solubiliza en un disolvente orgánico biocompatible al que se añade un fármaco que forma una solución o suspensión después de mezclarlos. Cuando esta formulación se inyecta en el cuerpo, el disolvente miscible con agua se disipa y el agua penetra en la fase orgánica.

Esto da lugar a la separación de fases y la

precipitación del polímero formando un depósito en el sitio de la inyección. Los sistemas de gelificación inducida térmicamente muestran transiciones sol/gel termo-reversibles y se caracterizan por una temperatura de solución crítica más baja. Son líquidos a temperatura ambiente y producen un gel en y por encima de la temperatura de solución crítica más baja. Los organogeles que se solidifican *in situ* comprenden lípidos anfifílicos, que crecen en agua y forman distintos tipos de cristales liotrópicos líquidos.

10

En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se inyectan en el sitio de la lesión isquémica, por ejemplo, por punción percutánea directa, mediante un catéter, o por inyección

15

intravertebral. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministra directamente en un sitio de lesión isquémica utilizando un implante revestido, un estent, o placa, o un implante impregnado con la composición de tetramina y/o la

20

composición promotora del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministra directamente en un sitio de la lesión isquémica liberando lentamente la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre desde un estent

25

intravascular conectado con la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se suministra en el sitio de la lesión isquémica por un liposoma de direccionamiento positivo o un complejo receptor-

30

donante. En algunas realizaciones, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se

suministran en el sitio de la lesión isquémica utilizando fisioterapia, ultrasonidos, iontoforesis, aumento de penetración por ultrasonidos, electroporación, y/o aplicación de esponjas. La aplicación de la composición de tetramina y/o

5 células en el sitio de la lesión isquémica puede ser tópica (por ejemplo, a través de la piel), puede ser en alguna localización en el tejido lesionado que está interior a la superficie del cuerpo, o ambos. Por ejemplo, la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre se puede
10 suministrar mediante iontoforesis mediante el vaso sanguíneo, una capa celular endotelial, u otros tejidos interiores, hacia el sitio de la lesión isquémica para proporcionar una concentración local eficaz de la composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre para la reparación
15 tisular.

En algunas realizaciones, una composición de liberación sostenida desvelada en el presente documento comprende un polímero biodegradable para el suministro controlado de la
20 composición de tetramina y/o la composición promotora del cobre. Los polímeros biodegradables adecuados normalmente incluyen poliláctidos (PLA), poliglicólidos (PGA), poli (láctido-co-glicólido) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poligliconato, polianhídridos, poliortoésteres, poli
25 (dioxanona), y polialquilcianoacrilatos. En algunas realizaciones, la composición de liberación sostenida comprende microesferas inyectables biodegradables tales como microesferas de PLGA, microesferas de PCL, microesferas de polianhídridos, microesferas de poliortoésteres, y
30 microesferas de polialquilcianoacrilatos.

En realizaciones particulares, se puede utilizar un intervalo de tipos de compuesto que contiene cobre para el suministro localizado de la composición promotora de cobre directamente en sitio de la lesión isquémica. Ejemplos de soluciones adecuadas que contienen el ion de cobre son soluciones de cloruro de cobre (I), cloruro de cobre (II), acetato de cobre, y sulfato de cobre. En algunas realizaciones, el cobre forma un compuesto o complejo con una proteína, péptido, aminoácidos, mono, di, o polisacárido, uno o más polímeros, o una molécula pequeña, y el complejo o compuesto se utiliza para el suministro localizado directo en el sitio de la lesión isquémica. En algunas realizaciones, un compuesto organometálico que contiene el cobre se utiliza para el suministro localizado en el sitio de la lesión isquémica.

En algunas realizaciones, la concentración de los iones del cobre en la composición promotora del cobre utilizada para el suministro directo de un sitio de lesión es desde aproximadamente 5 μM a aproximadamente 10 μM , aproximadamente 10 μM a aproximadamente 20 μM , aproximadamente 20 μM a aproximadamente 40 μM , aproximadamente 40 μM a aproximadamente 60 μM , aproximadamente 60 μM a aproximadamente 80 μM , aproximadamente 80 μM a aproximadamente 100 μM , aproximadamente 100 μM a aproximadamente 200 μM , aproximadamente 200 μM a aproximadamente 400 μM , aproximadamente 400 μM a aproximadamente 600 μM , aproximadamente 600 μM a aproximadamente 800 μM , aproximadamente 800 μM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM,

aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. La concentración del ion de cobre se puede determinar utilizando ensayos preclínicos y ensayos clínicos por procedimientos familiares para los médicos y clínicos.

Cobre y tetraminas quelantes del cobre

Los términos "cobre", "ion de cobre" y "elemento de cobre" se utilizan en el presente documento de manera intercambiable. En los sistemas biológicos, los iones de cobre habitualmente se encuentran en dos estados de oxidación, estados cuproso (Cu^{1+} , cobre (I), o reducido), y estado cúprico (Cu^{2+} , cobre (II), u oxidado). En algunas realizaciones, el cobre incluye tanto los estados cuproso y cúprico. En algunas realizaciones, el cobre está en estado cúprico (Cu^{2+}). En algunas realizaciones, el cobre está en estado cuproso (Cu^{1+}). En algunas realizaciones, el cobre es un ion libre, es decir no está unido ni forma un complejo con otra molécula, tal como una proteína o una molécula orgánica pequeña. En algunas realizaciones, el cobre está en forma de sal. En algunas realizaciones, el cobre está presente como una sal seleccionada de entre sulfato de cobre, cloruro de cobre, óxido de cobre, gluconato de cobre, y quelados de aminoácidos con cobre. En algunas realizaciones, el cobre está presente como un ion en un complejo. En algunas realizaciones el cobre está en un compuesto organometálico, tal como un compuesto organometálico de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el cobre está formando un complejo con la tetramina quelante del cobre. En algunas realizaciones, el

cobre es un ion en un complejo que comprende distintas especies de iones que resultan de la introducción del cobre en una célula, tejido, u organismo de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, el cobre forma un compuesto o complejo con una proteína, péptido, aminoácido, o mono, di, o polisacárido. Las proteínas de unión al cobre importantes que se encuentran en los sistemas biológicos incluyen, pero no se limitan a citocromo C oxidasa (CcO), cobre-zinc superóxido dismutasa (Cu, Zn-SOD), dopamina β -hidroxilasa (DBH), proteína priónica (PrP), tirosinasa, proteína inhibidora de apoptosis unida a X (XIAP), lisil oxidasa, metalotioneína (MT), y ceruloplasmina. En algunas realizaciones, el cobre está en forma no disponible para la captación o uso por un tejido isquémico, tal como en un complejo con ceruloplasmina. En algunas realizaciones, el cobre está en una forma disponible para la captación o uso por un tejido isquémico. En algunas realizaciones, el cobre desvelado en el presente documento es un inductor de la actividad transcripcional de HIF-1.

20

Se puede utilizar una composición promotora del cobre que comprenda cualquier especie de cobre que se ha descrito anteriormente en los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre comprende un Cu^{2+} . En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre comprende un Cu^{1+} . En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre comprende un ion en forma de sal (tal como cualquiera o la combinación que se selecciona de entre sulfato de cobre, cloruro de cobre, óxido de cobre, gluconato de cobre, y quelados de aminoácidos con cobre). En algunas realizaciones, la

30

composición promotora del cobre comprende un compuesto organometálico. En algunas realizaciones, la composición promotora del cobre no comprende un ion de cobre o un compuesto de cobre.

5

"Nivel de cobre" al que se hace referencia por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento se puede referir a la concentración de una cualquiera de las especies de cobre anteriores, tales como

10 Cu^{2+} , Cu^{1+} , y/o cobre libre o unido). En algunas realizaciones, el nivel de cobre se refiere al nivel del estado cúprico. En algunas realizaciones, el nivel de cobre se refiere al nivel de cobre que está en forma disponible para la captación o uso por el tejido isquémico.

15

"Tetramina quelante del cobre" se refiere a un compuesto de tetramina que se une o quela el cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre se une el Cu^{2+} . En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre se

20 une al Cu^{1+} . En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es específica (es decir con mayor afinidad) para el Cu^{2+} respecto al Cu^{1+} . En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre forma un complejo con un ion de cobre en una conformación cuadrada plana, un cuadrado plano

25 distorsionado, triángulo piramidal, cuadrado piramidal, u octaédrica distorsionada. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre altera el equilibrio entre Cu^{2+} y Cu^{1+} en las células u organismos. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre cambia (tal como disminuye) el

30 nivel de cobre (tal como el nivel total de cobre) en el individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante

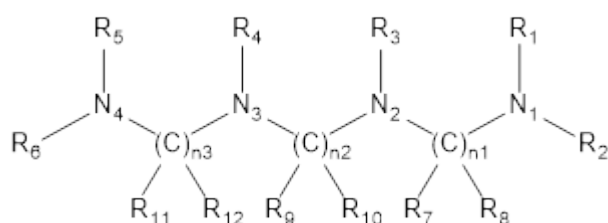
del cobre puede cambiar (tal como disminuir) el nivel de cobre (tal como el nivel de cobre total) en la sangre del individuo. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre puede aumentar el nivel de cobre intracelular (tal como el nivel total o cúprico). En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre puede redirigir el tráfico intracelular y/o transporte inter-tisular o inter-orgánico del cobre. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre se une específicamente a, y/o es captada por un tejido isquémico, tal como un tejido cardíaco isquémico. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre (incluyendo su complejo con el cobre) es permeable a través de la membrana. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre (incluyendo su complejo con el cobre) es liposoluble. En algunas realizaciones, la estequiometría de la tetramina quelante del cobre respecto al cobre en un complejo con el mismo es aproximadamente de 1:1. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre se une al ion de cobre con una afinidad suficientemente baja dentro de las células del tejido isquémico como para permitir la descarga o disociación del ion de cobre.

Se puede utilizar cualquier tetramina quelante del cobre que pueda aumentar el nivel de cobre intracelular en los procedimientos descritos en el presente documento. La tetramina quelante del cobre puede referirse al propio compuesto, sales farmacéuticamente aceptables, metabolitos activos, derivados, y profármacos de la misma, así como un estereoisómero, enantiómeros, mezclas racémicas y similares si fueran aplicables. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es lineal. En algunas realizaciones la

tetramina quelante del cobre esta ramificada. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es cíclica. En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre se selecciona de entre trietilentetramina (2,2,2-tetramina),
 5 2,3,2-tetramina y 3,3,3-tetramina.

En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es la trientina. "Trientina" a la que también se hace referencia como 2,2,2-tetramina, N, N'-Bis(2-aminoetil)-1,2-
 10 etanodiamina, 1,8-diamino-3,6-diazaoctano, 3,6- diazaoctano-1,8-diamina, 1,4,7,10-tetraazadecano, trieno, TETA, TECZA, N,N'-Bis(aminoetil)etilendiamina, N,N'-Bis(2-aminoetil)etanodiamina, y N,N'-Bis(2-aminoetil)-etilendiamina. En algunas realizaciones, la trientina es un compuesto de
 15 fórmula: $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Otras tetraminas quelantes del cobre con propiedades quelantes del cobre similares pueden incluir, pero no se
 20 limitan a, compuestos de Fórmula (II), y sales farmacéuticamente aceptables de la misma:



Fórmula (II)

En algunas realizaciones, la tetramina quelante del
 25 cobre es un compuesto cíclico de Fórmula (II), en el que R1, R2, R3, R4, R5 y R6 se escogen independientemente de entre H, CH₃, C₂-C₁₀ alquilos de cadena lineal o ramificada, C₃-C₁₀ cicloalquilo, C₁-C₆ alquilo C₃-C₁₀ cicloalquilos, arilos mono, di, tetra y penta alquilos sustituidos, heteroarilos,

arilos fusionados, C1-C6 alquil arilo, C1-C6 alquilos mono,
 di, tri, tetra y penta arilo sustituidos, C1-C5 alquilo
 heteroarilos, C1-C6 alquilos fusionados con arilo, CH_2COOH ,
 $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2$, $\text{CH}_2\text{P}(\text{CH}_3)\text{O}(\text{OH})$; n1, n2, y n3 se escogen
 5 independientemente para ser 2 o 3; y R7, R8, R9, R10, R11 y
 R12 se escogen independientemente de entre H, CH_3 , C2-C10
 alquilos de cadena lineal o ramificada, C3-C10 cicloalquilo,
 C1-C5 alquilo heteroarilos C3-C10 cicloalquilos, arilos,
 arilos, mono, di, tetra y penta sustituidos, heteroarilos,
 10 arilos fusionados, C1-C6 alquil arilo, C1-C6 alquilos mono,
 di, tri, tetra y penta arilo sustituidos, C1-C5 alquilo
 heteroarilos, C1-C6 alquilos fusionados con arilo. Además,
 uno o varios de entre R1, R2, R3, R4, R5, o R6 se pueden
 funcionalizar uniéndolos, por ejemplo, a péptidos, proteínas,
 15 polietilenglicoles y otras de dichas entidades químicas con
 el fin de modificar la farmacocinética, suministrabilidad y/o
 semivida en total de las construcciones. Ejemplos de dicha
 funcionalización incluyen pero no se limitan a C1-C10
 alquilo-CO-péptido, C1-C10 alquilo-CO-proteína, C1-C10
 20 alquil-CO-PEG, C1-C10 alquil-NH-péptido, C1-C10 alquil-NH-
 proteína, C1-C10 alquil-NH-PEG, C1-C10 alquil-S-péptido, C1-
 C10 alquil-S-proteína. Además, uno o varios de entre R7, R8,
 R9, R10, R11, o R12 se pueden funcionalizar por la unión, por
 ejemplo, con péptidos, proteínas, polietilenglicoles y otras
 25 de dichas entidades químicas con el fin de modificar la
 farmacocinética, suministrabilidad y/o semividas totales de
 las construcciones. Ejemplos de dicha funcionalización
 incluyen, pero no se limitan a C1-C10 alquilo-CO-péptido, C1-
 C10 alquilo-CO-proteína, C1-C10 alquil-CO-PEG, C1-C10 alquil-
 30 NH-péptido, C1-C10 alquil-NH-proteína, C1-C10 alquil-NH-PEG,
 C1-C10 alquil-S-péptido, C1-C10 alquil-S-proteína.

En algunas realizaciones, la tetramina quelante del cobre es un compuesto cíclico de Fórmula (II), en la que R1 y R6 están unidos entre ellos para formar el grupo de puente (CR13R14)_{n4}, y en la que R2, R3, R4, y R5 se escogen

5 independientemente de entre H, CH₃, C2-C10 alquilos de cadena lineal o ramificada, C3-C10 cicloalquilo, C1-C6 alquilo C3-C10 cicloalquilos, arilos, mono, di, tetra y penta arilos sustituidos, heteroarilos, arilos fusionados, C1-C6 alquil arilo, C1-C6 alquilos mono, di, tri, tetra y penta arilo

10 sustituidos, C1-C5 alquilo heteroarilos, C1-C6 alquilos fusionados con arilo, CH₂COOH, CH₂SO₃H, CH₂PO(OH)₂, CH₂P(CH₃)O(OH); n1, n2, y n3 se escogen independientemente para que sean un 2 o 3; y R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13 y R14 se escogen independientemente de entre H, CH₃, C2-C10

15 alquilos de cadena lineal o ramificada, C3-C10 cicloalquilo, C1-C6 alquilo heteroarilos C3-C10 cicloalquilos, arilos, arilos, mono, di, tetra y penta sustituidos, heteroarilos, arilos fusionados, C1-C6 alquil arilo, C1-C6 alquilos mono, di, tri, tetra y penta arilo sustituidos, C1-C5 alquilo

20 heteroarilos, C1-C6 alquilos fusionados con arilo. Además, uno o varios de entre R2, R3, R4, o R5 se pueden funcionalizar uniéndolos, por ejemplo, a péptidos, proteínas, polietilenglicoles y otras de dichas entidades químicas con el fin de modificar la farmacocinética, suministrabilidad y/o

25 semivida en total de las construcciones. Ejemplos de dicha funcionalización incluyen pero no se limitan a C1-C10 alquilo-CO-péptido, C1-C10 alquilo-CO-proteína, C1-C10 alquil-CO-PEG, C1-C10 alquil-NH-péptido, C1-C10 alquil-NH-proteína, C1-C10 alquil-NH-PEG, C1-C10 alquil-S-péptido, C1-

30 C10 alquil-S-proteína. Además, uno o varios de entre R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13 y R14 se pueden funcionalizar por la

unión, por ejemplo, con péptidos, proteínas, polietilenglicoles y otras de dichas entidades químicas con el fin de modificar la farmacocinética, suministrabilidad y/o semividas totales de las construcciones. Ejemplos de dicha

5 funcionalización incluyen, pero no se limitan a C1-C10 alquilo-CO-péptido, C1-C10 alquilo-CO-proteína, C1-C10 alquil-CO-PEG, C1-C10 alquil-NH-péptido, C1-C10 alquil-NH-proteína, C1-C10 alquil-NH-PEG, C1-C10 alquil-S-péptido, C1-C10 alquil-S-proteína.

10

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables incluyendo bases orgánicas e inorgánicas o ácidos orgánicos e inorgánicos igual. Cuando un

15 compuesto es básico, por ejemplo, se pueden preparar las sales a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos orgánicos e inorgánicos. Dichos ácidos incluyen, por ejemplo, acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico,

20 glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ácido p-toluenosulfónico, y similares.

25

En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables de la tetramina quelante del cobre se selecciona de entre una sal hidrocloreto (por ejemplo, dicloruro de trietilentetramina), sal succinato (por ejemplo, disuccinato de trietilentetramina) sal maleato (por ejemplo tetramaleato

30 de trietilentetramina), y sal de fumarato (por ejemplo, tetrafumarato de trietilentetramina). La tetramina quelante

del cobre, tal como la trientina, también puede estar en forma de sales de amonio cuaternario en el que el átomo de nitrógeno alberga un grupo orgánico adecuado tal como un resto alquilo, alquinilo, alquinilo o aralquilo. Los
5 metabolitos de la tetramina quelante del cobre, pueden incluir, pero no se limitan a, metabolitos acetilados, tales como N-acetil trientilentetramina (por ejemplo, monoacetil-trietilentetramina). Los derivados de la tetramina quelante del cobre pueden incluir, pero no se limitan a tetraminas
10 modificadas con PEG (tal como trientina-PEG).

La tetramina quelante del cobre, incluyendo la trientina, se puede preparar utilizando cualquiera de una variedad de procedimientos de síntesis química, asilamiento,
15 y purificación conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Pat. de EE. UU. N° 4.806.517, Pat. de EE. UU. N° 4.550.209, Pat. de EE. UU. N° 5.225.599, Pat. de EE. UU. N° 4.766.247, Patente Europea N° EP262562, Patente de EE. UU. N° 8.394.992, y Publicación de Pat. de EE. UU. N° US20130108709 A1.

20

Individuo que tiene una lesión tisular isquémica

La "Lesión tisular isquémica" que se describe en el presente documento se refiere a una lesión de un tejido, que
25 incluye, por ejemplo, el cardiovascular, hepático, cerebro, músculo esquelético, y similares, que da como resultado una restricción del suministro sanguíneo al tejido, produciendo una escasez del oxígeno y glucosa necesarios para el metabolismo celular del tejido. La lesión puede implicar
30 cualquiera de entre varias afecciones patológicas o traumatismos por una fuerza externa que da un resultado de la

alteración del flujo sanguíneo. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica es una isquemia cardiovascular. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica es una isquemia cerebral o un ictus isquémico. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica es una isquemia de una extremidad, tal como una isquemia de extremidades inferiores, en algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica es una isquemia del intestino grueso, tal como una colitis isquémica o una isquemia mesentérica. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica es una isquemia cutánea. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica se asocia con embolia, trombosis, aneurisma, trauma, infarto de miocardio, enfermedad de válvula mitral, fibrilación auricular crónica, cardiomiopatía, prótesis, síndrome de salida torácica, aterosclerosis, hipoglucemia, taquicardia, hipotensión, compresión tumoral de un vaso sanguíneo, enfermedad celular de Sickel, congelación, malformación arteriovenosa, enfermedad oclusiva arterial periférica, rotura de vasos sanguíneos significativos, anemia, diabetes, úlceras diabéticas del pie, enterocolitis necrotizante, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, restenosis (tras angioplastia o implantación de un estent), o pancreatitis. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica se asocia con infarto de miocardio. En algunas realizaciones, la lesión tisular isquémica se asocia con diabetes.

Los procedimientos descritos en el presente documento son aplicables por lo tanto en general a muchas enfermedades que implican la lesión tisular isquémica. Estos incluyen, pero no se limitan a: infarto de miocardio, cardiomiopatía,

aneurisma, angina, estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arterioesclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, fibrilación auricular y aleteo, endocarditis bacteriana, Síndrome de Barlow (prolapso de
5 válvula mitral), bradicardia, Enfermedad de Buerger (tromboangitis obliterante), cardiomegalia, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, defectos cardíacos congénitos, fallo cardíaco congestivo, enfermedad arterial coronaria, Síndrome de Eisenmenger,
10 embolia, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, displasia, bloqueo cardíaco, murmullo cardíaco, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, Enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos, enfermedad de ganglios
15 linfáticos mucocutáneos, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, miocarditis, taquicardia auricular paroxística (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, isquemia de extremidad
20 crítica, flebitis, estenosis de la válvula pulmonar (estenosis pulmonar), Enfermedad de Raynaud, estenosis de la arteria renal, hipertensión renovascular, enfermedad cardíaca reumática, vasculopatía diabéticas, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, Arteritis de
25 Takayasu, Tetralogía de Fallot, transposición de grandes vasos, atresia tricúspide, tronco arterioso, enfermedad cardíaca vascular úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, Síndrome de Wolff-Parkinson-White, defecto del cojín endocárdico, fiebre
30 reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, enfermedades

cardíacas reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral ,estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de la válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdicas, enfermedad cardíaca isquémica (agua
5 y subaguda), angina pectoris, enfermedad cardíaca pulmonar, embolismo pulmonar, enfermedad cardiaca pulmonar crónica, enfermedad cardíaca cifoescoliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endomiocárdica, bloqueo auriculoventricular, disritmias
10 cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedad cerebrovascular, una enfermedad de arterias, arteriolas y capilares, o una enfermedad de las enes y vasos linfáticos, una lesión cerebral adquirida, una lesión cerebral traumática, ictus (incluyendo isquémico, hemorrágico
15 intracerebral, hemorrágico subaracnoideo), lesiones anóxicas, trastornos metabólicos, encefalitis, y lesiones cerebrales debidas a la infección. En ciertas realizaciones, las enfermedades que implican una lesión tisular isquémica incluyen la sarcoidosis sistémica, una enfermedad o afección
20 cutánea, el síndrome de Löfgren, una enfermedad o afección pulmonar, una enfermedad o afección cardíaca, una enfermedad o afección ocular, una enfermedad o afección hepática, una enfermedad o afección musculoesquelética, y una enfermedad o afección renal. La presente solicitud por lo tanto también
25 comprende el tratamiento de cualquiera de las enfermedades que utilizan los procedimientos descritos en el presente documento.

Un "individuo", "sujeto" o "paciente" que se describe en
30 el presente documento se refiere a un mamífero tal como ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas,

bueyes, ovejas, cabras, caballos, monos y otros primates no humanos, y seres humanos, un vertebrado tal como pees, y un ave tal como un pollo. Los mamíferos pueden incluir animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas. En 5 algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Los procedimientos descritos en el presente documento son aplicables a un individuo que tiene una o más lesiones tisulares isquémicas, incluyendo, pero sin limitarse a: 10 lesión miocárdica isquémica, lesión cerebral isquémicas, lesión isquémica de la médula espinal, lesión muscular isquémica, lesión esquelética isquémica, necrosis tubular aguda, lesión isquémica intestinal, lesión pulmonar isquémica, lesión hepática isquémica, lesión renal isquémica, 15 lesión cutánea isquémica, hernia, anastomosis vascular, placa aterosclerótica, hemangioma, y después de una lesión traumática roma o penetrante.

En algunas realizaciones de acuerdo con cualquiera de 20 los procedimientos descritos en el presente documento, el individuo no tiene un sistema de reparación tisular comprometido. En algunas realizaciones, el individuo tiene un sistema de reparación tisular comprometido. Los individuos con un sistema de reparación tisular comprometido puede tener 25 una o más de las siguientes características: (a) edad avanzada (tal como al menos aproximadamente 60 años de edad, incluyendo por ejemplo, al menos aproximadamente cualquier de entre 65, 70, 75, 80, 85, 90, o más años de edad); (b) lesión tisular crónica (tal como un individuo que ha tenido una 30 lesión tisular durante al menos aproximadamente cualquiera de entre 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, o 24 meses); (c)

deficiencia de células madre; (d) deficiencia en la migración (es decir, migración dirigida) de células madre; (e) un sistema de reparación tisular defectuoso; y (f) uno o más de los siguientes síntomas o afecciones: pérdida de memoria, capacidad locomotora baja o reducida (incluyendo pero sin limitarse a capacidad de fuerza, velocidad, resistencia, flexibilidad, y movilidad articular), hipostesia, debilidad muscular, pérdida auditiva, y rigidez crónica.

10 En algunas realizaciones, el individuo tiene al menos aproximadamente uno cualquiera de entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o más años de edad. En algunas realizaciones, el individuo es más joven de aproximadamente uno cualquiera de entre 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o más años de edad. En 15 algunas realizaciones, el individuo tiene una isquemia crónica. En algunas realizaciones, el individuo tiene un flujo de cobre desde el tejido isquémico (tal como el miocardio isquémico) a la circulación sanguínea. En algunas realizaciones, el individuo tiene una disminución del nivel 20 (menor de aproximadamente cualquiera de entre un 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 %) de cobre en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, la disminución del nivel de cobre en el tejido isquémico está producida por afecciones isquémicas crónicas. En algunas 25 realizaciones el individuo tiene una actividad transcripcional de HIF-1 reprimida.

En algunas realizaciones, el individuo se selecciona para el tratamiento basándose en su nivel de cobre, tal como 30 el nivel de cobre intracelular, el nivel de cobre extracelular, el nivel de cobre total, y el nivel de cobre en

el suero (es decir, en la sangre). Los individuos con afecciones isquémicas crónicas habitualmente tienen un nivel bajo de cobre intracelular en el tejido isquémico, tal como menos de aproximadamente cualquiera de entre un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o menos del nivel de cobre medio intracelular del tejido correspondiente de individuos sanos. El nivel de cobre en el suero, tal como el nivel de cobre total en el suero, nivel de cobre unido a una proteína (por ejemplo, ceruloplasmina) en el suero, o cobre libre (es decir, no unido) en el suero, para los individuos con afecciones isquémicas crónicas es habitualmente mayor (tal como cualquiera de entre 1,2 veces, 1,5 veces, 1,75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, o más) que el nivel de cobre medio en el suero de individuos sanos. En algunas realizaciones, antes de la administración de la composición de tetramina el individuo tiene al menos aproximadamente cualquiera de entre 60 µg/dl, 70 µg/dl, 80 µg/dl, 90 µg/dl, 100 µg/dl, 110 µg/dl, 120 µg/dl, 130 µg/dl, 140 µg/dl, 150 µg/dl, 175 µg/dl, 200 µg/dl, 250 µg/dl, 300 µg/dl de nivel de cobre total en el suero. En algunas realizaciones, al administrar la composición de tetramina, el individuo tiene al menos aproximadamente cualquiera de entre un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más de nivel de cobre medio total en el suero de los individuos sanos. En algunas realizaciones, al administrar la composición de tetramina, el individuo tiene al menos aproximadamente cualquiera de entre 60 µg/dl, 70 µg/dl, 80 µg/dl, 90 µg/dl, 100 µg/dl, 110 µg/dl, 120 µg/dl, 130 µg/dl, 140 µg/dl, o 150 µg/dl de nivel de cobre total en el suero.

30

En algunas realizaciones, el individuo se selecciona

para el tratamiento basándose en su nivel de actividad de HIF-1. En algunas realizaciones, el individuo tiene los genes diana de la actividad transcripcional de HIF-1 reprimidos en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el individuo

5 tiene un alto nivel (tal como nivel de proteína o ARN) de HIF-1 α en el tejido isquémico, pero los genes diana de la actividad transcripcional de HIF-1 reprimidos en el tejido isquémico. En algunas realizaciones, el individuo tiene

10 isquemia crónica que da como resultado en una actividad de HIF-1 reprimida.

Kits, y artículos de fabricación

La presente solicitud también proporciona kits,

15 medicinas, composiciones, y formas de dosificación unitarias para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los kits proporcionados en el presente documento

20 incluyen uno o más envases que comprenden una cualquiera de las composiciones de tetramina (incluyendo las composiciones farmacéuticas) descritas en el presente documento y/u otros agentes, y en algunas realizaciones, comprenden

adicionalmente instrucciones para su uso de acuerdo con

25 cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. El kit puede comprender adicionalmente una descripción de la selección del individuo adecuado para el tratamiento. Las instrucciones suministradas con los kits de

la invención son normalmente instrucciones escritas en una

30 etiqueta o un prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables

instrucciones digitalizadas (por ejemplo, instrucciones albergadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit comprende

- 5 a) una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre (tal como la trientina) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y opcionalmente b) instrucciones para la administración de la composición de tetramina para el
- 10 tratamiento de una enfermedad o afección asociada con una lesión tisular isquémica.

- En algunas realizaciones, el kit comprende a) una composición de tetramina que comprende una tetramina
- 15 quelantes del cobre (tal como la trientina) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable; b) una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre (tal como CuSO_4 o CuCl_2) y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y opcionalmente c)
- 20 instrucciones para administrar la composición de tetramina y la composición promotora del cobre para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con una lesión tisular isquémica.

- 25 Los kits de la invención están en un envase adecuado. Un envase adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botellas, botes, un envase flexible (por ejemplo, Mylar sellado o bolsa de plástico) y similares. Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como
- 30 tampones e información de interpretación. La presente solicitud también proporciona por lo tanto artículos de

fabricación, que incluyen los viales (tales como viales sellados), botellas, botes, un envase flexible, y similares.

En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más
5 componentes que facilitan el suministro de la composición de tetramina, la composición promotora de cobre, y/o agentes terapéuticos adicionales al individuo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el kit comprende componentes que facilitan el suministro intralesional de la composición de
10 tetramina, y/o la composición promotora de cobre al individuo. En algunas realizaciones, el kit comprende, por ejemplo, jeringas y agujas adecuadas para el suministro de células al individuo, y similares. En dichas realizaciones, la composición de tetramina, y/o la composición promotora del
15 cobre pueden estar contenidas en el kit en una bolsa, o en uno o más viales. En algunas realizaciones, el kit comprende componentes que facilitan el suministro intravenoso de la composición de tetramina, y/o la composición promotora de cobre al individuo. En algunas realizaciones, la composición
20 de tetramina, y/o la composición promotora del cobre puede estar contenida, por ejemplo, en un bote o bolsa (por ejemplo, una bolsa de sangre o bolsa similar capaz de contener hasta aproximadamente 1,5 l de solución que comprende las células), y el kit comprende adicionalmente los
25 tubos y agujas necesarias para el suministro de la composición de tetramina, y/o la composición promotora de cobre al individuo.

Las instrucciones relativas al uso de las composiciones
30 incluyen en general información como de dosificación, programa de dosificación, y vía de administración para al

tratamiento pretendido. Los contenedores pueden ser dosis unitarias, envases clínicos (por ejemplo, envases multidosis) o dosis sub-unitarias. Por ejemplo, los kits pueden proporcionarse de manera que contengan dosificaciones
5 suficientes de la tetramina quelante del cobre como se desvela en el presente documento para proporcionar un tratamiento eficaz de un individuo durante un periodo extenso, tal como cualquiera de entre una semana, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 2 semanas, 3
10 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, o más. Los kits pueden incluir también múltiples dosis unitarias de las composiciones farmacéuticas e instrucciones para su uso y envasadas en cantidades suficientes para el almacenamiento y
15 uso en farmacia, por ejemplo, farmacias de hospital y farmacias de compuestos.

También se proporcionan medicinas, composiciones, y formas de dosificación unitaria útiles para los
20 procedimientos descritos en el presente documento.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente las composiciones y procedimientos de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán
25 que son posibles varias realizaciones en el alcance y espíritu de la invención. La invención se describirá ahora como mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no se debería considerar
30 como que limitan de ninguna manera su alcance.

EJEMPLOS**Ejemplo 1: Estructura cristalina de un complejo de trientina y un ion de cobre**

5

Se cristalizó un complejo que comprende dicloruro de trientina, un ion de cobre, y agua. Se seleccionó un único cristal adecuado (150116_s2_lzh_m) y se recolectaron los datos de difracción de rayos x utilizando el cristal único en un difractómetro Xcalibur Eos. El cristal se mantuvo a 143.00 - 143.10 K durante la recolección de datos. Utilizando Olex2 (Dolomanov y col., (2009) J. Appl. Cryst. 42: 339-341), se resolvió la estructura con el programa de solución de estructura Superflip (Palatinus y col., (2008) J. Appl. Cryst. 41: 975-984; Palatinus y col., (2012) J. Appl. Cryst. 45: 575-580) utilizando Charge Flipping y refinado con el paquete de refinamiento ShelXL (Sheldrick G.M. (2008) Acta Cryst. A64: 112-122) que utilizan el algoritmo de minimización Least Squares. Se determinó que la fórmula empírica del complejo de cada unidad era $C_6H_{20}Cl_2CuN_4O$. La estructura cristalina refinada y sus parámetros se muestran en las FIG. 1-3 y 4A-4C.

Ejemplo 2: Suministro intracelular de cobre en los cardiomiocitos mediante trientina y complejo de trientina-cobre

Este ejemplo describe un ensayo de suministro de cobre *in vitro* a cardiomiocitos mediante trientina y complejo de trientina con cobre. Un diagrama de flujo se muestra en la FIG. 5.

Se cultivaron cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales de rata en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) A 37 °C, un 10 % de CO₂ durante 48 hora. Las células se

5 transfirieron entonces a un DMEM libre de suero y se cultivaron a 37 °C, un 10 % de CO₂ durante 12 horas, antes se dividieron las células en cinco grupos experimentales (un grupo control, y cuatro grupos de tratamiento). En el grupo de control, las células se cultivaron con DMEM libre de suero

10 durante 6 horas adicionales a 37 °C, un 10 % de CO₂ con CuCl₂ solo, trientina sola, un complejo de trientina con cobre, y una mezcla de trientina y CuCl₂, respectivamente, cada uno a una concentración final de 10 µM de trientina y 10 µM de cobre. El complejo de trientina con cobre se sintetizó

15 caseramente y se caracterizó por espectrometría de masas y difracción con rayos X (XRD). El complejo de trientina y cobre tenía una composición y estructura como se describe en el Ejemplo 1. La mezcla de trientina y cobre se preparó añadiendo moles iguales de trientina y CuCl₂ al DMEM libre de

20 suero a una concentración final de 10 µM a 37 °C durante 24 horas antes de utilizarse la mezcla para tratar los cardiomiocitos neonatales de rata.

Después del tratamiento, las células se recolectaron con

25 un raspador celular, se lavaron tres veces con PBS enfriado en hielo que contenía 10 mM de EDTA (Sigma, EE. UU.) para asegurar el cobre extracelular se había retirado completamente, y se centrifugaron a 300 rpm durante 5 minutos. Los aglomerados celulares se lisaron utilizando un

30 1 % de solución SDS (Beyotime, CN). Los lisados se dividieron en dos partes. Una parte se digirió con ácido nítrico

concentrado a 50 °C durante 72 horas y se analizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica en horno de grafito para evaluar la concentración de cobre intracelular. La otra parte se utilizó para determinar la concentración de proteína total por el ensayo de proteína de ácido bicinchonínico (BCA) (Bio-Rad, EE.UU). La concentración de cobre intracelular de cada grupo de tratamiento se normalizó a la concentración de proteína total.

La FIG. 6 muestra las concentraciones de cobre intracelular normalizado de los cinco grupos experimentales. Todos los datos se expresaron como la media $\pm$ desviación típica (SD). Se utilizó el análisis de varianza de una vía para el análisis inicial, y se empleó el Student-Newman-Keuls para la comparación entre los múltiples grupos. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraba que eran significativas a $P < 0,05$. Como se muestra en la FIG. 6, la concentración de cobre intracelular del grupo de tratamiento con el complejo de trientina y cobre (es decir, Cu-Trientina) y el grupo de tratamiento con la mezcla de trientina y CuCl_2 (es decir, Cu+trientina) aumentaba significativamente en comparación con el grupo de control, y el aumento de las concentraciones de cobre intracelular en estos dos grupos era más pronunciada que con el tratamiento de CuCl_2 solo. Notablemente, la mezcla de y CuCl_2 (es decir, Cu+trientina) daba lugar a un aumento mayor de la concentración de cobre intracelular entre todas las condiciones ensayadas, sugiriendo que la trientina podía transportar el cobre desde un ambiente celular con alto nivel de cobre a los cardiomiocitos.

Ejemplo 3. Terapia con trientina en una modelo de rata de hipertrofia cardíaca patológica

Este ejemplo describe un experimento *in vivo* para evaluar la eficacia de la terapia con trientina en ratas Sprague-Dawley con hipertrofia cardíaca patológica. El modelo de rata de hipertrofia cardíaca patológica se estableció por una operación de constricción aórtica ascendente. La FIG. 7 muestra un diagrama de flujo del procedimiento experimental.

10

1.1 Establecimiento de hipertrofia cardíaca patológica en ratas

Antes del procedimiento quirúrgico, todos los sujetos recibieron una inyección intraperitoneal de un 10 % de hidrato de cloral (0,35 mg/kg) para inducir la sedación. Se introdujo una intubación endotraqueal para la ventilación. Se llevó a cabo la respiración asistida para alcanzar el volumen tidal entre 1,2 ml a 1,5 ml. La tasa respiratoria era de casi 80/min, y la relación inspiratoria/espирatoria era de 1:1.

20

Durante la operación, la posición de la rata se ajustó a decúbito lateral derecho y la rata se colocó en un estereomicroscopio. El área de operación se aisló de manera aséptica. El aislamiento se hizo con una pieza de venda estéril desechable.

25

El área quirúrgica se cortó ligeramente medial a la línea del segundo espacio intercostal izquierdo, y a 1-1,5 cm se hizo una incisión transversal desde el lado izquierdo del pre-esternón. El tejido subcutáneo y los planos musculares se

30

disecaron hasta la pleura, entrando en el espacio pleural. Se insertó un hisopo de algodón para separar el espacio pleural y empujar el pulmón lejos del campo de la operación para evitar la lesión pulmonar, y entonces se amplió la incisión

5 intercostal con un retractor para abrir el tórax y exponer el timo y grasa.

Después de que se empujaron lejos el timo y la grasa, los vasos principales se expusieron en la parte superior del

10 apéndice de la aurícula izquierda. La parte ascendente de la aorta se disecó del tronco pulmonar en la derecha. El sitio de constricción se localizó en la aorta ascendente entre la válvula aortica y la arteria sin nombre.

15 Se aplicó una constricción en la aorta ascendente con una aguja de calibre 20 (O.D. 0,9 mm). La aorta ascendente y la aguja se ataron utilizando un trozo sencillo de hilo quirúrgico de 6-0. La aguja se retiró entonces inmediatamente para proporcionar un a luz con aorta estenótica. Después de

20 la constricción, el ventrículo izquierdo y la aurícula izquierda se hinchaban.

Antes de cerrar el tórax, se retiró el retractor de tórax, y el timo y la grasa se devolvieron a su posición

25 normal. La cavidad torácica se cerró juntando la segunda y tercera costillas con dos suturas de nilón de 3-0. Para evitar la hemorrea y el neumotórax, se tuvo cuidado de evitar perforar el corazón dilatado y dañar el pulmón durante la sutura de las costillas. Los pulmones se re-inflaron

30 interrumpiendo el flujo de salida del ventilador durante 1-2 segundos utilizando un dedo mientras se cerraba la incisión

intercostal, las incisiones del músculo y la piel se cerraron en capas con suturas de seda de 5-0, y se limpió de manera estéril. El tubo endotraqueal se retrajo después de restaurarse la respiración espontánea. Para mejorar el dolor después de la cirugía, se administró el analgésico dezocina (0,8 mg/kg) por vía intramuscular y una vez al día durante los siguientes 2 días.

1.2 Ecocardiografía

Las ratas se sedaron mediante una inyección intraperitoneal de un 10 % de hidrato de cloral (0,35 mg/kg) para las mediciones ecocardiográficas. A los 4 meses después de la operación de constricción aórtica y a 1, 3 y 5 semanas depuse del tratamiento con trientina, se llevó a cabo una serie de ecocardiogramas utilizando un transductor de 11,5 MHz (Vivid 7 Dimension, GE). La profundidad del septo interventricular (IVSD) y la profundidad de la pared ventricular posterior izquierda (LVPWD) se obtuvieron utilizando un modo bi-dimensional tomando mediciones de las áreas seccionales transversales del eje corto y la longitud ventricular izquierda.

La fracción de eyección (EF) y la fracción de acortamiento (FS) del ventrículo izquierdo se evaluaron por el procedimiento de plano sencillo de Simpson. El volumen diastólico final ventricular izquierdo (LVEDV), volumen sistólico final (LVESV), diámetro interior diastólico final (LVID_d) y diámetro interior sistólico (LVID_s) se registraron directamente. Se calcularon la EF y FS de acuerdo con las siguientes fórmulas: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$, $FS =$

$$(\text{LVID}_d - \text{LVID}_s) / \text{LVID}_d \times 100 \%$$

1.3 Tratamiento con trientina

5 Cuatro meses después de las operaciones, se observaban la hipertrofia concéntrica ventricular izquierda y fibrosis miocárdica intersticial. El establecimiento del modelo de hipertrofia cardíaca se confirmó por evaluaciones mediante ultrasonidos de la morfología y las funciones cardíacas. El
10 tratamiento con trientina se inició después de la confirmación del estado de hipertrofia cardíaca patológico. El grupo de constricción aórtica ascendente (AAC) se dividió en tres grupos: un grupo de control (grupo NS) y dos grupos de tratamiento con trientina (grupo Tr(H) y grupo Tr(L)). Las
15 ratas de los grupos de control se trataron con solución salina. La trientina se administró por vía oral dos veces al día en los grupos de tratamiento con trientina. Se administraron dos dosis de trientina (dosis calculada basándose en dihidrocloruro de trientina), 45 mg/kg/día
20 (grupo Tr(H)) y 90 mg/kg/día (grupo Tr(L)). El tratamiento continuó durante 6 semanas.

El procedimiento experimental y los resultados de las siguientes secciones del presente ejemplo se enfocaron en el
25 tratamiento con una composición de trientina que consistía esencialmente en dihidrocloruro de trientina. El mismo protocolo experimental se utilizó para evaluar la eficacia terapéutica de otras composiciones de trientina para el tratamiento de hipertrofia cardíaca en el modelo de rata. Por
30 ejemplo, en un experimento, además del tratamiento con trientina, las ratas AAC de los grupos de trientina se

trataron adicionalmente con un suplemento de cobre oral (tal como cloruro de cobre) a una dosis de 54 mg/kg diariamente durante 6 semanas. En otro experimento, el complejo de trientina y cobre del Ejemplo 1 se utiliza para tratar las ratas AAC en el grupo de tratamiento de trientina a una dosis de 120 mg/kg/día por administración oral durante 6 semanas.

1.4 Evaluaciones de la morfología cardíaca y función

La morfología y funciones cardíacas se evaluaron por ecocardiografía, y se midieron las concentraciones de cobre (es decir, la detección en sangre) para evaluar la eficacia terapéutica de los tratamientos de trientina de acuerdo con la programación que se muestra en la FIG. 7.

Adicionalmente, se obtuvieron secciones de tejido cardíaco de las ratas después de sacrificarlas al final de los experimentos. Se llevaron a cabo experimentos inmunohistoquímicos sobre las secciones de tejido. Se determinó la densidad capilar de las secciones de tejido cardíaco, y se detectaron los cambios en contenidos de colágeno. Se midieron los niveles de ARNm y proteína de HIF1- α y sus dianas, tales como VEGF y VEGFR-1, en el tejido infartado, zona limítrofe del tejido infartado, y tejido cardíaco alejado del área infartada.

1.5 Concentración de cobre en el tejido cardíaco

Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C antes de la liofilización. Después de la liofilización y digestión de los tejidos con ácido nítrico,

la muestra estaba decolorada o ligeramente amarilla, y transparente sin un precipitado o residuo visible. Se añadió agua ultrapura a cada vaso para diluir el HNO₃ hasta el 2 % para los análisis posteriores de concentraciones de cobre. Se determinaron las concentraciones de cobre por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (ICE3500, Thermo) de acuerdo con el programa que se muestra en la Tabla 1 posteriormente.

Tabla 1 Programa de espectrometría de absorción atómica en horno de grafito

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de Gas Argón (l/min)
90	20	0,2
120	20	0,2
850	20	0,2
2100	3	0
2500	3	0,2

1.6 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media ± SD. La variación de cada parámetro se comparó entre los distintos grupos experimentales utilizando el ensayo de homogeneidad de Levene y el coeficiente de varianza (CV). Se utilizó un paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL), y la diferencia significativa se consideraba cuando los valores de P eran < 0,05.

2. Resultados

2.1 Morfología y funciones cardíacas

El examen ecocardiográfico demostraba que, después del tratamiento con trientina, se producía la inversión de la hipertrofia cardíaca patológica a nivel morfológico. Después de 3 semanas de tratamiento, la profundidad del septo interventricular (IVSD) y la profundidad de la pared posterior ventricular izquierda (LVPWD) de las ratas disminuía significativamente. Con la extensión del tiempo de tratamiento, el efecto del tratamiento con trientina era aún más obvio. Cuando las ratas AAC se trataron durante 5 semanas, el IVSD y LVPWD eran casi normales en comparación con las de los grupos falsos. Como se muestra en las FIG. 8A y FIG. 8B, los grupos tratados demostraban una tendencia a la baja de los valores del IVSD y LVPWD con el tiempo de acuerdo con los resultados del control continuo. Por el contrario en el grupo de control, el IVSD y LVPWD aumentaba establemente con el tiempo.

Aunque los parámetros de la función cardíaca, la fracción de eyección (EF) y la fracción de acortamiento (FS), estaban en un intervalo normal para todos los grupos experimentales debido a efectos compensatorios, las FIG. 9A y 9B muestra que la EF y FS de los grupos tratados con trientina no fluctúa muy significativamente. Por el contrario, se observó una tendencia significativa hacia abajo de la EF y FS en los grupos no tratados.

Las concentraciones de cobre en el plasma y el miocardio de las ratas de los distintos grupos de tratamiento se determinaron por espectrometría de absorción atómica. Como se muestra en la FIG. 10A, las concentraciones de cobre disminuían en el miocardio hipertrófico, cuando las ratas se

sometían a las operaciones de AAC. Después del tratamiento con trientina durante 6 semanas, las concentraciones de cobre aumentaban en los tejidos cardíacos de las ratas tratadas. La barra en la FIG. 10A que se corresponde con el grupo AAC-Tr muestra la concentración media de cobre en el tejido cardíaco de ratas AAC tratadas con la dosis alta de trientina y la dosis baja de trientina (es decir, los grupos combinados AAC-Tr(H) y AAC-Tr(L)).

Como consecuencia el flujo de cobre desde los tejidos cardíacos de las ratas AAC, las concentraciones en el plasma de las ratas AAC eran mayores que las de las ratas en el grupo falso. Sin embargo, después de 6 semanas de tratamiento con trientina, de acuerdo con las mediciones en diferentes momentos durante el curso de tratamiento (es decir, cada dos semanas), la concentración alta de cobre en el plasma de las ratas AAC disminuyó significativamente con el tiempo. Por el contrario, la concentración de cobre en el plasma de las ratas del grupo falso se mantuvo bastante estable durante el curso del tratamiento (FIG. 10B).

3. Conclusión

El presente estudio utilizaba trientina para aumentar la concentración de cobre en tejidos cardíacos hipertróficos de las ratas. Los resultados demostraban que la trientina era capaz de promover la redistribución tisular y la reutilización del cobre, e invertir la morfología y funciones de los corazones hipertróficos. Las actividades transcripcionales del HIF-1 y la densidad capilar también podían aumentar en los tejidos cardíacos infartados como

resultado del tratamiento con trientina en las ratas con hipertrofia cardíaca. Además, el examen ecocardiográfico mostraba que las funciones cardíacas normales se mantenían a lo largo del tratamiento con trientina. Los resultados de este experimento proporcionan una fuerte prueba de que el tratamiento con trientina de la presente invención puede suministrar cobre eficazmente en los tejidos cardíacos isquémicos *in vivo* para el tratamiento de hipertrofia cardíaca.

10

Ejemplo 4. Terapia con trientina para el modelo de fallo cardíaco de monos Rhesus después del infarto de miocardio isquémico

15 Este ejemplo describe un experimento *in vivo* para evaluar la eficacia de la terapia con trientina en un modelo de fallo cardíaco en mono Rhesus. El mono Rhesus tiene una similitud cardíaca de alto orden con los seres humanos en términos de su estructura interna, actividades eléctricas, 20 distribución de arterias coronarias, circulación coronaria colateral, y su situación y unión en la cavidad torácica. Por lo tanto, el modelo de fallo cardíaco en mono Rhesus proporciona un buen equivalente para evaluar la eficacia de terapias para las afecciones de fallo cardíaco en seres 25 humanos. En este experimento, el infarto miocárdico isquémico se estableció mediante una operación de ligadura de arterias coronarias. Después de la operación, el tejido cardíaco isquémico se reemplazó gradualmente por fibras de colágeno y se convirtió en un tejido infartado. Un año después de la 30 operación, el tejido cardíaco no infartado del animal se volvía incapaz de compensar la pérdida de funciones del

tejido cardíaco infartado, y se desarrollaba de esta manera el modelo de fallo cardíaco. El tratamiento con trientina se proporcionaba posteriormente a los monos para tratar el fallo cardíaco.

5

1.1 Establecimiento de un fallo cardíaco en monos Rhesus

Antes del procedimiento quirúrgico, todos los sujetos recibieron una inyección intramuscular de 5 mg/kg de ketamina y 0,2 mg/kg de midazolam para inducir la sedación. El pelo que cubre el pecho y las extremidades en los sitios de aplicación de los electrodos se afeitaron completamente para la operación y para mejorar el registro de los resultados de la electrocardiografía (ECG). Se registraron las derivaciones de las extremidades unipolar y bipolar convencionales. Los animales que presentaban un ECG anormal, tal como taquicardia (más de 200 latidos por minuto), arritmia, y desviaciones obvias del segmento ST desde la línea a base se excluyeron del presente estudio.

20

Las mediciones no invasivas que incluyen electrocardiograma, tensiómetro, pulso oximetría, y capnografía se controlaban constantemente (Dash3000, GE, EE. UU), y se establecieron catéteres venosos en los sujetos. Todos los monos sometidos al procedimiento quirúrgico se intubaron en primer lugar después de la anestesia inducida por infusión intravenosa con fentanilo (10 µg/kg), midazolam (0,2 mg/kg), Propofol (1 mg/kg), y vecuronio (0,1 mg/kg). Se llevó a cabo la respiración asistida con ventilación de presión controlada para alcanzar un volumen tidal final de CO₂ entre 35 mmHg a 40 mmHg. La presión inspiratoria se fijó

30

en un intervalo desde 12 a 20 cm de H₂O. La tasa era de 40/min, y la relación inspiratoria/espíratória era de 1:2.

Con el fin de mantener las condiciones anestésicas durante el procedimiento quirúrgico, se diluyeron 2 ml de fentanilo (0,1 mg) y 10 ml de Propofol (100 mg) hasta los 20 ml con solución salina. La mezcla se infundió continuamente mediante una bomba de jeringa a una velocidad de 5-10 ml/h. La velocidad de la bomba se ajustó de acuerdo con el estado anestésico y la duración de la operación. La canulación arterial se hizo por punción de la arteria femoral con una aguja de un catéter permanente, y se conectó a un tubo de control de presión para controlar la presión sanguínea invasiva durante la operación. Normalmente, la pulsación de la arteria femoral se palpa a medio camino entre la espina iliaca superior y la sínfisis pubiana. El área de operación se aisló de una manera aséptica. El asilamiento se hizo con cuatro piezas de paños de campo estériles desechables.

El área quirúrgica se cortó ligeramente medial a la línea del cuarto espacio intercostal izquierdo, y se hizo una incisión transversal de 4-5 cm partiendo del lado izquierdo del pre-esternón. Se aplicó diatermia monopolar para el corte de ambos tejidos y con fines de coagulación. El tejido subcutáneo y los planos musculares se disecaron hasta la pleura, entrando en el espacio pleural, y entonces se amplió la incisión abriendo con fórceps. Se insertó un hisopo de algodón para separar el espacio pleural y empujar el pulmón lejos del hueco, y entonces se amplió la incisión intercostal para abrir el tórax y exponer el pericardio.

El corazón se expuso mediante la incisión de toracotomía (4-5 cm) en el cuarto espacio intercostal izquierdo y se identificaron el ápex y la aurícula izquierda. El extremo epicárdico de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) se definió como el nivel cero; el origen de la LAD bajo la aurícula izquierda se definió como nivel 100. Se llevó a cabo la ligadura a un 60 % de la LAD. Además, la rama diagonal principal también se ligó en paralelo al sitio de la ligadura de la arteria LAD en algunos monos, si el sitio de la ramificación de la arteria diagonal estaba por encima del sitio de ligadura.

La arteria se ocluyó durante 1 minuto seguido por una perfusión de 5 minutos, y esta oclusión-perfusión se repitió 3 veces antes de la ligadura final. Después de la ligadura final, se controlaron la diferencia del movimiento de la pared ventricular izquierda, los cambios de color en la pared ventricular anterior, y las alteraciones en el electrocardiograma y la presión sanguínea para asegurar que la ligadura era satisfactoria. Se inyectó una embolada de azul de metileno (1 ml) en la aurícula izquierda con una jeringa de 1,0 ml después de la ligadura final. El llenado del defecto con el azul de metileno indicaba que la ligadura estaba completada, así como ayudaba a predecir el área isquémica.

Antes de cerrar el tórax se controlaron exhaustivamente las condiciones cardíacas durante 45 minutos. Se infundió Dobutamina ($3-5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{Min}^{-1}$) para apoyar las funciones cardíacas y se utilizó un desfibrilador (HEARTSTART XL, Philips) si era necesario. Se tiene que tener cuidado de

evitar dañar el corazón durante el cierre del pericardio. Se infundió hialuronato sódico en la cámara pericárdica como tratamiento anti-adherencias. El pericardio y la pleura se cerraron con suturas de polietileno de 4-0. La incisión intercostal se cerró con sutura de seda. Para evitar el neumotórax, se tuvo cuidado de evitar dañar el pulmón durante el cierre intercostal. Los pulmones se re-inflaron mientras se cerraba la incisión intercostal, de manera que se pudiera expulsar el aire de la cavidad pleural. Después del cierre de la incisión intercostal se depositó solución salina en el espacio subcutáneo, y se infló de nuevo el pulmón para asegurarse de que la incisión del tórax se había cerrado completamente. Las incisiones en el músculo y la piel se cerraron en capas con suturas de seda de 2-0, y se limpió de manera estéril. El tubo endotraqueal se retrajo después de restaurarse la respiración espontánea. La incisión se cubrió con gasas y un vendaje estéril. Se inyectó tramadol (2 mg/kg) por vía intramuscular para aliviar el dolor. El vendaje se cambió en días alternos y las suturas se retiraron una semana después de la operación.

1.2 Control por electrocardiograma (ECG)

Se registró un ECG de 12 derivaciones (MAC8000, GE, USA.) en posición supina de cada mono en el momento anterior a la operación, inmediatamente después de la operación (aproximadamente a las 2 horas del procedimiento quirúrgico completo), y a las cuatro semanas y ocho semanas después de la operación utilizando los electrodos pediátricos con una velocidad de papel de 25 mm/s y amplitud de 10 mm/mV. La pared torácica de un mono no es lo suficientemente amplia

para permitir 6 derivaciones precordiales al mismo tiempo incluso con los electrodos pediátricos. Por lo tanto, se dividieron las 6 derivaciones precordiales en dos grupos: V1, V3, y V5 se registraron en un grupo, y V2, V4, y V6 se registraron en otro grupo.

1.3 Ecocardiografía

Se llevaron a cabo mediciones ecocardiográficas de dos dimensiones en las vistas apical y de 2 y 4 cámaras convencionales con tres ciclos cardíacos consecutivos. La velocidad se mantuvo entre 70 fps y 100 fps. Todos los monos se sometieron a evaluación ecocardiográfica transtorácica con una sonda de 10,3 MHz (P10-4, Siemens ACUSON Antares System, Alemania) en posición lateral izquierda en el momento antes de la operación, y cuatro semanas y ocho semanas después de la operación.

La fracción de eyección (EF) del ventrículo izquierdo se evaluó con el procedimiento simple-plano de Simpson. El volumen diastólico final (LVEDV) y el volumen sistólico final (LVESV) del ventrículo izquierdo se registraron directamente, y la EF se calculó utilizando lo siguiente: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$. El volumen de choque (SV) del ventrículo izquierdo se calculó de la siguiente manera: $SV = LVEDV - LVESV$.

1.4 Tratamiento con trientina

Un año después de la operación, el tejido cardíaco isquémico estaba completamente remplazado por fibras de

colágeno y se convirtió en un tejido infartado. Se estableció un modelo de fallo cardíaco como se confirmó por las evaluaciones por ultrasonidos de las funciones cardíacas. El tratamiento con trientina se llevó a cabo posteriormente. En el grupo tratado con trientina, se administró trientina a cada mono por vía oral dos veces al día. La dosis de trientina era de 18 mg/kg/día. Este tratamiento continuó durante ocho semanas. Los monos del grupo sin tratar (es decir, el control) no recibieron ningún tratamiento. Se evaluaron las funciones cardíacas y la morfología de acuerdo con la programación que se muestra en la FIG. 11 para evaluar la eficacia terapéutica de la trientina.

El procedimiento experimental y los resultados de las siguientes secciones del presente ejemplo se enfocan en el tratamiento con la composición de trientina que consiste esencialmente en dihidrocloruro de trientina. El mismo protocolo se utilizó para evaluar la eficacia terapéutica de otras composiciones de trientina para tratar el fallo cardíaco en el modelo de mono Rhesus. Por ejemplo, en un experimento, además del tratamiento con trientina, los monos Rhesus con fallo cardíaco del grupo de tratamiento se trataron adicionalmente con un suplemento de cobre adicional (tal como cloruro de cobre) a una dosis de 16,5 mg/kg diariamente durante 6 semanas. En otro experimento, se utiliza el complejo de trientina y cobre del Ejemplo 1 para tratar monos Rhesus con fallo cardíaco en el grupo de tratamiento con una dosificación de 36,7 mg/kg/día mediante administración oral durante 6 semanas.

1.5 Examen histopatológico

Los monos se sacrificaron mediante inyección intravenosa de cloruro potásico (al 10 %, 10 ml) y se llevó a cabo una autopsia completa de cada mono. Se recolectaron los corazones y se lavaron e inspeccionaron superficialmente en cuanto a lesiones visibles y se fijaron en una solución de formaldehído al 10 %. Después, el corazón se corta en seis bloques desde el ápex hasta la base a lo largo del eje largo. El espesor de cada bloque es de 0,5 cm. La superficie de cada sección es suave y uniforme durante la incisión, y las secciones son marcadas por ligadura con una etiqueta. Se vuelven a cortar secciones delgadas y se tiñen con Masson y H/E para el examen microscópico.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido se examinaron utilizando procedimientos inmunohistoquímicos para detectar el HIF1- α , VEGFA, y VEGFR1. Se utilizaron los siguientes anticuerpos respectivamente: anticuerpo monoclonal de ratón anti- HIF1- α humano (ab16066, Abcam); monoclonal de ratón anti-VEGFA humano (sc-57496, Santa Cruz); anticuerpo monoclonal de conejo anti- VEGFR1 humano (1303-12, Epitomics); anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD31 humano (Maixin bio-tech company, Fuzhou). El HIF1- α se recupera por el procedimiento de recuperación de antígeno inducido por calor a alta presión utilizando EDTA (pH 9,0), el VEGF y VEGFR1 se recuperaron por procedimientos de recuperación de antígeno inducido por calor de microondas utilizando una solución tampón de citrato (pH 6,0), y el CD31 se recuperó por el procedimiento de recuperación de antígeno inducido por calor en microondas utilizando EDTA. Las concentraciones de trabajo de los

anticuerpos eran las siguientes: 1:800 para el anti- HIF1- α , 1:100 para anti-VEGF, y 1:100 para anti-VEGFR1. Las muestras de control negativo se incubaron con PBS en lugar del primer anticuerpo en los experimentos inmunohistoquímicos. El CD31 es un marcador de las células endoteliales. El marcador Ki-67 se examina por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal.

Densidad capilar

10

Las densidades capilares de las secciones de tejido se evaluaron de la siguiente manera. Primero, se determina un máximo de distribución capilar en el campo visual con un microscopio óptico con una magnificación de 100 veces, y después se recolectan 5 campos visuales aleatorios en un microscopio óptico a 200 veces de magnificación para determinar la densidad capilar. Los capilares se definen como una luz con un diámetro menor que la suma de 8 veces el diámetro de los glóbulos rojos. La medición se llevó a cabo por dos técnicos independiente.

20

Análisis semi-cuantitativo de expresión proteica

Se observaron los portaobjetos de la inmunohistoquímica en un microscopio óptico y se tomaron imágenes que se utilizaron para determinar los niveles de expresión proteica de una manera semi-cuantitativa utilizando el software de análisis de imagen Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics). Los portaobjetos de diferentes grupos se evaluaron por dos técnicos independientes. Las imágenes de 5 campos visuales aleatorios del área del borde y áreas remotas del infarto de

25

30

cada portaobjetos se tomaron con el microscopio óptico a 400 veces de magnificación.

1.6 Transferencia de Western

5

Preparación del tejido

El corazón se retira del tórax. La pared ventricular izquierda se examina cuidadosamente y se aíslan muestras de
10 tejido del área infartada, el área del borde, y áreas remotas. El área infartada se puede distinguir de las áreas no infartadas basándose en su apariencia pálida. El área del borde se define como un área de 1, dentro del área infartada hasta 3 mm fuera del área infartada. Las áreas remotas se
15 definen como de más de 3 mm fuera del área infartada. Las muestras se conservaron en nitrógeno líquido para el análisis de transferencia de Western.

Transferencia de Western

20

Se obtuvieron extractos de proteína después de machacar cada tejido en nitrógeno líquido y lisando el tejido molido en el tampón de lisis RIPA (Beyotime, CN) que contenía un 1 % de un coctel de EDTA libre de inhibidor de proteasa (Roche,
25 DE) durante 40 minutos en hielo. Las concentraciones de proteína se determinaron con el Kit de ensayo proteico BCA (Thermo SCIENTIFIC, 23227, USA). Se solubilizaron cantidades iguales de proteína (30 µg) de cada muestra en 5 x de tampón de muestra SDS y se separó sobre un 10 % SDS y un 8 % de gel
30 de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron entonces electroforéticamente a una membrana de fluoruro de

polivinilideno (Bio-Rad, USA). Las membranas se bloquearon durante 1 hora en solución tampón Tris/Tween 20 (TBST) (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM de NaCl, y un 0,1 % de Tween 20) que contenía un 5 % de leche en polvo desnatada (solución de

5 bloqueo), y se incubaron durante una noche a 4 °C con los anticuerpos primarios respectivos, tal como anti- HIF1- α (Abcam, ab113642, USA), anti-VEGF (Santa Cruz, sc57496, USA), y anti-VEGFR-1 (Abcam, ab32152, USA), diluidos en la solución de bloqueo de acuerdo con las recomendaciones del vendedor.

10

Después del lavado con TBST, las membranas se incubaron durante 1 hora a 37 °C con los anticuerpos secundarios apropiados. Las proteínas diana se visualizaron utilizando un sustrato HRP de quimioluminiscencia (Millipore, USA) y se

15 analizaron por densitometría utilizando el Software QUANTITY ONE™.

1.7 Niveles de ARNm de genes dianas de HIF-1

20

Con el fin de definir las actividades transcripcionales del HIF-1 en el miocardio isquémico, se determinaron los niveles de HIF1- α , genes diana de HIF-1, tal como VEGF y VEGFR-1 (también conocido como Flt-1), mediante PCR en tiempo real (RT-PCR).

25

Se aisló el ARN total de cada muestra utilizando TRIZOL® (Invitrogen, 15596-026, USA) según las instrucciones del fabricante. Se transcribió inversamente 1 μ g del ARN total utilizando el reactivo del kit PRIMESCRIPT™ RT (TaKaRa, RR037A, Japón) a 37 °C durante 15 minutos seguido por 85 °C

30 durante 5 segundos y 4 °C durante 5 minutos. Se llevaron a

cabo reacciones de RT-PCR utilizando el kit SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, RR820A, Japón). Para amplificar los fragmentos de ADNc de HIF1-α, VEGF y VEGFR1, las muestras se procesaron utilizando el sistema en tiempo real BIO-RAD CFX96 con el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Los resultados de la fase logarítmica lineal de la curva de crecimiento se analizaron y se llevó a cabo la cuantificación relativa utilizando el procedimiento 2-ΔCT. Los niveles de expresión de HIF1-α, VEGF y VEGFR1 se normalizaron cada uno al nivel de expresión de Actina en cada muestra. Se ejecutaron al menos 3 repeticiones para cada muestra. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 2, a continuación.

15

Tabla 2. Secuencias de cebadores de la RT-PCR

Gen diana		Secuencias de cebadores
HIF-1α de mono Rhesus	cebador directo	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG (SEQ ID NO: 1)
	cebador inverso	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT (SEQ ID NO: 2)
VEGF de mono Rhesus	cebador directo	GAGCTTCCTACAGCACAACA (SEQ ID NO: 3)
	cebador inverso	CCAGGACTTATAACGGGATTTC (SEQ ID NO: 4)
VEGFR1 de mono Rhesus	cebador directo	GGGTCACATCAACTAACATCAC (SEQ ID NO: 5)
	cebador inverso	CCTTTCTGCTGTCCCAGATTAC (SEQ ID NO: 6)
Actina de mono Rhesus	cebador directo	CCACGAACTAACTTCAACTCC (SEQ ID NO: 7)

Gen diana		Secuencias de cebadores
	cebador inverso	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT (SEQ ID NO: 8)

1.8 Concentración de cobre en el corazón

Las muestras de tejido se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C antes de la liofilización. Después de la liofilización y la digestión de los tejidos con ácido nítrico, las digestiones no tenían color o eran amarillo claro, y transparente sin precipitados o residuos visibles. Se añadió agua ultrapura a cada vaso para diluir el HNO₃ hasta un 2 % para los análisis posteriores de las concentraciones de cobre. Las concentraciones de cobre se determinaron por espectrometría por absorción atómica en horno de grafito (ICE3500, Thermo) de acuerdo con el programa que se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 3.

1.9 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como las medias ± SD. La variación de cada parámetro se comparó entre los distintos grupos experimentales utilizando el ensayo de homogeneidad de Levene y el coeficiente de varianza (CV). Se utilizó un paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL) y se asumió una diferencia significativa cuando los valores de P eran < 0,05.

2. Resultados

2.1 Funciones cardíacas

Los exámenes ecocardiográficos demostraban que, después del tratamiento con trientina, la fracción de inyección izquierda aumentaba significativamente con el tiempo. Sin embargo, en el grupo sin tratar, la eyección ventricular izquierda disminuía con el tiempo. Véase la FIG. 12.

2.2 Concentraciones de cobre en el corazón infartado

La concentración de cobre en el miocardio se determinó por espectroscopia de absorción atómica. Como se muestra en la FIG. 13, las concentraciones de cobre aumentaban significativamente después del tratamiento de trientina en muestras de tejido dl área infartada y la zona del borde del grupo tratado en comparación con la del grupo sin tratar. Por el contrario, las concentraciones de cobre de las muestras de tejido en las áreas remotas son comparables en el grupo tratado con trientina y el grupo sin tratar.

3. Conclusión

La isquemia de miocardio da lugar a una acumulación de HIF1- α y el agotamiento de cobre. En condiciones isquémicas, el HIF1- α acumulado no puede activar la transcripción de HIF debido a que se necesita cobre para la formación del complejo transcripcional de HIF y para la interacción de HIF con las secuencias del elemento de respuesta de HIF (HRE) en los genes diana. Por lo tanto, aunque la acumulación de HIF tiene lugar en el miocardio isquémico, la deficiencia de cobre bloquea la expresión de genes implicados en la angiogénesis regulados por HIF, que da lugar a la supresión de la angiogénesis miocárdica. Este efecto da como resultado el

infarto miocárdico, que progresa adicionalmente hacia el fallo cardíaco.

El presente estudio utilizaba trientina para aumentar las concentraciones de cobre en los tejidos isquémicos totales para el tratamiento del infarto de miocardio. Los resultados demostraban que la trientina promovía la redistribución tisular y la reutilización del cobre. Además, los exámenes ecocardiográficos demostraban que las funciones cardíacas mejoraban después del tratamiento con trientina. La dosis de trientina en este experimento era de 18 mg/kg por día para los monos Rhesus, que es equivalente a aproximadamente 420 mg por día para un individuo humano. En comparación con las dosis típicas de trientina utilizadas para disminuir el nivel de cobre en el suero en pacientes con enfermedad de Wilson (500-700 mg/día hasta un máximo de 1500 mg/día para pacientes pediátricos, y de 750-1250 mg/día hasta un máximo de 2000 mg/día para pacientes adultos), la dosis utilizada en este experimento es mucho menor. Los resultados de este experimento proporcionan una fuerte prueba de que el tratamiento de trientina a baja dosis que se describe en el presente documento es una estrategia eficaz para suministrar cobre *in vivo* para el tratamiento del infarto de miocardio.

Ejemplo 5. Terapia con trientina en el modelo de ratón de infarto miocárdico isquémico

En este experimento, se estableció un modelo de ratón de infarto miocárdico isquémico mediante una operación de ligadura de la arteria periférica permanente. A las 4 semanas después de la operación, el tejido cardíaco isquémico se

remplazó por fibras de colágeno y se convirtió en un tejido infartado. Los tratamientos con trientina se llevaron a cabo como se describe en el protocolo mostrado en la FIG. 14.

5 El tratamiento con trientina se administró a cuatro grupos de ratones modelizados por vía intragástrica dos veces al día a una dosis de 16,75, 33,49, 55,94, o 78,25 mg/kg por día. Este tratamiento continuó durante 4 semanas. El grupo sin tratar no recibió ningún tratamiento con trientina.

10

Ecocardiografía

Las funciones cardíacas se evaluaron por ecocardiografía para evaluar la eficacia terapéutica de la trientina. Todos
15 los ratones se sometieron a evaluación ecocardiográfica transtorácica con una sonda de 12 MHz (i13L, Vivid7, GE Ultrasound). La fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo se evaluó con el procedimiento de simple plano de Simpson. El volumen diastólico final (LVEDV) y el volumen
20 sistólico final (LVESV) del ventrículo izquierdo se registraron directamente, y se calculó la EF utilizando lo siguiente: $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100 \%$.

Concentración de cobre en el corazón

25

Las muestras tisulares se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C antes de la liofilización. Después de la liofilización y la digestión de los tejidos con ácido nítrico, las digestiones no tenían color o eran amarillo
30 claro, y transparente sin precipitados o residuos visibles. Se añadió agua ultrapura a cada vaso para diluir el HNO_3

hasta el 2 % para los análisis posteriores de concentración de cobre. Las concentraciones de cobre se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito (ICE3500, Thermo) de acuerdo con el programa mostrado en la

5 Tabla 1 del Ejemplo 3.

Resultados

La actuación cardíaca detectada por la ecocardiografía
10 demostraba que la función cardíaca según se mide con la fracción de eyección ventricular izquierda de los ratones tratados con trientina mejoraban a bajas dosis de tratamiento con trientina, y dicha mejoría disminuía con el tratamiento con trientina a dosis más altas (véase la FIG. 15). La
15 relación de mejora de la fracción de eyección alcanzaba un pico con la dosis de 33,49 mg/kg por día, y después disminuía incluso con una dosis más alta. Este experimento sugiere que la terapia con trientina para el infarto de miocardio es eficaz en un estrecho intervalo de dosis bajo. Como se
20 muestra en la FIG. 16, la concentración en el área infartada aumentaba significativamente la respuesta al tratamiento con trientina. Notablemente, en el grupo de tratamiento con la dosis de 33,49 mg/kg por día, el contenido de cobre en el área del infarto era el más alto.

25

Conclusión

El presente estudio utilizaba una serie de dosis crecientes de trientina para tratar el infarto miocárdico
30 isquémico en ratones. Los resultados demostraban que en el grupo tratado con trientina a una dosis de 33,49 mg/kg por

día, el contenido de cobre en el área infartada era el más alto entre todos los grupos experimentales, que se corresponde con la mayor relación de mejora de la fracción de eyección observada en este grupo en comparación con los otros grupos experimentales. A las dosis de trientina más altas ensayadas, no se observó una mejora adicional del contenido de cobre del área infartada o la fracción de eyección.

Las dosis de 16,75, 33,49, 55,94, y 78,25 mg/kg, ensayadas en el presente experimento eran equivalentes a aproximadamente 150, 300, 500, y 700 mg por día respectivamente para un paciente humano. Por el contrario, la dosis de trientina utilizada para tratar la enfermedad de Wilson para la disminución del nivel de cobre en los pacientes es aproximadamente de 500-700 mg por día hasta un máximo de 1500 mg por día para pacientes pediátricos, y aproximadamente 750 mg-1250 mg por día hasta un máximo de 2000 mg por día para pacientes adultos. Por lo tanto, la dosis de trientina con la eficacia más alta de recuperación del nivel de cobre en el tejido cardíaco isquémico y la restauración de las funciones cardíacas que se observan en el presente documento es mucho más baja que las dosis utilizadas en el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Wilson.

Los resultados de este experimento proporcionan una fuerte prueba de que la terapia con trientina para el infarto de miocardio es eficaz en un estrecho intervalo de dosis bajas.

Sin el deseo de quedar ligado por teoría o hipótesis alguna, la trientina puede servir como una lanzadera de

suministro de cobre para la transferencia de cobre de una alta concentración tisular o ambiental (tal como el suero después de la isquemia) a un tejido isquémico privado de cobre en el corazón, aliviando de esta manera el agotamiento de cobre en el tejido isquémico y mejorar las condiciones cardíacas. Varias publicaciones describen el nivel de cobre elevado en el suero de pacientes que tienen enfermedades cardiovasculares, especialmente el infarto miocárdico. Véase, por ejemplo, ES Ford. Am. J. Epidemiol. 151 (12): 1182 (2000); E. Gomez y col. J. Trace Elements Med. Biol. 14: 65-70 (2000); y Singh MM y col. Angiology-Journal of Vascular Diseases, 504-506 (1985).

Ejemplo 6. Un estudio clínico de terapia con trientina en pacientes con fallo cardíaco

Se llevó a cabo un estudio clínico para evaluar los efectos clínicos del tratamiento con trientina a dosis bajas en pacientes que tienen un fallo cardíaco. El objetivo primario del estudio es evaluar la eficacia de trientina en comparación con el placebo en el tratamiento de pacientes con fallo cardíaco antes y después del tratamiento.

El estudio es un estudio clínico aleatorio, de ocultación doble, controlado por placebo en pacientes con fallo cardíaco (por ejemplo, NYHA funcional clase II y III) con fracción de eyección reducida (por ejemplo, un LVEF $\leq$ 35 %). Se administró a los pacientes del grupo de control un cuidado convencional (SOC) más placebo dos veces al día. Se administró a los pacientes del grupo de tratamiento SOC más administración oral de trientina dos veces al día a 150

mg/dosis. Los pacientes se evaluaron a la exploración, la línea base (semana 0), a lo largo del curso de tratamiento, y después del tratamiento.

5 El punto final primario del estudio puede ser la supervivencia, hospitalización relacionada con fallo cardíaco, o cambio en un biomarcador relacionado con el fallo cardíaco. Por ejemplo, los niveles de péptidos natriuréticos circulantes con el tiempo se habían utilizado para
10 estratificar el riesgo de fallo cardíaco, y por lo tanto puede servir como biomarcadores para la gravedad del fallo cardíaco.

Los puntos finales secundarios del estudio pueden
15 incluir el cambio en la estructura y función cardíaca de la línea base al final del tratamiento. La estructura y función cardíaca se puede determinar por ecocardiografía. Las mediciones que pueden servir como puntos finales secundarios incluyen volumen diastólico final ventricular izquierdo,
20 fracción de eyección ventricular izquierdo, y relación E/E'.

Los puntos finales secundarios del estudio pueden incluir adicionalmente el estatus funcional basado en el ensayo de caminar una distancia de seis minutos, cambios en
25 los síntomas (clases de NYHA), y valoraciones de calidad de vida.

Los niveles de cobre y otros biomarcadores se pueden controlar como puntos finales terciarios del estudio.

30

La seguridad se evaluó revisando los eventos adversos

espontáneos (AE) informados por el sujeto y otras evaluaciones médicas y de seguridad apropiadas, tal como los signos vitales, ECG, ensayos de laboratorio, etc.

1. Un procedimiento de aumento del nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene
5 una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre.
2. Un procedimiento de suministro de cobre específicamente
10 a las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre.
- 15 3. Un procedimiento de inducción de al menos dos eventos de reparación tisular de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre.
20
4. Un procedimiento de inducción de la migración de células madre hacia un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que
25 comprende una tetramina quelante del cobre.
5. Un procedimiento de estimulación de las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular
30 isquémica, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de una composición que comprende una

tetramina quelante del cobre.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el individuo tiene un sistema
5 de reparación tisular comprometido.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el individuo no tiene un sistema de reparación tisular comprometido.

10

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tejido isquémico se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido cardíaco isquémico, tejido hepático isquémico, tejido cerebral
15 isquémico, tejido pulmonar isquémico, tejido renal isquémico, tejido cutáneo isquémico, tejido isquémico del tracto intestinal y tejido isquémico de una extremidad.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la tetramina quelante del
20 cobre es la trientina.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición comprende
25 adicionalmente un ion de cobre.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ion de cobre de la composición está formando un complejo con la tetramina quelante del cobre.

30

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el

complejo de la tetramina quelante del cobre y del ion de cobre es cristalino.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la
5 composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada plana, y en el que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones de cloruro y una molécula
10 de agua.

14. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ion de cobre en la composición no está formando un complejo con la tetramina quelante del cobre.

15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, que comprende adicionalmente la administración al individuo de una cantidad eficaz de un ion de cobre.

20 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la cantidad eficaz de la composición es insuficiente para disminuir el nivel de cobre extracelular en el individuo.

25 17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que la composición se administra por vía oral.

30 18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que la cantidad eficaz de la

composición comprende aproximadamente de 80 mg a aproximadamente 450 mg de la tetramina quelante del cobre por día.

5 19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que la composición se administra al menos dos veces al día.

10 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que la composición se administra durante al menos aproximadamente un mes.

15 21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que la administración de la composición da lugar a al menos aproximadamente 0,005 mg/l de la tetramina quelante del cobre en la sangre.

20 22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que la administración de la composición da lugar a al menos aproximadamente 0,005 mg/l de la tetramina quelante del cobre en la sangre durante al menos aproximadamente 1 semana.

25 23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que comprende adicionalmente el control del nivel de cobre intracelular en el individuo.

30 24. El procedimiento de la reivindicación 23, que comprende adicionalmente el ajuste de la dosificación de la composición basándose en el nivel de cobre intracelular en el individuo.

25. Una composición farmacéutica que comprende una tetramina quelante del cobre y un ion de cobre.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en
5 la que la tetramina quelante del cobre es la trientina.

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en la que la composición comprende un complejo cristalino de trientina y un ion de cobre, en el que el ion de cobre está
10 quelado por los cuatro grupos amina de la trientina para adoptar una geometría cuadrada plana, y en la que el complejo cristalino comprende adicionalmente dos iones cloruro y una molécula de agua.

15 28. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en donde la composición farmacéutica está formulada como un comprimido, una cápsula o una píldora.

29. Uso de una composición que comprende una tetramina
20 quelante del cobre en la fabricación de un medicamento para el aumento del nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

25 30. Uso de una composición que comprende una tetramina quelante del cobre en la fabricación de un medicamento para el suministro de cobre específicamente a las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

30

31. Uso de una composición que comprende una tetramina

quelante del cobre en la fabricación de un medicamento para estimular las actividades transcripcionales de HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

5

32. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 29-31 en el que la composición comprende adicionalmente un ion de cobre.

10

33. Una composición que comprende una tetramina quelante del cobre que se usa para aumentar el nivel de cobre intracelular en un tejido isquémico de un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

15

34. Una composición que comprende una tetramina quelante del cobre que se usa para el suministro de cobre específicamente a las células de un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

20

35. Una composición que comprende una tetramina quelante del cobre que se usa para promover las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre en un tejido isquémico en un individuo que tiene una lesión tisular isquémica.

25

36. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en donde la composición comprende adicionalmente un ion de cobre.

30

37. Un kit que comprende una composición de tetramina que comprende una tetramina quelante del cobre o una sal

farmacéuticamente aceptable de la misma para el tratamiento de una enfermedad o una afección asociadas a una lesión tisular isquémica.

- 5 38. El kit de la reivindicación 37, que comprende adicionalmente una composición promotora del cobre que comprende un ion de cobre.

USO DE TRIENTINA PARA EL SUMINISTRO DE COBRE A UN TEJIDO

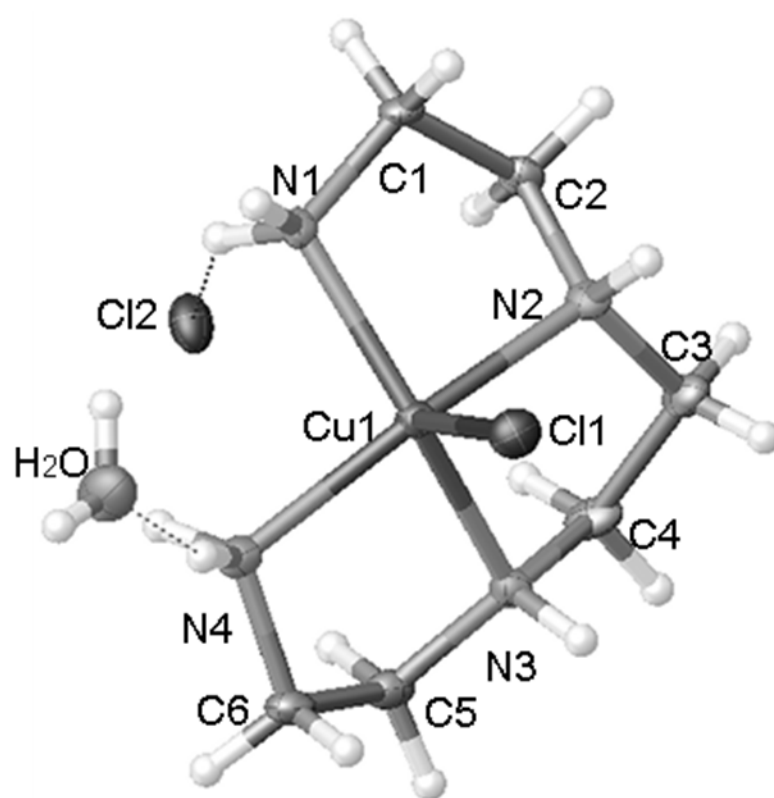
ISQUÉMICO

5

Procedimientos de reparación y regeneración de un tejido isquémico mediante la estimulación de la redistribución y del uso de nuevo de cobre administrando una composición que comprende una tetramina quelante del cobre, tal como la trientina. Procedimientos y composiciones para el aumento del nivel de cobre intracelular y/o la inducción de la reparación de un tejido isquémico en un individuo. El aumento del nivel de cobre en un tejido isquémico puede estimular las actividades transcripcionales del HIF-1 dependientes del cobre y la reparación tisular.

10

15

**FIG. 1**

Longitudes de enlace

Átomo	Átomo	Longitud/Å	Átomo	Átomo	Longitud/Å
C1	C2	1,525 (7)	C5	N3	1,473 (5)
C1	N1	1,482 (6)	C6	N4	1,470 (5)
C2	N2	1,480 (5)	C11	Cu1	2,4741 (12)
C3	C4	1,520 (6)	Cu1	N1	2,026 (4)
C3	N2	1,483 (6)	Cu1	N2	2,035 (4)
C4	N3	1,480 (6)	Cu1	N3	2,026 (4)
C5	C6	1,523 (6)	Cu1	N4	2,033 (4)

Ángulo de enlace

Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo/°	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo/°
N1	C1	C2	106,6 (4)	N3	Cu1	N2	84,54 (15)
N2	C2	C1	106,0 (4)	N3	Cu1	N4	84,82 (15)
N2	C3	C4	106,6 (4)	N4	Cu1	C11	106,67 (11)
N3	C4	C3	109,1 (4)	N4	Cu1	N2	146,08 (15)
N3	C5	C6	107,2 (4)	C1	N1	Cu1	107,6 (3)
N4	C6	C5	108,9 (4)	C2	N2	C3	115,7 (4)
N1	Cu1	C11	99,60 (11)	C2	N2	Cu1	107,0 (3)
N1	Cu1	N2	84,60 (16)	C3	N2	Cu1	105,4 (3)
N1	Cu1	N3	163,99 (15)	C4	N3	Cu1	109,4 (3)
N1	Cu1	N4	97,79 (15)	C5	N3	C4	115,0 (4)
N2	Cu1	C11	106,25 (11)	C5	N3	Cu1	105,9 (3)
N3	Cu1	C11	94,72 (10)	C6	N4	Cu1	108,8 (3)

Ángulo de torsión

A	B	C	D	Ángulo/°	A	B	C	D	Ángulo/°
C1	C2	N2	C3	-161,8 (4)	C5	C6	N4	Cu1	31,5 (4)
C1	C2	N2	Cu1	-44,7 (4)	C6	C5	N3	C4	168,4 (4)
C2	C1	N1	Cu1	-42,4 (4)	C6	C5	N3	Cu1	47,6 (4)
C3	C4	N3	C5	-89,9 (4)	N1	C1	C2	N2	58,3 (4)
C3	C4	N3	Cu1	29,1 (4)	N2	C3	C4	N3	-52,7 (5)
C4	C3	N2	C2	167,4 (4)	N3	C5	C6	N4	-53,3 (5)
C4	C3	N2	Cu1	49,4 (4)					

FIG. 2

Tabla 1 Datos del cristal y refinamiento de estructura para 150116_s2_lzh_m	
Código de identificación	150116_s2_lzh_m
Fórmula empírica	C ₆ H ₂₀ Cl ₂ CuN ₄ O
Peso de la fórmula	298,70
Temperatura /K	143,00(10)
Sistema cristalino	orthorhombic
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	7,0684(2)
b/Å	10,5124(4)
c/Å	16,5540(5)
α /°	90
β /°	90
γ /°	90
Volumen /Å ³	1230,05(7)
Z	4
ρ _{calc} mg/mm ³	1,613
m/mm ⁻¹	2,188
F(000)	620,0
Tamaño del cristal /mm ³	0,3 × 0,2 × 0,2
Radiación	MoK α (λ = 0,71073)
2θ intervalo para la recolección de datos	6,264 to 52,738°
Índice de intervalo	-8 ≤ h ≤ 6, -13 ≤ k ≤ 8, -13 ≤ l ≤ 20
Reflexión recolectada	3978
Reflexión independiente	2139 [R _{int} = 0,0266, R _{sigma} = 0,0500]
Datos/restricción/parámetros	2139/0/135
Bonanza de ajuste sobre F ²	1,039
Índices R finales [I>=2σ (I)]	R ₁ = 0,0314, wR ₂ = 0,0651
Índices R finales [todos los datos]	R ₁ = 0,0364, wR ₂ = 0,0679
Dif. mayor pico/hueco / e Å ⁻³	0,42/-0,35
Parámetro Flack	0,007(13)

FIG. 3

Tabla 2 Coordinados atómicos fraccionales ($\times 10^4$) y parámetros del desplazamiento isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para 150116_s2_1zh_m. U_{eq} se define como 1/3 del rastro del tensor U_{U} ortogonalizado.

Atomo	x	y	z	$U(\text{eq})$
C1	-3466 (6)	-5730 (5)	-7456 (3)	21, 1 (11)
C2	-3528 (6)	-4378 (5)	-7122 (3)	19, 7 (11)
C3	-1517 (6)	-3062 (5)	-6194 (3)	21, 2 (11)
C4	387 (7)	-3175 (5)	-5773 (3)	21, 1 (11)
C5	-122 (6)	-4630 (4)	-4606 (3)	16, 4 (11)
C6	-180 (6)	-6052 (4)	-4434 (3)	16, 3 (11)
C11	1894, 2 (15)	-6628, 5 (12)	-6795, 6 (7)	20, 4 (3)
Cu1	-916, 8 (7)	-5709, 6 (6)	-6122, 9 (3)	14, 05 (15)
N1	-2985 (5)	-6574 (4)	-6769 (2)	17, 6 (9)
N2	-1635 (5)	-4137 (4)	-6772 (2)	15, 4 (8)
N3	584 (5)	-4472 (4)	-5437 (2)	15, 7 (9)
N4	-1272 (5)	-6685 (4)	-5073 (2)	14, 3 (8)
C12	-5193, 7 (14)	-5164, 0 (11)	-4787, 6 (8)	22, 9 (3)
O1	-1646 (6)	-9247 (4)	-7027 (3)	29, 4 (9)

FIG. 4A

Tabla 3 Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para 150116_s2_lzh_m. El factor del exponente de desplazamiento anisotrópico tiene la forma:

$$-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + 2hka^*b^*U_{12} + \dots]$$

Átomo	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C1	21 (2)	28 (3)	14 (2)	4 (3)	-4, 4 (19)	0 (2)
C2	18 (2)	26 (3)	15 (2)	4 (3)	-0, 1 (18)	2 (2)
C3	32 (2)	14 (2)	19 (2)	3 (2)	0 (2)	8 (2)
C4	30 (2)	13 (3)	19 (2)	3 (2)	-2 (2)	-2 (2)
C5	19 (2)	17 (3)	13 (2)	-4 (2)	-0, 4 (19)	1 (2)
C6	18 (2)	18 (3)	12 (2)	4 (2)	-4, 0 (19)	2 (2)
C11	20, 6 (5)	20, 0 (7)	20, 7 (6)	-1, 4 (6)	3, 0 (5)	4, 1 (5)
Cu1	16, 6 (3)	11, 9 (3)	13, 6 (3)	0, 0 (3)	-1, 3 (3)	0, 3 (3)
N1	19, 2 (19)	17 (2)	16 (2)	1, 1 (19)	0, 5 (18)	0, 2 (18)
N2	16, 5 (17)	16 (2)	13, 4 (18)	-0, 9 (19)	-0, 1 (15)	-0, 2 (18)
N3	16, 1 (17)	13 (2)	18 (2)	0, 9 (18)	-1, 7 (15)	3, 9 (18)
N4	12, 5 (17)	13 (2)	18 (2)	0, 7 (18)	-0, 7 (15)	-1, 2 (16)
C12	15, 2 (5)	17, 7 (6)	35, 6 (7)	-0, 7 (6)	-1, 4 (5)	0, 5 (5)
O1	40 (2)	24 (2)	24 (2)	-6 (2)	1, 6 (19)	-3 (2)

FIG. 4B

Tabla 7 Coordinados ($\text{\AA} \times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para 150116_s2_lzh_m.

Átomo	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U (eq)
H1A	-4684	-5962	-7682	25
H1B	-2516	-5797	-7877	25
H2A	-3796	-3774	-7550	24
H2B	-4499	-4303	-6711	24
H3A	-2537	-3109	-5803	25
H3B	-1607	-2257	-6478	25
H4A	1398	-3011	-6156	25
H4B	472	-2552	-5343	25
H5A	-1376	-4265	-4555	20
H5B	713	-4206	-4227	20
H6A	1095	-6392	-4418	20
H6B	-768	-6205	-3913	20
H1C	-2548	-7392	-6966	21
H1D	-4090	-6712	-6433	21
H2	-716	-4011	-7208	19
H3	1922	-4716	-5453	19
H4C	-2602	-6704	-4929	17
H4D	-838	-7554	-5139	17
H1E	-1310 (90)	-9410 (70)	-6580 (40)	70 (30)
H1F	-1840 (70)	-9780 (50)	-7280 (30)	17 (17)

FIG. 4C

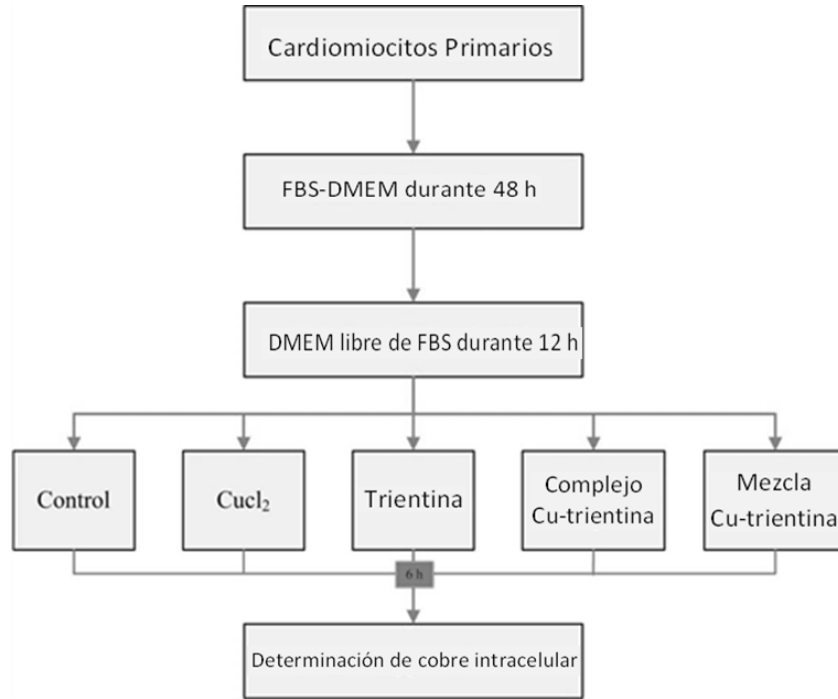


FIG. 5

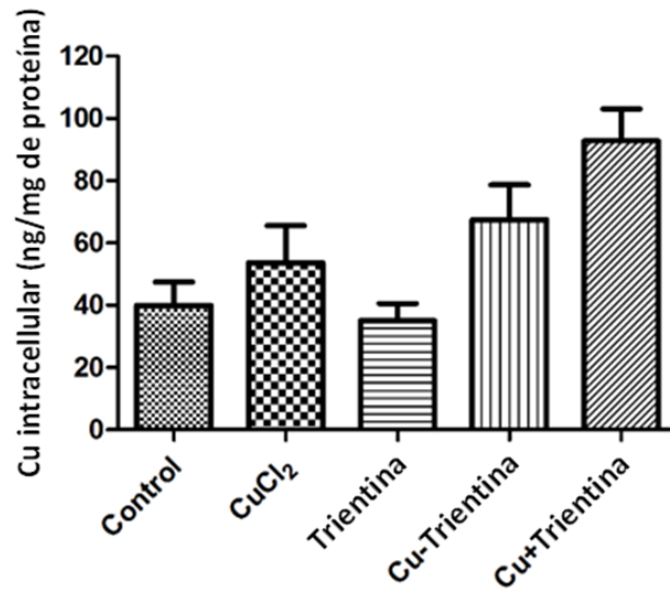


FIG. 6

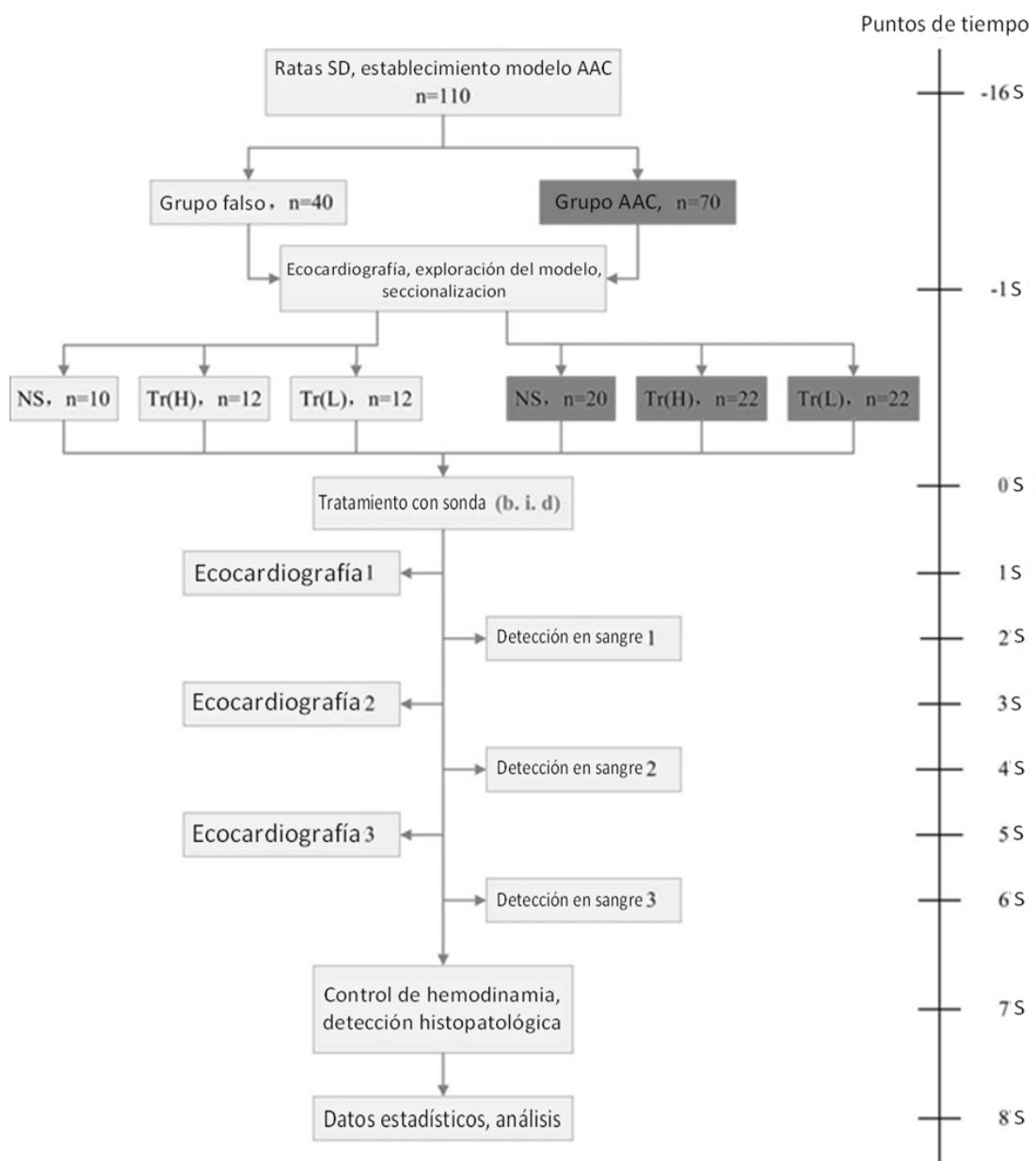


FIG. 7

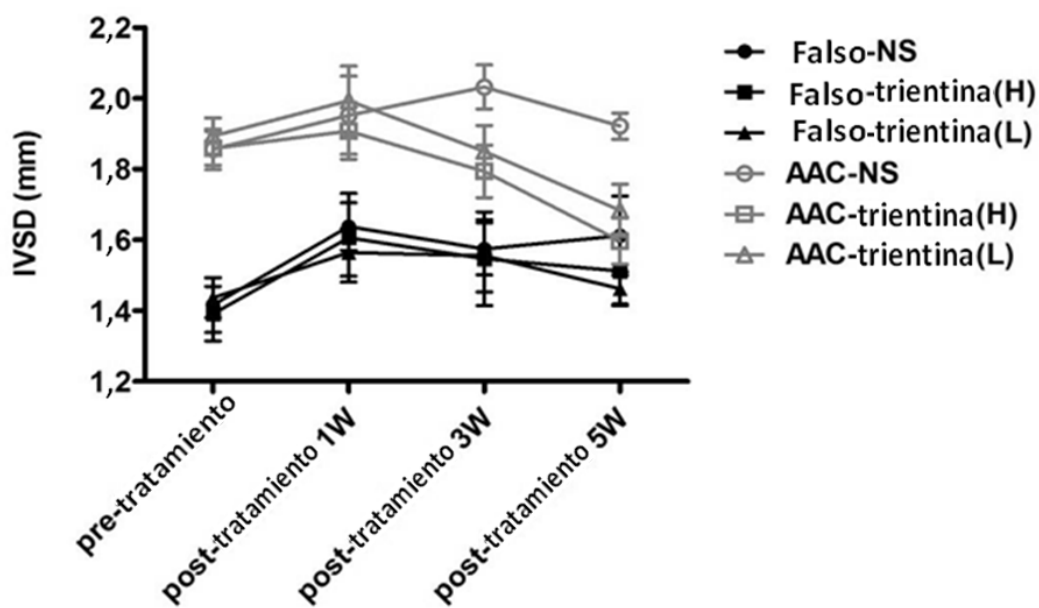


FIG. 8A

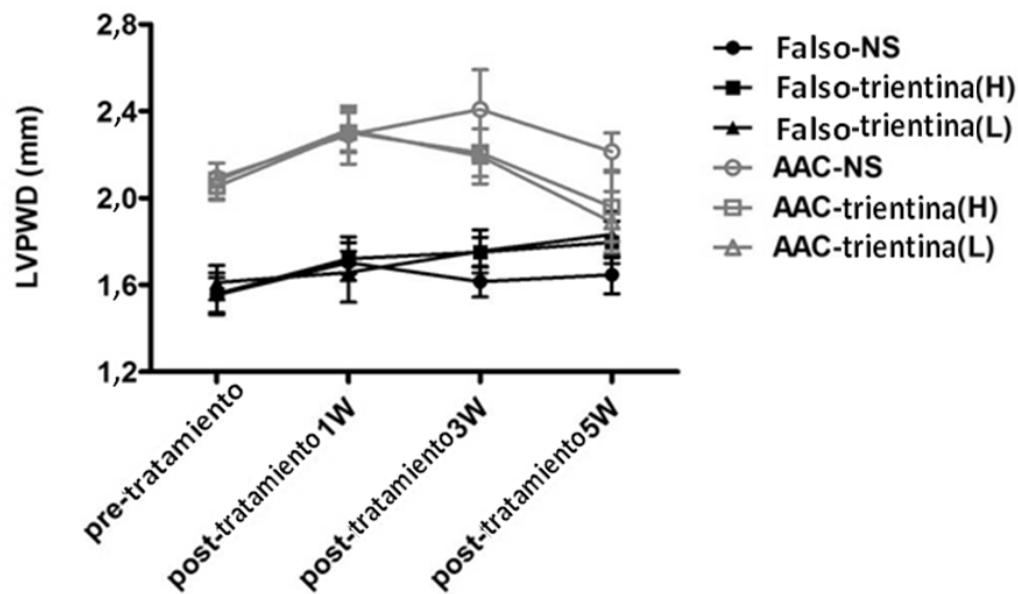


FIG. 8B

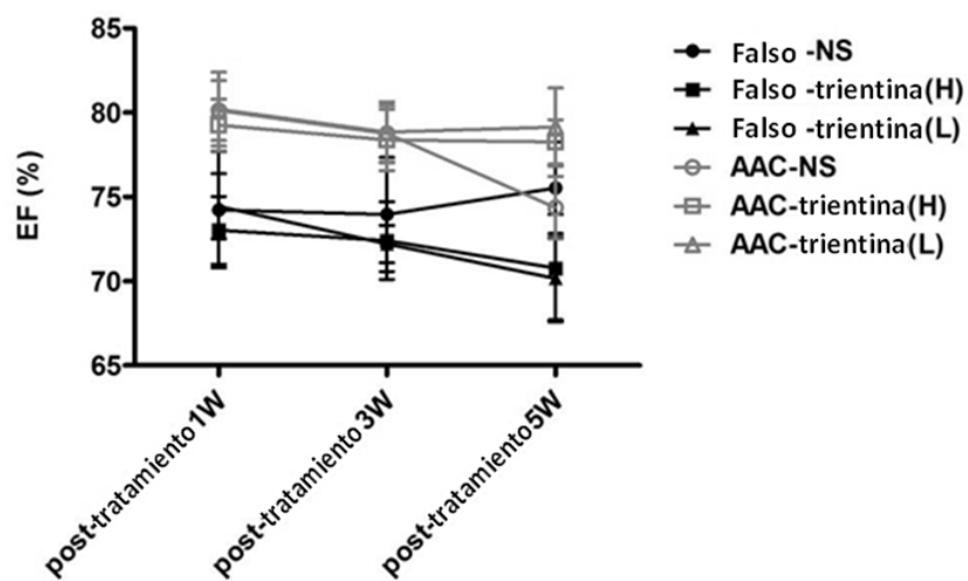


FIG. 9A

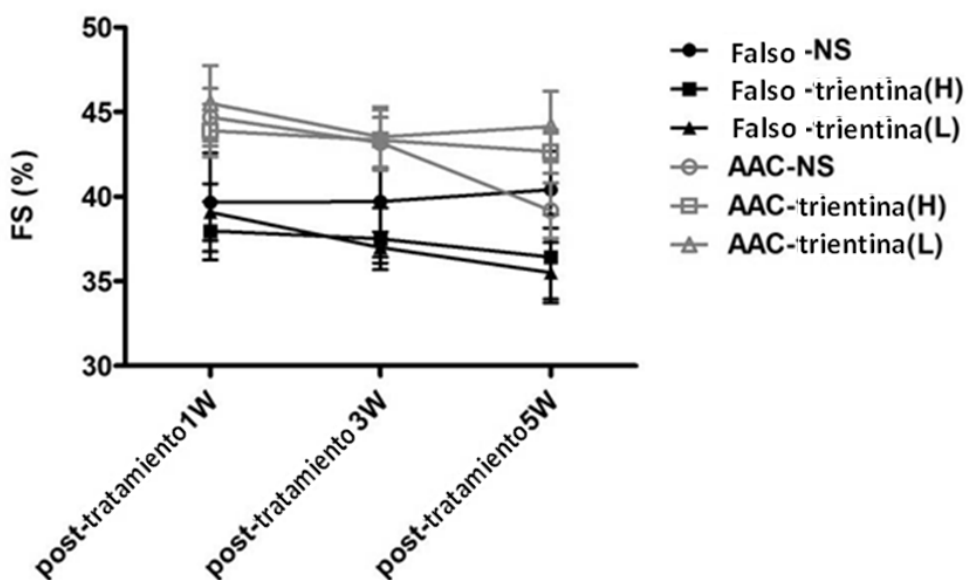


FIG. 9B

Concentración de cobre en el tejido cardíaco

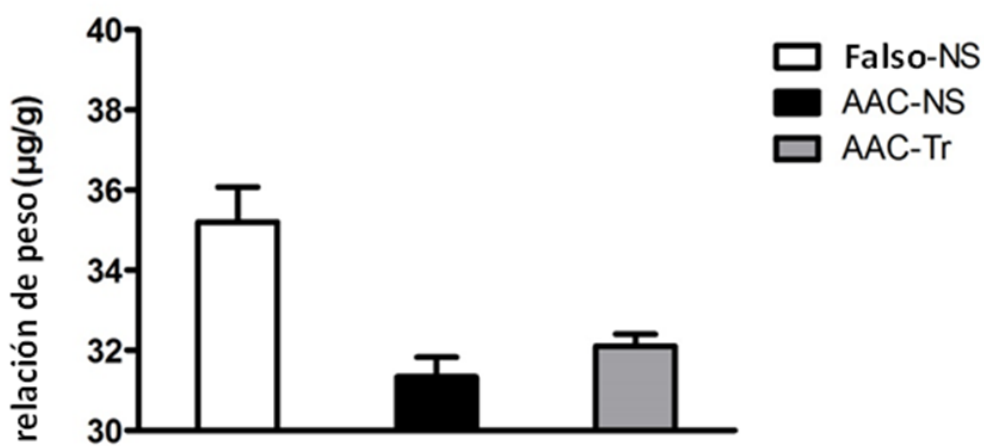


FIG. 10A

Concentración de cobre en el plasma

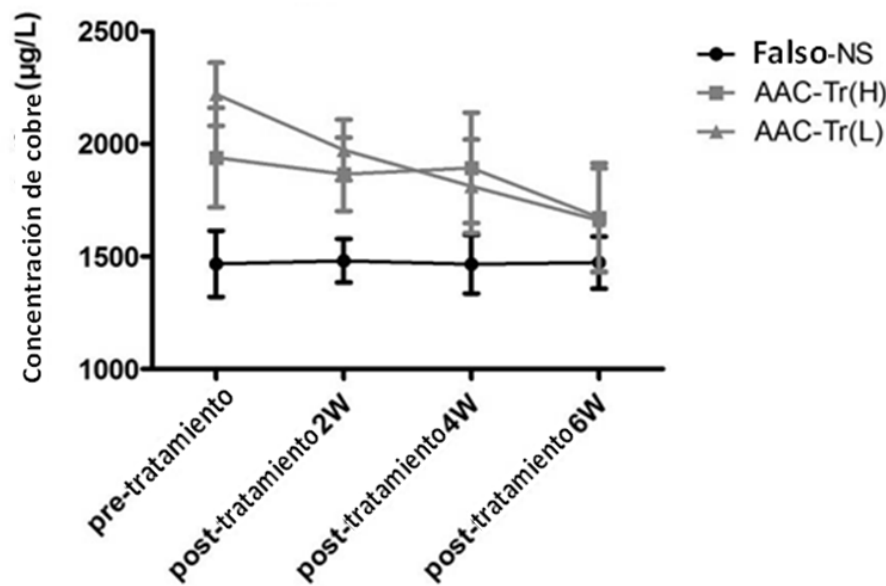


FIG. 10B

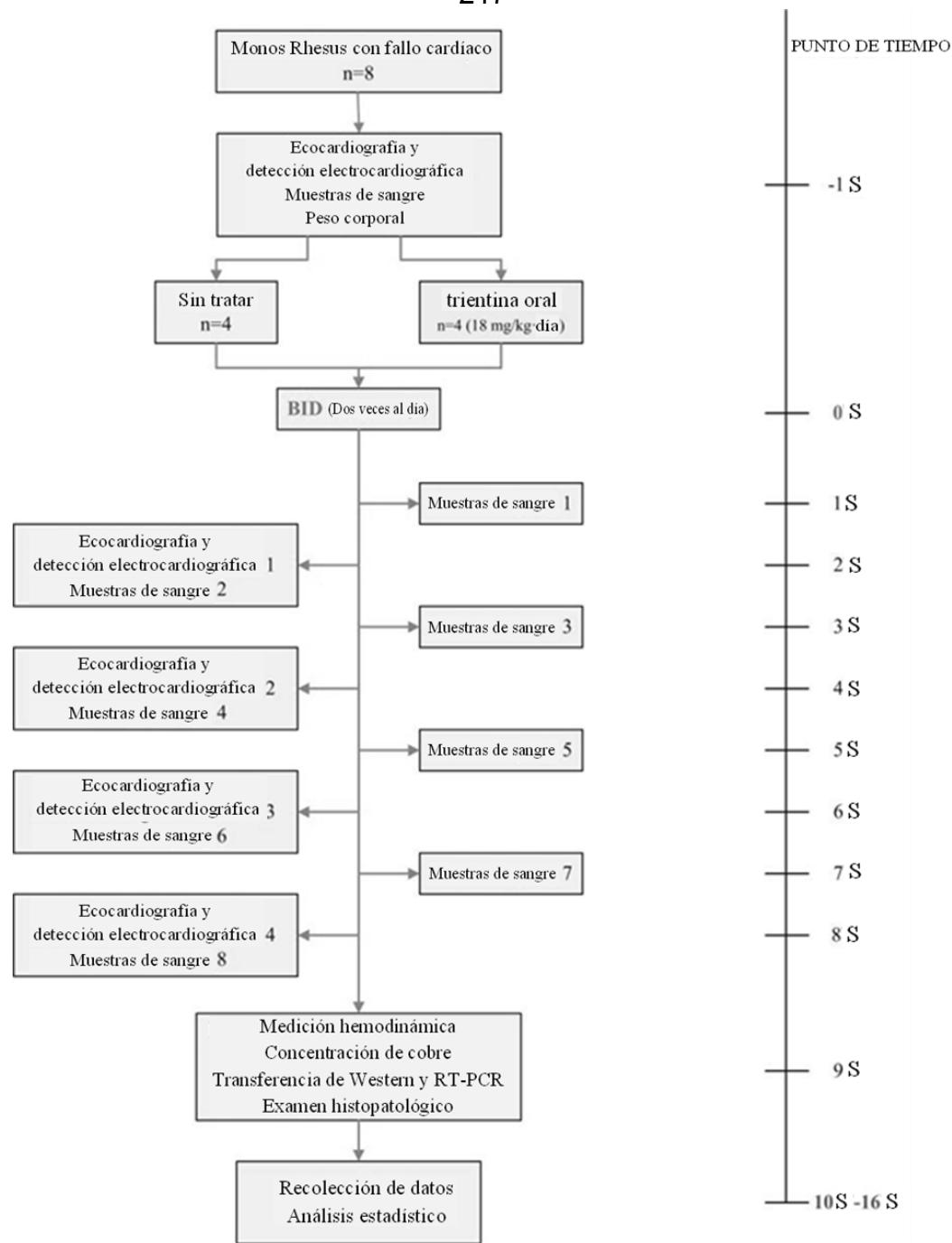


FIG. 11

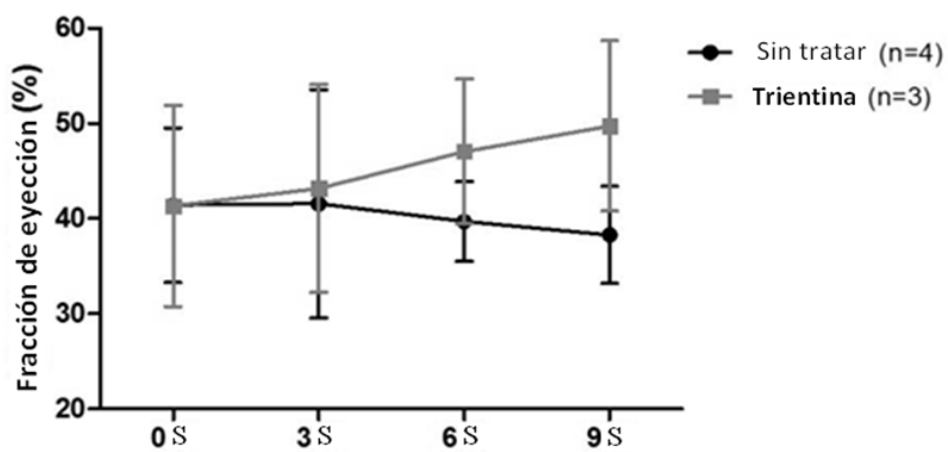


FIG. 12

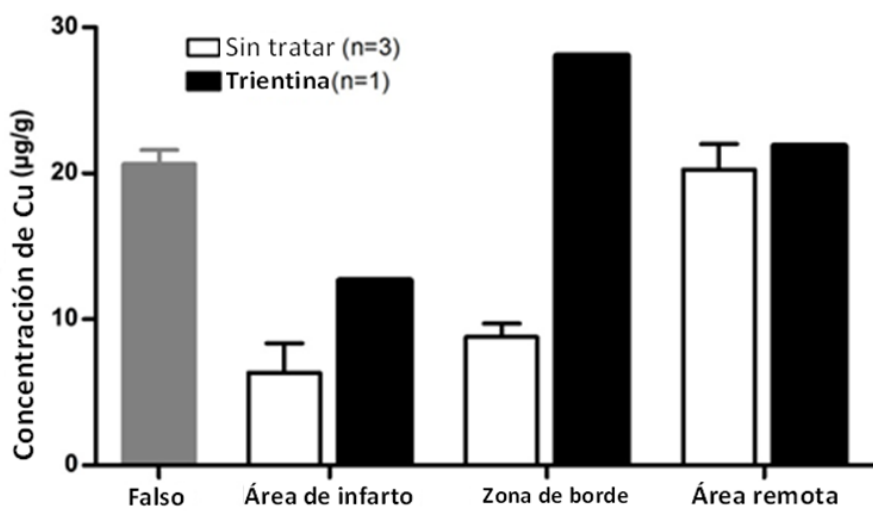


FIG. 13

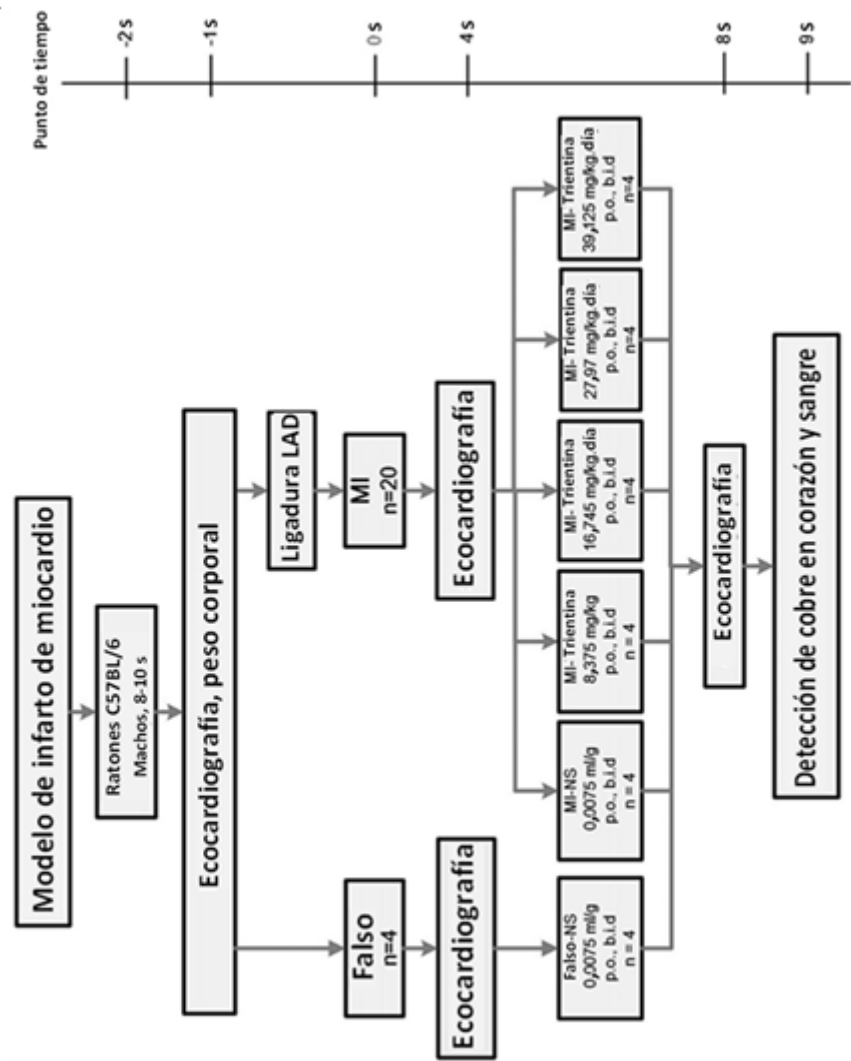


FIG. 14

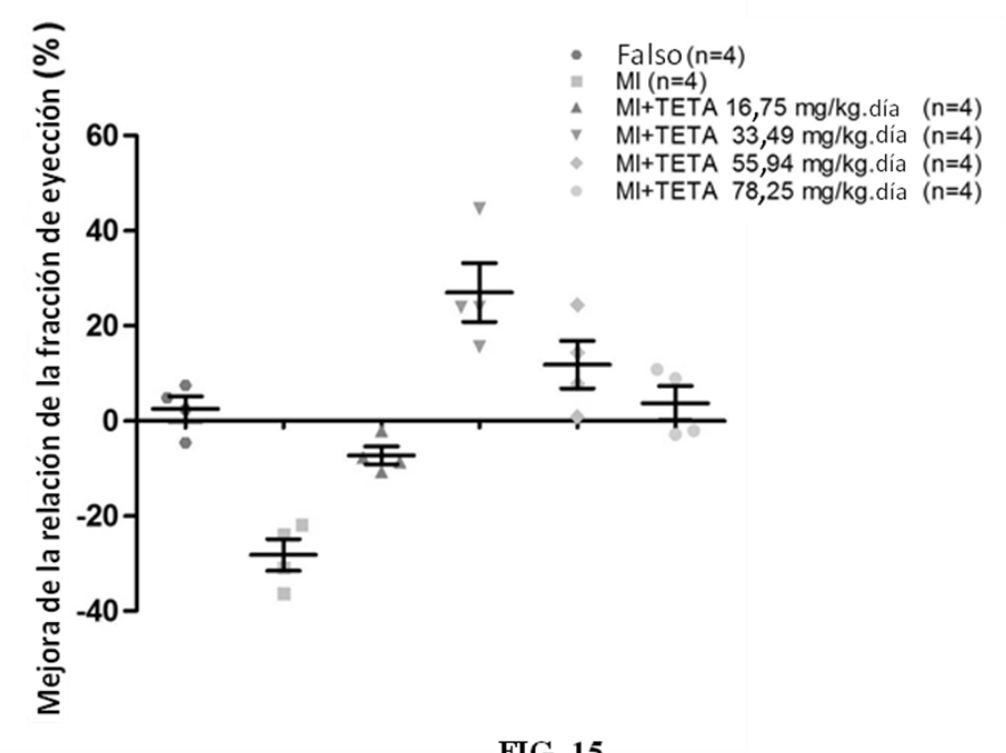


FIG. 15

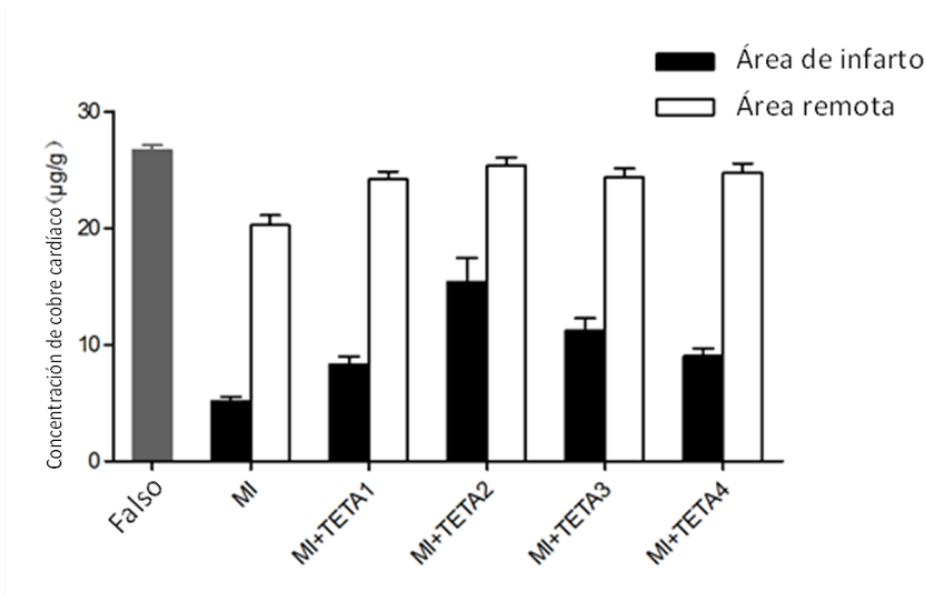


FIG. 16