



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 363 754**

(51) Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/071 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05849967 .4**
(96) Fecha de presentación : **22.11.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1838840**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

(54) Título: **Uso de tejido tridimensional cultivado para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva.**

(30) Prioridad: **22.11.2004 US 630243 P**
17.06.2005 US 692054 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2011

(73) Titular/es: **THEREGEN, Inc.**
280 Sussex Street
San Francisco, California 94131, US

(72) Inventor/es: **Siani-Rose, Michael;**
Kellar, Robert, S.;
Naughton, Gail, K. y
Williams, Stuart, K.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 754 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de tejido tridimensional cultivado para tratar la insuficiencia cardiaca congestiva

2. Antecedentes

La insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) es un síndrome clínico en el que una anomalía de la función cardiaca causa que el gasto cardiaco disminuya por debajo de un nivel adecuado para satisfacer la demanda metabólica de los tejidos periféricos. La insuficiencia cardiaca congestiva se produce con frecuencia debido a otras afecciones cardiacas, tales como arteriopatía coronaria que conduce a infarto de miocardio y muerte del músculo cardiaco. Las patologías adicionales que pueden conducir a una insuficiencia cardiaca congestiva incluyen isquemia, cardiomiopatías, miocarditis, disfunción valvular, anomalías metabólicas y endocrinas (por ejemplo, hipotiroidismo, alcohol, deficiencia de magnesio, etc.), anomalías pericárdicas, defectos cardiacos congénitos, arritmias cardiacas e infecciones víricas.

Los tratamientos incluyen típicamente el uso de varios agentes farmacéuticos diferentes, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), diuréticos, beta-bloqueantes, procedimientos quirúrgicos o ambos. Aunque estos tratamientos pueden mejorar los síntomas asociados con la insuficiencia cardiaca congestiva, son imperfectos. Por ejemplo, no pueden revertir los daños producidos en el corazón. El único tratamiento permanente para la ICC es el trasplante de corazón. Por consiguiente, existe la necesidad de tratamientos adicionales, especialmente aquellos que pueden mejorar y/o revertir los daños en el corazón de un paciente diagnosticado con ICC.

3. Sumario

La presente invención proporciona un tejido tridimensional cultivado y usos del mismo, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las composiciones y usos descritos en el presente documento pueden usarse para tratar al menos un síntoma clínico asociado con insuficiencia cardiaca congestiva. La insuficiencia cardiaca congestiva está típicamente causada por un debilitamiento del músculo cardiaco, dejándolo incapaz de bombear suficiente sangre a los órganos periféricos. Con el tiempo, el músculo cardiaco debilitado progresivamente aumenta de tamaño hasta que el corazón está tan aumentado de tamaño que no puede suministrar sangre de forma adecuada. Generalmente, el uso comprende la administración deseada de tejidos tridimensionales cultivados capaces de administrarse por inyección, implante y/o unión. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, los tejidos tridimensionales pueden unirse usando pegamentos, grapas, suturas u otros medios conocidos por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, la aplicación de un tejido o tejidos tridimensionales se usa para reforzar el músculo cardiaco debilitado de modo que se produzca un aumento perceptible en la eficacia de bombeo. Pueden medirse cambios en la eficacia de bombeo del corazón usando diversos procedimientos, incluyendo ecocardiogramas, y exploraciones nucleares.

En algunas realizaciones, la aplicación de un tejido o tejidos tridimensionales reduce el tamaño del corazón facilitando la remodelación del tejido cardiaco tratado, por ejemplo, promoviendo la endotelización, el crecimiento de tejido, la vascularización y/o la angiogénesis en el tejido cardiaco tratado. Pueden usarse diversos procedimientos para visualizar cambios en el tejido cardiaco después de la aplicación de un tejidos o tejidos tridimensionales, incluyendo rayos X y formación de imágenes por láser Doppler.

En otras realizaciones, la aplicación de un tejido o tejidos tridimensionales mejora la contractilidad del corazón. Pueden medirse mejoras en la contractilidad del corazón mediante varios procedimientos diferentes, incluyendo ventriculografía con radionúclidos o exploración con adquisición sincronizada múltiple para determinar cuánta sangre bombea el corazón con cada latido.

Pueden usarse diversos tipos de células para formar los tejidos tridimensionales. Los tejidos tridimensionales pueden formarse a partir de un tipo celular, o pueden usarse diversas combinaciones de tipos celulares para formar los tejidos tridimensionales. Los ejemplos de tipos celulares adecuados incluyen, pero sin limitación, células estromales, fibroblastos, células musculares cardiacas, células madre y/o otras células de origen tisular específico. También pueden usarse células obtenidas por ingeniería genética para formar los tejidos tridimensionales descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los tejidos tridimensionales se usan como fuente de, o para administrar, diversos factores de crecimiento producidos por los tejidos tridimensionales, incluyendo VEGF y proteínas Wnt.

La cantidad de tejido o tejidos tridimensionales cultivados administrados puede variar dependiendo en parte de la gravedad de los síntomas clínicos que se estén manifestando en un individuo que se esté tratando para insuficiencia cardiaca congestiva. Por ejemplo, pueden usarse una, dos, tres o más trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado para aumentar el área de tejido cardiaco tratable, aumentar la concentración de los diversos factores de crecimiento y/o proteínas Wnt presentes y/o aumentar el número de células viables que se están administrando por las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, las composiciones y usos descritos en el presente documento se combinan con tratamientos convencionales, tales como la administración de diversos agentes farmacéuticos y procedimientos quirúrgicos para tratar a individuos diagnosticados con insuficiencia cardíaca congestiva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la aplicación del tejido tridimensional se usa con otras opciones para tratar la insuficiencia cardíaca grave, incluyendo bombas cardíacas, marcapasos cardíacos biventriculares y cirugía de envolvimiento cardíaco.

4. Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 representa pruebas histológicas de formación de nuevos microvasos en corazones caninos de perro puestos en contacto con Anginera™ de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

las FIGURAS 2A y 2B representan los parámetros de índice de volumen diastólico final (IVDF) durante el periodo con aneroide de 30 días de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la FIGURA 3 representa el gasto cardíaco en los cuatro grupos de tratamiento 30 días después de la colocación de Anginera™ de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la FIGURA 4 representa el gasto cardíaco en los cuatro grupos de tratamiento 90 días después de la colocación de Anginera™ de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la FIGURA 5 representa la fracción de eyección ventricular izquierda (VI) en los cuatro grupos de tratamiento 30 días después de la colocación de Anginera™;

la FIGURA 6 representa la fracción de eyección VI en los cuatro grupos de tratamiento 90 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la FIGURA 7 representa el volumen diastólico final VI en los cuatro grupos de tratamiento en tensión 30 y 90 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la FIGURA 8 representa el volumen diastólico final VI en los cuatro grupos de tratamiento en reposo 30 y 90 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la Figura 9 representa el volumen sistólico VI en los cuatro grupos de tratamiento en reposo/tensión 30 días después de la colocación de Anginera™;

la Figura 10 representa el volumen sistólico VI en los cuatro grupos de tratamiento en reposo/tensión 90 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la Figura 11 representa el engrosamiento sistólico de la pared en la isquemia temprana en los cuatro grupos de tratamiento 30 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

la Figura 12 representa el engrosamiento sistólico de la pared en la isquemia crónica en los cuatro grupos de tratamiento 30 días después de la colocación de Anginera™, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

las FIGURAS 13A y 13B representan la inyección de perlas cultivadas a partir de una jeringa Hamilton equipada con aguja de calibre 24 G en tejido de miembro posterior isquémico, de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

las FIGURAS 13A y 13B son fotografías de animales tratados solamente con isquemia dos semanas después de inducirse isquemia de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

las FIGURAS 14A y 14B son fotografías de explantes de dos semanas de tejidos tridimensionales formados sobre micropartículas que muestran pruebas de una formación de nuevos microvasos limitada (flechas negras) en los miembros isquémicos tratados con SMC cultivadas en perlas Alkermes® de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento;

las FIGURAS 15A y 15B muestran la formación de nuevos microvasos (flechas negras) rodeando hilos trenzados después de 14 días de implantación de acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento.

5. Descripción detallada

En el presente documento se desvelan composiciones para tratar a un paciente que padece insuficiencia cardíaca

congestiva, que comprende poner en contacto una región del corazón del paciente con una cantidad de un tejido tridimensional cultivado que comprende células vivas eficaces para tratar al menos un síntoma clínico asociado con insuficiencia cardíaca congestiva.

- Clínicamente, la insuficiencia cardíaca congestiva implica una congestión circulatoria causada por trastornos cardíacos que se caracterizan principalmente por anomalías de la función ventricular izquierda y/o derecha y de la regulación neurohormonal. La insuficiencia cardíaca congestiva se produce cuando estas anomalías provocan que el corazón deje de bombear sangre a la velocidad requerida por los tejidos metabolizantes. La insuficiencia cardíaca congestiva puede implicar el lado izquierdo, el lado derecho o ambos lados del corazón. Típicamente, la insuficiencia cardíaca comienza con el lado izquierdo, en concreto el ventrículo izquierdo. En la insuficiencia ventricular izquierda, se produce acumulación de líquido en los pulmones y se manifiesta mediante edema pulmonar. La insuficiencia cardíaca izquierda es más común e importante debido a su tamaño relativo y a la función fisiológica de proporcionar circulación sistémica a órganos críticos. Tres afecciones médicas pueden estar asociadas con la insuficiencia cardíaca que comienza en el ventrículo izquierdo: insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica o una combinación de ambas.
- La insuficiencia cardíaca del lado derecho puede producirse independientemente o ser una consecuencia de la insuficiencia cardíaca ventricular izquierda. En el caso de la insuficiencia ventricular derecha, la consecuencia es un edema sistémico que con frecuencia se manifiesta inicialmente por un edema sintomático dependiente en sitios periféricos (por ejemplo, los tobillos).

5.2 Tejido y armazones tridimensionales

- En diversas realizaciones, el tejido tridimensional capaz de promover la cicatrización del tejido cardíaco en individuos diagnosticados con insuficiencia cardíaca congestiva puede obtenerse a partir de diversos tipos de células, como se analiza en más detalle a continuación. El tejido tridimensional puede obtenerse en el mercado o generarse *de novo* usando los procedimientos descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.372.494; 6.291.240; 6.121.042; 6.022.743; 5.962.325; 5.858.721; 5.830.708; 5.785.964; 5.624.840; 5.512.475; 5.510.254; 5.478.739; 5.443.950; y 5.266.480.

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se obtiene en el mercado en Smith & Nephew Londres, Reino Unido. En particular, el producto denominado Dermagraft™, también denominado en el presente documento Anginera™, puede obtenerse en Smith & Nephew.

- En general, las células cultivadas tienen un armazón de soporte, también denominado en el presente documento estructura tridimensional, compuesto por un material no vivo biocompatible. El armazón puede ser de cualquier material y/o forma que: (a) permita que las células se unan al mismo (o puede modificarse para permitir que las células se unan al mismo); y (b) permita que las células crezcan en más de una capa (es decir, formen un tejido tridimensional).

- En algunas realizaciones, el material biocompatible se forma en un armazón tridimensional que comprende espacios intersticiales para la unión y crecimiento de células en un tejido tridimensional. Las aberturas y/o espacios intersticiales del armazón son de un tamaño apropiado para permitir que las células se extiendan a través de las aberturas o espacios. El mantenimiento de células en crecimiento activo que se extienden a través del armazón parece aumentar la producción del repertorio de factores de crecimiento responsables para las actividades descritas en el presente documento. Si las aberturas son demasiado pequeñas, las células pueden alcanzar rápidamente la confluencia pero ser incapaces de salir fácilmente de la maya. Estas células atrapadas pueden presentar inhibición por contacto y cesar su producción de los factores de crecimiento descritos en el presente documento. Si las aberturas son demasiado grandes, las células pueden ser incapaces de extenderse a través de la abertura; lo que puede disminuir la producción de los factores de crecimiento descritos en el presente documento. Cuando se usa un armazón de tipo maya, como se ejemplifica en el presente documento, se ha descubierto que las aberturas de al menos aproximadamente 140 µm, de al menos aproximadamente 150 µm, de al menos aproximadamente 160 µm, de al menos aproximadamente 175 µm, de al menos aproximadamente 185 µm, de al menos aproximadamente 200 µm, de al menos aproximadamente 210 µm y de al menos aproximadamente 220 µm funcionan satisfactoriamente. Sin embargo, dependiendo de la estructura tridimensional y de la complejidad del armazón, otros tamaños pueden funcionar igual de bien. De hecho, puede usarse cualquier forma o estructura que permita que las células se extiendan, se repliquen y crezcan durante una longitud de tiempo adecuada para elaborar los factores de crecimiento descritos en el presente documento.

- En algunas realizaciones, el armazón tridimensional se forma a partir de polímeros o hilos trenzados, tejidos, tricotados u organizados de otro modo para formar un armazón, tal como un maya o tela. Los materiales pueden formarse por moldeo del material o fabricación en una espuma, matriz o armazón de tipo esponja. En otras realizaciones, el armazón tridimensional está formado de fibras enmarañadas generadas presionando polímeros u otras fibras entre sí para generar un material con espacios intersticiales. El armazón tridimensional puede adoptar cualquier forma o geometría para el crecimiento de células en cultivo siempre que el tejido resultante exprese una o más de las actividades de cicatrización tisular descritas en el presente documento. Las descripciones de cultivos celulares usando un armazón tridimensional se describen en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.372.494;

6.291.240; 6.121.042; 6.022.743; 5.962.325; 5.858.721; 5.830.708; 5.785.964; 5.624.840; 5.512.475; 5.510.254; 5.478.739; 5.443.950; y 5.266.480.

Pueden usarse varios materiales diferentes para formar el armazón. Estos materiales pueden ser materiales poliméricos y/o no poliméricos. Cuando se usan polímeros, pueden ser cualquier tipo de polímeros de bloque, copolímeros de bloque (por ejemplo, di, tri, etc.), polímeros lineales o ramificados, reticulados o no reticulados. Los ejemplos no limitantes de materiales para usar como armazones o estructuras incluyen, entre otros, fibra de vidrio, polietileno, polipropileno, poliamidas (por ejemplo, nylon), poliésteres (por ejemplo, Dacron), poliestirenos, poliacrilatos, compuestos de polivinilo (por ejemplo, cloruro de polivinilo; PVC), policarbonatos, politetrafluoroetilenos (PTFE; TEFLON), PTFE expandido (ePTFE), thermanox (TPX), nitrocelulosa, polisacáridos (por ejemplo, celulosas, quitosano, agarosa), polipéptidos (por ejemplo, seda, gelatina, colágeno), ácido poliglicólico (PGA) y dextrano.

En algunas realizaciones, el armazón está compuesto por materiales que se degradan con el tiempo en las condiciones de uso. Como se usa en el presente documento, un "material degradable" se refiere a un material que se degrada o descompone. En algunas realizaciones, el material degradable es biodegradable, es decir, se degrada por acción de agentes biológicos, directa o indirectamente. Los ejemplos no limitantes de materiales degradables incluyen, entre otros, ácido poli(láctico-co-glicólico) (es decir, PLGA), carbonato de trimetileno (TMC), copolímeros de TMC, PGA y/o PLA, tereftalato de polietileno (PET), policaprolactona, material de sutura *catgut*, colágeno (por ejemplo, espuma de colágeno equino), ácido poliláctico (PLA), matriz de fibronectina o ácido hialurónico.

En otras realizaciones, el armazón tridimensional es una combinación de materiales degradables y no degradables. El material no degradable proporciona estabilidad al armazón durante el cultivo, mientras que el material degradable permite que se formen espacios intersticiales suficientes para la formación de tejidos tridimensionales que producen factores útiles para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva. El material degradable puede revestirse sobre el material no degradable o tejerse, trenzarse o formarse en una maya. Pueden usarse diversas combinaciones de materiales degradables y no degradables. Una combinación ejemplar son telas de poli(tereftalato de etileno) (PET) revestidas con una película polimérica degradable fina (poli[ácido D-L-láctico-co-glicólico] PLGA).

En diversas realizaciones, el material de armazón se trata previamente antes de la inoculación con células para aumentar la unión de células al armazón. Por ejemplo, antes de la inoculación con células, se tratan tamices de nylon con ácido acético 0,1 M y se incuban en polilisina, suero bovino fetal y/o colágeno para revestir el nylon. En algunas realizaciones, el poliestireno puede tratarse de forma análoga usando ácido sulfúrico. En otras realizaciones, el crecimiento de las células en presencia del armazón tridimensional se potencia adicionalmente añadiendo al armazón, o revistiéndolo con proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras de elastina, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparán, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, etc.), fibronectinas, una matriz celular, glicopolímero (poli[N-p-vinilbencil-D-lactoamida], PLVA) y/u otros materiales para mejorar la unión celular.

En otras realizaciones, el armazón comprende partículas dimensionadas de modo que las células cultivadas en presencia de las partículas elaboren factores que promuevan la cicatrización de tejido cardíaco debilitado en individuos diagnosticados con insuficiencia cardíaca congestiva. En algunas realizaciones, las partículas comprenden micropartículas, u otras partículas adecuadas, tales como microcápsulas y nanopartículas, que pueden ser degradables o no degradables (véase, por ejemplo, "Microencapsulates: Methods and Industrial Applications," en *Drugs and Pharmaceutical Sciences*, 1996, vol. 73, Benita, S. ed, Marcel Dekker Inc., Nueva York). En general, las micropartículas tienen un intervalo de tamaño de partícula de al menos aproximadamente 1 µm, al menos aproximadamente 10 µm, al menos aproximadamente 25 µm, al menos aproximadamente 50 µm, al menos aproximadamente 100 µm, al menos aproximadamente 200 µm, al menos aproximadamente 300 µm, al menos aproximadamente 400 µm, al menos aproximadamente 500 µm, al menos aproximadamente 600 µm, al menos aproximadamente 700 µm, al menos aproximadamente 800 µm, al menos aproximadamente 900 µm, al menos aproximadamente 1000 µm. Las nanopartículas tienen un intervalo de tamaño de partícula de al menos aproximadamente 10 nm, al menos aproximadamente 25 nm, al menos aproximadamente 50 nm, al menos aproximadamente 100 nm, al menos aproximadamente 200 nm, al menos aproximadamente 300 nm, al menos aproximadamente 400 nm, al menos aproximadamente 500 nm, al menos aproximadamente 600 nm, al menos aproximadamente 700 nm, al menos aproximadamente 800 nm, al menos aproximadamente 900 nm, al menos aproximadamente 1000 nm. Las micropartículas pueden ser porosas o no porosas. Pueden usarse diversas formulaciones de micropartículas para preparar el armazón tridimensional, incluyendo micropartículas fabricadas de materiales degradables o no degradables usadas para formar la malla o los polímeros tejidos descritos anteriormente.

Las micropartículas no degradables ejemplares incluyen, pero sin limitación, polisulfonas, poli(acrilonitrilo-co-cloruro de vinilo), etileno-acetato de vinilo, copolímeros de hidroxietilmetacrilato-metil-metacrilato. Las micropartículas degradables incluyen las fabricadas de fibrina, caseína, albúmina sérica, colágeno, gelatina, lecitina, quitosano, alginato o poli-aminoácidos tales como poli-lisina. Polímeros sintéticos degradables tales como polilactida (PLA), poliglicolida (PGA), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(caprolactona), carbonato de polidioxano trimetileno, polihidroxialconatos (por ejemplo, poli(y-hidroxibutirato)), poli(Y-etil-glutamato), poli(DTH iminocarboni(bisfenol A iminocarbonato), poli(orto-éster) y policianoacrilato.

También pueden usarse hidrogeles para proporcionar armazones tridimensionales. En general, los hidrogeles son redes poliméricas hidrófilas reticuladas. Los ejemplos no limitantes de polímeros útiles en composiciones de hidrogel incluyen, entre otros, los formados a partir de polímeros de poli(lactida-co-glicolida), poli(*N*-isopropilacrilamida), poli(ácido metacrílico-y-poli(etilenglicol)), ácido poliacrílico y poli(oxipropileno-co-oxietileno)glicol y compuestos naturales tales como sulfato de condroitán, quitosano, gelatina, fibrinógeno o mezclas de polímeros naturales y sintéticos, por ejemplo quitosano-poli(óxido de etileno). Los polímeros pueden reticularse de forma reversible o irreversible para formar geles suficientes para que las células se unan y formen un tejido tridimensional.

Son bien conocidos en la técnica diversos procedimientos para generar micropartículas, incluyendo procedimientos de eliminación de disolvente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.389.330); procedimientos de emulsión y evaporación (Maysinger y col., 1996, Exp. Neuro. 141: 47-56; Jeffrey y col., 1993, Pharm. Res. 10: 362-68), secado por pulverización y extrusión. Se describen micropartículas ejemplares para preparar armazones tridimensionales en la publicación de Estados Unidos Nº 2003/0211083 y en las patentes de Estados Unidos Nº 5.271.961; 5.413.797; 5.650.173; 5.654.008; 5.656.297; 5.114.855; 6.425.918; y 6.482.231 y la solicitud de Estados Unidos Nº 11/216.574, titulada "Cultured Three Dimensional Tissues and Uses Thereof", presentada el 30 de agosto de 2005.

Debe entenderse que otros materiales en diversas formas geométricas distintos de los descritos anteriormente pueden usarse para generar un tejido tridimensional con las características de cicatrización tisular descritas en el presente documento y, por lo tanto, los materiales no se limitan a las realizaciones específicas desveladas en el presente documento.

5.3 Células y condiciones de cultivo

En algunas realizaciones, los tejidos tridimensionales cultivados se generan por inoculación de los materiales biocompatibles que comprenden el armazón tridimensional con las células apropiadas y cultivo de las células en condiciones adecuadas para promover la producción de un tejido tridimensional cultivado con una o más propiedades de cicatrización tisular. Las células pueden obtenerse directamente de un donante, de cultivos celulares generados a partir de un donante, o de líneas de cultivos celulares establecidos. En algunos casos, las células pueden obtenerse en cantidad de cualquier órgano de cadáver o fuente fetal apropiada. En algunas realizaciones, las células de la misma especie preferentemente coincidentes en uno o más loci del MHC, se obtienen por biopsia del sujeto o de un pariente cercano, que después se cultivan hasta la confluencia en cultivo usando condiciones convencionales y se usan según sea necesario. La caracterización de las células de donante se realiza en relación con el sujeto a tratar con el tejido tridimensional.

En algunas realizaciones, las células son autólogas, es decir, las células proceden del destinatario. Debido a que el tejido tridimensional procede de las propias células del destinatario, se reducen las posibilidades de una reacción inmunológica que neutralice la actividad del tejido tridimensional. En estas realizaciones, se cultivan típicamente las células para obtener un número suficiente para producir el tejido tridimensional.

En otras realizaciones, las células se obtienen a partir de un donante que no es el destinatario deseado del tejido tridimensional. En algunas de estas realizaciones, las células son singénicas, derivadas de un donante que es genéticamente idéntico en todos los loci del MHC. En otras realizaciones, las células son alogénicas, derivadas de un donante que difiere en al menos un locus del MHC del destinatario deseado. Cuando las células son alogénicas, las células pueden ser de un solo donante o comprender una mezcla de células de diferentes donantes que sean alogénicos entre sí. En realizaciones adicionales, las células comprenden células xenogénicas, es decir, que proceden de una especie que es diferente del destinatario deseado.

En diversas realizaciones en el presente documento, las células inoculadas sobre el armazón pueden ser células estromales que comprenden fibroblastos, con o sin otras células, como se describe adicionalmente a continuación. En algunas realizaciones, las células son células estromales, que proceden típicamente de tejido conectivo, incluyendo, pero sin limitación: (1) hueso; (2) tejido conectivo laxo, incluyendo colágeno y elastina; (3) el tejido conectivo fibroso que forma ligamentos y tendones, (4) cartílago; (5) la matriz extracelular de la sangre; (6) tejido adiposo, que comprende adipocitos; y (7) fibroblastos.

Las células estromales pueden proceder de diversos tejidos u órganos, tales como piel, corazón, vasos sanguíneos, músculo esquelético, hígado, páncreas, cerebro, prepucio, que pueden obtenerse por biopsia (cuando sea apropiado) o autopsia.

Los fibroblastos pueden ser de origen fetal, neonatal, adulto o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células estromales comprenden fibroblastos fetales. Como se usa en el presente documento, un "fibroblasto fetal" se refiere a fibroblastos obtenidos de fuentes fetales. Como se usa en el presente documento, un "fibroblasto neonatal" se refiere a fibroblastos obtenidos de fuentes de recién nacidos. En condiciones apropiadas, los fibroblastos pueden dar origen a otras células, tales como osteocitos, adipocitos y células musculares lisas y otras células de origen mesodérmico. En algunas realizaciones, los fibroblastos comprenden fibroblastos dérmicos. Como se usa en la presente memoria, los fibroblastos dérmicos se refieren a fibroblastos derivados de la piel. Pueden aislarse fibroblastos dérmicos humanos normales de prepucio neonatal. Estas células típicamente se

crioconservan al final del cultivo primario.

En otras realizaciones, el tejido tridimensional se genera usando células madre y/o progenitoras, en solitario o en combinación con cualquiera de los tipos celulares analizados en el presente documento. La expresión “célula madre” incluye, pero sin limitación, células madre embrionarias no humanas, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales y células madre mesenquimales.

En algunas realizaciones, un tejido tridimensional “específico” se prepara inoculando el armazón tridimensional con células obtenidas de un órgano particular, es decir, piel, corazón y/o de un individuo particular que posteriormente recibirá las células y/o tejidos cultivados de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

Como se ha analizado anteriormente, pueden estar presentes células adicionales en el cultivo con las células estromales. Los tipos celulares adicionales incluyen, pero sin limitación, células musculares lisas, células musculares cardíacas, células endoteliales y/o células musculares esqueléticas. En algunas realizaciones, fibroblastos, junto con uno o más tipos celulares distintos, se inoculan sobre el armazón tridimensional. Los ejemplos de otros tipos celulares incluyen, pero sin limitación, células que se encuentran en el tejido conectivo laxo, células endoteliales, pericitos, macrófagos, monocitos, adipocitos, células musculares esqueléticas, células musculares lisas y células musculares cardíacas. Estos otros tipos celulares pueden obtenerse fácilmente de tejidos u órganos apropiados tales como la piel, el corazón y los vasos sanguíneos, usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los analizados a continuación. En otras realizaciones, uno o más de otros tipos celulares, excluyendo fibroblastos, se inoculan sobre el armazón tridimensional. En otras realizaciones más, los armazones tridimensionales se inoculan solamente con células fibroblásticas.

Las células útiles en los usos y composiciones descritos en el presente documento pueden aislarse por disgregación de un órgano o tejido apropiado. Esto puede realizarse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el tejido u órgano puede disgregarse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivas y/o agentes quelantes que debiliten las conexiones entre células vecinas haciendo posible que se disperse el tejido en una suspensión de células individuales sin rotura celular apreciable. La disociación enzimática puede conseguirse picando el tejido y tratando el tejido picado con cualquiera de varias enzimas digestivas, en solitario o en combinación. Estas incluyen, pero sin limitación, tripsina, quimotripsina, collagenasa, elastasa y/o hialuronidasa, ADNasa, pronasa y dispasa. La ruptura mecánica puede conseguirse mediante varios procedimientos incluyendo, pero sin limitación, el uso de trituradores, mezcladoras, tamices, homogeneizadores, celdas de presión o sonicadores por nombrar algunos. Para una revisión de técnicas de disgregación de tejidos, véase Freshney, *Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique*, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Cap. 9, págs. 107-126.

Una vez que el tejido se ha reducido a una suspensión de células individuales, la suspensión puede fraccionarse en subpoblaciones a partir de las que pueden obtenerse los fibroblastos y/u otras células estromales y/u otros tipos celulares. Esto puede conseguirse usando técnicas convencionales para separación de células incluyendo, pero sin limitación, clonación y selección de tipos celulares específicos, destrucción selectiva de células no deseadas (selección negativa), separación basada en la capacidad de aglutinación celular diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución contracorriente, electroforesis y separación de células activadas por fluorescencia. Para una revisión de las técnicas de selección clonal y separación celular véase Freshney, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques*, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, Cap. 11 y 12, págs. 137-168.

Pueden aislarse células adecuadas para usar en los usos y composiciones descritos en el presente documento, por ejemplo, de la forma siguiente: se lavan minuciosamente muestras de tejido frescas y se pican en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) para eliminar el suero. El tejido picado se incuba de 1-12 horas en una solución recién preparada de una enzima de disociación tal como tripsina. Después de dicha incubación, las células disociadas se suspenden, se sedimentan por centrifugación y se siembran en placas de cultivo. Como las células estromales se unen antes que otras células, pueden aislarse y cultivarse selectivamente las células estromales apropiadas. Las células estromales aisladas pueden cultivarse hasta la confluencia, levantarse del cultivo confluyente e inocularse sobre el armazón tridimensional (patente de Estados Unidos Nº 4.963.489; Naughton y col., 1987, J. Med 18(3 y 4):219-250). La inoculación del armazón tridimensional con una alta concentración de células, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a 5×10^7 células estromales/ml, puede dar como resultado el establecimiento de un tejido tridimensional en periodos de tiempo más cortos.

En otras realizaciones, un tejido tridimensional obtenido por ingeniería genética preparado sobre un armazón tridimensional incluye células específicas de tejido y produce factores de crecimiento secretados de forma natural y proteínas Wnt que estimulan la proliferación o diferenciación de células madre o progenitoras en tipos celulares o tejidos específicos. Además, el tejido tridimensional obtenido por ingeniería genética puede modificarse por ingeniería genética para incluir células madre y/o progenitoras. Los ejemplos de células madre y/o progenitoras que pueden estimularse por y/o incluirse en el tejido tridimensional obtenido por ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, células estromales, células parenquimales, células madre mesenquimales, células de reserva hepáticas, células madre neurales, células madre pancreáticas y/o células madre embrionarias.

Después de la inoculación del armazón con el tipo o tipos celulares deseados, el armazón puede incubarse en un medio de nutrientes apropiado que sirva de soporte al crecimiento de las células en un tejido tridimensional. Son adecuados para su uso muchos medios disponibles en el mercado, tales como medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), RPMI 1640, Fisher e Iscove, McCoy. El medio puede complementarse con sales adicionales, fuentes de carbono, aminoácidos, suero y componentes del suero, vitaminas, minerales, agentes reductores, agentes tamponantes, lípidos, nucleósidos, antibióticos, factores de unión y factores de crecimiento. Se describen formulaciones para diferentes tipos de medios de cultivo en trabajos de referencia disponibles para el experto en la materia (por ejemplo, *Methods for Preparation of Media, Supplements and Substrates for Serum Free Animal Cell Cultures*, Alan R. Liss, Nueva York (1984); *Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra (1996); *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques*, 4ª Ed., Wiley-Liss (2000)). Típicamente, el tejido tridimensional se suspende en el medio durante el periodo de incubación para potenciar la actividad o actividades de cicatrización tisular, la secreción de factores de crecimiento y/o proteínas Wnt. En algunas realizaciones, el cultivo puede “nutrirse” periódicamente para eliminar el medio gastado, despoblar las células libres y añadir medio fresco. Durante el periodo de incubación, las células cultivadas crecen linealmente y envuelven los filamentos del armazón tridimensional antes de comenzar a crecer en las aberturas del armazón.

Diferentes proporciones de diversos tipos de colágeno depositado en el armazón pueden afectar al crecimiento de las células que entran en contacto con el tejido tridimensional. Las proporciones de proteínas de la matriz extracelular (MEC) depositadas pueden manipularse o aumentarse seleccionando fibroblastos que elaboren el tipo de colágeno apropiado. Esto puede lograrse usando anticuerpos monoclonales de un isotipo o subclase apropiado que sea capaz de activar el complemento, y que defina tipos de colágeno particulares. Estos anticuerpos y el complemento pueden usarse para seleccionar negativamente los fibroblastos que expresan el tipo de colágeno deseado. Como alternativa, las células usadas para inocular la estructura pueden ser una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno deseados. La distribución y el origen de diferentes tipos de colágeno se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1		
Tipo de Colágeno	Distribución Tisular Principal	Células de Origen
I	Tejido conectivo normal denso y laxo; fibras de colágeno	Fibroblastos y células reticulares; células musculares lisas
	Fibrocartílago	
	Hueso	Osteoblastos
	Dentina	Odontoblastos
II	Cartílago hialino y elástico	Condrocitos
	Cuerpo vítreo del ojo	Células retinianas
III	Tejido conectivo laxo; fibras reticulares	Fibroblastos y células reticulares
	Capa papilar de la dermis	
	Vasos sanguíneos	Células musculares lisas; células endoteliales
IV	Membranas basales	Células epiteliales y endoteliales
	Cápsula del cristalino del ojo	Fibras del cristalino
V	Membranas fetales; placenta	Fibroblastos
	Membranas basales	
	Hueso	
	Músculo liso	Células musculares lisas
VI	Tejido conectivo	Fibroblastos
VII	Membranas basales epiteliales; fibrillas de anclaje	Fibroblastos; queratinocitos
VIII	Córnea	Fibroblastos corneales
IX	Cartílago	

(continuación)

Tipo de Colágeno	Distribución Tisular Principal	Células de Origen
X	Cartílago hipertrófico	
XI	Cartílago	
XII	Dermis papilar	Fibroblastos
XIV (undulina)	Dermis reticular	Fibroblastos
XVII	Antígeno del penfigoide ampolloso P170	Queratinocitos

En diversas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado tiene un repertorio característico de productos celulares producidos por las células, tales como factores de crecimiento. En algunas realizaciones, los tejidos tridimensionales cultivados se caracterizan por la expresión y/o secreción de los factores de crecimiento mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2		
Factor de crecimiento	Expresado por Q-RT-PCR	Cantidad secretada determinada por ELISA
VEGF	8×10^6 copias/ μ g ARN	700 pg/ 10^6 células/día
Cadena A de PDGF	6×10^5 copias/ μ g ARN	
Cadena B de PDGF	0	0
IGF-1	5×10^5 copias/ μ g ARN	
EGF	3×10^3 copias/ μ g ARN	
HBEGF	2×10^4 copias/ μ g ARN	
KGF	7×10^4 copias/ μ g ARN	
TGF- β 1	6×10^5 copias/ μ g ARN	300 pg/ 10^6 células/día
TGF- β 3	1×10^4 copias/ μ g ARN	
HGF	2×10^4 copias/ μ g ARN	1 ng/ 10^6 células/día
IL-1a	1×10^4 copias/ μ g ARN	Por debajo del nivel de detección
IL-1b	0	
TNF-a	1×10^7 copias/ μ g ARN	
TNF-b	0	
IL-6	7×10^6 copias/ μ g ARN	500 pg/ 10^6 células/día
IL-8	1×10^7 copias/ μ g ARN	25 ng/ 10^6 células/día
IL-12	0	
IL-15	0	
NGF	0	
G-CSF	1×10^4 copias/ μ g ARN	300 pg/ 10^6 células/día
Angiopoyetina	1×10^4 copias/ μ g ARN	

- 5 En algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se caracteriza por la expresión y/o secreción de factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). El CTGF es un mitógeno de fibroblastos y factor angiogénico bien conocido que desempeña un papel importante en la formación de hueso, cicatrización de heridas y angiogénesis. Véase, por ejemplo, Luo, Q., y col., 2004, J. Biol. Chem., 279:55958-68; Leask y Abraham, 2003, Biochem Cell Biol, 81:355-63; Mercurio, S.B., y col., 2004, Development, 131:2137-47; y Takigawa, M., 2003, Drug News Perspect, 16: 11-21.
- 10 Además de la lista anterior de factores de crecimiento, el tejido tridimensional también se caracteriza por la expresión de proteínas Wnt. Las expresiones "Wnt" o "proteína Wnt", como se usan en el presente documento se refieren a una proteína con una o más de las actividades funcionales siguientes: (1) unión a receptores de Wnt, también denominados proteínas Frizzled; (2) modulación de la fosforilación de proteína Dishevelled y localización celular de Axina; (3) modulación de los niveles de β -catenina celular y de la ruta de señalización correspondiente; (4)
- 15 modulación de los factores de transcripción TCF/LEF; y (5) aumento del calcio intracelular y activación de proteínas sensibles a Ca^{+2} (por ejemplo, quinasa dependiente de calmodulina). La "modulación", como se usa en el contexto de proteínas Wnt, se refiere a un aumento o disminución en los niveles celulares, cambios en la distribución intracelular y/o cambios en la actividad funcional (por ejemplo, enzimática) de la molécula modulada por Wnt.
- 20 Son de importancia para la presente divulgación proteínas Wnt expresadas en mamíferos, tales como roedores, felinos, caninos, ungulados y primates. Por ejemplo, las proteínas Wnt humanas que se han identificado comparten una identidad de secuencia de aminoácidos del 27 al 83%. Las características estructurales adicionales de proteínas Wnt son un patrón conservado de aproximadamente 23 ó 24 restos de cisteína, una secuencia señal hidrófoba y una secuencia de modificación de oligosacárido unido a asparagina conservada. Algunas proteínas Wnt también están modificadas con lípidos, tales como con un grupo palmitoilo (Wilkert y col., 2003, Nature 423(6938):448-52). Las

proteínas Wnt ejemplares y los genes correspondientes expresados en mamíferos incluyen, entre otras, Wnt1, Wnt2, Wnt2B, Wnt3, Wnt3A, Wnt4, Wnt4B, Wnt5A, Wnt5B, Wnt6, Wnt7A, Wnt7B, Wnt8A, Wnt8B, Wnt9A, Wnt9B, Wnt10A, Wnt11 y Wnt16. Otras formas identificadas de Wnt, tales como Wnt12, Wnt13, Wnt14 y Wnt 15, parecen incluirse en las proteínas descritas para Wnt 1-11 y 16. Las secuencias de aminoácidos y proteínas de cada una de las proteínas Wnt de mamífero están disponibles en bases de datos tales como SwissPro y Genbank (NCBI). Véase también la publicación de Estados Unidos N° 2004/0248803 y la solicitud de Estados Unidos n° 11/216.580, titulada "Compositions and Methods Comprising Wnt Proteins to Promote Repair of Damaged Tissue," presentada el 30 de agosto de 2005, y la solicitud de Estados Unidos n° 11/217.121, titulada "Compositions and Methods for Promoting Hair Growth," presentada el 30 agosto 2005.

Se conocen en la técnica diversos procedimientos para el aislamiento e identificación de proteínas Wnt. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos N° 2004/0248803.

En algunas realizaciones, las proteínas Wnt comprenden al menos Wnt5a, Wnt7a y Wnt11. Como se usa en la presente memoria, Wnt5a se refiere a una proteína Wnt con las actividades funcionales descritas anteriormente y una similitud de secuencia con la proteína Wnt humana con la secuencia de aminoácidos en los N° de acceso del NCBI AAH74783 (gi:50959709) o AAA16842 (gi:348918) (véase también, Danielson y col., 1995, J. Biol. Chem. 270(52):31225-34). Wnt7a se refiere a una proteína Wnt con las propiedades funcionales de las proteínas Wnt descritas anteriormente y una similitud de secuencia con la proteína Wnt humana con la secuencia de aminoácidos en los N° de acceso del NCBI BAA82509 (gi:5509901); AAC51319.1 (GI:2105100); y 000755 (gi:2501663) (véase también, Ikegawa y col., 1996, Cytogenet Cell Genet. 74(1-2):149-52; Bui y col., 1997, Gene 189(1):25-9). Wnt11 se refiere a una proteína Wnt con las actividades funcionales descritas anteriormente y una similitud de secuencia con la proteína Wnt humana con la secuencia de aminoácidos en los N° de acceso del NCBI BAB72099 (gi:17026012); CAA74159 (gi:3850708); y CAA73223.1 (gi:3850706) (véase también, Kirikoshi y col., 2001, Int. J. Mol. Med. 8(6):651-6); Lako y col., 1998, Gene 219(1-2):101-10). Como se usa en el presente documento, en el contexto de proteínas Wnt específicas, la expresión "similitud de secuencia" se refiere a una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80% o más, de al menos aproximadamente el 90% o más, de al menos aproximadamente el 95% o más, o de al menos aproximadamente el 97% o más, o de al menos aproximadamente el 98% o más en comparación con la secuencia de referencia. Por ejemplo, la Wnt7a humana presenta una identidad de secuencia de aminoácidos del 97% con la Wnt7a murina, mientras que la secuencia de aminoácidos de la Wnt7a humana presenta una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 64% con la Wnt5a humana (Bui y col., anteriormente).

La expresión y/o secreción de diversos factores de crecimiento y/o proteínas Wnt por el tejido tridimensional puede modularse incorporando células que liberan diferentes niveles de los factores de interés. Por ejemplo, se sabe que las células musculares lisas vasculares producen sustancialmente más VEGF que los fibroblastos dérmicos humanos. Utilizando las células musculares lisas vasculares en lugar de o además de fibroblastos, la expresión y/o secreción de VEGF por el tejido tridimensional puede modularse.

5.4 Células modificadas por ingeniería genética

Puede prepararse tejido tridimensional modificado por ingeniería genética como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.755.964, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Un tejido modificado por ingeniería genética puede servir como vehículo de suministro de genes para la liberación sostenida de factores de crecimiento y/o proteínas Wnt *in vivo*. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, células, tales como células estromales, pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un producto génico que sea exógeno o endógeno a la célula modificada por ingeniería genética. Las células estromales que pueden modificarse por ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, fibroblastos (de origen fetal, neonatal o adulto), células musculares lisas, células musculares cardíacas, células madres o progenitoras y otras células que se encuentran en el tejido conectivo laxo, tales como células endoteliales, macrófagos, monocitos, adipocitos, pericitos y células reticulares que se encuentran en la médula ósea. En diversas realizaciones, las células madre o progenitoras pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un producto génico exógeno o endógeno y cultivarse en un armazón tridimensional, en solitario o en combinación con células estromales.

Las células y tejidos pueden modificarse por ingeniería genética para expresar un producto génico deseado que pueda conferir una amplia diversidad de funciones incluyendo, pero sin limitación, una función aumentada de las células y tejidos modificados por ingeniería genética para promover la cicatrización tisular cuando se implantan *in vivo*. El producto génico deseado puede ser un péptido o proteína, tal como una enzima, hormona, citocina, una proteína reguladora, tal como un factor de transcripción o proteína de unión a ADN, una proteína estructural, tal como una proteína de superficie celular, o el producto génico deseado puede ser un ácido nucleico tal como un ribosoma o una molécula antisentido. En algunas realizaciones, el producto génico deseado es una o más proteínas Wnt, que pueden desempeñar un papel en la diferenciación y proliferación de una diversidad de células como se han descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Miller, J.R., 2001, Genome Biology 3:3001.1-3001.15). Por ejemplo, pueden generarse células modificadas por ingeniería genética de forma recombinante que expresen factores Wnt específicos, incluyendo, pero sin limitación, Wnt5a, Wnt7a y Wnt11.

En algunas realizaciones, los productos génicos deseados proporcionan propiedades mejoradas a las células

modificadas por ingeniería genética incluyendo, pero sin limitación, productos génicos que potencian el crecimiento celular, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformado (TGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y factores Wnt. En otras realizaciones, las células y tejidos se modifican por ingeniería genética para expresar productos génicos deseados que dan como resultado la inmortalización celular, por ejemplo, oncogenes o telomerasa.

En otras realizaciones, las células y tejidos se modifican por ingeniería genética para expresar productos génicos que proporcionen funciones protectoras *in vitro*, tales como propiedades de criopreservación anti-deshidratación, por ejemplo, trehalosa (Patentes de Estados Unidos N° 4.891.319, 5.290.765, y 5.693.788). Las células y tejidos también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar productos génicos que proporcionan una función protectora *in vivo*, tales como las que protegerían a las células de una respuesta inflamatoria y protegerían frente al rechazo por el sistema inmune del huésped, tales como epítomos de HLA, alelos de MHC, epítomos de inmunoglobulina y receptores, epítomos de moléculas de adhesión celular, citocinas y quimiocinas.

Hay varias formas en las que los productos génicos deseados pueden modificarse por ingeniería genética para expresarse por las células y tejidos de la presente invención. Los productos génicos deseados pueden modificarse por ingeniería genética para expresarse de forma constitutiva o de una forma específica de tejido o específica de estímulo. Las secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos deseados pueden unirse operativamente, por ejemplo, a elementos promotores que sean constitutivamente activos, específicos de tejido o inducidos por la presencia de uno o más estímulos específicos.

En algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos modificados por ingeniería genética se unen operativamente a elementos promotores reguladores que son sensibles a tensión radial o de cizalla. En estas realizaciones, el elemento promotor se activa por el paso del flujo sanguíneo (cizalla), así como por la tensión radial que se induce como resultado del flujo pulsátil de sangre a través del corazón o de los vasos.

Los ejemplos de elementos promotores reguladores adecuados incluyen, pero sin limitación, elementos de respuesta a tetraciclina, elementos de respuesta a nicotina, elementos de respuesta a insulina, elementos de respuesta a glucosa, elementos de respuesta a interferón, elementos de respuesta a glucocorticoides, elementos de respuesta a estrógenos/progesterona, elementos de respuesta a ácido retinoide, transactivadores virales, promotores tempranos o tardíos de adenovirus SV40, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC, el sistema TRC, el promotor para 3-fosfoglicerato y los promotores de fosfatasa ácida. Además, pueden construirse elementos de respuesta artificiales que comprenden múltiples de sitios de unión a factores de transcripción y elementos de respuesta a hormonas similares a la arquitectura molecular de promotores y potenciadores de origen natural (véase, por ejemplo, Herr y Clarke, 1986, J Cell 45(3): 461-70). Dichas regiones reguladoras compuestas artificiales pueden diseñarse para responder a cualquier señal deseable y expresarse en tipos celulares particulares dependiendo de los sitios de unión a promotor/potenciador seleccionados.

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional modificado por ingeniería genética incluye células modificadas por ingeniería genética y produce factores secretados de forma natural que estimulan la proliferación y diferenciación de células madre y/o células progenitoras implicadas en la revascularización y cicatrización de tejido cardíaco debilitado.

5.5 Uso de tejidos tridimensionales cultivados para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva

Los tejidos tridimensionales descritos en el presente documento encuentran utilidad en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Los efectos de la insuficiencia cardíaca congestiva varían desde alteración durante el ejercicio físico hasta una completa insuficiencia de la función de bombeo cardíaco a cualquier nivel de actividad. Las manifestaciones clínicas de la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen dificultad respiratoria, tal como disnea y fatiga, y capacidad de o tolerancia al ejercicio reducida. Clínicamente, los signos y síntomas manifestados por un individuo particular se clasifican típicamente en uno de cuatro grupos, Clase 1-Clase 4. La insuficiencia cardíaca de Clase 1 es la más leve, mientras que la insuficiencia cardíaca de Clase 4 es la más grave.

Por consiguiente, las composiciones y usos descritos en el presente documento pueden administrarse en solitario, o en combinación con regímenes de tratamiento convencionales para tratar a individuos clasificados en una de las cuatro clases de insuficiencia cardíaca. La capacidad del tejido tridimensional para promover la cicatrización de un corazón en un individuo que manifieste clínicamente al menos un síntoma asociado con insuficiencia cardíaca congestiva depende en parte de la gravedad de la insuficiencia cardíaca, por ejemplo, Clases I, II, III o IV.

Sin quedar ligado a teoría alguna, la aplicación del tejido tridimensional a un corazón dañado o enfermo promueve diversas actividades biológicas implicadas en la cicatrización del corazón. A modo de ejemplo, pero sin limitación, la unión de las composiciones descritas en el presente documento a un corazón dañado o enfermo puede usarse para mejorar la eficacia de bombeo del corazón.

El Ejemplo 1 muestra que el tejido tridimensional cultivado suturado sobre la superficie del miocardio en el área de

isquemia influye positivamente sobre los acontecimientos de cicatrización de heridas en corazones enfermos, dando como resultado una remodelación ventricular favorable, un rendimiento ventricular mejorado y un movimiento de la pared ventricular mejorado.

Los usos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con tratamientos convencionales, tales como la administración de diversos agentes farmacéuticos y procedimientos quirúrgicos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se administra con uno o más de las medicaciones usadas para tratar la insuficiencia cardíaca. Pueden usarse medicaciones adecuadas para usar en los procedimientos descritos en el presente documento, que incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, enalapril (Vasotec), lisinopril (Prinivil, Zestril) y captopril (Capoten)), bloqueantes del receptor de angiotensina II (A-II) (por ejemplo, losartán (Cozaar) y valsartán (Diovan)), diuréticos (por ejemplo, bumetanida (Bumex), furosemida (Lasix, Fumide) y espironolactona (Aldactone)), digoxina (Lanoxin), beta-bloqueantes y nesiritida (Natrekor).

Además, el tejido tridimensional cultivado puede usarse con otras opciones usadas para tratar la insuficiencia cardíaca grave, incluyendo bombas cardíacas, también denominadas dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI), marcapasos cardíacos biventriculares, cirugía de envolvimiento cardíaco, corazones artificiales y contrapulsación externa aumentada (CPEA) y cirugía de envolvimiento cardíaco (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.425.856, 6.085.754, 6.572.533 y 6.730.016).

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se usa junto con cirugía de envolvimiento cardíaco. En estas realizaciones, se usa un saco o camisa flexible para administrar y/o unir el armazón tridimensional que comprende el tejido tridimensional. El tejido tridimensional puede colocarse en el interior de o embeberse dentro del saco antes de su colocación sobre el tejido cardíaco dañado o debilitado. En otras realizaciones, el saco y la estructura tridimensional pueden unirse entre sí. Por ejemplo, el saco y la estructura tridimensional pueden unirse entre sí usando un ensamblaje de punto elástico. En otras realizaciones, la estructura tridimensional puede configurarse para comprender hilos útiles para unir la estructura al saco. Las patentes de Estados Unidos N° 6.416.459, 5.702.343, 6.077.218, 6.126.590, 6.155.972, 6.241.654, 6.425.856, 6.230.714, 6.241.654, 6.155.972, 6.293.906, 6.425.856, 6.085.754, 6.572.533 y 6.730.016 y las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 2003/0229265 y 2003/0229261, describen diversas realizaciones de sacos y camisas, por ejemplo, dispositivos cardíacos de restricción que pueden usarse para administrar y/o unir el tejido estromal tridimensional.

En algunas realizaciones, se unen al saco otros dispositivos además del tejido tridimensional, por ejemplo, electrodos para desfibrilación, un indicador de tensión para indicar cuándo la camisa está ajustada sobre el corazón a un grado de tensión deseado, y se usan en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.169.922 y 6.174.279.

Como se describe con más detalle a continuación, uno o más de los tejidos que comprenden la pared del corazón de un individuo diagnosticado con una de las patologías descritas anteriormente pueden ponerse en contacto con un tejido tridimensional cultivado, incluyendo el epicarpio, el miocardio y el endocardio.

5.6 Ensayos útiles para determinar la eficacia del tratamiento de la ICC con tejido tridimensional

Pueden usarse varios procedimientos para medir cambios en el funcionamiento del corazón en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardíaca congestiva antes y después de la unión del tejido tridimensional cultivado. Por ejemplo, puede usarse un ecocardiograma para determinar la capacidad a la que está bombeando el corazón. El porcentaje de sangre bombeada fuera del ventrículo izquierdo con cada latido cardíaco se denomina la fracción de eyección. En un corazón sano, la fracción de eyección es de aproximadamente el 60 por ciento. En un individuo con insuficiencia cardíaca congestiva causada por la incapacidad del ventrículo izquierdo para contraerse energicamente, es decir, insuficiencia cardíaca sistólica, la fracción de eyección es habitualmente inferior al 40 por ciento. Dependiendo de la gravedad y de la causa de la insuficiencia cardíaca, las fracciones de eyección típicamente varían de menos del 40 por ciento al 15 por ciento o menos. También puede usarse un ecocardiograma para distinguir entre insuficiencia cardíaca sistólica e insuficiencia cardíaca diastólica, en la que la función de bombeo es normal pero el corazón está rígido.

Pueden usarse ecocardiogramas para comparar las fracciones de eyección antes y después del tratamiento con el tejido tridimensional cultivado. En ciertas realizaciones, el tratamiento con el tejido tridimensional cultivado da como resultado mejoras en la fracción de eyección de entre el 3 y el 5 por ciento. En otras realizaciones, el tratamiento con el tejido tridimensional cultivado da como resultado mejoras en la fracción de eyección entre el 5 y el 10 por ciento. En otras realizaciones más, el tratamiento con el tejido tridimensional cultivado da como resultado mejoras en la fracción de eyección superiores al 10 por ciento.

Pueden usarse exploraciones nucleares, tales como ventriculografía con radionúclidos (RNV) o exploración con adquisición sincronizada múltiple (MUGA) para determinar cuánta sangre bombea el corazón con cada latido. Estos ensayos se realizan usando una pequeña cantidad de colorante inyectado en las venas de un individuo. Se usa una cámara especial para detectar el material radiactivo a medida que fluye a través del corazón. Otros ensayos incluyen rayos X y ensayos sanguíneos. Pueden usarse rayos X torácicos para determinar el tamaño del corazón y si se ha

acumulado fluido en los pulmones. Pueden usarse ensayos sanguíneos para comprobar un indicador específico de insuficiencia cardiaca congestiva, el péptido natriurético cerebral (BNP). El BNP se secreta por el corazón en altos niveles cuando está agotado. Por lo tanto, los cambios en el nivel de BNP en la sangre pueden usarse para controlar la eficacia del régimen del tratamiento.

5 **5.7 Administración y dosificación de tejido tridimensional cultivado**

Pueden usarse una diversidad de procedimientos para unir y/o poner en contacto el tejido tridimensional cultivado con el corazón de un individuo diagnosticado con insuficiencia cardiaca congestiva. Los medios adecuados para la unión incluyen, pero sin limitación, la adherencia directa entre el tejido tridimensional y el tejido cardiaco, pegamento biológico, pegamento sintético, láseres e hidrogel. Están disponibles en el mercado varios agentes hemostáticos y sellantes, incluyendo, pero sin limitación, "SURGICAL" (celulosa oxidada), "ACTIFOAM" (colágeno), "FIBRX" (sellante de fibrina activado por luz), "BOREAL" (sellante de fibrina), "FIBROCAPS" (sellante de fibrina en polvo seco), polímeros de polisacáridos p-G1 cNac (parche "SYVEC"; Marine Polymer Technologies), polímero 27CK (Protein Polymer Tech.). También se conocen dispositivos médicos y aparatos para preparar sellantes de fibrina autólogos a partir de 120 ml de la sangre de un paciente en el quirófano en una hora y media (por ejemplo, Sistema Vivostat).

En algunas realizaciones, al tejido tridimensional cultivado se une directamente al tejido cardiaco por unión celular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido tridimensional se une a uno o más de los tejidos del corazón, incluyendo el epicardio, miocardio y endocardio. Cuando se une un tejido tridimensional al epicarpio o miocardio cardiaco, típicamente el pericardio (es decir, el saco cardiaco) se abre o se perfora antes de la unión del tejido tridimensional. En otras realizaciones, por ejemplo, cuando se une un tejido tridimensional al endocardio, se inserta un catéter o dispositivo similar en un ventrículo del corazón y el tejido tridimensional se une a la pared del ventrículo.

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional se une al tejido cardiaco usando un pegamento quirúrgico. Los pegamentos quirúrgicos adecuados para usar en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento incluyen pegamentos biológicos, tales como pegamentos de fibrina. Para una discusión de aplicaciones usando composiciones de pegamento de fibrina véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Número de Serie 10/851.938 y las diversas referencias desveladas en la misma.

En algunas realizaciones, se usa un láser para unir el tejido tridimensional al tejido cardiaco. A modo de ejemplo, se aplica un colorante láser al corazón, al tejido tridimensional o a ambos y se activa usando un láser de la longitud de onda apropiada para adherir el tejido tridimensional cultivado al corazón. Para una discusión de diversas aplicaciones usando un láser véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 10/851.938.

En algunas realizaciones, se usa un hidrogel para unir el tejido tridimensional cultivado al tejido cardiaco. Pueden usarse varios materiales poliméricos naturales y sintéticos para formar composiciones de hidrogel. Por ejemplo, pueden reticularse polisacáridos, por ejemplo, alginato, con cationes divalentes, polifosfacenos y poliacrilatos, iónicamente o por polimerización ultravioleta (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.709.854). Como alternativa, puede usarse un pegamento quirúrgico sintético tal como 2-octil cianoacrilato ("DERMABOND", Ethicon, Inc., Somerville, NJ) para unir el tejido tridimensional al tejido cardiaco.

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se une al tejido cardiaco usando una o más suturas como se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos nº 10/851.938. En otras realizaciones, las suturas comprenden un tejido tridimensional cultivado como se describe en la solicitud de Estados Unidos nº 11/216.574, titulada "Three Dimensional Tissues and Uses Thereof," presentada el 30 de agosto de 2005.

El tejido tridimensional cultivado se usa en una cantidad eficaz para promover la cicatrización tisular y/o la revascularización del tejido cardiaco debilitado o dañado en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardiaca congestiva. La cantidad del tejido tridimensional cultivado administrado depende, en parte, de la gravedad de la insuficiencia cardiaca congestiva, de si el tejido tridimensional cultivado se usa como una composición inyectable (véase, por ejemplo, solicitud de Estados Unidos Nº 11/216.574, titulada "Cultured Three Dimensional Tissues and Uses Thereof," presentada el 30 de agosto de 2005), la concentración de los diversos factores de crecimiento y/o proteínas Wnt presentes, el número de células viables que comprenden el tejido tridimensional cultivado y/o la facilidad de acceso al tejido o tejidos cardiacos que se traten. La determinación de una dosificación eficaz está bien dentro de las capacidades de los expertos en la materia. Pueden usarse modelos animales adecuados, tales como el modelo canino descrito en el Ejemplo 1, para ensayar la eficacia de la dosificación en un tejido particular del corazón.

Como se usa en el presente documento, el término "dosis" se refiere al número de trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado aplicados al corazón de un individuo diagnosticado con insuficiencia cardiaca congestiva. Un trozo cohesivo típico de tejido tridimensional cultivado es de aproximadamente 35 cm². Como se apreciará por los expertos en la materia, las dimensiones absolutas del trozo cohesivo pueden variar, siempre que comprenda un número suficiente de células para estimular la angiogénesis y/o promover la cicatrización del tejido cardiaco debilitado o dañado en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardiaca congestiva. Por lo tanto, los trozos cohesivos adecuados para usar en los procedimientos descritos en el presente documento pueden variar en tamaño

de 15 cm² a 50 cm².

La aplicación de más de un trozo cohesivo de tejido tridimensional cultivado puede usarse para aumentar el área del corazón que puede tratarse por los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en realizaciones que usan dos trozos de tejido cohesivo, el área tratable aproximadamente se duplica en tamaño. En realizaciones que usan tres trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado, el área tratable aproximadamente se triplica en tamaño. En realizaciones que usan cuatro trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado, el área tratable aproximadamente se cuadruplica en tamaño. En realizaciones que usan cinco trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado, el área tratable es de aproximadamente cinco veces, es decir, de 35 cm² a 175 cm².

En algunas realizaciones, un trozo cohesivo de tejido tridimensional cultivado se une a una región del corazón en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardíaca congestiva.

En otras realizaciones, dos trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado se unen a una región del corazón en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardíaca congestiva.

En otras realizaciones, tres trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado se unen a una región del corazón en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardíaca congestiva.

En otras realizaciones, cuatro, cinco o más trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado se unen a una región del corazón en un individuo diagnosticado con insuficiencia cardíaca congestiva.

En realizaciones en las que se administran dos o más trozos cohesivos de tejido tridimensional cultivado, la proximidad de un trozo a otro puede ajustarse, dependiendo en parte de la gravedad de la insuficiencia cardíaca congestiva, del grado del área a tratar y/o de la facilidad de acceso del tejido o tejidos cardíacos a tratar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los trozos cultivados de tejido tridimensional pueden localizarse inmediatamente adyacentes entre sí, de un modo que uno o más bordes de un trozo contacten con uno o más bordes de un segundo trozo. En otras realizaciones, los trozos pueden unirse al tejido cardíaco de modo que los bordes de un trozo no toquen los bordes de otro trozo. En estas realizaciones, los trozos pueden estar separados entre sí por una distancia apropiada basada en las condiciones anatómicas y/o patológicas presentadas por el paciente. La determinación de la proximidad de un trozo a otro está bien dentro de las capacidades de los expertos en la materia y, si se desea, puede ensayarse usando modelos animales adecuados, tales como el modelo canino descrito en el Ejemplo 1.

En realizaciones que comprenden una pluralidad de trozos de tejido tridimensional cultivado, algunos o todos los trozos pueden unirse a la misma área o a áreas diferentes del corazón.

En realizaciones que comprenden una pluralidad de trozos de tejido tridimensional cultivado, los trozos se unen simultáneamente o se unen de forma concurrente al corazón.

En algunas realizaciones, los trozos se administran con el tiempo. La frecuencia e intervalo de administración depende, en parte, de la gravedad de la insuficiencia cardíaca congestiva, de si el tejido tridimensional cultivado se usa como una composición inyectable (véase, por ejemplo, la Solicitud de Estados Unidos Nº 11/216.574, titulada "Cultured Three Dimensional Tissues and Uses Thereof", presentada el 30 de agosto de 2005), la concentración de los diversos factores de crecimiento y/o proteínas Wnt presentes, el número de células viables que comprenden el tejido tridimensional cultivado y/o la facilidad de acceso al tejido o tejidos cardíacos a tratar. La determinación de la frecuencia de administración y la duración entre aplicaciones sucesivas está bien dentro de las capacidades de los expertos en la materia y, si se desea, puede ensayarse usando modelos animales adecuados, tales como el modelo canino descrito en el Ejemplo 1.

En algunas realizaciones, el tejido tridimensional cultivado se administra como una composición inyectable como se describe en la Solicitud de Estados Unidos Nº 11/216.574, titulada "Cultured Three Dimensional Tissues and Uses Thereof", presentada el 30 de agosto de 2005). Se proporcionan consejos para la administración y dosificación eficaz de composiciones inyectables para el tratamiento del tejido isquémico en la Solicitud de Estados Unidos Nº 11/216.574, titulada "Cultured Three Dimensional Tissues and Uses Thereof", 30 de agosto de 2005).

6. Ejemplos

Ejemplo 1: Tratamiento de tejido crónicamente isquémico en un estudio cardíaco en perro

El tejido tridimensional cultivado, es decir, AngineraTM (también denominado en el presente documento DermagraftTM) se fabricó por Smith & Nephew. AngineraTM es un tejido basado en fibroblastos humanos crioconservado estéril generado por cultivo de fibroblastos dérmicos neonatales humanos sobre un armazón de maya de poliglactina bioabsorbible (VicrylTM). El procedimiento se lleva a cabo dentro de un recipiente de cultivo o biorreactor especializado. El crecimiento del tejido se mantiene con medio celular que proporciona los nutrientes necesarios para la proliferación celular. El sistema de biorreactor cerrado usado para fabricar AngineraTM mantiene un entorno controlado para el crecimiento de un tejido humano viable estéril, uniforme y reproducible.

Los fibroblastos dérmicos usados en la fabricación de AngineraTM se obtuvieron de tejido de prepucio neonatal

humano obtenido de procedimientos de circuncisión rutinarios. Cada lote de Anginera™ pasa los ensayos de esterilidad USP antes de facilitarse su uso. Se crioconserva a -75°C después de la recogida para proporcionar una vida útil prolongada. Después de la descongelación, aproximadamente el 60% de las células conservan la viabilidad y son capaces de secretar factores de crecimiento, proteínas de la matriz y glicosaminoglicanos.

- 5 Se usó un estudio canino para evaluar la seguridad y eficacia de Anginera™ para tratar el tejido cardíaco crónicamente isquémico. La evaluación de los datos del estudio canino demostró que Anginera™ era segura a todos los niveles de dosificación. El estudio canino se realizó de conformidad con la Normativa relativa a las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la Food and Drug Administration, como se expone en el Título 21 del Código de Normativa Federal de los Estados Unidos, Parte 58.
- 10 Inicialmente, se indujo isquemia miocárdica crónica en cuarenta animales (cuatro grupos de cinco perros mestizos macho y cinco hembra) a través de la colocación quirúrgica de un constrictor ameroide en la rama interventricular ventral de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI). Aproximadamente 30 días ($\pm$ dos días) después de la colocación quirúrgica de un constrictor ameroide, los animales recibieron uno de cuatro tratamientos: Grupo 1, tratamiento quirúrgico simulado; Grupo 2, aplicación quirúrgica de una unidad de Anginera™ no viable; Grupo 3, aplicación quirúrgica de una unidad de Anginera™ viable; y Grupo 4, aplicación quirúrgica de tres unidades de Anginera™ viable. El Anginera™ usado en este estudio era Dermagraft™ comercializado por Smith & Nephew para uso clínico. Todos los investigadores que realizaron ensayos o analizaron datos lo hicieron a ciegas en la mayor medida posible en lo que se refiere a la identidad del tratamiento de un animal. Se realizó la necropsia de dos animales por sexo el Día 30 ($\pm$ un día) y se realizó la necropsia de tres animales por sexo de cada grupo de tratamiento el Día 90 ($\pm$ un día) (véase la Tabla III).

Los electrocardiogramas y la presión arterial directa se controlaron de forma continua durante el procedimiento quirúrgico. Se realizó una toracotomía lateral izquierda entre la cuarta y quinta costillas. Antes del aislamiento del corazón, se administró lidocaína por vía intravenosa (2 mg/kg) y tópicamente según fuera necesario para ayudar a controlar las arritmias. El corazón se aisló y se construyó una pared pericárdica. La rama interventricular ventral de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) se identificó y aisló para la colocación de un constrictor ameroide. El constrictor ameroide apropiadamente dimensionado (Cardovascular Equipment Corporation, Wakefield, Massachusetts, 2,0-3,0 mm) se colocó alrededor de la porción proximal de la DAI. Cualquier arritmia ventricular se trató usando agentes farmacológicos, es decir, lidocaína, dexametasona, bretilio, según fuera necesario y según se indica. El diseño de estudio se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3						
Número de Grupo	Número de Animales		Tratamiento		Régimen de Tratamiento	Día de Necropsia
	Machos	Hembras				
1	5	5	Isquemia solamente	ninguno	ninguno	Día 30: 2/sexo/grupo Día 90: 3/sexo/grupo
2	5	5	Un trozo de Anginera™ no viable	~35 cm ²	NA	Día 30: 2/sexo/grupo Día 90: 3/sexo/grupo
3	5	5	Un trozo de Anginera™	~35 cm ²	Día 1 solamente	Día 30: 2/sexo/grupo Día 90: 3/sexo/grupo
4	5	5	Tres trozos de Anginera™	~105 cm ²	Día 1 solamente	Día 30: 2/sexo/grupo Día 90: 3/sexo/grupo

- 30 Se evaluó la seguridad evaluando las observaciones clínicas, los exámenes físicos y oftálmicos, los pesos corporales, las temperaturas corporales, el control cardíaco (incluyendo electrocardiografía (ECG), presión sanguínea arterial, frecuencia cardíaca y determinación ecocardiográfica de la función ventricular izquierda), la patología clínica (incluyendo hematología, coagulación, química sérica, Troponina T y urianálisis), la anatomía patológica e histopatología de órganos y tejidos seleccionados. Se realizó una evaluación adicional de los datos de la ecocardiografía de todos los grupos de tratamiento a los puntos temporales de Día 30 y Día 90. Por último, se realizó un análisis separado de la histología del corazón.

Se recogieron ecocardiogramas en las cuatro semanas anteriores al Día -30 (es decir, 30 días antes de la cirugía, la cirugía se realizó el Día 0), aproximadamente ocho días antes del Día 1 y aproximadamente ocho días antes del sacrificio/necropsia (Día 30 o 90). Se realizó ecocardiografía en tensión y en reposo transtorácica usando procedimientos para normalizar las ventanas y las vistas ecocardiográficas. Los animales se sujetaron manualmente tanto como fue posible y se pusieron en decúbito lateral derecho (con el lado derecho hacia abajo). Se realizó la evaluación ecocardiográfica después de que los animales hubieran conseguido una frecuencia cardíaca estable, seguida de un segundo examen ecocardiográfico con frecuencia cardíaca aumentada inducida por dobutamina. Se administró dobutamina por vía intravenosa comenzando con 5 microgramos/kg/min y se ajustó la dosis a una

velocidad de infusión máxima de 50 microgramos/kg/min para conseguir un aumento del 50% en la frecuencia cardíaca ($\pm 10\%$). Los números de ID de los animales, los datos de estudio y las vistas se anotaron en la grabación de vídeo de cada estudio. Todos los estudios ecográficos se registraron en cinta de vídeo y las imágenes y bucles se capturaron digitalmente y se guardaron en un disco óptico. Se registraron imágenes del eje corto tanto en cinta de vídeo como digitalmente en disco óptico, y se incluyeron al menos dos ciclos cardíacos. Se cuantificó la contractilidad segmentaria, medida como engrosamiento de la pared (en centímetros), en la región isquémica y la región de control del ventrículo izquierdo. Estas mediciones se realizaron en tres planos transversales para incluir un plano basal, un plano papilar medio y un plano papilar bajo. Las mediciones de las dimensiones del ventrículo izquierdo se tomaron a partir de imágenes bidimensionales. Se registraron imágenes del eje largo de dos cámaras y cuatro cámaras para la determinación de los volúmenes ventriculares izquierdos, de la fracción de eyección y del gasto cardíaco. El modelo matemático para esta determinación era la aproximación de Simpsons modificada biplano. Los electrocardiogramas se registraron coordinados con la ecocardiografía.

Las imágenes guardadas en disco óptico se almacenaron en CD en un formato de imagen DICOM para su revisión en el orden cronológico del estudio por al menos un cardiólogo veterinario con certificado de especialidad (VetMed), a ciegas en lo que se refiere a la identidad de las muestras. Se realizaron tres mediciones en todos los datos ecocardiográficos y se describieron como la media de las tres mediciones.

Se realizó una ecocardiografía en todos los animales en las cuatro semanas anteriores a la colocación del ameroide. Cualquier animal identificado con cardiopatía congénita o función ventricular izquierda anormal por ecocardiograma se excluyó del estudio. Se realizó ecocardiografía en tensión con dobutamina para establecer las comparaciones basales.

Se realizó ecocardiografía en todos los animales después de la cirugía y la colocación del constrictor ameroide en la DAI, y dentro del plazo de aproximadamente ocho días antes de la aplicación de tratamiento. Se evaluó el movimiento regional de la pared ventricular izquierda en condiciones de reposo y de tensión con dobutamina. Cualquier animal identificado con infartos transmurales se excluyó del estudio.

Se realizó ecocardiografía en todos los animales dentro del plazo de aproximadamente ocho días a la necropsia. Se evaluó el movimiento regional de la pared ventricular izquierda en condiciones de reposo y de tensión con dobutamina. Se evaluó la función ventricular izquierda global usando una combinación de mediciones de las dimensiones del ventrículo izquierdo, determinaciones del volumen ventricular izquierdo, de la fracción de eyección y determinaciones del gasto cardíaco.

Se realizó un análisis de ecocardiografía sin BPL separado de los datos de ecocardiografía originales para proporcionar comparaciones estadísticas de parámetros seleccionados. Se usó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre grupos de tratamiento. Se realizaron comparaciones entre grupos y dentro de grupos centrándose específicamente en los cambios de los parámetros en condiciones de reposo frente a condiciones de tensión con dobutamina a los puntos temporales tanto de 30 como de 90 días. Los parámetros que se identificaron para la comparación eran:

1. Gasto Cardíaco (GC): Se esperaba que el GC aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar el GC en condiciones de tensión con dobutamina.

2. Fracción de Eyección Ventricular Izquierda (FEVI): También se esperaba que la FEVI aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar la FEVI en condiciones de tensión con dobutamina.

3. Índice de Volumen Diastólico Final Ventricular Izquierdo (IVDFVI): Se esperaba que el IVDFVI aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen aumentos superiores en el IVDFVI en condiciones de tensión con dobutamina.

4. Índice de Volumen Sistólico Final Ventricular Izquierdo (IVSFVI): Se esperaba que el IVSFVI disminuyera de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para disminuir el IVSFVI en condiciones de tensión con dobutamina.

5. Engrosamiento Sistólico de la Pared (EPS): Se esperaba que los valores de ESP aumentasen de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar los valores de ESP en condiciones de tensión con dobutamina.

Ninguno de los animales observados durante la evaluación ecográfica pre-ameroide basal demostró una disfunción ventricular izquierda significativa o una cardiopatía congénita. Se evaluó que, en las condiciones de reposo basales, todos los animales estaban dentro de los intervalos normales para la especie para los valores hemodinámicos y las dimensiones de la pared. Estos datos demuestran que los animales de todos los grupos comenzaron el estudio con valores dentro de los intervalos normales de la función ventricular izquierda. Además, las dimensiones de la pared ventricular izquierda pre-tratamiento, post-ameroide demostraron una respuesta mitigada a la tensión con dobutamina a nivel basal (valvular mitral), papilar alto y papilar bajo en comparación con la evaluación basal pre-ameroide, demostrando una función de la pared disminuida en la pared anterior y lateral del ventrículo izquierdo. Estas observaciones ecográficas pre-tratamiento, post-ameroide concuerdan con el modelo experimental con ameroide que daba como resultado una dilatación ventricular izquierda leve secundaria a isquemia ventricular, y

demuestran que el modelo canino con ameroide usado en este estudio creaba con éxito una isquemia ventricular medible por ecocardiografía.

No se observaron muertes de animales durante la fase en vida del estudio.

Se observaron las observaciones clínicas comunes a los procedimientos quirúrgicos asociados con la exposición del corazón por toracotomía (colocación de ameroide) o esternotomía (colocación de artículo de ensayo) (por ejemplo, hinchazón, eritema, incisiones abiertas, abrasiones, etc.). La distribución y frecuencia de estas observaciones clínicas antes del Día 1 eran similares entre los agrupamientos de tratamiento finales. Después de la administración quirúrgica de tratamiento el Día 1, las observaciones clínicas eran similares entre los cuatro grupos de tratamiento con la excepción de que se observaron más animales en los Grupos 1, 2 y 4 (isquemia solamente, Anginera™ no viable y tres trozos de Anginera™, respectivamente) en comparación con el Grupo 3 (un solo Anginera™) con incisiones quirúrgicas abiertas. La mayoría de las incisiones abiertas se observaron después del procedimiento de esternotomía (aplicación de tratamiento), aunque uno o dos animales por grupo tenían incisiones abiertas observadas después del procedimiento de toracotomía (aplicación de oclisor ameroide). Todos los animales con incisiones abiertas se trataron con antibióticos hasta que las incisiones se cerraron o presentaban granulación y estaban secas.

Se evaluó que los exámenes oftalmológicos, exámenes físicos, pesos corporales, temperaturas corporales, hematología, coagulación, química sérica, Troponina T, urianálisis, control cardiovascular/hemodinámico quirúrgico y control cardiovascular semanal estaban todos dentro de los intervalos normales para la especie y no eran diferentes entre los cuatro grupos de animales. En su conjunto, estos datos demuestran la seguridad de Anginera™ a todos los niveles de dosificación dentro de los parámetros evaluados. La evaluación cualitativa de los ECG demostró ritmos cardíacos normales para todos excepto tres animales (dos animales del Grupo 2 y un animal del Grupo 3). Se evaluó que las arritmias o alteraciones de la conducción observadas en estos tres animales eran variantes normales en perros o un efecto residual temporal de la colocación quirúrgica del artículo de ensayo sobre la superficie miocárdica.

Las observaciones patológicas macroscópicas a simple vista se limitaban a numerosas adhesiones miocárdicas (entre el corazón y el pericardio y el pericardio y los pulmones o la pared torácica) y lesiones nodulares o decoloraciones en el tejido miocárdico que rodea los ameroides. No se detectaron diferencias en la frecuencia o intensidad de estas observaciones entre los cuatro grupos de tratamiento de animales. Estos tipos de observaciones macroscópicas concuerdan con los procedimientos quirúrgicos utilizados en este protocolo experimental (es decir, toracotomía y esternotomía). Las observaciones de patología microscópica asociadas con la colocación quirúrgica del material de ensayo incluían un engrosamiento fibroso generalizado del epicardio, que se correlaciona con las adhesiones entre la superficie epicárdica del corazón y el pericardio o pulmón, y exudados serosanguinolentos limitados. Estas observaciones se anotaron en todos los animales en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento y parecía que estaban relacionadas con los procedimientos quirúrgicos y no con el tratamiento específico con el artículo de ensayo. Por lo tanto, no eran evidentes cuestiones de seguridad a partir de los resultados histológicos, y las respuestas tisulares observadas concuerdan con la lesión tisular atribuida a los procedimientos quirúrgicos. Los cambios microscópicos señalados como resultado de la colocación quirúrgica del oclisor ameroide sobre la arteria coronaria variaban de infiltrados histiocíticos y linfoplasmocíticos de bajo grado, grados variables de hiperplasia de la íntima arterial en el vaso con ameroide y áreas de infarto de miocardio. No se observó infarto transmural en ninguna de las muestras tisulares examinadas. En su conjunto, ninguna pauta en la incidencia o gravedad del infarto podía asociarse con un tratamiento específico a los puntos temporales de evaluación de Día 30 y Día 90.

En resumen, la evaluación de los criterios de valoración de seguridad primarios (incluyendo observaciones hemodinámicas, electrocardiográficas, ecocardiográficas y clínicas y de patología macroscópica) demostró la seguridad de Anginera™ a todos los niveles de dosificación y en ambos puntos temporales.

Se realizaron evaluaciones adicionales de la histología cardíaca para identificar pruebas de formación de nuevos microvasos. Estos descubrimientos confirman los descubrimientos previamente descritos y publicados de formación de nuevos microvasos con la presencia de una microvasculatura madura (arteriolas, vénulas y capilares) (véase la FIGURA 1).

Se analizaron adicionalmente secciones teñidas con hematoxilina y eosina del estudio canino para evaluar el infiltrado celular en asociación con Anginera™ y el tejido epicárdico. Este análisis se realizó en tejidos que estaban en contacto directo con el material Anginera™. Se realizaron las observaciones siguientes:

1. Se observó en todos los grupos cicatrización indicativa de daños isquémicos subendocárdiales.
2. Los especímenes del Grupo 1 (isquemia solamente) mostraban un engrosamiento pericárdico focal mínimo sin inflamación.
3. Los implantes del Grupo 2 (Anginera™ no viable) tenían un engrosamiento pericárdico difuso leve y focalmente aumentado con inflamación mínima y proliferación mesotelial focal.
4. El Grupo 3 (una sola dosis de Anginera™) y el Grupo 4 (tres trozos de Anginera™) tenían un engrosamiento pericárdico fibroso con cantidades variables de inflamación moderada, focal, multifocal o tipo banda entre el parche y el epicarpio, y reacción a cuerpo extraño focal (en su mayoría asociada con las suturas).
5. Se observó menos inflamación a los 90 que a los 30 días.

6. No se observaron pruebas definitivas de reacción inmunológica.
7. En ningún caso había inflamación que implicase al miocardio.
8. Se observó una vasculatura aumentada focalmente en áreas de inflamación pericárdica.

Estas evaluaciones histopatológicas no demostraron pruebas de reacción inmunológica contra Anginera™. Había una respuesta inflamatoria transitoria observada en los cuatro grupos de tratamiento asociada con las condiciones experimentales. En los grupos con Anginera™ viable había pruebas de una respuesta celular, que incluía un aumento en la microvasculatura específica para el epicardio y pericardio. No había pruebas de fibrosis localizada, asociada con el tratamiento, en el epicardio o miocardio que pudiera conducir a arritmias. Los infiltrados tenían el aspecto morfológico de tipos celulares macrofágicos más que linfocíticos.

Las evaluaciones ecocardiográficas pre-necropsia realizadas como parte del estudio de BPL demostraron disminuciones dependientes de la dosis en los volúmenes de la cámara ventricular izquierda. Los índices de gasto cardíaco y volumen sistólico en reposo se disminuyeron en el Grupo 3, pero estas leves disminuciones se normalizaron en respuesta a la infusión de dobutamina. Los índices de gasto cardíaco y volumen sistólico en reposo disminuían en el Grupo 4, mientras que las disminuciones en los volúmenes de la cámara ventricular izquierda eran notables en comparación con los valores pre-tratamiento y estaban disminuidos sobre los valores basales. Estos cambios eran más espectaculares en el Grupo 4 en comparación con el Grupo 3. La respuesta a la infusión de dobutamina en términos de diferencia en porcentaje en el Grupo 4 era realmente mejor que la observada en los valores basales. Los índices de gasto cardíaco y volumen sistólico no volvían a los valores basales normales, pero estaban muy próximos.

Los animales del Grupo 3 (una dosis unitaria de Anginera™) en el punto temporal pre-necropsia de 30 días tenían ventrículos izquierdos más grandes que los animales del Grupo 3 en el punto temporal pre-necropsia de 90 días o los animales del Grupo 4 (tres dosis unitarias de Anginera™) a los puntos temporales pre-necropsia de 30 ó 90 días. Los animales del Grupo 4 tenían ventrículos izquierdos más pequeños que los animales del Grupo 1, 2 ó 3. Los mecanismos compensatorios causan por sí mismos una disminución del tamaño ventricular izquierdo (volumen), como se observó en los animales sin tratar del Grupo 1 y en los animales tratados con Anginera™ no activo del Grupo 2. Sin embargo, el hecho de que los volúmenes ventriculares izquierdos fueran realmente más pequeños en los animales del Grupo 4 que en los animales del Grupo 1, 2 ó 3 sugiere un efecto de tratamiento positivo. Las disminuciones en los volúmenes/tamaños ventriculares izquierdos son al menos en parte responsables de las disminuciones en el índice de volumen sistólico (IVS) y el índice de gasto cardíaco (IGC). Estas disminuciones devolvían tanto el índice de gasto cardíaco como el índice de volumen sistólico a valores similares a o mejores que los valores basales normales, que también estaban mejorados en comparación con los valores pre-tratamiento. La función más mejorada en comparación con los valores pre-tratamiento era en los animales del Grupo 4 en el punto temporal pre-necropsia de 90 días.

Como parte del estudio de BPL, los datos de la función segmentaria y las dimensiones de la pared segmentaria sugieren que la aplicación de tratamiento de los Grupos 2, 3 y 4 aumentaba las dimensiones de la pared cuando se aplicaba. También sugería que en estas regiones había un efecto de endurecimiento miocárdico leve evidente en perros del Grupo 2 que recibieron artículo de ensayo no activo solamente. Los datos de este grupo también sugieren que el artículo de ensayo no activo solamente puede causar una mejora en la función segmentaria global en segmentos adyacentes. Esto puede ser simplemente una manifestación de respuestas compensatorias en otros segmentos. Los animales del Grupo 3 demostraron aumentos leves en la función segmentaria o ningún cambio sobre los valores pre-tratamiento, respaldando el hecho de que Anginera™ era seguro y a esta dosis mejoraba levemente la función en los segmentos isquémicos, pero no devolvía la función segmentaria a los valores basales normales. Las mediciones del Grupo 4 a nivel basal demostraron una función segmentaria aumentada con vuelta a valores próximos a los basales y una mejora notable sobre los valores pre-tratamiento. Este no era el caso a nivel del músculo papilar alto ni a nivel apical, donde el engrosamiento de la pared segmentaria se reducía levemente en respuesta a la infusión de dobutamina en la mayoría de los segmentos. Los segmentos que pusieron de manifiesto una función segmentaria levemente reducida tenían dimensiones de la pared sistólicas que estaban significativamente aumentadas sobre los valores pre-tratamiento o normalizadas en respuesta al tratamiento.

Se realizó una evaluación sin BPL separada de los valores del IVDF ventricular izquierdo por dos razones. En primer lugar, para entender específicamente los cambios en los valores del IVDF después del tratamiento; y en segundo lugar, para evaluar el periodo con ameroide de 30 días con respecto al modelo canino. Los estudios descritos en la bibliografía publicada han sugerido que los caninos son capaces de una colateralización significativa de la circulación coronaria. Esto puede presentar limitaciones a la interpretación de los datos funcionales que tienen como objetivo evaluar el beneficio de un tratamiento. Sin embargo, el modelo canino continúa siendo un modelo bien establecido dentro de la bibliografía publicada.

A la luz de estos entendimientos del modelo canino, se evaluaron los parámetros del IVDF con más detalle. Los parámetros del IVDF durante el periodo con ameroide de 30 días parecen sugerir que los animales tratados con un solo trozo de Anginera™ (Grupo 3) y los tratados con tres trozos de Anginera™ (Grupo 4) podrían haber tenido una patología más grave, como sugieren los valores IVDF en el punto temporal pre-tratamiento con tensión con dobutamina (FIGURA 2). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre los valores de IVDF basales, posiblemente debido a las grandes desviaciones típicas y al

pequeño tamaño de la muestra. Clave de la leyenda del eje X: Normal = punto temporal de oclusión pre-ameroide (-30 días); PreTx = oclusión con ameroide, punto temporal pre-tratamiento (0 días); 30d PreNx = tratamiento después de 30 días, antes de la necropsia (30 días), y 90d PreNx = tratamiento después de 90 días, antes de la necropsia (90 días).

Como se ha descrito anteriormente, se realizó una evaluación secundaria separada de los datos sin procesar originales que se recogieron en la evaluación de electrocardiografía primaria. La evaluación secundaria se centraba en comparaciones estadísticas específicas de los parámetros ecocardiográficos clínicamente relevantes. Los descubrimientos generales de la evaluación ecocardiográfica primaria y los descubrimientos específicos de la evaluación ecocardiográfica secundaria se respaldan entre sí. Además, en la evaluación ecocardiográfica secundaria los parámetros de gasto cardiaco (GC), fracción de eyección ventricular izquierdo (FEVI), índice de volumen sistólico final ventricular izquierdo (IVSFVI) y engrosamiento sistólico de la pared (ESP) confirman la conclusión de que Anginera™ estimula un efecto biológico positivo sobre corazones caninos crónicamente isquémicos. Además, estos datos confirman la conclusión de que el tratamiento con Anginera™ viable mejora el rendimiento ventricular y el movimiento de la pared ventricular en corazones caninos crónicamente isquémicos después de 30 días de tratamiento.

Después de 30 días de tratamiento, los perros en los grupos con parche de Anginera™ no viable, único y múltiple mostraban una mejora significativa ($P < 0,05$) en el gasto cardiaco con dobutamina (4273 ± 450 , 4238 ± 268 y 4144 ± 236 ml/min, respectivamente) en comparación con su gasto cardiaco en reposo basal. El grupo con cirugía simulada no mejoró significativamente su GC con la infusión de dobutamina. Sin embargo, a los 90 días todos los perros mejoraban su GC con dobutamina, incluyendo los animales con cirugía simulada (FIGURAS 3 y 4). Se esperaba que el GC aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar el GC en condiciones de tensión con dobutamina. Estos datos sugieren que los perros tratados con trozos no viables, únicos y múltiples de Anginera™ tenían una respuesta de GC mejor a dobutamina que el grupo de control con tratamiento simulado a los 30 días. A los 90 días, todos los grupos se comportaban estadísticamente equivalentes entre sí.

La FEVI demostró una respuesta en tensión a la dobutamina similar a la del GC a los 30 y 90 días (FIGURAS 5 y 6). En concreto, después de días de tratamiento, los perros en los grupos con parche de Anginera™ no viable, único y múltiple mostraban una mejora significativa ($P < 0,05$) en la FEVI con dobutamina en comparación con su FEVI en reposo basal. El grupo con cirugía simulada no mejoró significativamente su FEVI con la infusión de dobutamina. Sin embargo, a los 90 días todos los perros mejoraban su FEVI con dobutamina, incluyendo los animales con cirugía simulada. La FEVI se esperaba que aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar la FEVI en condiciones de tensión con dobutamina. Estos datos sugieren que los perros tratados con trozos no viables, únicos y múltiples de Anginera™ tenían una respuesta de FEVI mejor a la dobutamina que el grupo de control con tratamiento simulado a los 30 días. A los 90 días, todos los grupos se comportaban estadísticamente equivalentes entre sí.

El índice de VDFVI se midió en reposo y durante la tensión en todos los grupos a 30 y 90 días. En reposo el índice VDFVI era similar en todos los grupos a los 30 y 90 días. Sin embargo, durante la tensión a los 90 días había una disminución significativa ($P < 0,05$) en el índice de VDFVI a la dosis de Anginera™ mayor (Grupo 4) (FIGURAS 7 y 8). Se esperaba que el IVDFVI aumentase de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen aumentos mayores en el IVDFVI en condiciones de tensión con dobutamina. Por lo tanto, el resultado de los animales del Grupo 4 a los 90 días en condiciones de tensión con dobutamina que tenían valores del índice de VDFVI significativamente menores sugiere que el grupo con tratamiento máximo (tres trozos de Anginera™) proporciona un beneficio adicional al corazón isquémico.

De acuerdo con los datos de la FEVI y del GC, los valores del índice de VSVI también disminuían significativamente con Anginera™ viable o no viable en condiciones de tensión en comparación con las medidas basales a los 30 días. A los 90 días, también había una mejora en el índice de VSVI con los animales con cirugía simulada (FIGURAS 9 y 10). Se esperaba que el índice de VSFVI disminuyera de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para disminuir el IVSFVI en condiciones de tensión con dobutamina. Estos datos sugieren que los perros tratados con trozos no viables, únicos y múltiples de Anginera™ tenían una respuesta de índice de VSFVI mejor a la dobutamina que el grupo de control con tratamiento simulado a los 30 días. A los 90 días, todos los grupos se comportaban de forma estadísticamente equivalente entre sí.

Durante el periodo de isquemia temprana, la dobutamina aumentaba ($P < 0,05$) el ESP en los 4 grupos aleatorizados, sin embargo parece existir una relación dependiente de la dosis puesto que el aumento más significativo en el ESP se producía en perros que tenían los tres parches de Anginera™ implantados (FIGURA 11). A los 30 y 90 días post-tratamiento, dentro del periodo de isquemia crónica, hay una tendencia gradual que demuestra un aumento en el ESP en respuesta a dobutamina con el tiempo, como se representa por análisis de regresión lineal de todos los puntos de datos (FIGURA 12). Esto parece ocurrir tanto en animales isquémicos sin tratar como en los tratados con parches de Anginera™. Se esperaba que los valores de ESP aumentasen de las condiciones de reposo a tensión. Se espera que los corazones enfermos demostrasen una capacidad comprometida para aumentar los valores de ESP en condiciones de tensión con dobutamina. Estos datos sugieren que durante el periodo de

isquemia temprana (30 días después del tratamiento) la dobutamina aumenta ($P < 0,05$) el ESP en los 4 grupos de tratamiento; sin embargo, parece existir una relación dependiente de la dosis puesto que el aumento más significativo en el ESP se producía en perros que tenían los tres parches de AngineraTM implantados.

La colocación de parches de AngineraTM viables o no viables, independientemente del número de parches implantados, daba como resultado una fracción de eyección VI mejorada, un gasto cardíaco mejorado y un índice de volumen sistólico VI reducido durante las condiciones de tensión con dobutamina a los 30 días después de la inducción de isquemia. En los animales con isquemia crónica (grupo 1), esta respuesta sólo se observaba a los 90 días; en este punto temporal los animales con isquemia crónica eran capaces de montar una respuesta a la dobutamina aun cuando no habían recibido el tratamiento con AngineraTM. Este descubrimiento es congruente con la bibliografía publicada, en la que el modelo canino se describe como un modelo que tiene una capacidad intrínseca para colateralización coronaria.

En conclusión, los descubrimientos generales de la evaluación ecocardiográfica primaria como parte del estudio de BPL y los descubrimientos específicos de los análisis ecocardiográficos sin BPL separados se respaldan entre sí. Además, en los análisis ecocardiográficos sin BPL separados los cambios en el GC, FEVI, IVSFVI y ESP confirman las conclusiones de que el tratamiento con AngineraTM mejora el rendimiento ventricular y el movimiento de la pared ventricular en corazones caninos crónicamente isquémicos después de 30 días de tratamiento.

Ejemplo 2: Inyección de tejidos estromales tridimensionales en un modelo de miembro posterior de ratón isquémico

El modelo de isquemia del miembro posterior de ratón se desarrolló en dos cepas diferentes, la C57BL/6 y la Balb/C. Este modelo consiste en la ligación de la arteria y vena proximal a la bifurcación de la arteria femoral profunda y de nuevo en un sitio 5-7 mm distal. Aunque se han usado ambas cepas en la bibliografía, se ha descubierto que el ratón Balb/C muestra menos colateralización que otras cepas. Por lo tanto, se seleccionó la cepa de ratón Balb/C para estudios adicionales.

El modelo de isquemia del miembro posterior de ratón se usó para evaluar la capacidad de construcciones mínimamente invasivas para inducir la angiogénesis *in vivo* cuando se implantan en tejidos periféricos isquémicos. Se indujo isquemia en dos animales y a los animales se les inyectó una composición de células musculares lisas (SMC) cultivadas en perlas Alkermes®. Como control, se indujo isquemia en los animales pero se dejó sin tratar. Las células cultivadas sobre perlas se inyectaron con éxito a través de una jeringa Hamilton de calibre 24 G; sin embargo, aproximadamente el 50% del volumen de perlas permanecía en la jeringa (FIGURAS *A y *B). Se inyectaron los 20 µl de medio, inyectándose aproximadamente 10 µl de los 20 µl de volumen de perlas en el músculo isquémico. Para asegurar una administración completa, pueden usarse agentes de administración farmacéuticamente adecuados tales como hidrogeles de PEG para aumentar la viscosidad del vehículo y proporcionar una mayor administración de perlas.

Las observaciones 2 semanas después de la implantación demostraron pruebas de una formación de nuevos microvasos limitada (flechas negras) en miembros isquémicos tratados con células musculares lisas sobre perlas Alkermes (FIGURAS *A y *B) en comparación con los animales de control con miembros con isquemia solamente (FIGURAS *A y *B).

También se llevaron a cabo estudios usando el modelo de isquemia del miembro posterior de ratón con tejidos tridimensionales preparados usando hilos trenzados. Los resultados sugieren la presencia de formación de nuevos microvasos rodeando los implantes después de 14 días de implantación (FIGURAS *A y *B).

Las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente divulgación se han presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No pretenden ser exhaustivas o limitar el alcance de la divulgación a las formas concretas desveladas, y son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de los contenidos anteriores.

REIVINDICACIONES

1. Un tejido tridimensional cultivado que comprende fibroblastos vivos para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva en un paciente.
- 5 2. Uso de un tejido tridimensional cultivado que comprende fibroblastos vivos en la fabricación de un medicamento para tratar a un paciente con insuficiencia cardíaca congestiva.
3. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado comprende una estructura tridimensional compuesta por material no vivo biodegradable.
- 10 4. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho material biodegradable se selecciona de entre el grupo que consiste en: PLGA, TMC, PGA, PLA, policaprolactona, material de sutura *catgut*, colágeno, fibronectina, celulosa, gelatina, dextrano y ácido hialurónico.
- 5 5. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado comprende además un material no biodegradable.
- 15 6. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho tejido tridimensional cultivado comprende una estructura tridimensional compuesta por un hidrogel.
- 20 7. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado comprende además una célula viva seleccionada de entre el grupo que consiste en: célula estromal, célula muscular lisa, célula muscular lisa vascular, célula muscular cardíaca, célula muscular esquelética, célula endotelial, pericito, macrófago, monocito, leucocito, célula plasmática, mastocito, adipocito, célula madre y célula progenitora.
- 25 8. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado está destinado a ponerse en contacto con el corazón del paciente en una región seleccionada de entre el grupo que consiste en: tejido cardíaco dañado o enfermo, epicarpio, miocardio y endocardio.
9. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado es capaz de aumentar la fracción de eyección cardíaca de aproximadamente el 3% al 5%, de aproximadamente el 5% al 10%, o más del 10%.
10. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado es capaz de mejorar la eficacia de bombeo del corazón.
- 30 11. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado se va a aplicar en forma de más de un trozo cohesivo de tejido tridimensional cultivado que comprende fibroblastos vivos.
- 35 12. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado comprende espacios intersticiales dimensionados para permitir que las células vivas se extiendan a través de los mismos.
13. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dichos espacios intersticiales se dimensionan de al menos aproximadamente 140 μm , 150 μm , 160 μm , 175 μm , 135 μm , 200 μm , 210 μm o 220 μm .
- 40 14. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado está destinado a unirse al corazón del paciente con unión celular, pegamento biológico, pegamento sintético, colorante láser, suturas o hidrogel.
15. El uso o tejido tridimensional cultivado para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho tejido tridimensional cultivado varía en tamaño de aproximadamente 15 cm^2 a aproximadamente 50 cm^2 .

45

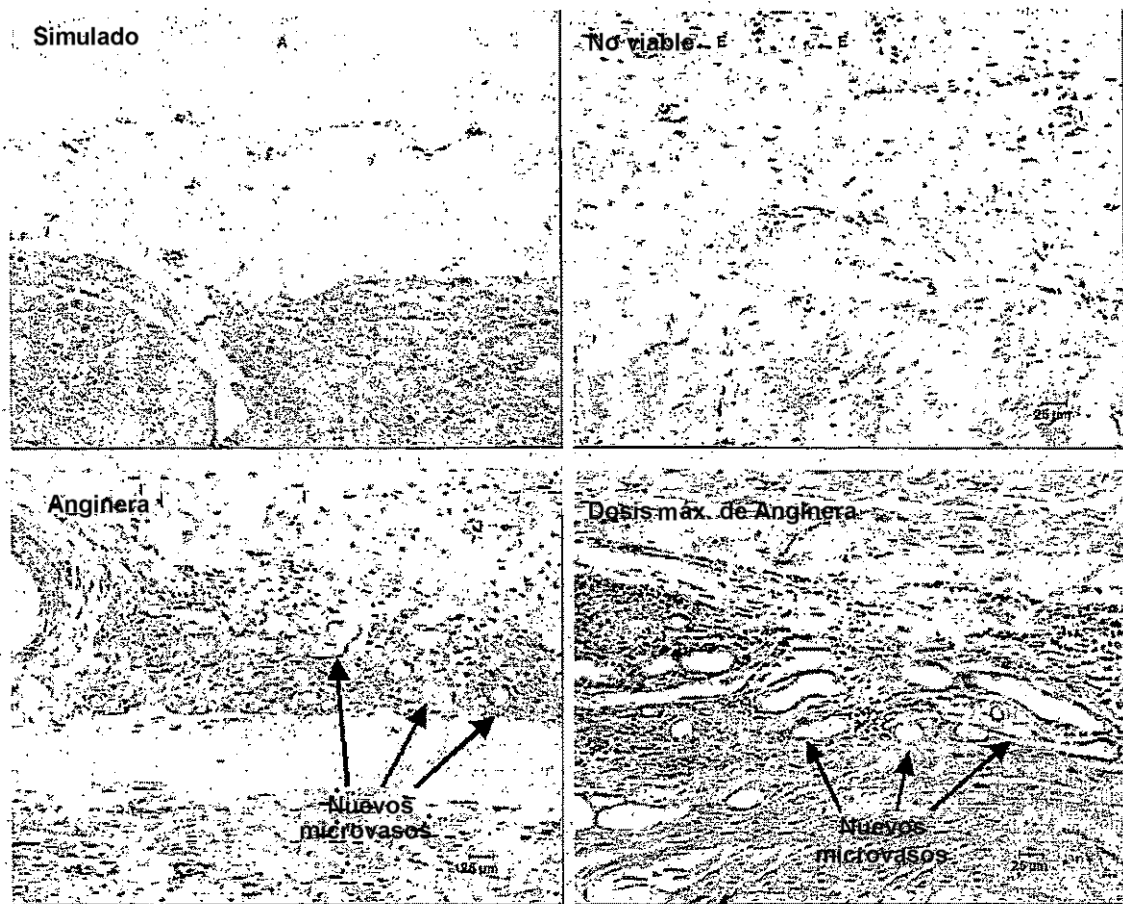


Figura 1

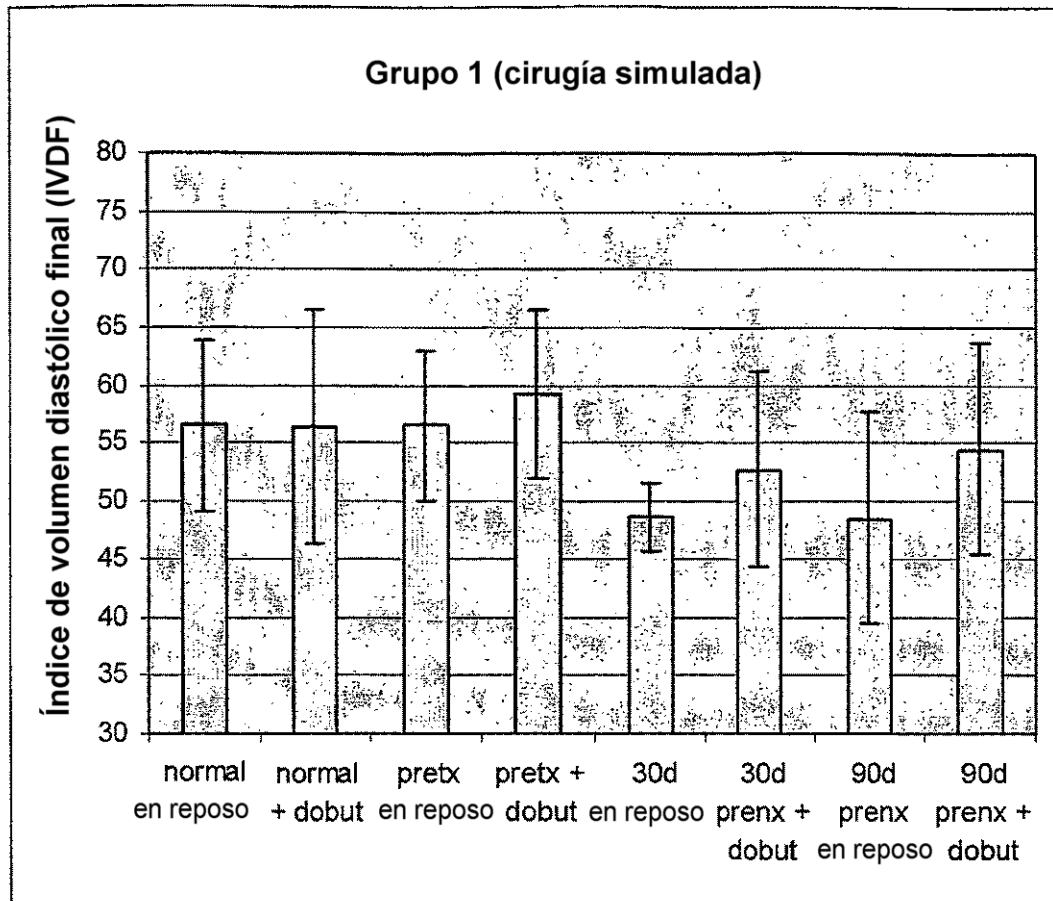


Figura 2A

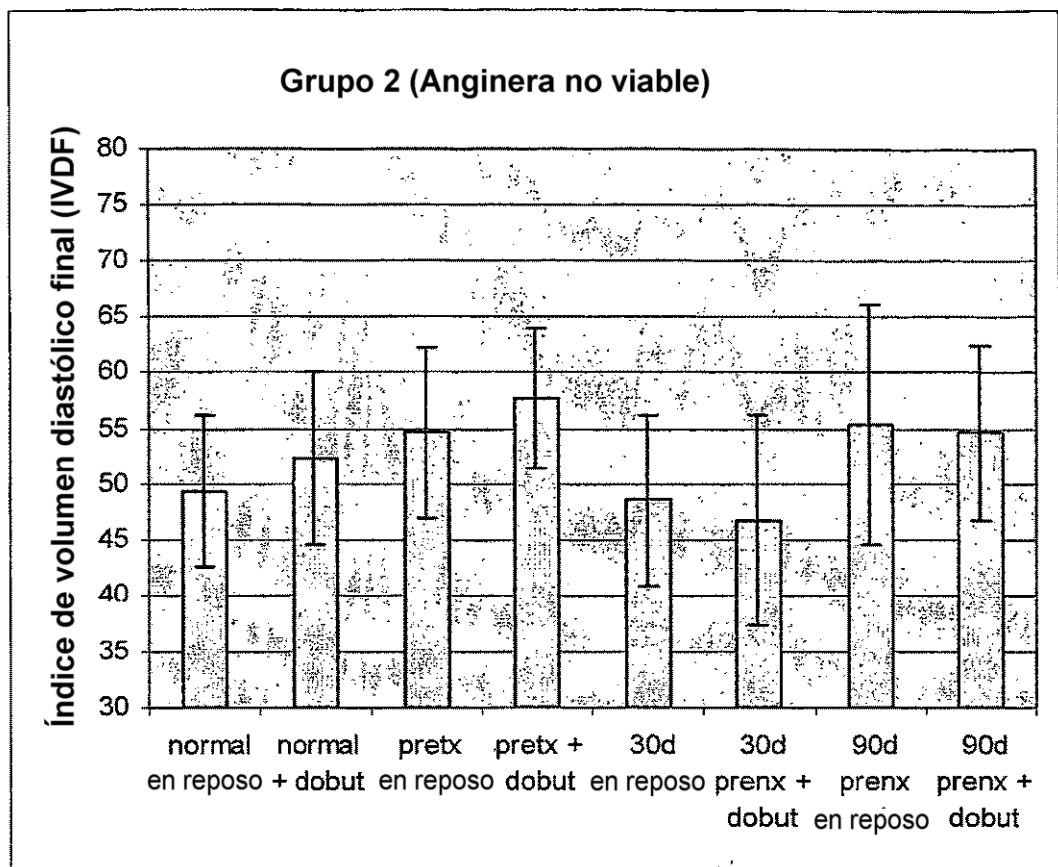


Figura 2B

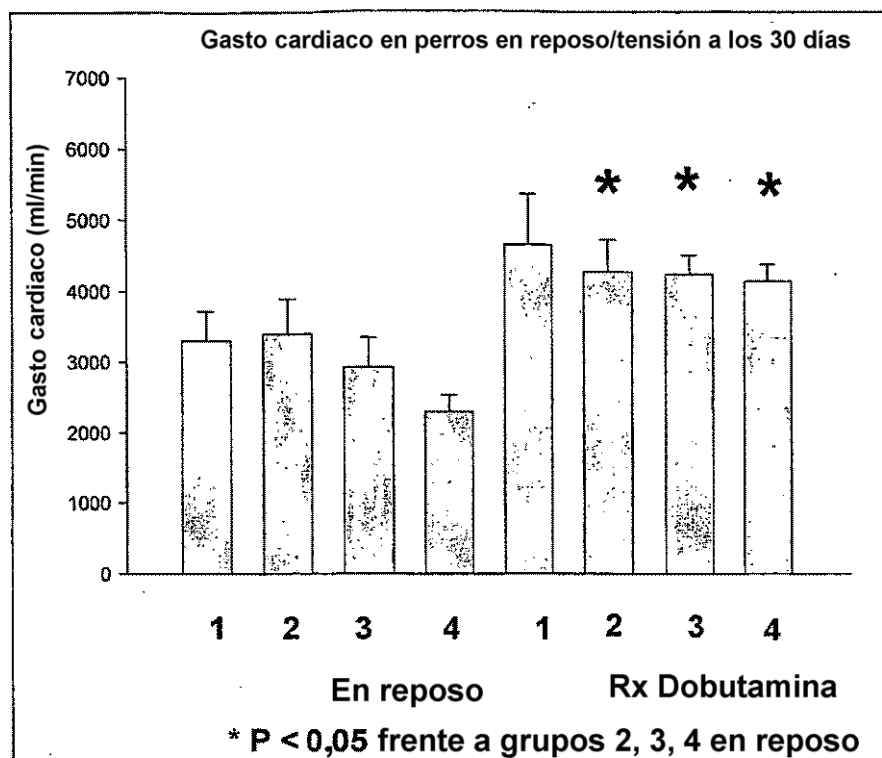


Figura 3

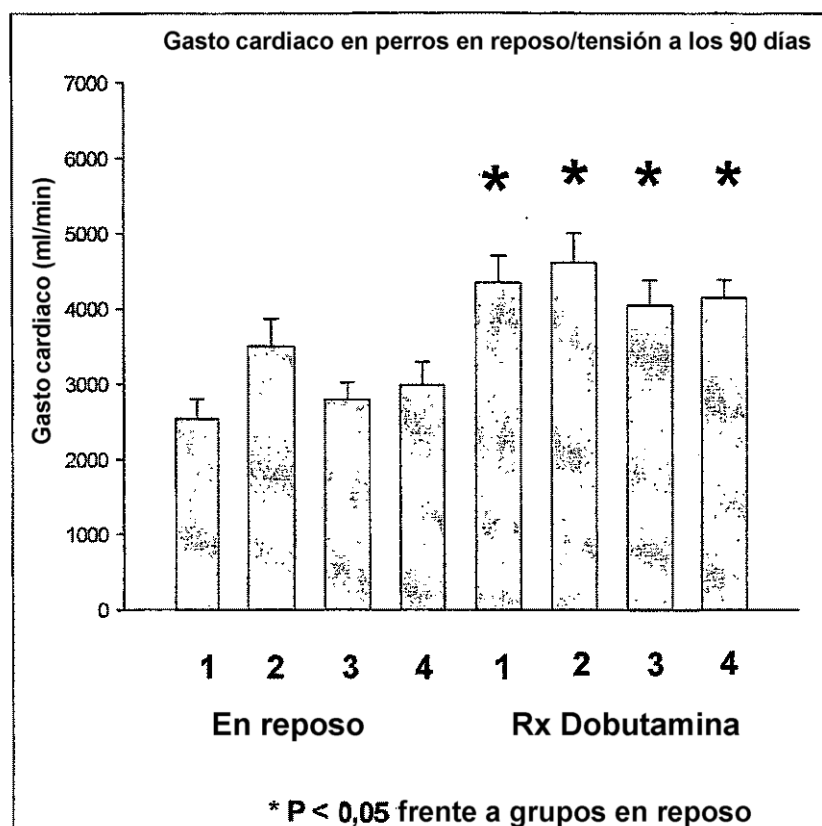


Figura 4

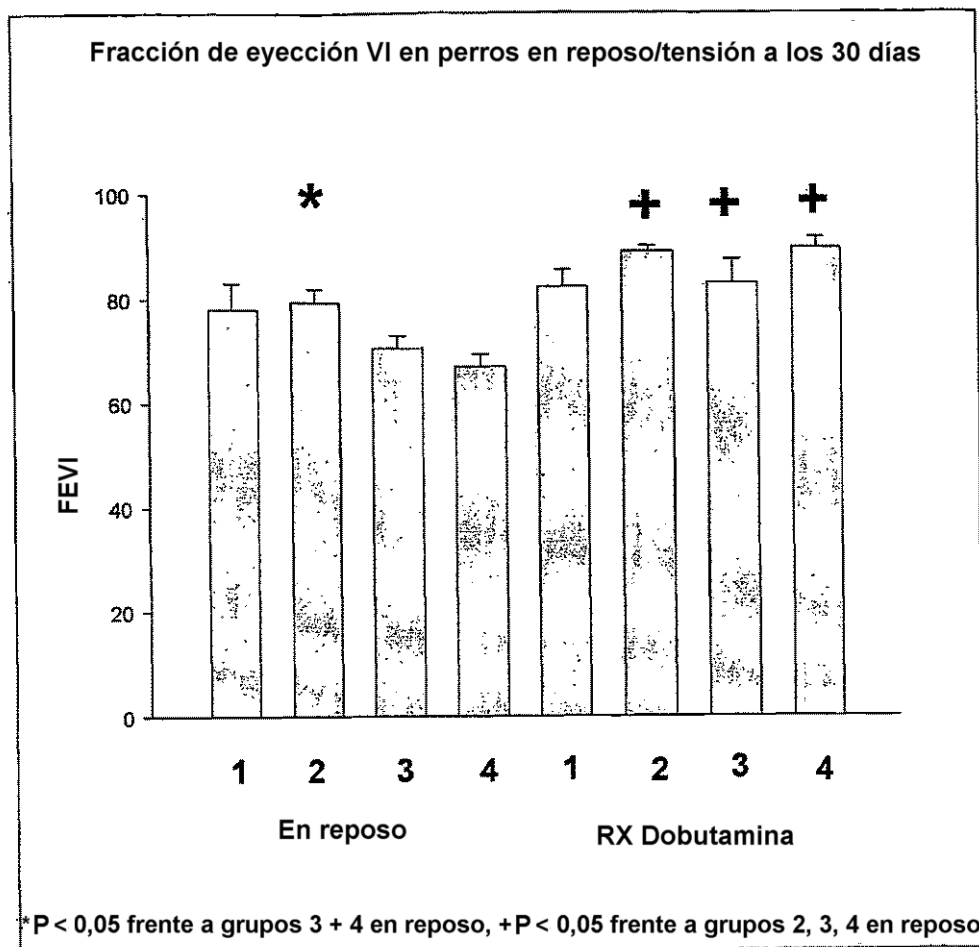


Figura 5

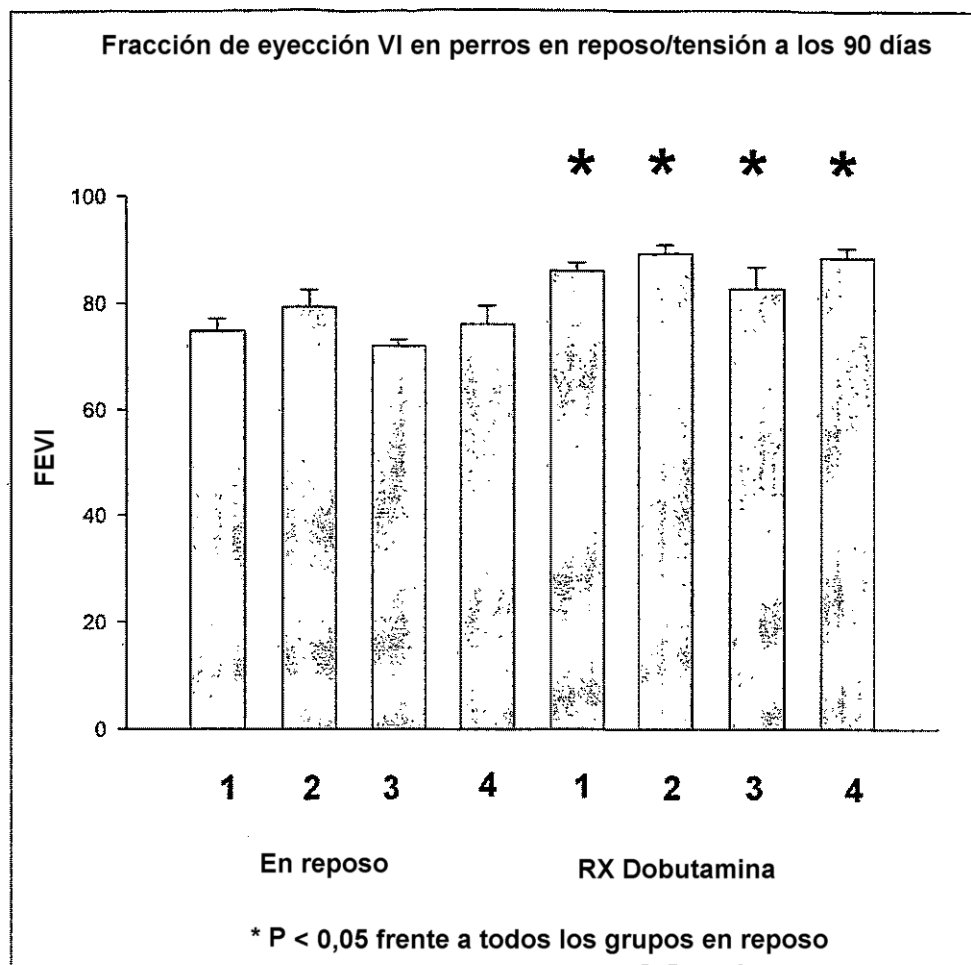


Figura 6

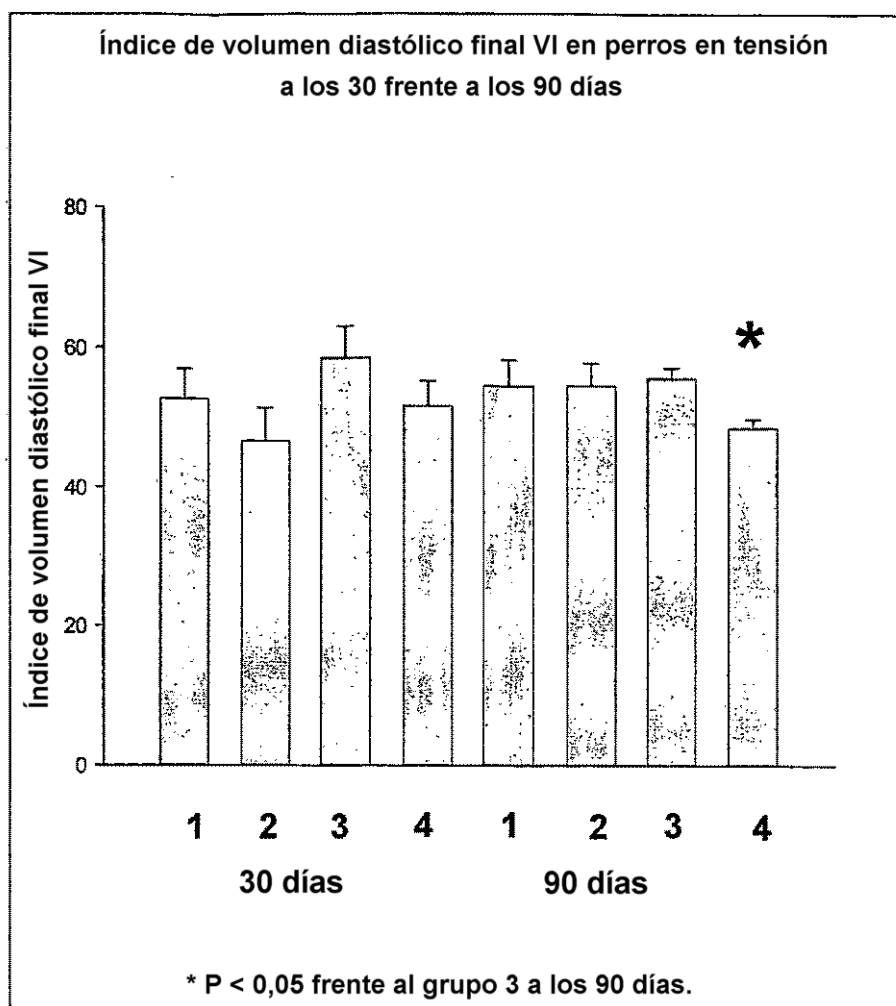


Figura 7

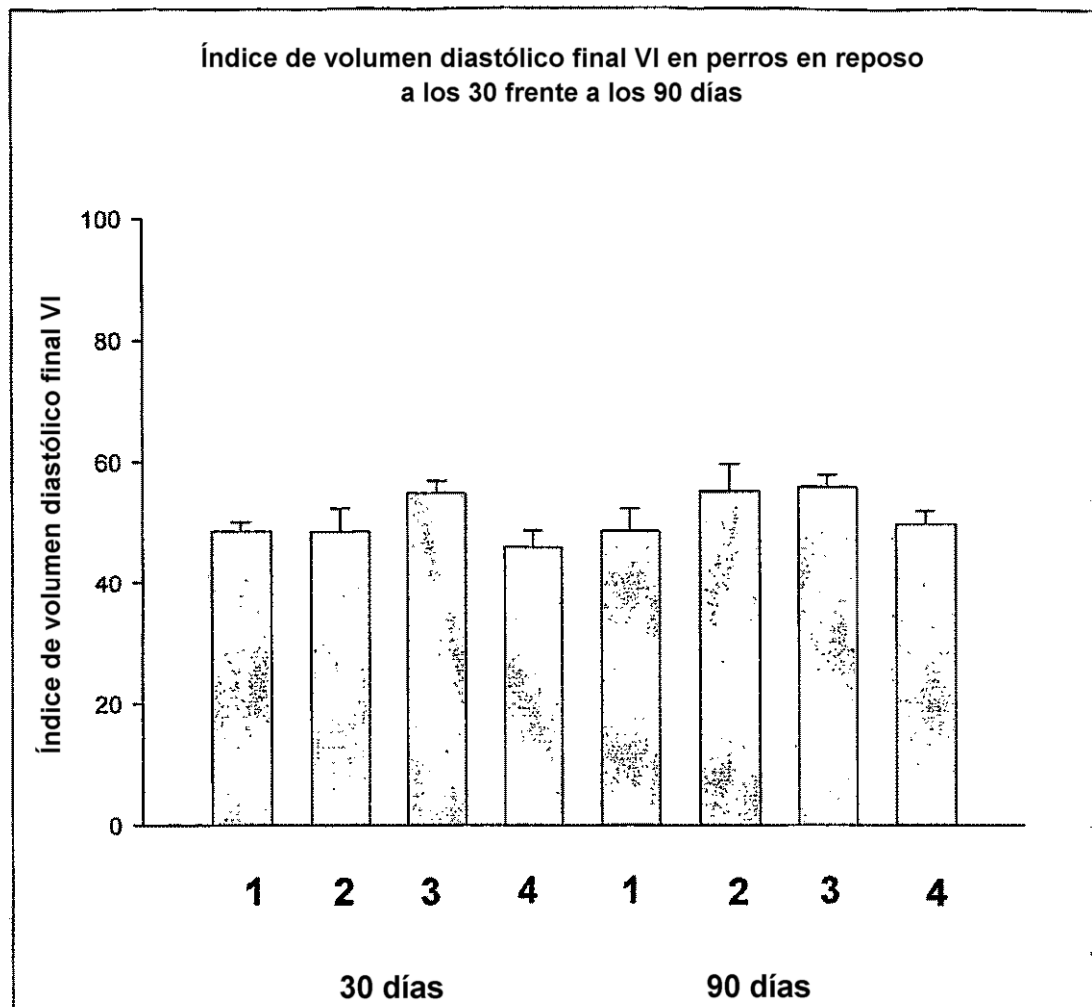


Figura 8

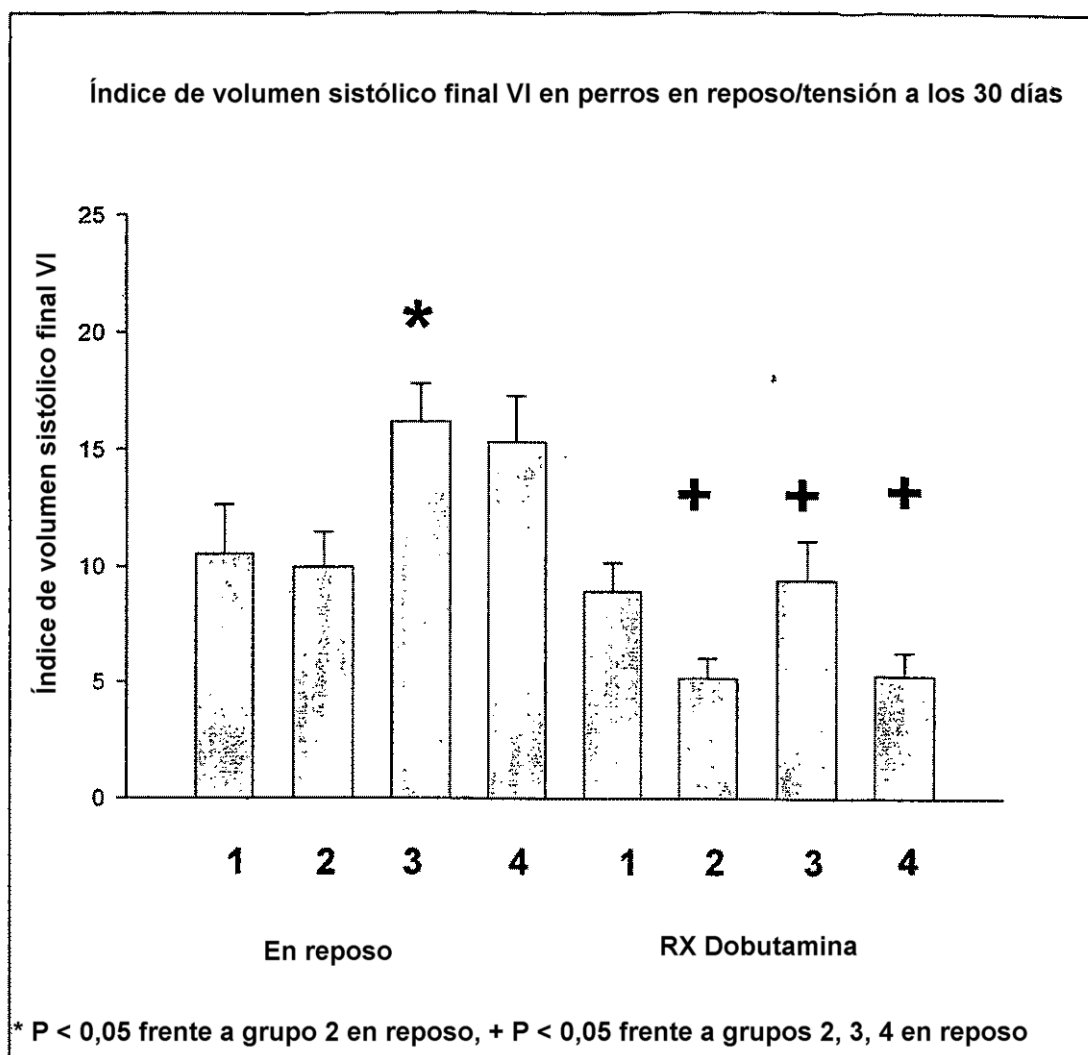


Figura 9

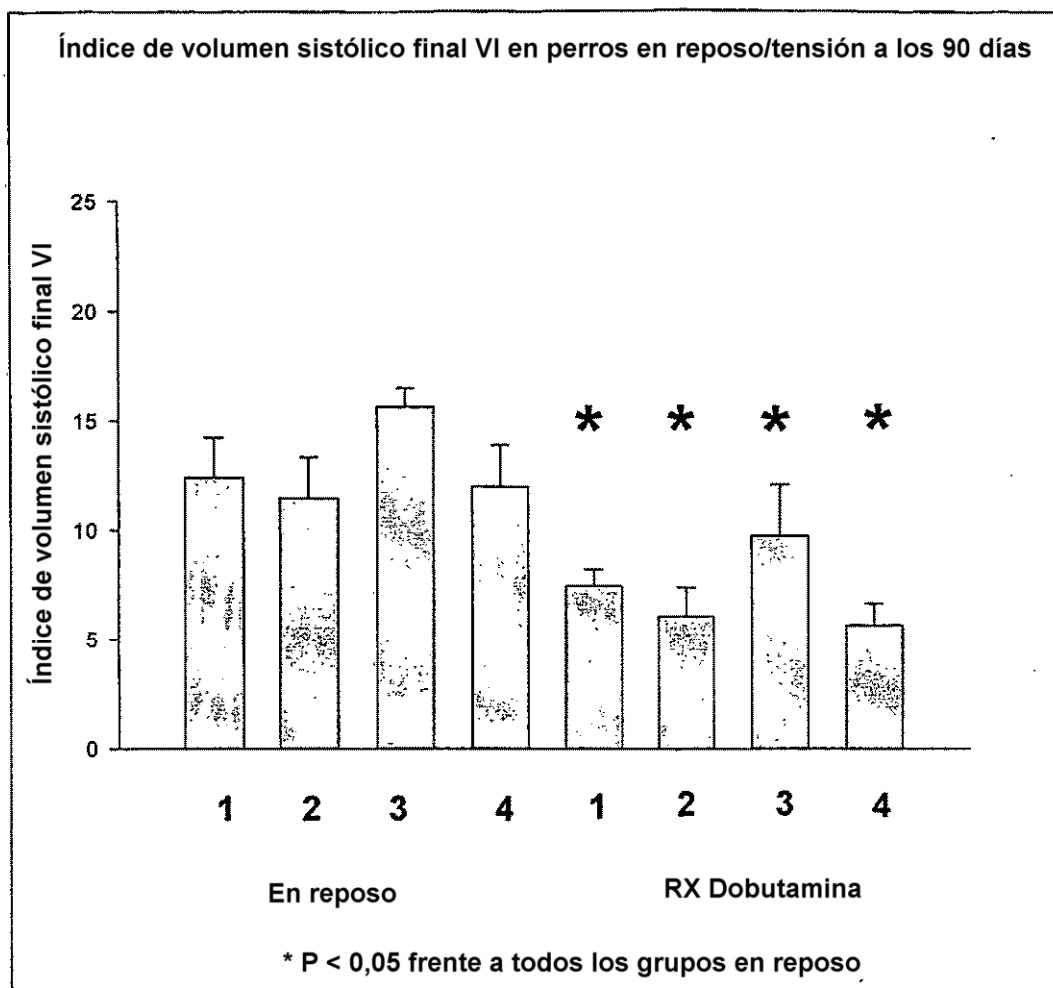


Figura 10

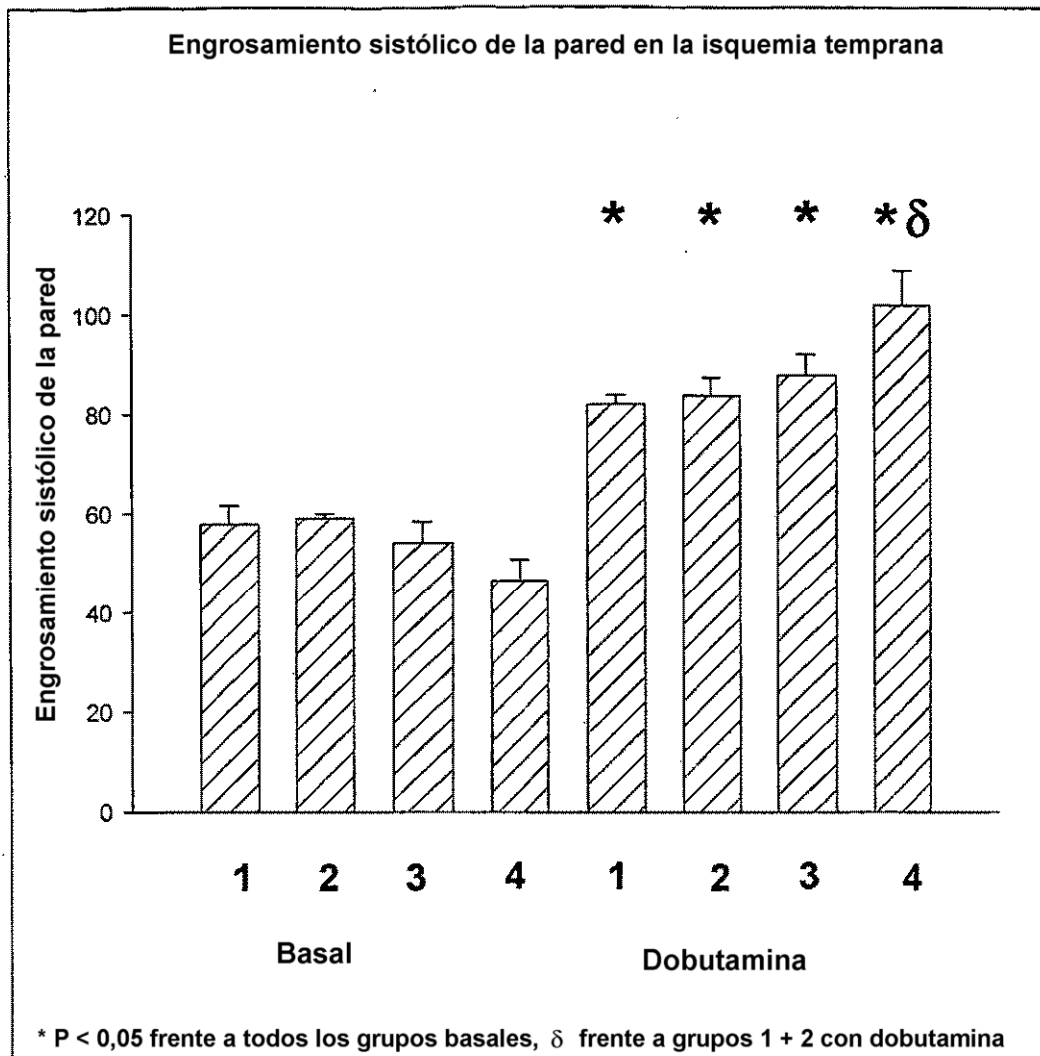


Figura 11

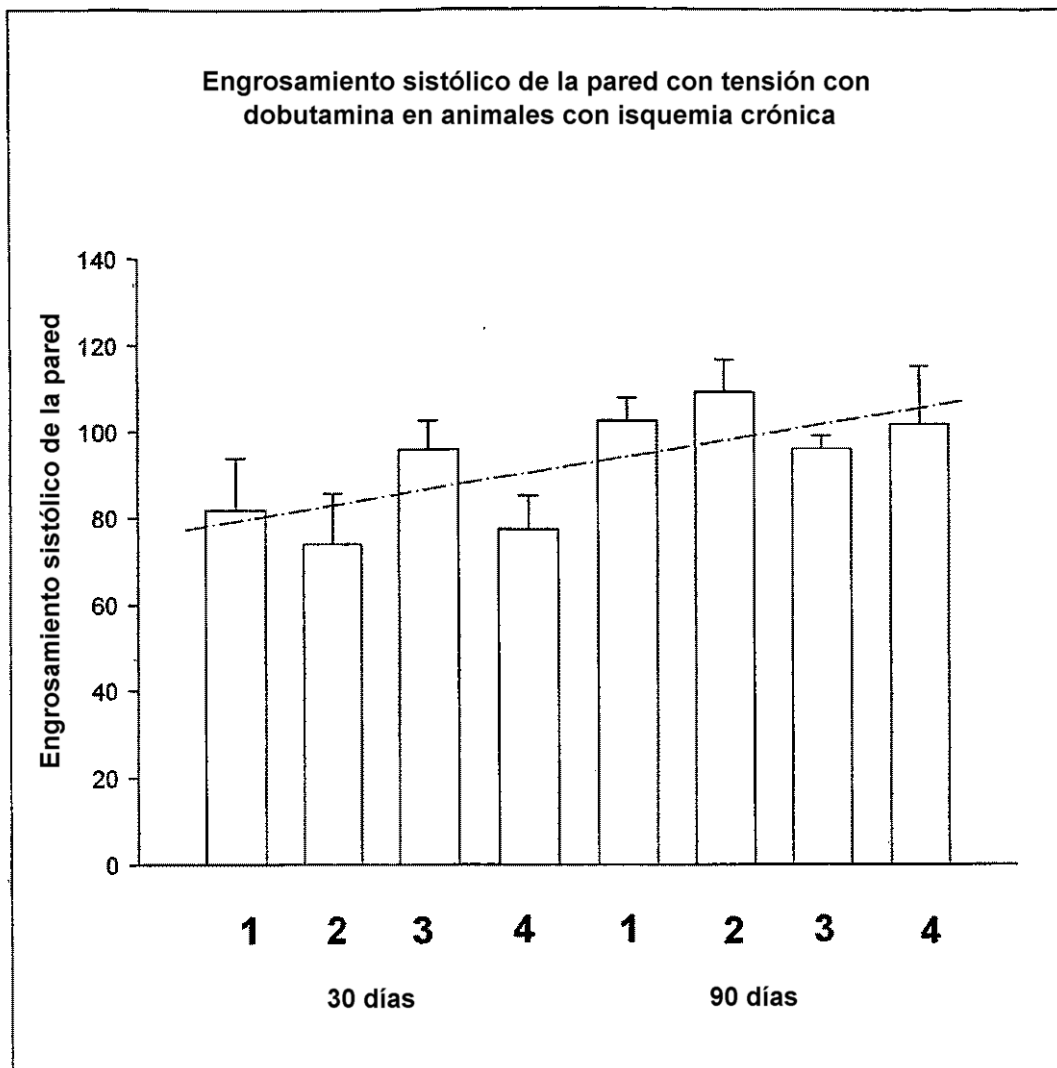


Figura 12

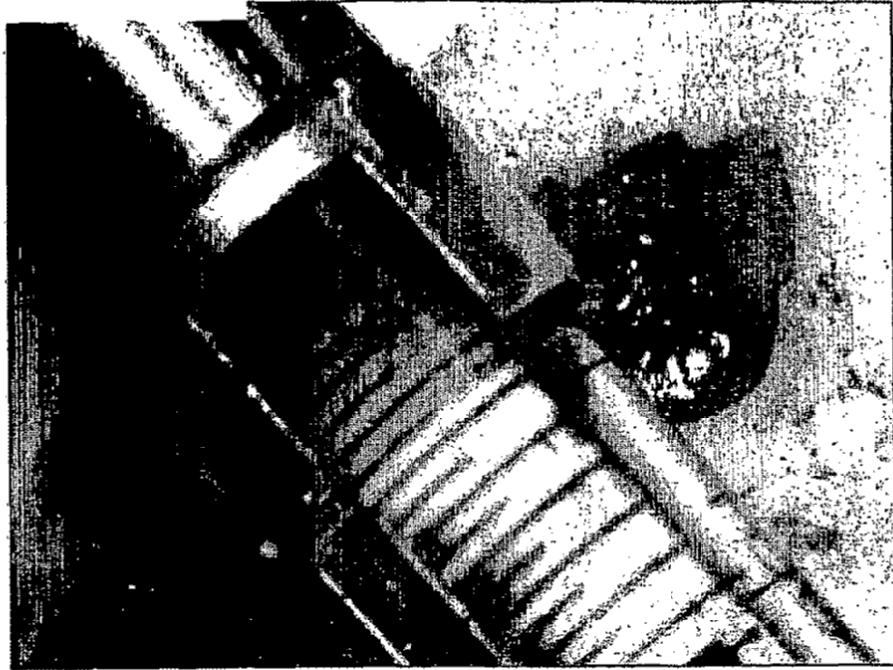


FIG. 13A



FIG. 13B



FIG. 14A

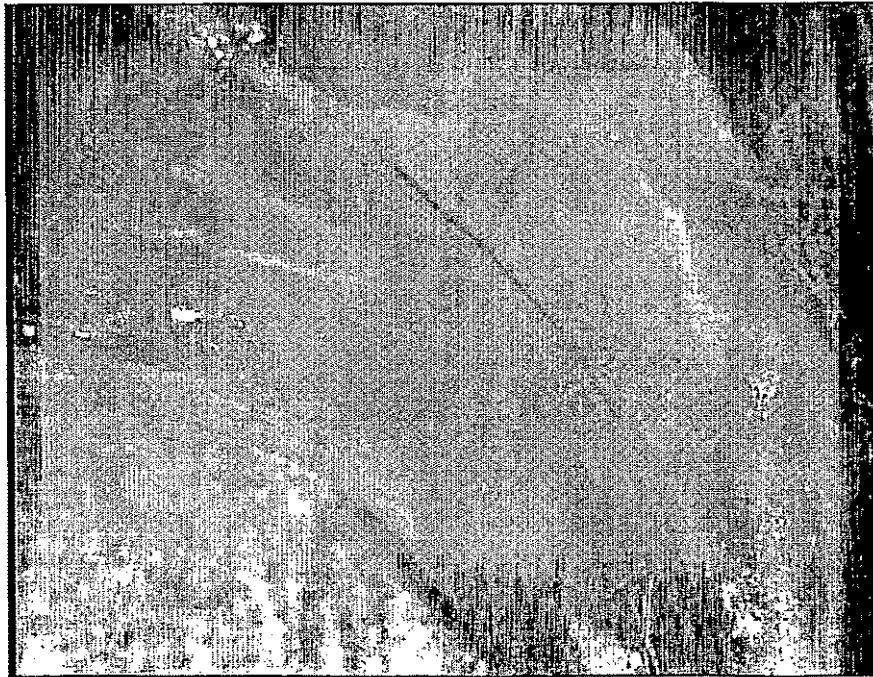


FIG. 14B

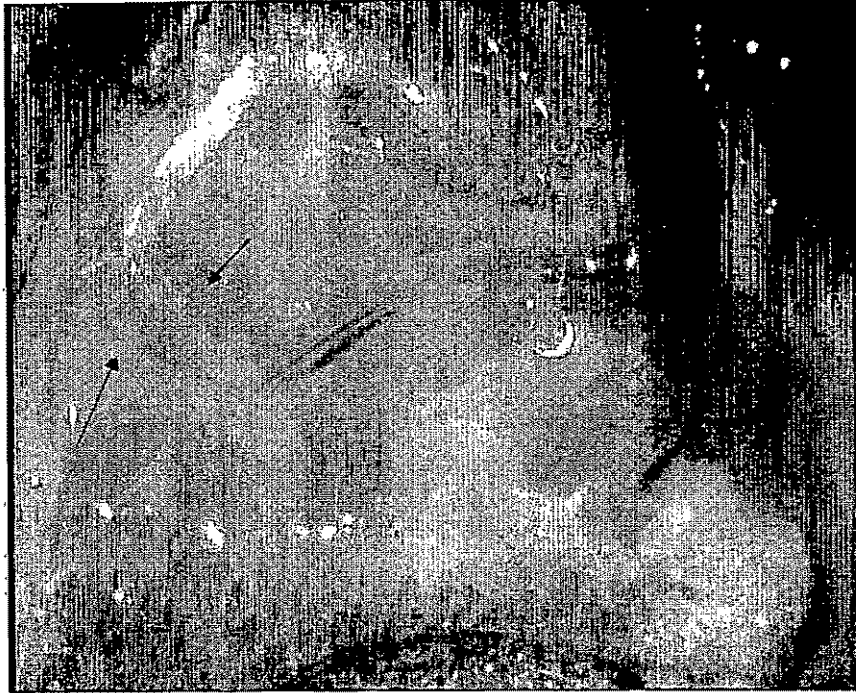


FIG. 15A

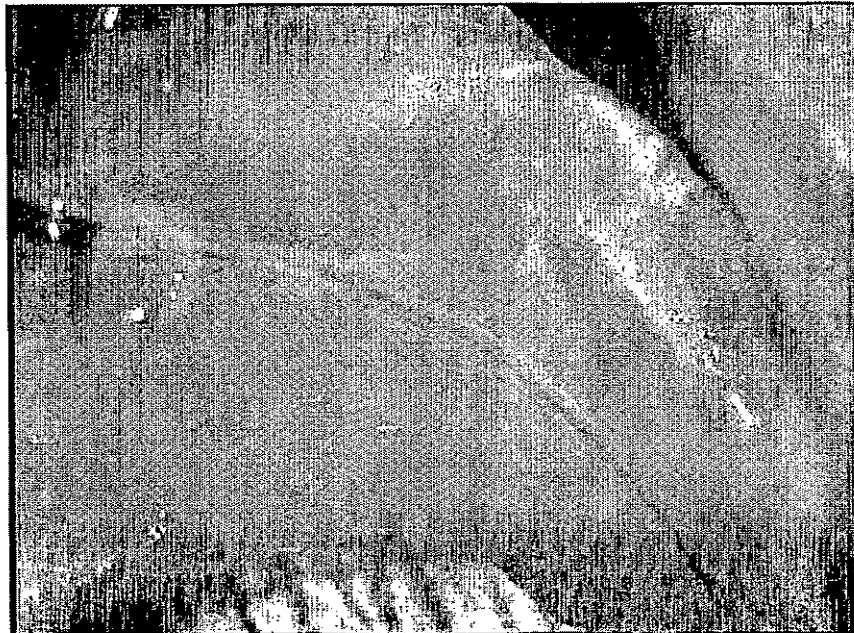


FIG. 15B

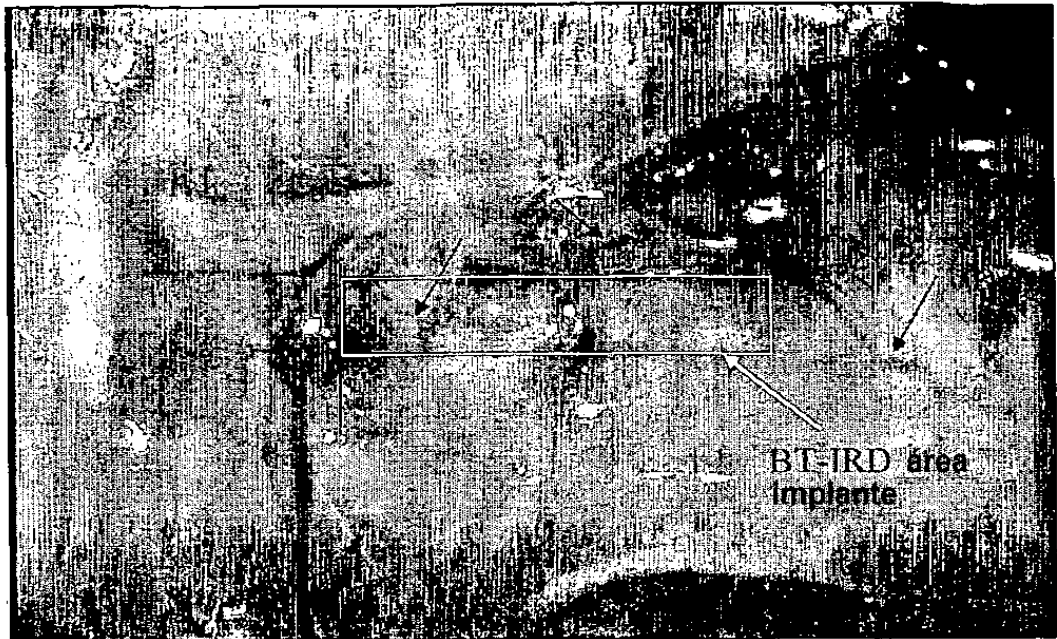


FIG. 16A



FIG. 16B