



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 701**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07 (2006.01)
C12N 5/078 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05745232 .8**
96 Fecha de presentación : **01.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1759536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Técnicas *in vitro* para su uso con células madre.**

30 Prioridad: **01.06.2004 US 576266 P**
15.07.2004 US 588520 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **KWALATA TRADING LIMITED**
P.O. Box 22454
1522 Nicosia, CY

72 Inventor/es: **Fulga, Valentin;**
Porat, Yael;
Belkin, Danny;
Shimoni-Zalk, Daphna y
Porozov, Svetlana

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 701 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

Técnicas *in vitro* para su uso con células madre

Referencias Cruzadas a Solicitudes Relacionadas

La presente solicitud reivindica beneficio de prioridad de:

- 5 (a) Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/576.266 presentada el 1 de Junio de 2004, titulada "Técnicas *in vitro* para su uso con células madre" y
- (b) Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/588.520, presentada el 15 julio de 2004, titulada "Indicaciones para uso de células madre".

Estas dos solicitudes se asignan al cesionario de la presente solicitud de patente.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a procedimientos y aparatos para el tratamiento de pacientes humanos que padecen trastornos vasculares y específicamente a procedimientos y aparatos para facilitar la angiogénesis y/o neovascularización y/o vasculogénesis.

Antecedentes de la invención

- 15 Debido al estrechamiento de las arterias por depósitos grasos u otras anomalías vasculares se produce cierta disfunción arterial. Esto puede interferir con el flujo sanguíneo y/o evitar que los tejidos y órganos se abastezcan con suficientes nutrientes y oxígeno.

- Los trastornos vasculares son afecciones habituales y pueden afectar gravemente a la calidad de vida de un paciente. A pesar de avances considerables en la terapia médica y mejoras en los procedimientos de revascularización para disfunción arterial, tales como injerto de arteria coronaria, angioplastia de globo y endoprótesis vasculares de los vasos coronarios, una proporción sustancial de pacientes padece enfermedad derivada de disfunción arterial.

- Se han usado células progenitoras endoteliales (CPE) para tratar pacientes que padecen enfermedades vasculares. En tales casos graves, cuando los fármacos o los procedimientos de revascularización directa ya no son eficaces o no pueden usarse, se requieren terapias alternativas. Se han aplicado CPE a tejido isquémico. Las CPE tienen la capacidad de diferenciarse para formar endotelio, la capa de células que forma los vasos sanguíneos. Estas células están implicadas en los procesos de reendotelización, neovascularización, vasculogénesis y angiogénesis. Los mecanismos por los que las CPE implantadas pueden convertirse en parte del proceso de curación incluyen autorreplacación, fusión con células del tejido dañado y secreción de citocinas y factores de crecimiento. La repoblación de CPE y su diferenciación a células endoteliales maduras activa sus funciones en los procesos de reendotelización, neovascularización, vasculogénesis y angiogénesis. Pruebas recientes sugieren que la fusión de CPE con células de tejido dañado potencia la regeneración de función tisular. Además, después de la secreción de citocinas y factores de crecimiento, las CPE pueden influir en la supervivencia celular de células inherentes al tejido y pueden ayudar a la movilización de células madre al tejido dañado.

- Una célula ancestro común, el hemangioblasto, da lugar a precursores tanto endoteliales como hematopoyéticos (células sanguíneas). Esta célula ancestro se diferencia en células madre hematopoyéticas y angioblastos, que son células precursoras mesodérmicas, que se diferencian para dar precursoras endoteliales. Estas células tienen la capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse en células endoteliales, pero no han adquirido aún marcadores endoteliales maduros específicos. Después de su compromiso al linaje endotelial, los angioblastos se ensamblan en un plexo vascular primitivo de venas y arterias, en un proceso llamado vasculogénesis. Esta vasculatura primitiva se refina posteriormente en una red funcional por angiogénesis y por remodelación y arteriogénesis de vasos de nueva formación. Se ha mostrado que las CPE se movilizan (es decir, migran en mayores números desde la médula ósea (MO) a la circulación) en pacientes con traumatismo vascular o infarto de miocardio agudo (IMA). (Véase, por ejemplo, los siguientes dos artículos (a) Gill, M., S. Dias, y col. (2001), "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells," *Circ Res* 88(2): 167-74; y (b) Shintani, S., T. Murohara, y col. (2001), "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction," *Circulation* 103(23): 2776-9). En general, el uso de CPE se dirige a promover la formación de derivaciones naturales dentro del tejido isquémico o cicatrizado y aliviar de este modo la afección clínica de estos pacientes.

- Numerosos experimentos con animales y ensayos clínicos han investigado el potencial de esta terapia para aumentar el flujo sanguíneo y producir un alivio asociado de síntomas isquémicos, según se manifiesta por la mejora de un paciente en su actuación física.

Se han descrito diversas fuentes para CPE autólogas para trasplante, incluyendo células madres aspiradas directamente de la médula ósea (MO) y células madre de sangre periférica derivadas de MO.

Las células progenitoras, o las células madre, incluyen células de médula ósea que pueden multiplicarse, migrar y diferenciarse en una amplia diversidad de tipos celulares. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea se caracterizan porque son "positivas para CD34" (CD34+), es decir, que expresan el marcador CD34.

5 Se supone que la plasticidad de poblaciones bien definidas de progenitores hematopoyéticos les permite transdiferenciarse en respuesta a estímulos ambientales presentes en el órgano diana y, más específicamente, a convertirse en células endoteliales.

El trasplante de médula ósea es clínicamente atrayente debido a la relativa simplicidad del procedimiento médico. Implica la aspiración de médula ósea de la cresta iliaca y la inmediata reinyección del aspirado o células seleccionadas en la cicatriz post infarto. Sin embargo, el procedimiento es invasivo y debe realizarse con anestesia.

10 La primera prueba que indica la presencia de CPE en la circulación del adulto se obtuvo cuando se mostró que células sanguíneas mononucleares de voluntarios humanos sanos adquirirían el fenotipo de tipo célula endotelial *in vitro* y se incorporaban a capilares *in vivo* (véase Asahara, T., T. Murohara, y col. (1997), "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis," *Science* 275(5302): 964-7).

15 Estas CPE potenciales se caracterizaron mediante expresión de CD34 y receptor de factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2/KDR), dos antígenos compartidos por progenitores endoteliales embrionarios y células madre hematopoyéticas (HSC). Además de CD34, las células progenitoras hematopoyéticas tempranas expresan CD133. (AC133), que no se expresa después de la diferenciación. Actualmente, la definición ampliamente aceptada de CPE en circulación es, para fines prácticos, células CD34+/VEGFR-2+ o CD133+/VEGFR-2+.

20 Pueden obtenerse CPE de sangre periférica a partir de sangre de pacientes no tratados o de pacientes tratados para aumentar la movilización de CPE usando citocinas tales como factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los tratamientos de movilización se evitan normalmente en pacientes que padecen trastornos derivados arteriales y hematológicos. También se ha indicado en tratamientos tales como inhibidores de HMG CoA reductasa (estatinas) elevan los números de CPE en circulación.
25 Véase, por ejemplo:

1. Dimmeler S., y col. (2001), "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway," *J. Clin. Invest* 108: 391-397.

30 2. Hyun-Jae, Hyo-Soo Kim, y col. (2003), "Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infraction: the MAGIC cell randomized clinical trial," *The Lancet* 363: 751-756.

3. Brigit Assmus, Volker Schachinger y col., (2002), "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infraction (TOPCARE-AMI)," *Circulation* 106: 3009-3017.

4. Alexandra Aicher, Winfried Brenner, y col., (2003), "Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling," *Circulation* 107: 2134-2139.

35 El procedimiento para retirar sangre periférica es más simple y más conveniente para el paciente que la retirada de MO. El hecho de que las CPE puedan aislarse de sangre periférica es un factor importante adicional en la selección del uso de estas células para terapia. El aislamiento de las células progenitoras de MO, que contiene muchos más tipos celulares, es también técnicamente más difícil.

40 Los resultados de tratamientos con CPE y CMO muestran función cardíaca mejorada, mayor densidad capilar, aumento notable en el número de vasos colaterales, mejora de la fracción de eyección ventricular izquierda ecocardiográfica, reducción en la cicatrización de área isquémica y prevención de apoptosis de cardiomiocitos en modelos de rata de infarto de miocardio. Además, se mostró una mejora del flujo sanguíneo y la densidad capilar y una tasa reducida de pérdida de extremidades en extremidades posteriores en un modelo de isquemia en ratones desnudos.

45 Los siguientes artículos describen técnicas que pueden usarse en combinación con técnicas descritas en el presente documento:

(1) Kalka, C., H. Masuda, y col. (2000). "Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects." *Circ Res* 86(12): 1198-202.

50 (2) Kawamoto, A., H. C. Gwon, y col. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." *Circulation* 103(5): 634-7.

(3) Kawamoto, A., T. Tkebuchava, y col. (2003). "Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia." *Circulation* 107(3): 461-8.

(4) Kamihata, H., H. Matsubara, y col. (2001). "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic

yocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines." *Circulation* 104(9): 1046-52.

(5) Kocher, A. A., M. D. Schuster, y col. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bonemarrow- derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." *Nat Med* 7(4):430-6.

Los siguientes artículos y capítulos de libros, que también se incorporan en el presente documento por referencia, describen técnicas que pueden usarse en combinación con técnicas descritas en el presente documento:

Flammera J y col. (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." *Progress in Retinal and Eye Research* 21: 359-393.

Zarbin MA (2004). "Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol.* 122(4):598-614.

Frank RN (2004). "Diabetic retinopathy." *N Engl J Med* 350:48-58.

Singleton JR (2003). "Microvascular complications of impaired glucose tolerance." *Diabetes* 52:2867-2873.

Bahlmann FH y col. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." *Blood* 103(3):921-6.

Greenfield, Ed. (2001). "Surgery: scientific principles and practice." Lippincot: Philadelphia, capítulo 107.

Kouwenhoven EA y col. (2000). "Etiology and pathophysiology of chronic transplant dysfunction." *Transplant Internat.* 13(6):385-401.

Browne EZ y col. (1986). "Complications of skin grafts and pedicle flaps." *Hand Clin.*2:353-9.

Chen y col. (1991). "Four types of venous flaps for wound coverage: a clinical appraisal." *J. Trauma* 31(9):1286-93.

Beatrice y col. (2004) *Dermatol. Surg.* 30(3):399.

Ferretti y col. (2003). "Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant." *Life Sci.* 73:1985-94.

Schechner y col. (2003). "Engraftment of a vascularized human skin equivalent." *FASEB J.* 17(15):2250-60.

Se ha llevado a cabo investigación en seres humanos durante los últimos años para examinar los beneficios potenciales de usar CPE y otras células derivadas de médula ósea para tratar trastornos miocárdicos. Estudios recientes demuestran que la implantación de células progenitoras autólogas después de infarto de miocardio agudo parece limitar el daño pos-infarto. Los siguientes ensayos clínicos se centran en los estudios que evaluaron la seguridad y eficacia de células derivadas de sangre o derivadas de médula ósea administradas en pacientes con trastornos cardíacos.

Perin y col. llevaron a cabo un ensayo clínico que incluía 21 pacientes (14 en el grupo de tratamiento, 7 en el grupo de control) que recibieron inyecciones transendocárdicas de CMO mononucleares autólogas (véase Perin, E. C., H. F. Dohmann, y col. (2003), "Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure," *Circulation* 107(18): 2294-302.). A los 4 meses, hubo una mejora en la fracción de eyección, una reducción en el volumen sistólico final y una mejora mecánica significativa en los segmentos inyectados en los pacientes tratados.

Otro grupo inyectó CPE autólogas en la zona límite del infarto en seis pacientes que habían padecido infarto de miocardio y que se habían sometido a injerto de derivación de arteria coronaria. De tres a nueve meses después de la cirugía, todos los pacientes estaban vivos y sanos y la función ventricular izquierda global se mejoró en cuatro pacientes. Los seis pacientes presentaron una mejora notable en la capacidad de ejercicio. Se indicó que las exploraciones de perfusión miocárdica habían mejorado sorprendentemente por análisis cuantitativos en cinco de seis pacientes. Los resultados de este estudio indican que la implantación de CPE en el corazón probablemente induce angiogénesis, mejorando de este modo la perfusión del miocardio infartado. (Véase Stamm, C., B. Westphal, y col. (2003), "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration," *Lancet* 361(9351): 45-6.)

El estudio de Trasplante de Células Progenitoras y Potenciación de la Regeneración en Infarto de Miocardio Agudo (TOP-CARE-AMI) implicó el suministro de células progenitoras endoteliales en circulación o células de médula ósea directamente en arterias coronarias después del infarto en pacientes con infarto de miocardio agudo con reperfusión (Véase Assmus, B., V. Schachinger, y col. (2002), "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)," *Circulation* 106(24): 3009-17). En los primeros 20 pacientes, 11 recibieron CPE y 9 recibieron CMO. A los 4 meses, el trasplante de células progenitoras dio como

resultado un aumento significativo de la fracción de eyección ventricular izquierda global, la ecocardiografía reveló mejora del movimiento de la pared regional en la zona del infarto, reducción de los volúmenes ventriculares izquierdos sistólicos finales y mejora de la viabilidad miocárdica en la zona del infarto en comparación con un grupo de referencia igualado no aleatorio. No existieron acontecimientos adversos del tratamiento en ninguno de los pacientes tales como arritmias o aumento en creatina quinasa y troponina. No hubo diferencia entre células derivadas de sangre periférica y de MO.

Un estudio realizado por un equipo dirigido por Amit Patel de la Universidad de Pittsburg, implicó a 20 pacientes con insuficiencia cardíaca grave de los cuales a 10 se inyectó en los vasos coronarios CPE derivadas de MO. En seguimientos de uno, tres y seis meses, las tasas de fracción de eyección de los pacientes con células madre mejoraron significativamente en comparación con los otros pacientes (véase resumen de American Association for Thoracic Surgery, Toronto, Mayo 2004).

Los siguientes artículos también pueden ser de interés.

J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* 267, 10931 (1992)

W. Brugger, S. Heimfeld, R. J. Berenson, R. Mertelsmann, L. Kanz, *N. Engl J. Med.* 333,283 (1995)

F. Katz, R. W. Tindle, D. R. Sutherland, M. D. Greaves, *Leuk. Res.* 9, 191 (1985)

R. G. Andrews, J. W. Singer, I. D. Bernstein, *Blood* 67, 842 (1986)

B. 1. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, y col, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1579 (1992)

B. Millauer, S. Witzigmann-Voos, H. Schnurch, R. Martinez, N. P. H. Moller, y col, *Cell* 72, 835 (1993)

J. C. Voyta, D. P. Via, C. E. Butterfield, B. R. Zetter, *J. Cell Biol.* 99, 2034 (1984)

P. J. Newman, M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, y col, *Science* 247, 1219 (1990)

T. N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, y col, *Nature* 376, 70 (1995)

H. Schnurch, W. Risau, *Development* 119, 957 (1993)

J. L. Liesveld, K. E. Frediani, A. W. Harbol, J. F. DiPersio, C. N. Abboud, *Leukemia* 8, 2111 (1994).

S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L. Q. Pu, y col, *J. Clin. Invest.* 93, 662 (1994)

R. Baffour, J. Berman, J. L. Garb, S. W. Rhee, J. Kauffman, y col, *J. Vasc. Surg.* 16, 181 (1992)

J. M. Isner, A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, y col, *Lancet* 348, 370 (1996)

Y. Sato, K. Okamura, A. Morimoto, R. Hamanaka, K. Hamanaguchi, y col, *Exp. Cell Res.* 204, 223 (1993)

Los siguientes artículos también pueden ser de interés:

Badorff, C., R. P. Brandes, y col. (2003). "Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes." *Circulation* 107(7): 1024-32.

Bhattacharya, V., P. A. McSweeney, y col. (2000). "Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34(+) bone marrow cells." *Blood* 95(2): 581-5.

Grant, M. B., W. S. May, y col. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." *Nat Med* 8(6): 607-12.

Hirata, K., T. S. Li, y col. (2003). "Autologous bone marrow cell implantation as therapeutic angiogenesis for ischemic hindlimb in diabetic rat model." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1): H66-70.

Ikenaga, S., K. Hamano, y col. (2001). "Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model." *J Surg Res* 96(2): 277-83.

Kalka, C., H. Masuda, y col. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(7): 3422-7.

Kaushal, S., G. E. Amiel, y col. (2001). "Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo." *Nat Med* 7(9): 1035-40.

Kornowski, R., M. B. Leon, y col. (2000). "Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models."

- J Am Coll Cardiol 35(4): 1031-9.
- Li, R. K., Z. Q. Jia, y col. (1996). "Cardiomyocyte transplantation improves heart function." *Ann Thorac Surg* 62(3): 654-60; discussion 660-1.
- 5 Rajnoch, C., J. C. Chachques, y col. (2001). "Cellular therapy reverses myocardial dysfunction." *J Thorac Cardiovasc Surg* 121(5): 871-8.
- Schatteman, G. C., H. D. Hanlon, y col. (2000). "Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice." *J Clin Invest* 106(4): 571-8.
- Shintani, S., T. Murohara, y col. (2001). "Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation." *Circulation* 103(6): 897-903.
- 10 Strauer, B. E., M. Brehm, y col. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." *Circulation* 106(15): 1913-8.
- Taylor, D. A., B. Z. Atkins, y col. (1998). "Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation." *Nat Med* 4(8): 929-33.
- 15 Thompson, C. A., B. A. Nasser, y col. (2003). "Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel surgical approach for myocardial cell transplantation." *J Am Coll Cardiol* 41(11): 1964-71.
- Tomita, S., R. K. Li, y col. (1999). "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function." *Circulation* 100(19 Suppl): II247-56.
- Tomita, S., D. A. Mickle, y col. (2002). "Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation." *J Thorac Cardiovasc Surg* 123(6): 1132-40.
- 20 Wang y col. (2004). "Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy." *Circulation* 109(11): 1392-400.
- Rupp y col. (2004). "Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells." *Basic Res Cardiol*. 99(1): 61-8.
- 25 Quirici y col. (2001). "Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells." *Br J Haematol*. 115(1): 186-94.
- Di Stefano y col. (2002) "Different growth conditions for peripheral blood endothelial progenitors." *Cardiovasc Radiat Med*. 3(3-4): 172-5.
- Akita y col. (2003). "Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." *Lab Invest*. 83(1): 65-73.
- 30 Wang y col. (2004). "Mechanical, cellular, and molecular factors interact to modulate circulating endothelial cell progenitors." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(5): H1985-93.
- Bahlmann y col. (2003). "Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin." *Kidney Int*. 64(5): 1648-52.
- 35 Heeschen y col. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood*. 102(4): 1340-6.
- Verma y col. (2004). "C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: Further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease." *Circulation*. 109 (17): 2058-67.
- 40 Las Patentes de Estados Unidos 5.980.887, 6.569.428 y 6.676.937 de Isner y col., describen de forma general productos farmacéuticos incluyendo progenitores de EC para su uso en procedimientos para regular la angiogénesis, es decir, para potenciar o inhibir la formación de vasos sanguíneos en un paciente seleccionado y en algunas realizaciones preferidas para dirigir un modulador de angiogénesis a localizaciones específicas. Por ejemplo, los progenitores de EC pueden usarse para mejorar la angiogénesis o para suministrar un modulador de angiogénesis, por ejemplo, agentes anti o pro angiogénicos, respectivamente a sitios de angiogénesis patológica o utilitaria. Adicionalmente, en otra realización, pueden usarse progenitores de EC para inducir reendotelización de un vaso sanguíneo lesionado y por lo tanto reducir la reestenosis inhibiendo indirectamente la proliferación de células de músculo liso.
- 45 La Patente de Estados Unidos N° 5.541.103 de Kanz y col., describe tratamientos de quimioterapia de dosis alta para pacientes que padecen ciertos tipos de cáncer. Para facilitar la recuperación, se describe un procedimiento para la expansión *ex vivo* de células progenitoras de sangre periférica, en el que las células CD34+ se enriquecen y
- 50

cultivan en un medio que comprende IL-1, IL-3, IL-6, EPO y SCF. Las células progenitoras de sangre periférica expandidas *ex vivo* pueden administrarse a pacientes de cáncer después de la quimioterapia.

5 La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0199464 de Itescu describe un procedimiento para tratar un trastorno del corazón de un sujeto que implica pérdida de cardiomiocitos. El procedimiento incluye administrar al sujeto una cantidad de un agente descrito como eficaz para provocar proliferación de cardiomiocitos dentro del corazón del sujeto de modo que se trate de este modo el trastorno. En una realización, el agente son células progenitoras endoteliales humanas. La solicitud también describe procedimientos para determinar la susceptibilidad de un cardiomiocito en un sujeto a apoptosis.

10 La Publicación de Patente de PCT WO 01/94420 de Itescu, describe un procedimiento para estimular vasculogénesis de tejido dañado por infarto de miocardio en un sujeto que comprende: (a) retirar células madre de una localización en el sujeto; (b) recuperar células progenitoras endoteliales de las células madres; (c) introducir las células progenitoras endoteliales de la etapa (b) en una localización diferente en el sujeto de modo que las precursoras migran a y estimulan la revascularización del tejido. Las células madre pueden retirarse directamente o por movilización. Las células progenitoras endoteliales pueden expandirse antes de la introducción en el sujeto. Se describe un procedimiento para inducir angiogénesis en tejido peri infarto. También se describe un procedimiento para aumentar selectivamente el tráfico de precursores de células endoteliales derivadas de médula ósea humanas al sitio de tejido dañado por lesión isquémica, que comprende: (a) administrar células progenitoras endoteliales a un sujeto; (b) administrar quimiocinas al sujeto de modo que se atraiga de este modo precursores de células endoteliales al tejido isquémico. También se describe un procedimiento para estimular vasculogénesis o angiogénesis del tejido dañado por infarto de miocardio en un sujeto que comprende inyectar células madre alogénicas en un sujeto. También se describe un procedimiento para mejorar la función miocárdica en un sujeto que ha padecido un infarto de miocardio que comprende cualquiera de los presentes procedimientos. También se describe un procedimiento para mejorar la función miocárdica en un sujeto que ha padecido un infarto de miocardio que comprende inyectar G-CSF o anticuerpo anti-CXCR4 en el sujeto para movilizar las células progenitoras endoteliales.

15 La Patente de Estados Unidos 5.199.942 de Gillis, describe un procedimiento para trasplante de células hematopoyéticas autólogas de pacientes que reciben terapia citorrreductora, que incluye: (1) obtener células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea o sangre periférica de un paciente antes de terapia citorrreductora; (2) expandir las células progenitoras hematopoyéticas *ex vivo* con un factor de crecimiento *ex vivo* seleccionado del grupo que consiste en interleucina 3 (IL-3), factor Steel (SF), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), interleucina 1 (IL-1), proteínas de fusión GM-CSF/IL-3 y combinaciones de las mismas, para proporcionar una preparación celular que comprende una población expandida de células progenitoras; y (3) administrar la preparación celular al paciente simultáneamente con o después de terapia citorrreductora. El procedimiento incluye opcionalmente un tratamiento preliminar con factor de crecimiento de reclutamiento para reclutar células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica y un tratamiento posterior con un factor de crecimiento de injerto para facilitar el injerto y proliferación de células progenitoras hematopoyéticas administradas en la preparación celular. La patente también describe una composición de medio de expansión de células progenitoras hematopoyéticas que comprende medio celular, un factor de crecimiento *ex vivo* y suero autólogo.

20 La Patente de Estados Unidos 4.656.130 de Shoshan, describe una placa de crecimiento celular revestida de colágeno que incluye un sustrato revestido con un revestimiento estable de almacenamiento de fibrillas de colágeno. El procedimiento de preparar las placas de crecimiento celular revestidas con colágeno comprende distribuir fibrillas de colágeno biológicamente activas suspendidas en agua destilada en una placa de cultivo tisular. A continuación, se coloca la placa que contiene la suspensión de fibrilla de colágeno en una campana de flujo laminar provista de una corriente de aire estéril y luz ultravioleta. Las fibrillas sedimentan y se adhieren al fondo de la placa, el agua se evapora en la corriente de aire estéril y se retira en la salida de la campana de flujo laminar y la luz ultravioleta asegura que la capa fina resultante de fibrillas de colágeno es estéril y está lista para la inoculación de células vivas. El procedimiento se describe como productor de una placa de crecimiento celular pre revestida conveniente que puede mantener un periodo de caducidad razonable cuando se mantiene a temperatura ambiente sin ninguna reducción significativa en las propiedades de soporte del crecimiento celular.

25 La Patente de Estados Unidos N° 5.932.473 de Swiderek y col., describe un sustrato de cultivo celular que se reviste con una composición que contiene un promotor de adhesión celular en una solución salina. Un sustrato tal como plástico, vidrio o fibras microporosas se reviste con una composición que contiene aproximadamente 5 - 1000 µg/ml de poli-D-lisina en una solución salina de sulfato o citrato 0,005 - 0,5 M. Para proporcionar aproximadamente 50 - 500 µl de la composición por cm² de sustrato. El sustrato revestido se aclara para retirar materiales ajenos y se seca para obtener un sustrato revestido que tiene mayor periodo de validez y/o estabilidad. El sustrato revestido puede esterilizarse aclarando con un medio de esterilización tal como etanol.

30 La Patente de Estados Unidos 6.040.182 de Septak describe procedimientos y materiales para la facilitación de alta capacidad de unión a proteínas en superficies de plástico tratadas con cultivo tisular, tales como, por ejemplo, placas de ensayo de poliestireno.

35 La Patente de Estados Unidos 4.450.231 de Ozkan describe un inmunoensayo de una muestra de un suero o

similares para determinar complejos inmunes. Se describe un procedimiento que incluye producir en una base plástica una capa de un polímero no proteináceo, no iónico que se adherirá a la base plástica y tiene la capacidad de absorber complejos inmunes de la muestra, colocando una muestra de ensayo en la capa y tratando la capa para producir un indicio de la cantidad de complejos inmunes. El polímero puede ser polietilenglicol, dextrano, cloruro de polivinilo, un polioli polimérico o un aducto de polietilenglicol. Un producto para su uso en un ensayo tal es una placa que tiene pocillos o un tubo de ensayo formado de plástico, poliestireno y prefiriéndose cloruro de polivinilo, con una capa de tal capa no iónica no proteinácea sobre los pocillos de la placa o la cavidad del tubo de ensayo.

La Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0229393 de Kutryk y col., describe composiciones y procedimientos para producir un dispositivo médico tal como una endoprótesis vascular, un injerto de endoprótesis vascular, un injerto vascular sintético o válvulas cardíacas, que se revisten con una matriz biocompatible que incorpora anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o moléculas pequeñas, que reconocen, se unen a y/o interaccionan con un antígeno de superficie de célula progenitora para inmovilizar las células en la superficie del dispositivo. El revestimiento en el dispositivo también puede contener un compuesto o factor de crecimiento para promover que la célula endotelial progenitora acelere la adherencia, crecimiento y diferenciación de las células unidas en células endoteliales maduras y funcionales sobre la superficie del dispositivo para evitar hiperplasia de la íntima. Se describen procedimientos para preparar tales dispositivos médicos, composiciones y procedimientos para tratar a un mamífero con enfermedad vascular tal como reestenosis, aterosclerosis u otros tipos de obstrucciones vasculares.

Sumario de la invención

La presente solicitud de patente detalla procedimientos para aislamiento, diferenciación y expansión de células madre de un tejido. Por ejemplo, las células madre pueden incluir células progenitoras endoteliales (CPE). Como alternativa o adicionalmente, el tejido puede incluir sangre periférica humana. Normalmente, las células madre se trasplantan al donante o a otro individuo (por ejemplo, para potenciar la vasculogénesis, angiogénesis y/o neovascularización). La presente solicitud de patente proporciona protocolos para obtener un producto que contiene números apropiados de CPE funcionales. Los procedimientos descritos incluyen: (a) Extracción de subpoblaciones celulares de un tejido; (b) expansión y diferenciación de CPE en un cultivo durante 1-30 días (o 3-30 o 4, 5, 6, 7 u 8 días) en medio de cultivo enriquecido; y/o (c) identificación de componentes celulares del cultivo; (d) implantación de un número apropiado de CPE en un paciente. Debe entenderse que mientras que en algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren específicamente a CPE derivadas de sangre, el alcance de la presente invención incluye técnicas para su uso con células madre derivadas de una diversidad de tejidos corporales, cambiando lo que deba cambiarse.

Para algunas aplicaciones, el procedimiento comprende recoger una muestra de sangre de un donante y/o un paciente, aislar de la muestra células mononucleares de sangre periférica, separar una población de células ricas en CD31 y células progenitoras de la fracción de células mononucleares y cultivar estas células en condiciones que provocarán que las células progenitoras hematopoyéticas presentes en la mezcla de células se diferencien en CPE y proliferen. Esta etapa de expansión *ex vivo* se usa normalmente debido a que el número de CPE en circulación es inferior a 0,1 %. Después de esta etapa de aumento, las células pueden implantarse por inyección en vasos sanguíneos en el órgano diana, tales como los vasos coronarios o en el miocardio de un paciente.

Se proporciona por lo tanto un procedimiento para su uso con sangre extraída, incluyendo:

40 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

45 Aplicar las células sanguíneas al primer gradiente incluye aplicar las células sanguíneas a un gradiente que incluye copolímeros de sacarosa y epiclorohidrina tal como Ficoll-Paque Plus (TM) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) o Lymphoprep (TM) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) o que pueden obtenerse de otra fuente. En una realización, el gradiente de densidad lo prepara *in situ* un técnico.

50 Aplicar las células del primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células del primer pase a un gradiente, que incluye una solución acuosa de Iodixanol tal como OptiPrep (TM) o Nycodenz (TM) (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega).

Aplicar las células del primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células del primer pase a un gradiente, incluyendo coloides de sílice revestidos de polivinilpirrolidona tales como Percoll (TM) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

55 Se proporciona adicionalmente un procedimiento para su uso con células madre extraídas, incluyendo:

aplicar tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

5 aplicar las células del segundo pase a un tercer gradiente adecuado para seleccionar células de tercer pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml; y

augmentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml, cultivando las células de tercer pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

10 El tercer gradiente es adecuado para seleccionar células que tienen una densidad entre 1,059 y 1,068 g/ml y en el que aplicar las células del segundo pase al tercer gradiente incluye seleccionar las células que tienen una densidad entre 1,059 y 1,068 g/ml.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células del primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

15 aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; e

incubar las células del segundo pase en una superficie que incluye (por ejemplo revestida con) plasma y/o un anticuerpo.

Se proporciona adicionalmente un procedimiento para su uso con sangre extraída que incluye:

20 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; e

25 incubar las células del segundo pase en una superficie que incluye una molécula potenciadora del crecimiento distinta de colágeno o fibronectina.

Incubar las células del segundo pase incluye incubar las células del segundo pase en una superficie que incluye, además de la molécula potenciadora del crecimiento al menos uno de: colágeno y fibronectina.

Se proporciona adicionalmente un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

30 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

cultivar las células del segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye hasta un 5 % de suero (por ejemplo, sin suero, menos del 1 % de suero o entre el 1 y 5 el % de suero).

35 Aún se proporciona adicionalmente un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

40 cultivar las células del segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye más de o igual al 10 % de suero.

Cultivar las células del segundo pase incluye cultivar las células del segundo pase en un medio de cultivo que incluye menos del 20 % de suero.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

45 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

durante un periodo de tiempo de suero bajo, cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye menos del 10 % de suero; y

- 5 durante un periodo de tiempo de suero alto, cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye más del 10 % de suero.

Cultivar las células del segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células del segundo pase durante un tiempo de entre 1 y 5 días.

- 10 Cultivar las células del segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto incluye cultivar las células del segundo pase durante un tiempo de entre 1 y 30 días.

Cultivar las células del segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza antes de cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto.

Cultivar las células del segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza después de cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto.

- 15 Se proporciona adicionalmente un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

- 20 durante un periodo de tiempo hipóxico y/o hipercápnico (H/H) que dura al menos 2 horas, cultivar las células del segundo pase en condiciones H/H; y

durante un periodo de tiempo no H/H que dura al menos 1 día, cultivar las células del segundo pase en condiciones no H/H.

- 25 En el contexto de la presente solicitud de patente y en las reivindicaciones, el término hipercapnia se refiere a una concentración de CO₂ que es mayor del 5 %.

Los periodos de tiempo H/H y no H/H están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y cultivar las células del segundo pase en condiciones H/H incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H durante los primeros dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 30 Los periodos de tiempo H/H y no H/H están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H durante los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

Los periodos de tiempo H/H y no H/H están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H durante al menos dos horas entre los primeros dos días y los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 35 Cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H se realiza antes de cultivar las células de segundo pase en condiciones no H/H.

Cultivar las células de segundo pase en condiciones H/H se realiza después de cultivar las células de segundo pase en condiciones no H/H.

Se proporciona además un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 40 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

- 45 cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye al menos uno de los siguientes: eritropoyetina, VEGF, IGF, FGF, una molécula de la familia de los estrógenos (por ejemplo, 17-β-estradiol, estrona, estriol, un derivado de estradiol, valerato de estradiol, cipionato de estradiol, mestranol, quinestrol), una molécula de la familia de la progestina (por ejemplo, progesterona, carato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona), una estatina (por ejemplo, Simvastatina, Atorvastatina) y un agente antidiabético (por ejemplo, Rosiglitazona).

El agente antidiabético incluye Rosiglitazona y cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye Rosiglitazona.

La estatina incluye Simvastatina o Atorvastatina y cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye Simvastatina o Atorvastatina.

- 5 Las moléculas hormonales de las familias de estrógeno y progestina incluyen 17- β -estradiol y progesterona y cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye 17- β -estradiol y/o progesterona.

10 Las moléculas hormonales de las familias del estrógeno y la progestina incluyen 17- β -estradiol y progesterona y cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye 17- β -estradiol y al que se añade progesterona después de un cierto periodo.

Las moléculas hormonales de las familias del estrógeno y la progestina incluyen 17- β -estradiol y progesterona y cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye progesterona y al que se añade 17- β -estradiol después de un cierto periodo.

Se proporciona además adicionalmente un procedimiento para su uso con células madre extraídas, que incluye:

- 15 aplicar tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

- 20 aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,059 y 1,068 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

El procedimiento incluye extraer las células madre de médula ósea.

El procedimiento incluye movilizar las células madre de médula ósea para facilitar la extracción de las células madre.

El procedimiento incluye extraer las células madre de sangre, sangre del cordón umbilical, un embrión, un feto o una placenta.

- 25 Cultivar las células de segundo pase incluye:

cultivar las células de segundo pase en un primer recipiente durante una primera parte del periodo;

retirar al menos algunas de las células de segundo pase del primer recipiente al final de la primera parte del periodo; y

- 30 cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del periodo, las células retiradas del primer recipiente.

Retirar las al menos algunas de las células de segundo pase incluye seleccionar para retirada células que se adhieren a una superficie del primer recipiente.

Retirar las al menos algunas de las células de segundo pase incluye seleccionar para retirada células que no se adhieren a una superficie del primer recipiente.

- 35 El primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y cultivar las células en el primer recipiente incluye cultivar las células en el primer recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

40 El segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y cultivar las células en el segundo recipiente incluye cultivar las células en el segundo recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

La molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: plasma (que puede ser autólogo, alogénico o xenogénico), colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de célula madre.

Se proporciona por lo tanto un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 45 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase

que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

augmentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e identificar células progenitoras endoteliales en las células cultivadas.

- 5 Aplicar la sangre al primer gradiente incluye aplicar la sangre a una solución que incluye un copolímero de sacarosa y epiclorohidrina.

Aplicar las células de primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células de primer pase a una solución acuosa de iodixanol.

- 10 Aplicar las células de primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células de primer pase a una solución de densidad gradual que incluye coloides de sílice revestidos de polivinilpirrolidona.

Aplicar las células sanguíneas al primer gradiente incluye aplicar las células sanguíneas a un gradiente de tipo Ficoll.

Aplicar las células de primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células de primer pase a un gradiente de tipo OptiPrep.

- 15 Aplicar las células de primer pase al segundo gradiente incluye aplicar las células de primer pase a un gradiente de tipo Precoll.

También se proporciona un procedimiento para su uso con células madre extraídas, que incluye:

aplicar tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

- 20 aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

aplicar las células de segundo pase a un tercer gradiente adecuado para seleccionar células de tercer pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml;

- 25 aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml, cultivando las células de tercer pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e identificar las células progenitoras endoteliales en las células cultivadas.

El tercer gradiente es adecuado para seleccionar células que tienen una densidad entre 1,059 y 1,068 g/ml y en el que aplicar las células de segundo pase al tercer gradiente incluye seleccionar las células que tienen una densidad entre 1,059 y 1,068 g/ml.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 30 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

- 35 cultivar las células de segundo pase en una superficie que incluye plasma; e identificar células progenitoras en la células cultivadas.

Cultivar incluye cultivar las células de segundo pase en la superficie, cuando la superficie está revestida con plasma autólogo.

Cultivar incluye cultivar las células de segundo pase en la superficie, cuando la superficie está revestida con al menos un plasma seleccionado de la lista que consiste en: plasma alogénico y plasma xenogénico.

- 40 También se proporciona un procedimiento para su uso con tejido, que incluye:

cultivar el tejido en una superficie que incluye plasma.

El tejido incluye sangre. El plasma incluye plasma autólogo.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 45 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

cultivar las células de segundo pase en una superficie que incluye un anticuerpo; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

- 5 Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.

Cultivar incluye cultivar las células de segundo pase en la superficie, cuando la superficie está revestida con plasma autólogo.

- 10 Cultivar incluye cultivar las células de segundo pase en la superficie, cuando la superficie está revestida con al menos un plasma seleccionado de la lista que consiste en: plasma alogénico y plasma xenogénico.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

- 15 aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

cultivar las células de segundo pase en una superficie que incluye una molécula potenciadora del crecimiento distinta de colágeno o fibronectina; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

- 20 Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.

Cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en una superficie que incluye, además de la molécula potenciadora del crecimiento al menos uno de: colágeno y fibronectina.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 25 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

cultivar las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye hasta el 5 % de suero; e

- 30 identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 35 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

cultivar las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye más del 10 % de suero; e

- 40 identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Cultivar las células de segundo pase incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye menos del 20 % de suero.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída que incluye:

- 45 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

- aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
- durante un periodo de tiempo de suero bajo, cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye menos del 10 % de suero;
- 5 durante un periodo de tiempo de suero alto, cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye más del o igual al 10 % de suero; e
- identificar células progenitoras en las células cultivadas.
- Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye hasta el 5 % de suero.
- 10 Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células de segundo pase en un medio de cultivo sin suero.
- Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células de segundo pase durante un tiempo de entre 1 y 5 días.
- 15 Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto incluye cultivar las células de segundo pase durante un tiempo de entre 1 y 30 días.
- Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza antes de cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto.
- Cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza después de cultivar las células de segundo pase durante el periodo de tiempo de suero alto.
- 20 También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:
- aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;
- aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
- 25 durante un periodo de tiempo hipóxico que dura al menos 2 horas, cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas;
- durante un periodo de tiempo no hipóxico que dura al menos 1 día, cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipóxicas; e
- identificar células progenitoras en las células cultivadas.
- 30 Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.
- Los periodos de tiempo hipóxicos y no hipóxicos están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas durante los primeros dos días del periodo de tiempo de cultivo.
- 35 Los periodos de tiempo hipóxicos y no hipóxicos están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas durante los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.
- Los periodos de tiempo hipóxicos y no hipóxicos están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas durante al menos dos horas entre los primeros dos días y los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.
- 40 Cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas se realiza antes de cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipóxicas.
- Cultivar las células de segundo pase en condiciones hipóxicas se realiza después de cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipóxicas.
- 45 También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:
- aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado;

aumentar el número de células que tienen un segundo intervalo de densidad deseado cultivando las células seleccionadas en un medio que incluye estrógenos y posteriormente en un medio que incluye una progestina; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 5 aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado; aumentar el número de células que tienen un segundo intervalo de densidad deseado cultivando las células seleccionadas en un medio que incluye una progestina y posteriormente en un medio que incluye estrógeno; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 10 aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado; aumentar el número de células que tienen un segundo intervalo de densidad deseado cultivando las células seleccionadas en un medio que incluye estrógeno y una progestina; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

La progestina incluye progesterona.

- 15 El estrógeno incluye estradiol.

Cultivar incluye cultivar durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 20 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml; aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; durante un periodo de tiempo hipercápnico que dura al menos 2 horas, cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas, caracterizado el periodo de tiempo hipercápnico por un nivel de CO₂ mayor del 5 %; durante un periodo de tiempo no hipercápnico que dura al menos 1 día, cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipercápnicas, caracterizado el periodo de tiempo no hipercápnico por un nivel de CO₂ menor o igual al 5 %; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Establecer el nivel de CO₂ durante el periodo de tiempo hipercápnico para que sea al menos del 6 %.

- 30 Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas durante los primeros dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 35 Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas durante los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas durante al menos 2 horas entre los primeros dos días y los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 40 Cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas se realiza antes de cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipercápnicas.

Cultivar las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas se realiza después de cultivar las células de segundo pase en condiciones no hipercápnicas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 45 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una

densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

5 cultivar las células de segundo pase durante en un medio de cultivo que incluye al menos un agente seleccionado de la lista que consiste en: eritropoyetina, VEGF, IGF, FGF, estrógeno, 17-β-estradiol, estrona, estriol, un derivado de estradiol, valerato de estradiol, cipionato de estradiol, mestranol, quinestrol, progestina, una molécula de la familia de progestina, progesterona, progesterona sintética, carato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, una estatina, simvastatina, atorvastatina, un agente antidiabético y rosiglitazona; e

10 identificar células progenitoras en las células cultivadas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con células madre extraídas, que incluye:

aplicar tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

15 aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Aplicar el tejido incluye aplicar sangre del cordón umbilical al primer gradiente.

20 Aplicar el tejido incluye aplicar células embrionarias al primer gradiente.

Aplicar el tejido incluye aplicar células placentarias al primer gradiente.

Aplicar el tejido incluye aplicar células fetales al primer gradiente.

Extraer las células madre de médula ósea.

Movilizar las células madre de médula ósea para facilitar la extracción de las células madre.

25 Extraer las células madre de sangre periférica.

Cultivar las células de segundo pase incluye:

cultivar las células de segundo pase en un primer recipiente durante una primera parte del periodo;

retirar al menos algunas de las células de segundo pase del primer recipiente al final de la primera parte del periodo; y

30 cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del periodo, las células retiradas del primer recipiente.

Retirar las al menos algunas células de segundo pase incluye seleccionar para retirada células que se adhieren a una superficie del primer recipiente.

35 Retirar las al menos algunas de las células de segundo pase incluye seleccionar para retirada células que no se adhieren a una superficie del primer recipiente.

El primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y en el que cultivar las células en el primer recipiente incluye cultivar las células en el primer recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

40 La molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: plasma, colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de célula madre.

El segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y en la que cultivar las células en el segundo recipiente incluye cultivar las células en el segundo recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

45 La molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: plasma, colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de célula madre.

5 También se proporciona un procedimiento para tratar una afección, que incluye aplicar células progenitoras endoteliales (CPE) a las cercanías del tejido o un espacio de un sujeto seleccionado de la lista que consiste en: tejido de un nervio periférico del sujeto, tejido de un nervio del sistema nervioso central del sujeto, un nervio óptico del sujeto, tejido coroidal del sujeto, tejido retinal del sujeto, espacio subretinal del sujeto, tejido corneal de un sujeto, tejido renal del sujeto, tejido de un hueso dañado del sujeto, tejido del hueso fracturado del sujeto, tejido inflamado del sujeto, tejido infectado del sujeto, tejido contusionado del sujeto, tejido dañado, ulcerado o herido de piel, tejido cerebral del sujeto, tejido de una extremidad del sujeto, tejido de un injerto de piel y tejido de un miembro amputado reimplantado del sujeto.

El procedimiento incluye generar las CPE:

10 aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

15 aumentando el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

El procedimiento incluye generar las CPE:

aplicando tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

20 aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

aplicando las células del segundo pase a un tercer gradiente adecuado para seleccionar células de tercer pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml; y

aumentando el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,068 g/ml, cultivando las células del tercer pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

25 El procedimiento incluye generar las CPE:

aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

30 cultivando las células de segundo pase en una superficie que incluye un anticuerpo.

El procedimiento incluye generar las CPE:

aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

35 aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

cultivando las células de segundo pase en una superficie que incluye una molécula potenciadora del crecimiento distinta de colágeno o fibronectina.

El procedimiento incluye generar las CPE:

40 aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye hasta el 5 % de suero.

45 El procedimiento incluye generar las CPE:

aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye más del 10 % de suero.

5 El procedimiento incluye generar las CPE:

aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

10 durante un periodo de tiempo de suero bajo, cultivando las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye menos del 10 % de suero; y

durante un periodo de tiempo de suero alto, cultivando las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye más del o igual al 10 % de suero.

El procedimiento incluye generar las CPE:

15 aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

20 durante un periodo de tiempo hipóxico que dura al menos 2 horas, cultivando las células de segundo pase en condiciones hipóxicas; y

durante un periodo de tiempo no hipóxico que dura al menos 1 día, cultivando las células de segundo pase en condiciones no hipóxicas.

El procedimiento incluye generar las CPE:

25 aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;

30 durante un periodo de tiempo hipercápnico que dura al menos 2 horas, cultivando las células de segundo pase en condiciones hipercápnicas, caracterizado el periodo de tiempo hipercápnico por un nivel de CO₂ mayor del 5 %; y

durante un periodo de tiempo no hipercápnico que dura al menos 1 día, cultivando las células de segundo pase en condiciones no hipercápnicas, caracterizado el periodo de tiempo no hipercápnico por un nivel de CO₂ menor o igual al 5 %.

El procedimiento incluye generar las CPE:

35 aplicando sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

40 cultivando las células de segundo pase en un medio de cultivo que incluye al menos un agente seleccionado de la lista que consiste en: eritropoyetina, estrógeno, una molécula de la familia del estrógeno, 17-β-estradiol, estrona, estriol, un derivado de estradiol, valerato de estradiol, cipionato de estradiol, mestranol, quinestrol, progestina, una molécula de la familia de la progestina, progesterona, progesterona sintética, carato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, una estatina, simvastatina, atorvastatina, un agente antidiabético y rosiglitazona,

45 aplicando el tejido que incluye las células madre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;

aplicando las células de primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml; y

aumentando el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 5 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;
- aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
- 10 aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml, cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 30 días; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- 15 aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;
- dividir las células del primer pase en primera y segunda partes respectivas de las mismas;
- aplicar la primera parte de las células de primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
- 20 mezclar la segunda parte de las células de primer pase con las células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
- aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Dividir las células de primer pase incluye establecer la primera parte para que sea mayor que la segunda parte.

- 25 Dividir las células de primer pase incluye establecer la primera parte para que sea menor que la segunda parte.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

- aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado;
- aumentar el número de células que tienen un segundo intervalo de densidad deseado cultivando las células seleccionadas durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e
- 30 identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar sangre a un gradiente adecuado para seleccionar células que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar sangre a un gradiente adecuado para seleccionar células que tengan una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml.

- 35 Aumentar el número de células incluye cultivar las células durante un periodo que dura entre 4 y 8 días.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a una solución que incluye un copolímero de sacarosa y epiclorohidrina.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a una solución de densidad gradual que incluye coloides de sílice revestidos con polivinilpirrolidona.

- 40 Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a una solución acuosa de iodixanol.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a un gradiente de tipo Ficoll.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a un gradiente de tipo OptiPrep.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar la sangre a un gradiente Percoll.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar la sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

cultivar las células seleccionadas durante un periodo que dura entre 3 y 30 días en una superficie que incluye plasma autólogo; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

5 También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

cultivar las células seleccionadas en una superficie que incluye un anticuerpo; e identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Cultivar incluye cultivar las células en la superficie, cuando la superficie está revestida con plasma autólogo.

10 Cultivar incluye cultivar las células en la superficie, cuando la superficie está revestida con al menos un plasma seleccionado de la lista que consiste en: plasma alogénico y plasma xenogénico.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

15 cultivar las células seleccionadas en una superficie que incluye una molécula potenciadora del crecimiento distinta de colágeno o fibronectina; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Cultivar las células incluye cultivar las células en una superficie que incluye, además de la molécula potenciadora de crecimiento, al menos uno de: colágeno y fibronectina.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

20 aplicar la sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

cultivar las células seleccionadas durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye hasta el 5 % de suero; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

25 aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

cultivar las células seleccionadas durante un periodo que dura entre 1 y 5 días en un medio de cultivo que incluye más del 10 % de suero; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Cultivar las células incluye cultivar las células en un medio de cultivo que incluye menos del 20 % de suero.

30 También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

durante un periodo de tiempo de suero bajo, cultivar las células seleccionadas en un medio de cultivo que incluye menos del 10 % de suero;

35 durante un periodo de tiempo de suero alto, cultivar las células seleccionadas en un medio de cultivo que incluye más del o igual al 10 % de suero; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células en un medio de cultivo que incluye hasta el 5 % de suero.

40 Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células en un medio de cultivo sin suero.

Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero bajo incluye cultivar las células durante un tiempo entre 1 y 5 días.

Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero alto incluye cultivar las células durante un tiempo entre 1 y 30 días.

Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza antes de cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero alto.

- 5 Cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero bajo se realiza después de cultivar las células durante el periodo de tiempo de suero alto.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar la sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

- 10 durante un periodo de tiempo hipóxico que dura al menos 2 horas, cultivar las células seleccionadas en condiciones hipóxicas;

durante un periodo de tiempo no hipóxico que dura al menos 1 día, cultivar las células seleccionadas en condiciones no hipóxicas; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

- 15 Los periodos de tiempo hipóxico y no hipóxico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células en condiciones hipóxicas durante los primeros dos días del periodo de tiempo del cultivo.

Los periodos de tiempo hipóxico y no hipóxico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células en condiciones hipóxicas durante los últimos dos días del periodo de tiempo del cultivo.

- 20 Los periodos de tiempo hipóxico y no hipóxico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células en condiciones hipóxicas incluye cultivar las células en condiciones hipóxicas durante al menos 2 horas entre los primeros dos días y los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

Cultivar las células en condiciones hipóxicas se realiza antes de cultivar las células en condiciones no hipóxicas.

Cultivar las células en condiciones hipóxicas se realiza después de cultivar las células en condiciones no hipóxicas.

- 25 También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un intervalo de densidad deseado;

durante un periodo de tiempo hipercápnico que dura al menos 2 horas, cultivar las células seleccionadas en condiciones hipercápnicas, caracterizándose el periodo de tiempo hipercápnico por un nivel de CO₂ mayor del 5 %;

- 30 durante un periodo de tiempo no hipercápnico que dura al menos 1 día, cultivar las células seleccionadas en condiciones no hipercápnicas, caracterizado el periodo de tiempo no hipercápnico por un nivel de CO₂ menor del o igual al 5 %; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

- 35 El procedimiento incluye establecer el nivel de CO₂ durante el periodo de tiempo hipercápnico para que sea de al menos el 6 %.

Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células en condiciones hipercápnicas durante los primeros dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 40 Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días, y en el que cultivar las células en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células en condiciones hipercápnicas durante los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

Los periodos de tiempo hipercápnico y no hipercápnico están dentro de un periodo de tiempo de cultivo que dura menos de 30 días y en el que cultivar las células en condiciones hipercápnicas incluye cultivar las células en condiciones hipercápnicas durante al menos dos horas entre los primeros dos días y los últimos dos días del periodo de tiempo de cultivo.

- 45 Cultivar las células en condiciones hipercápnicas se realiza antes de cultivar las células en condiciones no hipercápnicas.

Cultivar las células en condiciones hipercápnicas se realiza después de cultivar las células en condiciones no hipercápnicas.

También se proporciona un procedimiento para su uso con sangre extraída, que incluye:

aplicar sangre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado;

5 cultivar las células seleccionadas en un medio de cultivo que incluye al menos un agente seleccionado de la lista que consiste en: VEGF, IGF, FGF, eritropoyetina, estrógeno, una molécula de la familia de estrógeno, 17-β-estradiol, estrona, estriol, un derivado de estradiol, valerato de estradiol, cipionato de estradiol, mestranol, quinestrol, progestina, una molécula de la familia de la progestina, progesterona, progesterona sintética, carato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, una estatina, simvastatina, atorvastatina, un agente antidiabético y rosiglitazona; e

10 identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Las células progenitoras incluyen células progenitoras endoteliales (CPE) y en las que identificar las células progenitoras incluye identificar las CPE.

15 Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar sangre a un gradiente adecuado para seleccionar células que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml.

Aplicar la sangre al gradiente incluye aplicar sangre a un gradiente adecuado para seleccionar células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,077 g/ml.

También se proporciona un procedimiento para su uso con células madre extraídas, que incluye:

20 aplicar tejido que incluye las células madre a un gradiente para seleccionar células que tienen un primer intervalo de densidad deseado;

aumentar el número de células que tienen un segundo intervalo de densidad deseado, cultivando las células seleccionadas durante un periodo que dura entre 3 y 30 días; e

identificar células progenitoras en las células cultivadas.

Aplicar el tejido incluye aplicar sangre de cordón umbilical al gradiente.

25 Aplicar el tejido incluye aplicar células embrionarias al gradiente.

Aplicar el tejido incluye aplicar células fetales al gradiente.

Aplicar el tejido incluye aplicar células placentarias al gradiente.

El procedimiento incluye extraer las células madre de la médula ósea.

30 El procedimiento incluye movilizar las células madre de la médula ósea para facilitar la extracción de las células madre.

El procedimiento incluye extraer las células madre de sangre.

El procedimiento incluye cultivar las células, que incluye:

cultivar las células en un primer recipiente durante una primera parte del periodo;

retirar al menos algunas de las células del primer recipiente al final de la primera parte del periodo; y

35 cultivar, en un segundo recipiente durante una segunda parte del periodo, las células retiradas del primer recipiente.

El procedimiento incluye retirar las al menos algunas de las células seleccionado para su retirada las células que se adhieren a una superficie del primer recipiente.

40 Retirar las al menos algunas de las células incluye seleccionar para su retirada células que no se adhieren a una superficie del primer recipiente.

El primer recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y en el que cultivar las células en el primer recipiente incluye cultivar las células en el primer recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

45 La molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: plasma, colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de célula madre.

El segundo recipiente incluye en una superficie del mismo una molécula potenciadora del crecimiento y en el que cultivar las células en el segundo recipiente incluye cultivar las células en el segundo recipiente que incluye la molécula potenciadora del crecimiento.

- 5 La molécula potenciadora del crecimiento se selecciona de la lista que consiste en: plasma, colágeno, fibronectina, un factor de crecimiento y un anticuerpo para un receptor de superficie de célula madre.

Descripción detallada de las realizaciones

10 Se proporciona un procedimiento para aislar, diferenciar y cultivar células progenitoras endoteliales (CPE) de sangre periférica humana. Las CPE normalmente se implantan en un paciente para inducir vasculogénesis, angiogénesis y/o neovascularización. Normalmente, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) separadas por un gradiente de densidad tal como Ficoll se enriquecen adicionalmente mediante uno o más gradientes de densidad (tales como Percoll, OptiPrep o Nycodenz) y se permite después que se adhieran a placas de cultivo tisular. Las células se cultivan normalmente durante 3-30 días en un medio de cultivo enriquecido. En varios puntos temporales durante el periodo de cultivo, se toman muestras para evaluación fenotípica. Las células expandidas se recogen y se guardan hasta implantación en el paciente.

15 Se describen una serie de protocolos a continuación en el presente documento que pueden usarse de forma separada o en combinación, según sea apropiado, de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Debe apreciarse que se proporcionan valores numéricos como ilustración y no como limitación. Normalmente, pero no necesariamente, cada valor mostrado es un ejemplo seleccionado de un intervalo de valores que está dentro del 25 % del valor mostrado. De forma similar, aunque se describen ciertas etapas con un alto nivel de especificidad, un experto en la materia apreciará que pueden realizarse otras etapas, cambiando lo que deba cambiarse.

Protocolo para revestimiento de placa de cultivo tisular

25 Pueden revestirse recipientes adecuados, tales como placas de cultivo, con una o una combinación de moléculas potenciadoras del crecimiento de CPE. Las moléculas pueden comprender anticuerpos para receptores de superficie de células progenitoras tales como CD34, CD133, Tie-2, VEGFR-2 (KDR), CD144 o moléculas tales como LDL, VEGF, FGF, IGF o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Ejemplo 1: Revestir matraces T-75 con plasma autólogo

Para 20 matraces T-75: Preparar el día de la preparación celular

30 El revestimiento de superficie de matraces T-75 con el plasma puede realizarse usando plasma autólogo retirado de la muestra tisular centrifugada o, como alternativa, con plasma de una fuente diferente, tal como plasma disponible en el mercado de Chemicon de Temecula, CA, Estados Unidos.

Recoger plasma de la fracción superior de tubos de Ficoll.

Llenar cada matraz con 2-5 ml de plasma.

Incubar a 37 °C durante al menos 30 minutos.

Descartar el plasma.

35 Lavar el matraz dos veces en 10 ml de PBS.

Los matraces están listos para su uso.

Ejemplo 2: Revestir matraces T-75 con Fibronectina 25 µg/ml:

Para 20 matraces T-75: Preparar (a) el día de la preparación celular o (b) un día antes del día de la preparación celular.

40 Preparar 50 ml de solución de Fibronectina 25 µg/ml en PBS.

Añadir 250 µl de Fibronectina 5 mg/ml a 50 ml de PBS.

Llenar cada matraz con 2-5 ml de Fibronectina 25 µg/ml.

Incubar a 37 °C durante al menos 30 minutos.

Recoger la solución de Fibronectina.

45 La solución de Fibronectina puede volver a usarse si se almacena en tubos estériles de 50 ml a 4 °C, normalmente durante hasta 1 semana.

Lavar el matraz dos veces en PBS.

Mantener los matraces secos a temperatura ambiente.

Los matraces secos pueden guardarse durante una semana a temperatura ambiente (TA).

Ejemplo 3: Revestir matraces T-75 con Fibronectina y anti-CD34 5 µg/ml:

- 5 Para 20 matraces T-75: Preparar (a) el día de la preparación celular o (b) un día antes del día de la preparación celular.

Revestir los matraces con Fibronectina, como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Preparar 25 ml de solución Anti-CD34 5 µg/ml en PBS.

Añadir 125 µl de anti-CD34 1 mg/ml a 25 ml de PBS.

- 10 Llenar cada matraz con 5 ml de anti-CD34 5 µg/ml.

Incubar durante 2 h a 37 °C o durante una noche a 4 °C.

Retirar la solución de anticuerpo.

Lavar el matraz dos veces en PBS.

Los matraces están listos para su uso.

15 **Preparación Celular**

Mezclar la sangre invirtiendo suavemente la bolsa de sangre arriba y abajo.

Transferir sangre de la bolsa a un bote estéril de 500 ml.

Cargar la sangre en un gradiente de Ficoll.

Llenar los tubos con sangre hasta 50 ml.

- 20 Centrifugar los tubos durante 20 minutos a 1050 g a temperatura ambiente sin freno.

Recoger la mayor parte del plasma de la capa superior en tubos vacíos de 50 ml.

Recoger la fracción de anillo de glóbulos blancos (por ejemplo, las CMSP) de cada tubo.

Transferir cada CMSP a un nuevo tubo de 50 ml, prellenado con 15-20 ml de PBS.

Ajustar el volumen a 30 ml por tubo usando PBS.

- 25 Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 580 g, a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante.

Mezclar suavemente el sedimento celular y resuspender con 1-5 ml de PBS.

Combinar los contenidos de cada cuatro tubos en un tubo de 50 ml y llenar ese tubo hasta 50 ml con PBS.

Por ejemplo:

(1) Preparar gradiente OptiPrep de 1,072 g/ml.

- 30 Para 36 ml de gradiente OptiPrep de 1,072 g/ml

Preparar gradiente de 1,072 g/ml mezclando juntos: (i) 25 ml de solución de albúmina de suero bovino o humano 0,5 %, NaCl 0,8 %, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM (tamponado a pH 7,4) con (ii) 11 ml de mezcla de 10 ml de solución de OptiPrep + 5 ml de solución de albúmina de suero bovino o humano 0,5 %, NaCl 0,8 %, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM (tamponado a pH 7,4).

- 35 Mezclar: (a) 10 ml de células derivadas de las etapas de Preparación Celular descritas anteriormente con (b) 10 ml de mezcla de 10 ml de solución de OptiPrep + 5 ml de solución de albúmina de suero bovino o humano 0,5 %, NaCl 0,8 %, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM (tamponado a pH 7,4).

- 40 Colocar sobre la mezcla de (a) y (b) 20 ml del gradiente de OptiPrep de 1,072 g/ml preparado en las etapas (i) y (ii) y colocar sobre esto 1,5 ml de solución de albúmina de suero bovino o humano 0,5 %, NaCl 0,8 %, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM (tamponado a pH 7,4).

Centrifugar durante 30 minutos a 700 g, por ejemplo, a temperatura ambiente o 4 °C, sin freno.

Recoger las células aisladas de la interfaz entre el gradiente y la solución de albúmina de suero bovino 0,5 %, NaCl 0,8 %, Hepes 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4.

Centrifugar 10 minutos a 395 g, a temperatura ambiente.

- 5 Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 10 ml de medio de cultivo.

(2) Preparar gradiente de Percoll para densidad celular de 1,060-1,068 g/ml

Por ejemplo, para 30 ml de preparación de gradiente de Percoll continua mezclar en un tubo de 50 ml: 13,5 ml de Percoll (Amersham)

15,0 ml de modificación de Agitador MEM

- 10 1,5 ml de solución de sales de Earle 10x

Centrifugar 10 minutos a 14000 x g sin frenos en un rotor de ángulo fijo.

Tomar cuidadosamente el gradiente fuera del rotor. El gradiente está ahora listo para usar.

El tubo debería poder resistir la centrifugación a 14000 x g. Aplicar todas las células en el gradiente de Percoll.

Centrifugar 30 minutos a 400 x g sin frenos.

- 15 Recoger CMSP enriquecidas y transferirlas a un tubo de 50 ml.

Llenar el tubo con PBS, centrifugar 10 minutos a 300 x g.

Resuspender en 50 ml de PBS, centrifugar 10 minutos a 200 x g.

Resuspender en 50 ml de PBS, centrifugar 10 minutos a 200 x g.

Tomar una muestra de 50 µg para conteo celular

- 20 **Preparación de Suero**

Puede obtenerse suero directamente del plasma coagulado del paciente (suero "del coágulo") o prepararse a partir de plasma generado de sangre pretratada con un anticoagulante.

Por ejemplo, para preparación de suero a partir de sangre pretratada con un anticoagulante:

- 25 Tomar plasma que se recogió de la fracción superior de los tubos de Ficoll (Véase la descripción anterior de Preparación Celular).

Para cada 50 ml de plasma, añadir 1,2 ml de CaCl₂·2H₂O 0,8 M o cualquier otro inductor de coagulación biológico/químico tal como Cloruro Cálcico, Tromboplastina, péptidos agonistas de Trombina u otros para catalizar el mecanismo de coagulación.

Incubar durante 0,5-4 horas a 37 °C.

- 30 Centrifugar el plasma coagulado durante 10 minutos a 3500 g.

Recoger el suero en un nuevo tubo. No permitir que el coágulo se mezcle con el suero.

Usar suero recogido para preparación de medio o recoger en alícuotas y guardar a -20 °C hasta su uso.

Conteo Celular

Prellenar cuatro placas de 96 pocillos con 50 µl de azul de Tripano (TB) cada uno.

- 35 Hacer diluciones 1:5 por transferencia de 20 µl de muestra de células a un pocillo que contenga TB y mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.

Cargar 10 µl de células diluidas en cada una de las 2 cámaras del hemocitómetro.

Contar células transparentes (viables) y azules (muertas) que quedan en los 25 cuadrados de las cámaras superior e inferior.

- 40 Si se cuentan menos de 10 células, realizar una dilución 1:2 por transferencia de 50 µl de muestra de células a 50 µl

de TB.

Si se cuentan más de 200 células, realizar una dilución 1:25 por transferencia de 20 µl de suspensiones 1:5 a un pocillo que contiene TB y mezclar suavemente pipeteando arriba y abajo.

Calcular el número de células para cada cámara de acuerdo con la siguiente ecuación:

- 5 N° de células viable x 10.000 x Factor de dilución = N° de células viable /ml
 N° de células muertas x 10.000 x Factor de dilución = N° de células muertas /ml
 % de células muertas = N° de células muertas/(N° de células viables + N° de células muertas) x 100
 % de células muertas normalmente no debería exceder el 30 %.
 Calcular el número de células medio.
- 10 Registrar los resultados del conteo.
 Resumir los números de células finales y el rendimiento de células/ml de sangre.

Preparación del Medio

Calcular el volumen de medio necesario.

Preparar el medio de cultivo.

- 15 El medio debería contener el 1-20 % de suero autólogo.
 El medio puede contener los siguientes aditivos en diversas concentraciones de 0,5 pg/ml - 1ng/ml o 1 ng/ml - 100 µg/ml, por ejemplo, EPO (0,01-10 UI/ml), IGF(1-100 ng/ml), FGF 10-100ng/ml, VEGF (0,5-20 ng/ml); Heparina 5-100 UI/ml; diferentes moléculas dependiendo de su peso y de la molaridad deseada pueden variar de pg- µg o la molaridad correspondiente: moléculas de Estatina (por ejemplo simvastatina 5-500 µg/ml), agentes antidiabéticos (por ejemplo, Rosiglitazona 5-500 µg/ml) y/o hormonas esteroides tales como un estrógeno (por ejemplo, 17-β-estradiol (2-2000 ng/ml) y una progestina (por ejemplo progesterona 2-2000 ng/ml) y combinaciones de los mismos.

- 25 Se ha planteado la hipótesis de que las hormonas del sistema reproductor esteroides (por ejemplo, estrógenos y progestinas) ejercen su efecto elevando los niveles en sangre de CPE. Por lo tanto, aplicar tales moléculas o cualquier combinación de las mismas puede aumentar el rendimiento de la producción o la diferenciación de las progenitoras en CPE *in vitro*, particularmente cuando se someten células de sangre periférica a sus efectos.

Ejemplo para Medio de Bajo % de Suero

Para 100 ml de medio añadir:

- 2 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)
- 30 100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
- 5 ml de Suero Autólogo
- 94,9 ml de medio sin suero

Ejemplo 1 para Medio de Alto % de Suero

Para 100 ml de medio añadir:

- 35 2 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)
- 100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
- 20 ml de Suero Autólogo
- 79,9 ml de medio sin suero

Ejemplo 2 para Medio de Alto % de Suero

- 40 Para 100 ml de medio añadir:
 5 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)

100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
 4 µl de Progesterona 5 mg/ml (concentración final de 0,2 µg/ml)
 10 ml de Suero Autólogo
 89,9 ml de medio sin suero

5 *Ejemplo 3 para Medio de Alto % de Suero*

Para 100 ml de medio añadir:

5 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)
 100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
 4 µl de 17-β-estradiol 0,05 mg/ml (concentración final de 0,002 µg/ml)

10 10 ml de Suero Autólogo
 89,9 ml de medio sin suero

Ejemplo 3 para Medio de Alto % de Suero

Para 100 ml de medio añadir:

5 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)
 100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
 4 µl de Progesterona 0,05 mg/ml (concentración final de 0,002 µg/ml)
 4 µl de 17-β-estradiol 0,005 mg/ml (concentración final de 0,0002 µg/ml)

15 10 ml de Suero Autólogo
 89,9 ml de medio sin suero

20 *Ejemplo 4 para Medio de Alto % de Suero*

Para 100 ml de medio añadir:

2 µl de VEGF 100 µg/ml (concentración final de 10 µg/ml)
 100 µl de Heparina 5000 U/ml (concentración final de 5 U/ml)
 330 µg de Simvastatina 570 µM (concentración final de 0,95 µM)

25 10 ml de Suero Autólogo
 89,6 ml de medio sin suero

Cultivo

Dividir células de la suspensión de células combinada.

Centrifugar los tubos durante 15 minutos a 500 g, temperatura ambiente, descartar el sobrenadante.

30 Mezclar suavemente el sedimento celular y resuspender las células a $5-50 \times 10^6$ /ml.

Sembrar $1-5 \times 10^6$ células/ml.

Incubar los matraces a 37 °C, CO₂ 5 %.

Incubar células en medio que contiene niveles bajo de suero (por ejemplo, hasta el 5 %). Como alternativa o adicionalmente, usar niveles de suero altos (>10 %).

35 De acuerdo con una realización de la presente invención, las células se incuban en medio de suero bajo antes de incubarse en medio de suero alto.

Como alternativa, las células se incuban en medio de suero bajo después de incubarse en medio de suero alto.

De acuerdo con una realización, (a) se lleva a cabo incubación en medio que comprende suero 0,5-5 % antes de incubación en medio de suero alto (>10 % de suero) y (b) se lleva a cabo incubación en medio sin suero (i) antes de la incubación en el medio de suero 0,5 %-5 %, (ii) entre la incubación en el medio que comprende suero 0,5-5 % y la incubación en el medio de suero alto y/o (iii) después de la incubación en el medio de suero alto.

- 5 Como alternativa, (a) se lleva a cabo incubación en medio que comprende suero 0,5-5 % después de incubación en el medio con suero alto (>10 % de suero) y (b) se lleva a cabo incubación en medio sin suero (i) después de la incubación en el medio de suero 0,5 %-5 %, (ii) entre la incubación en el medio de suero alto y la incubación en el medio que comprende suero 0,5-5 % y/o (iii) antes de la incubación en el medio de suero alto.

- 10 En una realización, se llevan a cabo técnicas descritas en el presente documento con respecto a medio de suero bajo usando medio sin suero.

Pueden obtenerse expansión y diferenciación aumentada de células por exposición del cultivo celular a hipoxia y/o hipercapnia (H/H) durante 2-12 horas, 12-24 horas, 24-36 horas o 36-48 horas. Esto se realiza una o más veces en puntos diferentes durante el cultivo celular (Véase posteriormente para un protocolo de hipoxia aplicado a una muestra).

- 15 En el contexto de la presente solicitud de patente y en las reivindicaciones, el término hipercapnia se refiere a una concentración de CO₂ que es mayor del 5 %.

Después de los tres primeros días de cultivo, las células se cultivan en un medio que contiene altos niveles de suero (por ejemplo, >10 %).

Se realizan exámenes de morfología del cultivo.

- 20 Se realiza un recambio del medio cada 2-3 días.

Por ejemplo, cuando las células se cultivan en matraces T-75:

1. Recoger células en tubos de 50 ml.
2. Llenar cada matraz con 5 ml de medio fresco.
3. Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 450 g, a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante.
- 25 4. Mezclar suavemente el sedimento celular y resuspender las células en 5 ml de medio fresco por matraz.
5. Devolver 5 ml de la suspensión celular a cada matraz.
6. Tomar muestras de células para separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y/o análisis inmunohistológico cada pocos días (por ejemplo, los días 6, 9, 13, 16, 20, 24 y 30).
7. Seguir y registrar la morfología del cultivo siempre que se trate el cultivo.
- 30 8. Tomar muestras del medio de cultivo de placas de crecimiento para ensayos de esterilidad al comienzo y final del procedimiento y cada 10 días durante el periodo de cultivo.
9. Recoger todas las células cultivadas (Véase sección posterior, "Recogida de células para tinción FACS").

Hipoxia y/o hipercapnia aplicada

- 35 Para algunas aplicaciones, puede obtenerse un aumento de la expansión y diferenciación de células por exposición del cultivo celular, durante 2-48 horas, a condiciones hipóxicas (por ejemplo, el 1-5 % o el 5-15 % de oxígeno) y/o a condiciones hipercápnicas (por ejemplo, el 6-10 % de CO₂). Esto se realiza normalmente una o más veces, en diferentes puntos durante el cultivo celular.

Por ejemplo:

- 40 El primer día de cultivo, incubar matraces T-75 en un incubador controlado para oxígeno. Establecer la presión de oxígeno al 5 % y/o establecer la concentración de CO₂ a más del 5 % (por ejemplo, 6 % - 8 % u 8 % - 10 %) y mantenerla a este nivel durante 6 horas. Retirar los matraces del incubador y examinar el cultivo. Tomar una muestra de las células y ensayar la viabilidad por procedimiento de exclusión de azul de Tripano. Establecer la presión de oxígeno del incubador al 21 % y/o establecer la concentración de CO₂ al 5 %. Reinsertar los matraces en el incubador y continuar la incubación durante el resto del periodo. Este procedimiento puede repetirse, por ejemplo,
- 45 una vez a la semana durante el periodo de cultivo y/o en un periodo de 24, 48 o 72 horas antes de la finalización del cultivo.

En una realización, las células se cultivan en condiciones hipercápnicas antes de cultivarse en un ambiente de menos o igual al 5 % de CO₂. Como alternativa o adicionalmente, las células se cultivan en condiciones

hipercápnicas después de cultivarse en un ambiente de menos del o igual al 5 % de CO₂.

Volver a sembrar células adherentes, separadas y/o flotantes

Por ejemplo:

5 Para algunas aplicaciones, puede conseguirse un aumento de la expansión y diferenciación de células volviendo a sembrar células recogidas en nuevas placas prerrevestidas en medio de cultivo.

10 El tercer o cuarto día de cultivo, recoger todas las células cultivadas (Véase sección posterior, "Recogida de células para tinción de FACS"). Centrifugar los tubos durante 10 minutos a 450 g, a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante. Después, mezclar suavemente el sedimento y resuspender las células en 10 ml de medio fresco por matraz. Finalmente, sembrar células suspendidas en nuevos matraces T-75 prerrevestidos. Continuar cultivando las células y realizar todas las demás actividades (por ejemplo, recambio de medio, inspección visual y/o citometría de flujo), según sea apropiado, como se describe en el presente documento.

Este procedimiento puede realizarse semanalmente durante el periodo de cultivo y/o en un periodo de 24, 48 o 72 horas antes de la finalización del cultivo.

Conservación Celular

15 Las células pueden mantenerse en un medio de conservación o congeladas en tampón de congelación hasta su uso, por ejemplo, implantación en el paciente.

Recogida de células para tinción de FACS

Recoger células en tubos de 50 ml.

Lavar cuidadosamente la superficie del matraz pipeteando con PBS frío, para separar células adherentes.

20 Recoger las células adherentes lavadas en tubos de 50 ml.

Añadir 5 ml de PBS frío.

Separar las células adherentes restantes usando movimientos circulares suaves con un raspador de células.

Recoger las células separadas y añadirlas al tubo.

25 Según sea apropiado, añadir 5 ml de EDTA e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Recoger las células separadas y añadirlas al tubo.

Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 450 g, a temperatura ambiente. Resuspender el sedimento en 2-5 ml de PBS.

Contar las células y registrar los resultados del conteo.

30 Resumir los números de células finales y rendimientos/número de células sembradas para cada día de funcionamiento.

Dividir volúmenes iguales de células para FACS.

Tinción de FACS

Lavar las células con PBS.

Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 450 g, 4-8 °C.

35 Descartar totalmente el sobrenadante vertiendo el tampón y absorbiendo el resto en el tejido.

Mezclar suavemente el sedimento celular.

Añadir reactivo de tinción (de acuerdo con la tabla de tinción) y mezclar el sedimento de células.

Incubar los tubos durante 15-30 minutos en agua helada en la oscuridad.

Lavar las células con PBS.

40 Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 450 g, 4-8 °C.

Descartar totalmente el sobrenadante vertiendo el tampón y absorbiendo el resto en el tejido.

Mezclar suavemente el sedimento celular.

Añadir 0,5 ml de PBS por tubo (o menos, si el tubo contiene menos de 1×10^6 células).

Si los agregados son visibles, transferir la suspensión celular a través de una malla de 200 μm .

Leer los resultados de la tinción usando una máquina de FACS.

5 Resumir y registrar los resultados de FACS.

Ensayo de formación de colonias

1. Recoger las células cultivadas (Véase sección, "Recogida de células para tinción de FACS").
2. Suspender 100×10^3 células en 0,7 ml de medio enriquecido que contiene SCF 50 ng/ml, EPO 2 UI/ml, IL-3 5 ng/ml y complemento de crecimiento de células endoteliales-BTI 25 mg/ml (ECGS) en M199.
- 10 3. A un tubo de fondo redondo añadir los siguientes ingredientes y mezclar suavemente;
 - 3.1. Metilcelulosa 2 % - 1,4 ml
 - 3.2. FCS - 0,9 ml
 - 3.3. Suspensión celular 0,7 ml
4. Sembrar cada mezcla de 3 ml en dos placas de Petri de 35 mm (1,5 ml en cada una).
- 15 5. Colocar ambas placas de Petri de 35 mm en una placa de Petri de 100 mm que contiene otra placa de Petri de 35 mm precargada con ddH₂O.
6. Incubar en 37 °C, CO₂ 5 %, humedad del 97 %.
7. Puntuar las colonias después de 10-14 días, usando un microscopio invertido.

Ensayo de formación de tubo

- 20 1. Descongelar ECMatrix a 4 °C durante la noche.
2. Añadir 100 microlitros de tampón diluyente 10X a 900 microlitros de solución de ECMatrix en un tubo de microcentrífuga estéril.
3. Mezclar suavemente; no pipetear aire en la solución. Mantener la solución en hielo para evitar la solidificación.
- 25 4. Transferir 40 microlitros de solución de ECMatrix tamponada a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos que se ha preenfriado a 4 °C durante la noche.
5. Incubar a 37 °C durante al menos 1 hora para permitir que la solución de matriz se solidifique.
6. Recoger las células cultivadas (Véase sección, "Recogida de células para tinción de FACS").
- 30 7. Suspender las células a $0,15 \times 10^6$ /ml en medio enriquecido que contiene suero Humano 10 %, complemento de crecimiento de células Endoteliales-BTI (ECGS) 25 microgramos/ml y heparina 5 UI/ml en M199.
8. Pipetear 150 microlitros de suspensión celular por pocillo en la superficie de la ECMatrix polimerizada.
9. Incubar durante la noche a 37 °C, CO₂ 5 %, 97 % de humedad.
10. Inspeccionar la formación de tubos en un microscopio de luz invertida a 40X-200X aumentos.

Especificaciones Celulares

- 35 Si las células van a trasplantarse a un ser humano, entonces deberían cumplirse normalmente las siguientes condiciones:
 - (I) Las células deberían estar generalmente libres de cualquier contaminación bacteriana o viral.
 - (II) Las células deberían caracterizarse morfológicamente como (a) mayores en tamaño que los linfocitos y/o (b) alargadas, en forma de huso o de forma irregular y/o (c) granuladas o nucleadas oscuras y/o (d) con estructuras de tipo flagelos o pseudópodos y/o (e) con forma de tipo fibroblasto o poligonal.
 - (III) La suspensión celular final generalmente debería contener al menos 1×10^6 células que expresan uno o
- 40

más de los marcadores: CD31, CD34, CD133, CD34+CD133, KDR, CD34+KDR, CD144, factor de von Willebrand, SH2 (CD105), SH3, fibronectina, colágeno (tipos I, III y IV), ICAM (tipo 1 o 2), VCAM1, Vimentina, BMP-R IA, BMP-RII, CD44, integrina b1, actina aSM, MUC18 y/o ser positiva para la reacción enzimática DiI-Ac-LDL.

5 **Resultados obtenidos de acuerdo con realizaciones de la presente invención**

Ejemplo 1. Se llevó a cabo un aislamiento de dos pases de CPE en siete experimentos independientes usando Ficoll (primer pase) y OptiPrep (segundo pase), como se ha descrito anteriormente. Los resultados en la Tabla 1 muestran el enriquecimiento del porcentaje de células CD34+ en las células de segundo pase. El enriquecimiento se define como el porcentaje de células CD34+ después del segundo pase dividido por el porcentaje de células CD34+ después del primer pase usando OptiPrep.

Tabla 1. Enriquecimiento de % de CD34 en las células de Segundo Pase

Número de experimento	% de células CD34+		Factor de Enriquecimiento
	Primer Pase	Segundo Pase	
1	0,2	0,49	2,5
2	<0,2	0,34	>1,7
3	<0,2	0,69	>3,5
4	<0,2	0,65	>3,3
5	<0,2	0,58	>2,9
6	<0,2	<0,2	-
7	<0,2	0,46	>2,3

15 **Ejemplo 1.** En un conjunto de experimentos separados, se evaluó la capacidad de CPE enriquecidas de primer pase para generar tubos usando un ensayo de formación de tubos después de crecimiento *in vitro* en matraces T-75 revestidos con Fibronectina en presencia de medio que contenía niveles altos de suero (>10 % de suero autólogo o suero no autólogo), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml y Heparina 5-25 U/ml. Se presentan imágenes de formación de tubo típicas en la Figura 1. En estos experimentos realizados con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento, se tomaron imágenes usando un microscopio invertido (Nikon ECLIPSE TS100) usando ampliaciones de x4 y x20.

20 La Figura 1 muestra el ensayo de formación de tubos de enriquecimiento de CPE de primer pase en cultivo.

Ejemplo 2. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de segundo pase después de crecimiento *in vitro* en matraces T-75 revestidos con Fibronectina en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF, b-FGF, IGF y Heparina. Se resumen los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de veinte experimentos independientes en la Tabla para el ejemplo 2. En estos experimentos realizados con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento, los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medios que contenían altos niveles de suero (>10 %) y VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml produjeron los siguientes cambios en los niveles de tinción del día 0 al día 13:

Tabla para el ejemplo 2. Enriquecimiento de CPE de segundo pase después de trece días de cultivo

Marcador	% de células teñidas el día 0	% de células teñidas el día 13
CD45	85 % - 98 %	7,0 % - 39,0 %
CD34	Indetectable (<1 %)	hasta 17,7 %
CD133	Indetectable (<1 %)	hasta 6,5 %
KDR	Indetectable (<0,5 %)	hasta 7.3 %

30 **Ejemplo 3.** En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en matraces T-75 revestidos con Fibronectina en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF y Heparina. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de

experimentos independientes se resumen en la Tabla para el ejemplo 3. Estos experimentos se realizaron con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la incubación las células mostraban menos del 1 % de CD34. Se resumen los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medios que contenían suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %); VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml y Heparina 5-25 UI/ml. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), los marcadores de células madre/progenitoras CD34 y CD117 y los marcadores de células endoteliales/CPE CD133, KDR (VEGF-R), CD144 y Di1-Ac-LDL.

Tabla para el ejemplo 3. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en matraces prerrevestidos con Fibronectina en presencia de VEGF

Marcador	Media (%)	Error típico	N
CD45	89,36	0,85	83
CD34	11,62	1,11	87
CD117	7,01	1,09	45
CD133	2,85	0,46	41
KDR	1,79	0,38	85
CD144	10,33	1,50	3
DIL-Ac-LDL	7,97	0,42	3

Ejemplo 4. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en Matraces T-75 revestidos con plasma autólogo en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF y Heparina. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de 17 experimentos independientes se resumen en la Tabla para el ejemplo 4. Estos experimentos se realizaron con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la incubación las células mostraban menos del 1 % de CD34. Se resumen los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medios que contenían suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml y Heparina 5-25 UI/ml. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), los marcadores de células madre/progenitoras CD34 y CD117 y los marcadores de células endoteliales/CPE CD133 y KDR (VEGF-R).

Tabla para el ejemplo 4. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en matraces revestidos con plasma

Marcador	Media	ET
CD45	89,46	1,75
CD34	6,94	1,29
CD117	4,25	0,72
CD133	2,03	0,57
KDR	1,31	0,39

Ejemplo 5. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en Matraces T-75 revestidos con plasma autólogo en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF, progesterona y Heparina. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de 3 experimentos independientes se resumen en la Tabla para el ejemplo 5. Estos experimentos se realizaron con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la incubación las células mostraban menos del 1 % de CD34. Se resumen los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medio que contenía suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml, progesterona 0,02-2 microgramos/ml y Heparina 5-25 UI/ml. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), los marcadores de células progenitoras/madre CD34 y CD117 y los marcadores de células endoteliales/CPE CD133 y KDR (VEGF-R).

Tabla para el ejemplo 5. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en matraces prerrevestidos con plasma en presencia de progesterona

Marcador	Media	ET
CD45	94,82	2,31
CD34	21,22	3,47
CD117	5,54	2,08
CD133	5,72	0,47
KDR	1,05	0,12

5 Ejemplo 6. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en Matraces T-75 revestidos con plasma autólogo en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF, 17-beta-estradiol y Heparina. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de 3 experimentos independientes se resumen en la Tabla para el ejemplo 6. Estos fueron experimentos realizados con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la
10 incubación las células mostraban menos del 1 % de CD34. Se resumen los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medio que contenía suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml, 17- β -estradiol 0,002-2 microgramos/ml y Heparina 5-25 UI/ml. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), los marcadores de células progenitoras/madre CD34 y CD117 y los marcadores de células endoteliales/CPE CD133 y KDR (VEGF-R).

15 **Tabla para el ejemplo 6. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en matraces prerrevestidos con plasma en presencia de 17- β -estradiol**

Marcador	media	ET
CD45	96,14	0,38
CD34	4,12	0,05
CD117	1,41	0,27
CD133	1,77	0,88
KDR	0,28	0,20

20 Ejemplo 7. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en Matraces T-75 revestidos con plasma y anticuerpos anti-CD34 en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF y Heparina. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de 2 experimentos independientes se presentan en la Tabla para el ejemplo 7. Estos fueron experimentos realizados con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la
25 incubación las células mostraban menos del 1 % de CD34. Se presentan los resultados de tinción de FACS de células cultivadas en medio que contenía FACS en células cultivadas en matraces T-75 revestidos con 5 ml de plasma autólogo y CD34 antihumano 0,5-10 microgramos/ml en medio que contenía suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml y Heparina 5-25 UI/ml. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), los marcadores de células progenitoras/madre CD34 y CD117 y los marcadores de células endoteliales/CPE CD133 y KDR (VEGF-R).

30 **Tabla para el ejemplo 7. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en matraces revestidos con anti-CD34 y plasma**

Marcador	Exp. Nº 1	Exp. Nº 2
CD45	85,34	97,10
CD34	1,96	1,50
CD117	0,64	0,83
CD133	0,57	3,88

Marcador	Exp. Nº 1	Exp. Nº 2
KDR	0,24	0,54

Ejemplo 8. En un conjunto de experimentos separados, se evaluó el enriquecimiento de CPE de células de primer pase después de crecimiento *in vitro* en Matracas T-75 revestidos con Fibronectina en presencia de medio que contenía suero autólogo, VEGF y Heparina en un ambiente humidificado con alto % de CO₂. Los resultados de porcentaje de tinción de citometría de flujo de 3 experimentos independientes se resumen en la Tabla para el ejemplo 8. Estos experimentos se realizaron con sangre humana, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento. Antes de la incubación las células mostraban menos de 1 % de CD34. Se presentan suero autólogo 5-20 % (normalmente 10 %), VEGF 1, 2, 10 o 20 ng/ml, 17-β-estradiol 0,002-2 microgramos/ml y Heparina 5-25 UI/ml que se incubaron a 37 °C, CO₂ 6,5 - 12,5 % y 97 % de humedad. Se analizaron los siguientes marcadores de superficie: CD45 (un marcador panlinfocítico), el marcador de células progenitoras/madre CD34 y el marcador de células endoteliales/CPE CD133.

Tabla para el ejemplo 8. Caracterización de CPE de primer pase cultivadas en un ambiente húmedo que contiene condiciones hipercápnicas

Marcador	Media	ET
CD45	90,47	4,53
CD34	23,77	17,93
CD133	4,48	2,10

La pérdida parcial o completa del riego sanguíneo a tejidos corporales (isquemia) es un mecanismo habitual en muchas enfermedades como una causa o como una etapa intermedia responsable del resultado de la enfermedad. Este déficit en abastecimiento conduce a que el tejido afectado se vuelva progresivamente incapaz de realizar sus funciones, al comienzo de procesos patológicos resultantes de la privación de nutrientes, principalmente oxígeno, así como acumulación de metabolitos, tales como CO₂. Si estos procesos son graves, con el tiempo conducen a muerte celular y tisular.

La inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos para aumentar o reemplazar el riego sanguíneo deteriorado conduce a la restauración de la función del tejido u órgano afectado y prevención de la muerte de las células afectadas. El principio de restaurar el riego sanguíneo a un órgano empobrecido lo practican cardiólogos (por ejemplo, en la cirugía de injerto de vaso coronario y angioplastia de globo) para restaurar el funcionamiento del corazón y evitar deterioro adicional.

Este enfoque invasivo es generalmente posible solamente cuando se ocluyen vasos de tamaño medio y grande. Sin embargo, en muchas enfermedades asociadas con una reducción de vascularización, la oclusión se produce en vasos pequeños no susceptibles de este tipo de intervención.

En una realización de la presente invención, se aportan CPE a un órgano o tejido privado de sangre para aumentar o reemplazar la vascularización defectuosa creando nuevos vasos sanguíneos en el órgano empobrecido usando células progenitoras/madre endoteliales autólogas o no autólogas inyectadas directamente en el tejido isquémico o en vasos sanguíneos permeables en la proximidad del tejido isquémico. Una creación exitosa de una vasculatura tal generalmente restaura la función, evita deterioro adicional, detiene la formación de procesos patológicos secundarios a la privación de riego sanguíneo, y/o evita la muerte de células en el órgano afectado. Además, en algunos casos, la formación de vasos sanguíneos controlada en ciertas regiones del órgano reduce la vascularización patológica de otras regiones dentro del órgano que puede reducir la función del órgano.

En una realización de la presente invención, proporcionar CPE a un órgano o tejido trata una o más de las siguientes afecciones relacionadas con isquemia. La mejora resultante del riego sanguíneo deteriorado generalmente cura parcial o completamente la enfermedad o conduce al cese o ralentización de la progresión de la afección.

- Glaucoma. Esta enfermedad consiste en muerte progresiva de fibras del nervio óptico asociadas con isquemia de la cabeza del nervio óptico. Un tratamiento que conduce a la restauración de la vasculatura de la cabeza del nervio óptico generalmente detiene el proceso de enfermedad y restaura algunas de las funciones del nervio óptico (al menos en las fibras del nervio óptico cuyos cuerpos celulares aún no han muerto, a pesar de que sus axones estén afectados en la cabeza del nervio). En una realización de la presente invención, inyectar CPE en la cabeza del nervio óptico y/o en sus cercanías generalmente efectúa la inducción de vasculatura deseada. (Véase el artículo anteriormente mencionado de Flammera J y col.)
- Degeneración macular relacionada con la edad. Esta enfermedad está asociada con alteraciones circulatorias

en la coroides, el tejido vascular sanguíneo que aporta a las capas exteriores de la retina sus requisitos metabólicos. Estas alteraciones deterioran la retina, conduciendo a su muerte progresiva con reducción posterior de las funciones visuales. En una realización de la presente invención, inyectar CPE en la coroides generalmente detiene el proceso de enfermedad y evita la ceguera. (Véase el artículo anteriormente mencionado de Zarbin MA).

- Retinopatía diabética. Esta enfermedad es una enfermedad de vasos pequeños que conduce a isquemia local en la retina y por lo tanto edema que perjudica la visión. Aunque se produce neovascularización, esta sucede como resultado de isquemia y se produce en la región más importante para la visión precisa, la mácula, perjudicando de este modo la visión. En una realización de la presente invención, la inducción controlada de crecimiento de vasos sanguíneos por administración de CPE a regiones adyacentes a, pero no en, la mácula reduce o elimina el crecimiento vascular y la formación de edema en el área macular. Esta inducción controlada inducida por CPE de crecimiento de vasos sanguíneos normalmente proporciona suficiente sangre a la retina para obviar la necesidad de la retina de vascularizar el área macular (véase el artículo anteriormente mencionado de Frank RN y el artículo anteriormente mencionado de Singleton JR y col.).
- Nefropatía diabética. Esta enfermedad implica bloqueo aterosclerótico de los vasos sanguíneos del riñón y destrucción de las estructuras filtradoras de sangre de los riñones y por lo tanto insuficiencia renal, que necesita diálisis. En una realización de la presente invención, la inducción de vasos de reemplazo inyectando CPE en los riñones detiene el proceso. (Véase el artículo anteriormente mencionado de Bahlmann FH y col. (2004)).
- Ausencia de unión de huesos. Este suceso después de traumatismo y cirugía habitualmente resulta de riego sanguíneo insuficiente en el área de incisión quirúrgica/fractura del hueso afectado. En una realización de la presente invención, la aplicación local de CPE al área de incisión quirúrgica/fractura del hueso afectado restaura la vascularización y permite la curación de la lesión.
- Úlceras cutáneas crónicas. Estas lesiones son un resultado del deterioro del riego sanguíneo al área relevante de la piel. En una realización de la presente invención, la aplicación local de CPE a úlceras cutáneas crónicas restaura el riego sanguíneo y generalmente conduce a la curación de la herida.
- Demencia vascular, post apoplejía. Esta afección resulta del cierre irreversible progresivo de los vasos sanguíneos en el cerebro. En una realización de la presente invención, aportar al cerebro CPE restaura al menos una parte de la circulación deteriorada y por lo tanto restaura la función cerebral y/o ralentiza el deterioro de la función cerebral.
- Vasculopatía diabética. Esta oclusión progresiva de vasos pequeños en las extremidades es una causa habitual de amputaciones quirúrgicas. En una realización de la presente invención, tales amputaciones se evitan restaurando la circulación en los miembros afectados por la inyección local de CPE.

Como todos los trasplantes, los injertos de piel dependen del riego sanguíneo para su supervivencia (véase, por ejemplo, el libro anteriormente mencionado editado por Greenfield, y el artículo anteriormente mencionado de Kouwenhoven EA y col.). Tanto los injertos libres como pliegues cutáneos pueden fracasar debido a vascularización inadecuada. Los injertos libres requieren vascularización adecuada en el lecho y los pliegues requieren la continuación de su propio riego sanguíneo hasta que puedan establecerse anastomosis locales (véase, por ejemplo, los artículos anteriormente mencionados de Browne EZ y col., Chen y col. y Beatrice y col.). Esto es cierto también para trasplantes hechos de piel artificial (véase, por ejemplo, el artículo anteriormente mencionado de Ferretti y col.). En estos casos, la buena vascularización es una precondition para la reinervación óptima del injerto.

La vascularización se induce por siembra de injertos cutáneos con CPE. Dicha vascularización inducida por CPE generalmente aumenta la probabilidad de supervivencia del injerto cutáneo. Para algunas aplicaciones, esta técnica de siembra de CPE se usa en combinación con técnicas para trasplante de células endoteliales descritas en el artículo anteriormente mencionado de Schechner y col., cambiando lo que deba cambiarse.

La vascularización se induce por siembra de un sitio de unión con CPE durante la reimplantación de una extremidad amputada. Tal siembra de CPE generalmente ayuda a restaurar la microcirculación a la extremidad reimplantada.

Debe observarse que las indicaciones descritas en el presente documento anteriormente solo son ejemplos de los usos terapéuticos de CPE. Otras afecciones en las que la circulación sanguínea está deteriorada se tratan por aplicación apropiada de CPE a localizaciones que tienen insuficientes vasos sanguíneos o no tienen ninguno.

También se observa que las técnicas descritas en el presente documento con respecto a aumentar las poblaciones de células madre antes de su administración a pacientes cardíacos también pueden adaptarse para su uso con pacientes que tengan cualquiera de las afecciones descritas anteriormente en el presente documento.

La seguridad y eficacia de las CPE enriquecidas de células de primer pase se evaluaron en un estudio clínico en curso. Estos experimentos se realizaron con sangre autóloga de pacientes, usando el protocolo descrito anteriormente en el presente documento.

Se han admitido dieciséis pacientes con terapia farmacológica máxima que padecen angina de pecho grave en el ensayo clínico que se inició por TheraVitae y se realizó de acuerdo con una realización de la presente invención. Los pacientes se siguieron durante hasta 6 meses, como se realiza normalmente en ensayos clínicos cardiovasculares. Cada paciente constituye su propio control, comparándose la condición postratamiento al estado pretratamiento. Algunos de los resultados de los primeros diez pacientes que se han seguido durante al menos tres meses se presentan a continuación. Debería enfatizarse que los resultados presentados en el presente documento no son completos y se realizará un análisis exhaustivo de los datos al final del ensayo clínico.

Seguridad - El tratamiento muestra un perfil de seguridad alto. Un número limitado de pacientes desarrolló acontecimientos adversos menores que se definieron como posiblemente relacionados con la terapia (tasa de sedimentación de eritrocitos elevada, dolor del pecho durante la angiografía). Estos hallazgos desaparecieron después de un corto periodo sin afectar a la condición clínica del paciente.

Eficacia (véase tablas 1, 2 y 3) - La condición clínica general de todos los pacientes mejoró, como se muestra por la mejora en la Escala de Calificación para Angina de Pecho de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (CCS), mostrando mejor capacidad para ejercitarse. Todos los pacientes mejoraron su capacidad de caminar sin síntomas cardíacos. Este hallazgo también está apoyado por el aumento en carga de trabajo estimada, una evaluación objetiva de la capacidad de ejercicio realizada por exploración sestamibi. Ambos resultados muestran alta significación estadística.

Tabla I: Mejora clínica de pacientes según se demuestra por la Escala de Calificación para Angina de Pecho de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (CCS).

	Valor medio antes del tratamiento	Valor medio después del tratamiento	Porcentaje medio de mejora
Puntuación de CCS	1,92	1,00	52 %
P valor	0,0029		

Tabla II: Mejora clínica de los pacientes a los 3 meses, según se demostró por ensayo de paseo de 6 minutos

	Valores Absolutos	Porcentaje
Número total de pacientes que mejoraron	10	100 %
Mejora - media (metros)	84	25 %
P valor	0,0003	

Tabla III: Mejora de los pacientes a los 3 meses, según se demostró por la carga de trabajo estimada (MET)

	Valores Absolutos	Porcentaje
Número de pacientes que mejoraron	7	78 %
Mejora - media	1,42	20 %
P valor	0,02	

En una realización, las CPE producidas por cualquiera de las técnicas indicadas en cualquiera de las reivindicaciones a continuación en el presente documento se administran a un ser humano o animal.

En una realización, las CPE producidas por cualquiera de las técnicas indicadas en cualquiera de las reivindicaciones a continuación en el presente documento se usan en el tratamiento de un trastorno cardíaco y/o de los vasos, para trata el envejecimiento, para tratar un trastorno sistémico o para tratar un trastorno multisistema.

Para algunas aplicaciones, las técnicas descritas en el presente documento se aplican a tejido animal.

Las personas expertas en la materia se darán cuenta que la presente invención no está limitada a lo que se ha mostrado y descrito de modo particular anteriormente en el presente documento. En su lugar, el alcance de la presente invención incluye tanto combinaciones como subcombinaciones de las diversas características descritas anteriormente en el presente documento, así como variaciones y modificaciones de las mismas que no están en la técnica anterior, que realizarían personas expertas en la materia tras la lectura de la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para su uso con sangre extraída, que comprende:
 - aplicar sangre a un primer gradiente adecuado para seleccionar células de primer pase que tienen una densidad menor de 1,077 g/ml;
- 5 aplicar las células del primer pase a un segundo gradiente adecuado para seleccionar células de segundo pase que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml;
 - aumentar el número de células que tienen una densidad entre 1,055 y 1,074 g/ml cultivando las células de segundo pase durante un periodo que dura entre 1 y 30 días en un medio de cultivo que comprende uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en: suero autólogo, VEGF, b-FGF, IGF y heparina; para
- 10 proporcionar una población de células cultivadas enriquecida en células progenitoras hematopoyéticas y en particular en células progenitoras endoteliales (CPE).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende adicionalmente identificar las CPE en la población de células cultivadas.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las células de segundo pase se cultivan durante un periodo que dura entre 3 y 30 días.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer gradiente comprende una solución que incluye un copolímero de sacarosa y epiclorohidrina.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo gradiente comprende una solución acuosa de iodixanol.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo gradiente comprende una solución de densidad gradual que incluye coloides de sílice revestidos de polivinilpirrolidona.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer gradiente comprende un gradiente de tipo Ficoll.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el segundo gradiente comprende un gradiente de tipo Percoll.

Fig. 1

