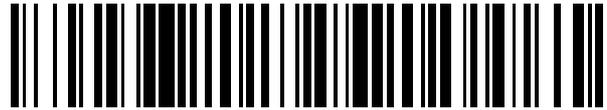


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 212**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/34** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10723556 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2432482**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardiacas**

30 Prioridad:

**20.05.2009 WO PCT/EP2009/056197**

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

**16.07.2015**

73 Titular/es:

**CELYAD S.A. (100.0%)  
Axis Business Parc, Rue Edouard Belin, 12  
1435 Mont-Saint-Guibert, BE**

72 Inventor/es:

**GAUSSIN, VINCIANE;  
GORDON-BERESFORD, ROLAND y  
HOMSY, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 541 212 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

Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardíacas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades, trastornos o predisposiciones a un trastorno cardíaco mediante la administración de una composición farmacéutica a un individuo que lo necesita. En particular, describe una composición farmacéutica que comprende células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, contenida en un recipiente de manera que permita la supervivencia y el transporte de las células a ubicaciones de todo el mundo, manipulación conveniente por el personal para la administración al receptor, donde dichas células se producen de acuerdo con estándares internacionalmente reconocidos para la fabricación de productos farmacéuticos.

15 **Estado de la técnica**

Los tratamientos celulares regenerativos son particularmente relevantes para enfermedades en las que los órganos están comprometidos de tal manera que se requiere la reconstrucción del tejido, por ejemplo, para restaurar la morfología así como la función de un órgano enfermo o cuando los mecanismos de reparación fisiológica están deteriorados. El corazón es un órgano terminalmente diferenciado y la pérdida masiva de cardiomiocitos tal como en un ataque al corazón produce daños irreversibles que hacen por tanto necesaria la reparación. Además, las enfermedades cardíacas son una causa principal de muerte en todo el mundo. El tratamiento celular para la reparación cardíaca es un desafío de la mayor importancia.

La experiencia clínica con el tratamiento celular se ha basado en citoblastos adultos administrados en un estado inalterado. La primera generación de agentes biológicos son citoblastos humanos no expuestos anteriormente a tratamiento, identificados como citotipos fácilmente accesibles. Se ha mostrado que unos pocos individuos mejoran tras la administración de citoblastos humanos no expuestos anteriormente a tratamiento. El estado de la técnica en el campo del trasplante de células no expuestas al tratamiento en el corazón de seres humanos se ha descrito, entre otros, en la revisión llevada a cabo por Abdel-Latif A. et al. '*Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.*' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997, y las citas en el anterior. En la esperanza de mejorar el resultado clínico, se ha desarrollado el concepto el concepto de tratamientos con citoblastos de segunda generación, que consiste en mejorar el potencial cardiogenerador de los citoblastos no expuestos anteriormente a tratamiento antes de administrarlos al paciente.

Para explorar formas de mejorar el potencial cardiogenerador de una célula, la investigación fundamental usó en primer lugar embriocitoblastos de ratón (a partir de ahora en el presente documento mESC) para descifrar las complejas rutas de señalización implicadas en la diferenciación cardíaca. Esta investigación condujo a la identificación de sustancias cardiogénicas que, en contacto con una célula, aumentan la capacidad de dicha célula para diferenciarse en una célula cardiopoyética. La célula cardiopoyética es un fenotipo celular intermedio en el que la célula ha comenzado a diferenciarse hacia la generación de tejido cardíaco pero aún no se ha diferenciado completamente. Los hitos clave de la investigación básica en el campo de la regeneración cardíaca se describen en:

- Behfar et al. '*Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny*', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: 578-582,
- Behfar et al., '*Cardiopoietic programming of embryonic cells for tumor-free repairs*', 10 J. Exp. Med. (2007) 204: 405-420, y
- WO 2006/015127; WO 2008/0019944 y WO 2009/151907, todos de la Mayo Foundation for Medical Education and Research, Terzic A. y Behfar A.

Los anteriores autores, solicitantes e inventores mostraron que la diferenciación de los mESC en células que han comenzado a diferenciarse hacia la generación de tejido cardíaco puede iniciarse cuando los mESC se cultivan en contacto con los denominados 'cócteles' de sustancias cardiogénicas, es decir, composiciones que contienen factores cardiogénicos en solución. Tal como se describe en el documento WO2006/015127, cuando las células cardiopoyéticas derivadas de mESC se administran en corazones de murino infartados crónicamente, se puede conseguir la reparación cardíaca. De esta manera, se ha sabido ahora que las células cardiopoyéticas derivadas de mESC podrían mostrar beneficios en la regeneración del tejido cardíaco. Sin embargo, el riesgo tumorigénico asociado con las ESC suscita problemas de seguridad para traducir estos hallazgos básicos en un uso terapéutico. Además, los experimentos se llevaron a cabo en ratones en el escenario del laboratorio con células cardiopoyéticas derivadas de mESC recogidas de un cultivo, suspendidas en un medio de cultivo en un tubo de laboratorio, y usadas rápidamente después en la misma instalación.

El tratamiento con citoblastos adultos se considera desprovisto de riesgo tumorigénico. La identificación de una fuente de citoblastos con un riesgo tumorigénico no documentado y adecuada para la derivación en células cardiopoyéticas se ha descrito en Behfar et al. '*Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny*', Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine (2006) 3:S78-S82. En el documento US

2008/0019944 se describen células cardiopoyéticas obtenidas de citoblastos mesenquimales.

Los autores, solicitantes e inventores han descrito también que se puede conseguir la diferenciación de citoblastos mesenquimales adultos humanos en células cardiopoyéticas utilizando un cóctel de factores cardiogénicos (documento WO 2009/151907).

El estado de la técnica en el campo del trasplante de células en el corazón de seres humanos se ha descrito, entre otros en la revisión llevada a cabo por Abdel-Latif A. et al. 'Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis.' Arch Intern Med. (2007) 167:989-997, y las citas en el anterior. En otra revisión de Behfar et al. 'Guided stem cell cardiopoietic: Discovery and translation' J. Mol. and Cell. Cardiology (2008) 45: 523-529, se ha descrito también el concepto de utilización de células cardiopoyéticas para la regeneración cardiaca.

El paso del banco de pruebas al lecho del enfermo suele ser un desafío para la industria farmacéutica. En este caso, este desafío ha sido particularmente difícil de superar ya que las características biológicas de las células que han comenzado a diferenciarse hacia la generación de tejido cardiaco y la absoluta necesidad de mantener estas características hasta su administración a un individuo cuando el individuo no está presente se aproximen a las premisas de las premisas de fabricación.

La presente invención resuelve este problema describiendo un método para producir industrialmente una composición farmacéutica que contiene células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con estándares reconocidos internacionalmente para la fabricación de productos farmacéuticos, un método para la preservación y envasado de células que permita el uso diferido manteniendo a la vez las características de las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco, su supervivencia, transporte a ubicaciones de todo el mundo, manipulación conveniente por el personal para la administración al receptor.

### Definiciones

En el marco del presente documento, y a no ser que se indique otra cosa, los términos designados a continuación entre comillas tienen las siguientes definiciones.

'BMMS' designa citoblastos mesenquimales de médula ósea. 'hBMMS' designa aquellos BMMS de origen humano.

Las 'células cardiopoyéticas' son un fenotipo celular intermedio, es decir, que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco pero no aún no se han diferenciado por completo. Las células cardiopoyéticas se caracterizan por la translocación nuclear de Nkx2.5 y MEF2C, combinadas con la ausencia de proteínas sarcoméricas (Behfar et al. '*Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny*', Nature Clin. Pract., Cardiovasc. Med. (2006) 3: 878-882). Las células cardiopoyéticas retienen la capacidad proliferativa. Las células cardiopoyéticas pueden derivarse de citoblastos incluyendo por ejemplo, citoblastos mesenquimales adultos humanos, embriocitoblastos humanos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones), citoblastos de tipo embrionario, citoblastos pluripotentes inducibles, o cualquier otra fuente adaptada.

Un 'cóctel cardiogénico' o 'cóctel' designa una composición que contiene al menos dos sustancias cardiogénicas.

Una 'sustancia cardiogénica' es una sustancia que, en contacto con una célula, aumentan la capacidad de dicha célula para diferenciarse en una célula cardiopoyética.

'Confluencia' designa el estado en el que las células han crecido hasta una capacidad máxima en una determinada cantidad de espacio. En este momento, el contacto con otras células les produce una inhibición del crecimiento.

La 'cantidad eficaz' significa una cantidad suficiente de la composición farmacéutica que proporciona el efecto o el resultado terapéutico o fisiológico deseado. Dicho efecto o resultado incluye la reparación, mantenimiento, regeneración, aumento del tejido cardiaco o mejora de la función cardiaca. Los efectos indeseables se manifiestan algunas veces junto con el efecto terapéutico deseado; de este modo, un especialista equilibra los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales al determinar cuál es la 'cantidad eficaz' adecuada. Esta cantidad puede variar de un sujeto a otro, dependiendo por ejemplo de la edad del sujeto, estado de salud general, variabilidad genética y epigenética y similares, y del modo de administración. De esta manera, es posible que no se pueda especificar una 'cantidad eficaz' exacta. Sin embargo, una persona normalmente experta en la materia puede determinar una "cantidad eficaz" adecuada en cualquier caso individual antes o durante el procedimiento de administración de la composición farmacéutica, por ejemplo, administrando la cantidad más elevada posible sin efecto indeseable durante la administración de la composición farmacéutica.

'Excipiente' es una sustancia inactiva usada como transportador de los principios activos de un medicamento. En muchos casos, una sustancia "activa" puede no administrarse y absorberse fácilmente por el cuerpo humano; en dichos casos, la sustancia en cuestión puede disolverse en o mezclarse con un excipiente. Además de su uso en una cantidad de dosificación unitaria, los excipientes se pueden usar en el proceso de fabricación para ayudar en la manipulación de la sustancia activa referida. Dependiendo de la ruta de administración, y de la forma de medicación, se pueden usar diferentes excipientes. Para estabilizar el principio activo, se añaden excipientes, que aseguran que el principio activo sigue siendo "activo", y, lo que es más importante, estable durante un periodo de tiempo suficientemente largo, de tal manera que la vida media en almacenamiento del producto lo haga competitivo con otros productos.

'Capacidad proliferativa' designa, en el marco del presente documento, un aumento del número de células.

'Viabilidad' significa, en el marco de este documento, la característica de las células de no absorber el colorante azul tripan demostrando por tanto la integridad de la membrana celular.

Los términos 'sujeto', 'receptor' y 'paciente' se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren, salvo que se indique explícitamente, a cualquier ser humano o mamífero en necesidad de tratamiento de una enfermedad o trastorno cardíaco con la composición farmacéutica descrita por este medio. Los sujetos incluyen también aquellos en riesgo de tener dicha enfermedad o trastorno cardíaco.

Tal como se usa en la memoria descriptiva sujeto, las formas singulares 'un', 'una' y 'el' incluyen los aspectos plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. De esta manera, por ejemplo, la referencia a 'un citoblasto' incluye una única célula, así como a dos o más células; la referencia a 'un agente' o 'un reactivo' incluye un único agente o reactivo, así como a dos o más agentes o reactivos; la referencia a 'la invención' o a 'una invención' incluye aspectos individuales o múltiples de una invención; y así sucesivamente.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente una persona normalmente experta en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados.

### Sumario de la invención

En la siguiente descripción detallada se muestran numerosos detalles a fin de proporcionar una comprensión minuciosa de la presente materia sujeto reivindicada. Sin embargo, los expertos en la materia entenderán que la materia sujeto reivindicada se puede practicar sin estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito detalladamente métodos, procedimientos, componentes, y similares para no ocultar la materia sujeto reivindicada.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco se producen preferentemente de acuerdo con los estándares internacionalmente reconocidos para la fabricación de productos farmacéuticos. De manera más preferida, dicho excipiente farmacéuticamente aceptable es una solución conservante. Preferentemente, la solución conservante puede escogerse en el grupo que comprende soluciones conservantes que permiten la crioconservación a temperaturas entre  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y soluciones conservantes que permiten la preservación a temperaturas entre  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Preferentemente, la solución conservante es una solución conservante que puede contener iones, tampones de pH, impermeabilizantes, coloides y metabolitos, dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, sacarosa, albúmina de suero, trehalosa, o cualquiera de sus combinaciones. Preferentemente, los iones se seleccionan entre el grupo que consiste en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , y las combinaciones de dichos iones. Preferentemente, los tampones de pH se seleccionan entre el grupo que consiste en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico) (HEPES) y sus mezclas. Preferentemente, los impermeabilizantes se seleccionan entre el grupo que consiste en lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa y sus combinaciones. Preferentemente, el coloide es dextrano-40. Preferentemente, los metabolitos se seleccionan entre el grupo que consiste en adenosina, glutatión, y sus combinaciones. Preferentemente, dicho al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende además como mínimo un componente seleccionado entre el grupo que consiste en factores de crecimiento, citoquinas, proteínas implicadas en la señalización de la organogénesis, agentes farmacéuticos, lisados de plaquetas, suero, isótopos, medios para el seguimiento de células *in vivo*, diluyentes, lubricantes, materiales de matriz o de la estructura principal, y sus combinaciones.

Preferentemente, las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco pueden ser citoblastos o células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco derivadas de citoblastos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones humanos). Preferentemente, los citoblastos se seleccionan entre el grupo que consiste en citoblastos adultos, embriocitoblastos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones humanos), citoblastos pluripotentes inducidos (IPS), células inducibles multilínea adultas aisladas de médula ósea (MIAMI), citoblastos cardíacos

residentes, citoblastos vegetales, o cualquiera de sus combinaciones. Preferentemente, los citoblastos son citoblastos mesenquimales cosechados de una fuente de tejido adecuada seleccionada en el grupo que consiste en médula ósea, tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, fluido amniótico, fluido menstrual, sangre, Preferentemente, las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células de mamífero. Preferentemente, las células de mamífero se seleccionan en el grupo que consiste en seres humanos, gatos, perros, cerdos, caballos, ratones, ratas, hámsteres y otros mamíferos. Preferentemente, dichas células son células autólogas, células alogénicas, células xenogénicas, o cualquiera de sus combinaciones.

Preferentemente, las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células cardiopoyéticas. Preferentemente, las células cardiopoyéticas se pueden derivar de citoblastos, incluyendo por ejemplo, de citoblastos mesenquimales adultos humanos, embriocitoblastos humanos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones), citoblastos de tipo embrionario, citoblastos pluripotentes inducibles, cardiocitoblastos residentes o cualquier otra fuente adaptada o sus combinaciones.

Preferentemente, dicha composición contiene células no cardiopoyéticas no detectables, incluyendo cardiomiocitos, células hematopoyéticas, células precursoras endoteliales, adipoblastos, adipocitos, condrioblastos, condriocitos, osteoblastos osteocitos, neuroblastos y neurocitos. Preferentemente, el contenido en células no cardiopoyéticas totales está comprendido entre 0 % y 50 % del número total de células, preferentemente entre 0 % y 15 % del número total de células. Preferentemente, el contenido de cada categoría de células no cardiopoyéticas está entre 0 % y 50 % del número total de células, preferentemente entre 0 % y 15 % del número total de células.

Se describe adicionalmente en el presente documento una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la cardiomiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, infarto de miocardio crónico, insuficiencia cardiaca de origen no isquémico, insuficiencia cardiaca de origen isquémico, cardiomiopatía congénita, o una de sus combinaciones.

La invención se refiere también a un proceso para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende las siguientes etapas:

- obtener células a partir de las cuales pueden derivarse células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco;
- cultivar dichas células en condiciones que permitan obtener células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco;
- recoger dichas células que han iniciado su diferenciación;
- añadir a dichas células que han iniciado su diferenciación al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, el proceso de la invención se lleva a cabo de acuerdo con estándares internacionalmente reconocidos para la fabricación de productos farmacéuticos, que comprende tomar muestras en cualquier etapa del proceso para llevar a cabo las operaciones de control de calidad. De manera más preferida, el proceso de la invención se lleva a cabo de acuerdo con estándares internacionalmente reconocidos para la fabricación de productos farmacéuticos, que comprenden tomar muestras en la última etapa de cultivo celular para llevar a cabo el control de calidad de la sustancia activa.

Preferentemente, los criterios de control de calidad de la sustancia activa comprenden al menos un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en un ensayo de identidad, ensayo de homogeneidad, ensayo de pureza y sus combinaciones. Preferentemente, cuando las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células cardiopoyéticas, la identidad de dichas células cardiopoyéticas corresponde a un aumento observado en el nivel de expresión de al menos un gen en el grupo Nkx2.5, TbxS, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 y sus homólogos. Preferentemente, el aumento de la expresión génica es un mínimo de 2 veces según se ha determinado mediante el método de la qPCR, en comparación con un patrón. Preferentemente, cuando las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células cardiopoyéticas, la identidad de dichas células cardiopoyéticas se considera cumplida por la presencia observada de al menos una especie de polipéptido seleccionada entre el grupo que consiste en Nkx2.5, TbxS, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 y sus homólogos, en comparación con la referencia, y cualquiera de Nkx2.5 o MEF2C o translocándose ambos adicionalmente a los núcleos de las células cardiopoyéticas. Preferentemente, la presencia observada se muestra mediante inmunomarcado con al menos un anticuerpo del grupo que consiste en anticuerpo dirigido contra Nkx2.5, anti-TbxS, anti-MEF2C, anti-GATA4, anti-GATA6, anti-Mesp1, anti-FOG1, anti-FOG2, anti-Flk1, y sus homólogos. Preferentemente, la homogeneidad se cumple cuando al menos un 50 % en una muestra dada son células cardiopoyéticas. Preferentemente, la homogeneidad se cumple cuando al menos un 50 %, de la forma más preferente al menos un 85 %, de una muestra dada son células cardiopoyéticas. Preferentemente, la presencia de citoblastos mesenquimales entre las células recogidas se muestra por el inmunomarcado positivo con un anticuerpo dirigido contra un marcador superficial seleccionado en el grupo que consiste en C0105, C090, C0133, C0105, C0166, C029, y C044, y la ausencia de un inmunomarcado detectable con un anticuerpo dirigido contra un marcador superficial seleccionado en el grupo que consiste en C014, C034, y C045. Preferentemente, no se cumple la pureza con un aumento en el nivel de expresión de los genes C034, FABP4, osteocalcina, nestina, Sox9, y MYH7 y sus homólogos dos o más veces cuando se

comparan con un patrón. Preferentemente, se determina el aumento de la expresión génica por el método de la qPCR, en comparación con un patrón. Preferentemente, no se cumple la pureza con un aumento del número de células no cardiopoyéticas, incluyendo cardiomiocitos, células hematopoyéticas, células precursoras endoteliales, adipoblastos, adipocitos, condrioblastos, condriocitos, osteoblastos osteocitos, neuroblastos y neurocitos, como se muestra por el inmunomarcado. Preferentemente, dicho patrón consiste en células no cardiopoyéticas. Preferentemente, dicho patrón consiste en células cultivadas en ausencia de cualquier sustancia cardiogénica. Preferentemente, las condiciones de cultivo incluyen usar un biorreactor que comprende inmovilizar o encapsular dichas células sobre partículas o en una matriz y pasar el medio de cultivo celular a través del lecho de partículas o la matriz.

Se describe adicionalmente en el presente documento un método para el tratamiento de enfermedades cardíacas, trastornos o predisposiciones a un trastorno en el que la composición farmacéutica se administra a un individuo en una cantidad eficaz. Preferentemente, los individuos muestran una insuficiencia del sistema cardiovascular. Preferentemente, el individuo padece cardiomiopatía isquémica, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca de origen isquémico, insuficiencia cardíaca de origen no isquémico, cardiomiopatía congénita, o una de sus combinaciones.

Preferentemente, la composición farmacéutica se administra usando una ruta de administración seleccionada en el grupo que consiste en intramiocardial, intracardiaca, intracoronaria, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, *in utero*, parenteral, o sistémica. Preferentemente, la composición farmacéutica se inyecta intramiocardialmente usando un catéter, una jeringa, o una de sus combinaciones.

Las células a partir de las cuales pueden derivarse células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco pueden ponerse en contacto con al menos una sustancia cardiogénica, que se puede seleccionar entre el grupo que consiste en TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TNF- $\alpha$ , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, factor inhibidor de leucemia (LIF), VEGF-A, VEGF-C, factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1), interleuquina 6 (IL-6), Activina A, trombina  $\alpha$ , ácido retinoico, cardiotropina 1, cardiogenol C, y sus combinaciones.

Se puede usar un gran número de cócteles cardiogénicos. La lista proporcionada a continuación no es limitativa. Se puede usar por ejemplo un cóctel de sustancias cardiogénicas que comprende TGFB-1, BMP4, trombina  $\alpha$ , un compuesto seleccionado entre grupo que consiste en cardiotropina e IL-6, y un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en cardiogenol C y ácido retinoico. Otro cóctel puede comprender TGFB-1, BMP4, trombina  $\alpha$ , Cardiotropina y cardiogenol C. Otro cóctel más puede comprender al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en FGF-2, IGF-1, Activina A, TNF- $\alpha$ , FGF-4, LIF, VEGF-A y sus combinaciones. Pueden comprender también FGF-2, IGF-1 y Activin-A. Otros cócteles preferidos comprenden activina-A, FGF-2, IL-6, IGF-1 y ácido retinoico. Otros cócteles pueden carecer al menos de un compuesto seleccionado en el grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , FGF-4, LIF, y VEGF-A.

Cuando uno de los siguientes compuestos está presente en un cóctel, puede estar presente en una cantidad de entre 1 y 5 ng de dicho TGF $\beta$ -1 por ml, entre 1 y 10 ng de dicho BMP4 por ml, entre 0,5 y 5 ng de dicha cardiotrofina por ml, entre 0,5 y 5 unidades de dicha a-trombina por ml, y entre 50 y 500 nM de dicho cardiogenol C, entre 1 y 10 ng de dicho FGF-2 por ml, entre 10 y 100 ng de dicho IGF-1 por ml, entre 1 y 50 ng de dicha activina-A por ml, entre 1, 25 y 50 ng de dicho TNF- $\alpha$  por ml, entre 1 y 20 ng de dicho FGF-4 por ml, entre 10 y 100 ng de dicho IL-6 por ml, entre 1 y 10 unidades de dicho LIF por ml, entre 1 y 50 ng de dicho VEGF-A por ml, entre 0,1 y 1,0  $\mu$ M de dicho ácido retinoico por ml.

Un tipo de cóctel particular comprende TGFB-1 (2,5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Cardiotropina (1 ng/ml), Cardiogenol C (100 nM), usados de una manera combinatoria. Los cócteles particularmente preferidos comprenden dichos compuestos y comprenden además una trombina a, (1 U/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml) y Activina-A (5 ng/ml).

Otros cócteles preferidos TGF $\beta$ -1 (2,5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Activina-A (5 ng/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml), Factor-IIa (ha- trombina, 1 U/ml), IGF-1 (50 ng/ml), y ácido retinoico (1  $\mu$ M) usado de manera combinatoria.

El cóctel puede estar diluido en un medio que contiene compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en suero de feto de ternera, suero humano, lisados de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, y sus mezclas y compuestos seleccionados.

La presente invención se refiere también a un kit para la administración de una composición farmacéutica que comprende un recipiente que contiene dicha composición farmacéutica. Preferentemente, dicho recipiente es un recipiente biocompatible que permite la supervivencia y el transporte de células a todo el mundo, manipulación conveniente por el personal para la administración al receptor. Preferentemente, dicho recipiente está cerrado herméticamente. Preferentemente, dicho recipiente es compatible con el excipiente y las condiciones de conservación. Preferentemente, dicho recipiente es un recipiente de vidrio cerrado. Preferentemente dicho recipiente tiene un tapón de septo perforable. Preferentemente, dicho septo perforable permite un adaptador de vial que

incluye una válvula activada de tipo luer para extraer el fluido desde el recipiente. Preferentemente, dicho tapón de septo perforable puede ser accesible con una aguja. Preferentemente, dicha composición farmacéutica se almacena en un recipiente cerrado herméticamente adecuado para la crioconservación. Preferentemente, la vida media de la composición farmacéutica en dicho recipiente es al menos de 48 horas, preferentemente 72 horas. Preferentemente, dicho kit comprende además al menos un catéter. Preferentemente, dicho kit comprende además al menos una jeringuilla.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (LV) (LVEDV, panel A), volumen sistólico final del LV (LVESV, panel B), y la fracción de eyección de LV (LVEF, panel C), que se han medido en el momento y 6 meses después en sujetos asignados aleatoriamente a los grupos del control (n=8) y tratados (n=9). Los resultados se normalizaron con respecto al valor inicial.

### Descripción detallada de la invención

#### Ejemplo

Inicio de la fabricación: Muestras de médula ósea humana que se habían recogido de la cresta ilíaca de un paciente y que cumplían los criterios mínimos de calidad se cultivaron en incubadoras a 37 °C/ CO<sub>2</sub> al 5 % en matraces de 175 cm<sup>2</sup> para purificar los BMMSC. Los criterios mínimos de calidad incluyen un ensayo de serología negativo del donante (al menos VIH 1/2, sífilis, VHB, VHC), el control de la temperatura de transporte de la médula ósea entre el sitio de recogida y el sitio de fabricación, el volumen total, el registro de la presencia y el volumen de los coágulos de sangre, y la ausencia de contaminación bacteriana. Después de 24 horas, la médula ósea y los residuos celulares se descartaron cuidadosamente de los matraces. Los BMMSC adherentes se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se añadió medio de cultivo, y se reanudó el cultivo hasta el pase inicial P0 con cambio de medio cada cuatro a seis días.

P0 - Expansión inicial de las colonias hasta la capa de células: Se llevó a cabo un pase inicial (P0) para disociar colonias y permitir su expansión y la formación de una monocapa. Las células se sembraron en una relación uno a uno en matraces de 175 cm<sup>2</sup> y se permitió su expansión y la formación de una monocapa durante un máximo de 6 días. La confluencia determina la temporalización para el siguiente pase 1. Esta etapa puede omitirse si los BMMSC forman espontáneamente una monocapa sin colonias detectables. El proceso continúa con pases similares numerados 'P0' seguido por una letra secuencial hasta que se obtuvo un mínimo de 50x10<sup>6</sup> células. Se definen parámetros como la densidad celular en la siembra y pases estimulados por la confluencia. El número de células obtenidas en el pase es el que determina el tamaño del recipiente que debe usarse en la siembra para optimizar el rendimiento y evitar la inhibición del contacto. El ensayo del control en proceso en la fase P0 incluye el número de células y el porcentaje de viabilidad.

P1 - Comienzo del tratamiento con el cóctel cardiogénico: Se cultivaron las células durante 5 días en medio de cultivo y un cóctel cardiogénico. Por ejemplo, se pueden usar cócteles cardiogénicos tales como los descritos en los documentos WO2006/015127, WO2009/151907 y en Behfar et al. '*Derivation of a 25 cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny*', Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine, Marzo 2006 vol. 3 suplemento 1, páginas S78-S82).

P2 - Final del tratamiento con el cóctel cardiogénico: Se descartó el medio que contenía el cóctel cardiogénico. El cultivo contiene ahora células cardiopoyéticas. Se hicieron pases del cultivo y se sembraron en nuevos recipientes con medio de cultivo para permitir fases de expansión adicionales según necesidad.

P3 - Expansión y recogida: Los siguientes pases se numeraron 'P3' seguido por una letra secuencial. Se hicieron pases de las células cuando se alcanzó la confluencia óptima, y se repitieron hasta que el número de células obtenidas está entre 600x10<sup>6</sup> y 1200x10<sup>6</sup> células. Cuando se cumple este criterio, se recogen las células. Esta etapa implica una tripsinización final seguida por etapas de lavado y concentración mediante centrifugación. Se llevó a cabo el lavado inicial en una solución de conservación de células. De manera adecuada, la solución de conservación empleada puede ser similar a las soluciones acuosas de conservación para almacenamiento en frío de tejidos orgánicos y biológicos normalizadas tales como HypoThermosol-FRS® de BioLifeSolutions (Bothell, Wash).

El concentrado celular se transfiere a continuación a un recipiente biocompatible (en este ejemplo, una botella de vidrio de Tipo I, Ph. Eur.) y se añade solución de conservación para alcanzar un volumen total de 10 ml y una concentración celular en el intervalo de 60x10<sup>6</sup> a 120x10<sup>6</sup> cél/ml. Esto finaliza la fabricación de la composición farmacéutica.

Los criterios de liberación de la composición farmacéutica incluyen normalmente la identidad celular, la homogeneidad y la pureza que se combinan con los parámetros de fabricación que confirman la ausencia de contaminación accidental (asepsia, nivel bajo de endotoxinas, y micoplasmas no añadidos durante el procesamiento).

Vale la pena señalar que sin ningún prejuicio a la presente invención, podrían abarcarse otros métodos de producción de células cardiopoyéticas en vez del uso de sustancias cardiogénicas.

5 En este ejemplo, el medio de conservación es HypoThermosol-FRS® de BioLifeSolutions (Bothell, Wash). HypoThermosol-FRS contiene iones ( $\text{Na}^+$  100 mM,  $\text{K}^+$  42,5 mM,  $\text{Ca}^{2+}$  0,05 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM,  $\text{Cl}^-$  17,1 mM); tampones de pH ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  10 mM,  $\text{HCO}_3^-$  5 mM, HEPES 25 mM); impermeabilizantes para contrarrestar la hinchazón celular (100 mM lactobionato, sacarosa 20 mM, manitol 20 mM); coloide (6 % Dextrano-40); y metabolitos (glucosa 5 mM, adenosina 2 mM, glutatión 3 mM).

10 La conservación de la composición farmacéutica puede conseguirse también de acuerdo con la invención mediante la criopreservación en dimetil sulfóxido (DMSO). Este ofrece la ventaja de permitir incluso una vida más larga (una semana o más) con la condición de que el transporte sea con hielo seco, con un control adecuado de la temperatura de transporte.

15 De acuerdo con la realización de la composición farmacéutica de la presente invención en la que el excipiente es HypoThermosol-FRS, la vida media del producto farmacéutico en un recipiente es al menos de 72 horas. Es particularmente remarcable observar que el número total de  $1200 \times 10^6$  células tiene un volumen de aproximadamente 8 mililitros, mientras que el volumen máximo deseable para la inyección intramiocardial es de aproximadamente 10 mililitros. Esto significa que la cantidad de HypoThermosol-FRS es pequeña frente al volumen  
20 celular y estará en el intervalo de solo unos pocos milímetros.

Se ha observado sorprendentemente que incluso dicha pequeña cantidad de HypoThermosol-FRS es suficiente para mantener dicha importante vida media de 72 horas para la composición farmacéutica. Esto proporciona un tiempo suficiente para confirmar que se cumplen todos los criterios de liberación, para enviar la composición farmacéutica a  
25 cualquier parte en el mundo, y para administrarla al receptor.

Criterios de liberación - identidad de la composición farmacéutica: Las células cardiopoyéticas se caracterizan por la expresión positiva y, cuando es aplicable, la translocación nuclear de varios marcadores de diferenciación cardiaca temprana, incluyendo Nkx2.5, MEF2C y GATA-4. La identidad positiva de las células cardiopoyéticas contenidas en  
30 la composición farmacéutica está representada por un mínimo de aumento de 2 veces en el nivel de expresión de MEF2C y/o Tbx5 en comparación con el patrón de referencia, medido mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y su mantenimiento durante la vida media.

En esta realización preferida, la Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 3 siguientes muestran que la expresión de los marcadores de diferenciación cardiaca temprana se mantiene durante un tiempo tan largo como 14 días después que la composición farmacéutica se almacena en su recipiente final, y que la viabilidad y la proliferación de dichas células se mantiene durante al menos 5 días. Esto demuestra la capacidad única del proceso de fabricación aquí para  
35 obtener y mantener la identidad de las células expuestas a las sustancias cardiogénicas en un estado adecuado para su uso previsto:

40

Tabla 1 identidad (qPCR) en 100 millones de células viables totales por ml

Día	Lote 1		Lote 2	
	MEF2C	Tbx5	MEF2C	Tbx5
0	2,5	2,6	3,0	2,0
1	2,1	2,4	2,2	1,7
2	2,5	2,6	2,6	2,0
3	2,2	2,1	2,9	1,9
4	2,3	2,5	2,3	3,0
5	2,0	1,8	2,5	2,0
6	2,3	1,0	2,7	1,7
10	2,1	2,0	3,0	3,1
14	2,3	1,5	3,5	2,6

Tabla 2: Viabilidad de la composición farmacéutica en una concentración celular de 100 millones de células viables totales/ml.

Día	Lote 1	Lote 2
0	96	96
1	88	95
2	92	96
3	87	93
4	91	96
5	87	91

45

Tabla 3: Capacidad proliferativa de la composición farmacéutica a una concentración celular de 100 millones de células viables totales/ml.

Día	Lote 1	Lote 2
1	444	456
2	297	481
3	417	333
4	306	417
5	303	722

Además, La Tabla 4 y la Tabla 5 muestran que la composición farmacéutica no está limitada a un rendimiento de la concentración celular definido individualmente. De hecho, el mantenimiento de la viabilidad celular y la capacidad proliferativa a diferentes concentraciones celulares son características distinguibles de la composición farmacéutica descrita de esta manera.

Tabla 4 Influencia de la concentración celular en el porcentaje de viabilidad

Día	Lote 1 (en células Mio/ml)			Lote 2 (en células Mio/ml)	
	80	100	110	100	120
0	96	96	96	96	96
1	90	88	91	95	94
2	90	92	90	96	87
3	90	87	88	93	93
4	94	91	90	96	96
5	90	87	88	91	94

Tabla 5 Influencia de la concentración celular sobre la capacidad proliferativa

Día	Lote 1 (en células Mio/ml)			Lote 2 (en células Mio/ml)	
	80	100	80	100	80
1	375	444	333	456	444
2	174*	297	314	481	425
3	694	417	500	333	333
4	278	306	292	417	444
5	256	303	214	722	583

El valor obtenido para el lote 1 en el día 2 de 80 millones de células por ml identificado con (\*) se considera un error experimental.

Criterios de liberación - homogeneidad de la composición farmacéutica: Para determinar el porcentaje de células cardiopoyéticas en la composición farmacéutica descrita de esta manera en esta realización preferida, se llevó a cabo un inmunomarcado por duplicado en una alícuota de células con anticuerpos dirigidos contra MEF2C y CD105, seguido por tinción nuclear usando DAPI. La meta es determinar el porcentaje de células cardiopoyéticas (tinción nuclear para MEF2C) y citoblastos mesenquimales (positivos para CD105), con el número total de células contadas dadas por el número de núcleos teñidos con DAPI. Análisis de las células cardiopoyéticas derivadas de paciente que pasaron el ensayo de identidad mediante la qPCR (MEF2C: aumento de  $2,8 \pm 0,6$ , Tbx5: aumento de  $2,2 \pm 0,6$  veces) muestra que el  $96 \pm 2$  % de las células son cardiopoyéticas. Además, el 100 % de las células contadas son positivas para CD105. Esto tomado junto con la ausencia de aumento en el nivel de expresión de CD34, un marcador para células hematopoyéticas y células precursoras endoteliales (véase párrafo en 'Pureza'), indica que el 100 % de las células son citoblastos mesenquimales o derivados de citoblastos mesenquimales.

Criterios de liberación - pureza de la composición farmacéutica: El ensayo de pureza llevado a cabo de acuerdo con la realización preferida de la presente invención tiene por objetivo determinar qué tipos de células diferentes de las células cardiopoyéticas y los BMMSc están ausentes de la composición farmacéutica. Un método de selección para abordar los criterios de pureza es la qPCR. La solución tomada para desarrollar el método de la qPCR para el ensayo de la pureza incluyó la identificación de los marcadores adecuados, el diseño del cebador patentado y los conjuntos de sondas, el análisis de las curvas de amplificación y de los máximos de fusión, y la identificación de los ARN positivos para el control comercialmente disponibles. Se determinó la ausencia del fenotipo hematopoyético y del fenotipo endotelial precursor normalmente presentes en la médula ósea mediante la ausencia de niveles detectables de células que expresan CD34 en la composición farmacéutica. Se determinó la ausencia de adipoblastos, condrioblastos, osteoblastos o neuroblastos en la composición farmacéutica mediante la ausencia de niveles detectables de células que expresan FABP4, células que expresan Sox9, células que expresan osteocalcina y células que expresan nestina, respectivamente. La exclusión de cardiomiocitos maduros se evaluó mediante la ausencia de niveles detectables de células que expresan MYH7 en la composición farmacéutica.

La realización preferida descrita en el presente documento para la composición farmacéutica de la invención se inyectó endocardialmente en un ser humano con insuficiencia cardíaca de origen isquémico en una cantidad eficaz de  $1200 \times 10^6$  células en la zona límite del miocardio no viable usando un catéter específico. Se obtuvieron resultados

satisfactorios.

Se evaluó la factibilidad, seguridad y eficacia de una composición farmacéutica que contenía células cardiopoyéticas, de acuerdo con la invención, en un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, abren, de dos brazos  
5 secuenciales en paralelo, multicéntrico.

Los sujetos que presentaban insuficiencia cardiaca crónica secundaria a cardiomiopatía isquémica se asignaron aleatoriamente al control o al grupo tratado. El grupo del control recibió un estándar óptimo de cuidados. El grupo  
10 tratado recibió la composición farmacéutica que contenía células cardiopoyéticas además del estándar óptimo de cuidados.

La composición farmacéutica que contenía células cardiopoyéticas se inyectó endoventricularmente en la zona límite del área infartada utilizando el catéter de inyección MyoStar® (Biologics Delivery Systems, California, EE.UU.). En un procedimiento de inyección única, se inyectaron hasta  $1,2 \times 10^9$  células en hasta veinte sitios de inyección  
15 alrededor del área infartada.

Se realizó una evaluación ecocardiográfica bidimensional de la función del ventrículo izquierdo (LV) en 17 sujetos alistados en este ensayo (9 tratados, 8 del control) en el momento inicial y a los 6 meses después. Se evaluó la función cardiaca midiendo el cambio en el volumen diastólico final del LV (LVEDV), volumen sistólico final del LV (LVESV), y fracción de eyección de LV (LVEF) desde el valor inicial a los 6 meses después de la inyección de células. Se observó una tendencia para estos tres importantes parámetros en el grupo tratado a favor de un efecto  
20 positivo de la composición farmacéutica sobre la función cardiaca (Figura 1). Los médicos especialistas en la técnica reconocerán las implicaciones sobre el pronóstico y terapéuticas importantes que conllevan estos resultados.

## 25 **Otras realizaciones**

Debe entenderse que aunque se ha descrito la invención junto con su descripción detallada, se pretende que la anterior descripción ilustre, y no limite el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones  
30 adjuntas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están comprendidos en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

En particular, la composición farmacéutica descrita en el presente documento, incluyendo sus condiciones de almacenamiento y su vida media, es solo una realización preferida que representa gráficamente el uso de células cardiopoyéticas autólogas derivado de citoblastos mesenquimales de médula ósea (BMMSC), es decir, una  
35 composición farmacéutica preparada a partir de BMMSC que se va usar en el mismo individuo en el que se recogieron los BMMSC. El alcance de la presente invención no está limitado a los BMMSC autólogos e incluye el uso de cualesquiera citoblastos, independientemente de la fuente. Las células que permiten obtener células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco (en el presente documento después de este párrafo 'células originales') pueden ser alogénicas y xenogénicas. Las células originales se pueden obtener también por  
40 otros medios diferentes del aprovisionamiento de médula ósea reciente. Las células originales pueden ser embriocitoblastos con la condición de que su aprovisionamiento no implique la destrucción de embriones humanos. Las células originales pueden ser citoblastos de tipo embrionario tales como citoblastos pluripotentes inducidos (IPS) obtenidos por cualquier medio incluyendo la transfección, reprogramación celular u otro método que vuelva a los IPS exentos de genes exógenos; las células originales pueden ser también células inducibles multilínea adultas aisladas  
45 de médula ósea (MIAMI), citoblastos cardiacos residentes, citoblastos vegetales, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización adicional, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede incluir componentes adicionales, por ejemplo, sustancias cardiogénicas, factores de crecimiento tales como factores de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento placentario o factor de crecimiento endotelial vascular, citoquinas, o proteínas implicadas en la señalización de la organogénesis, construcciones moleculares, células no  
50 cardiopoyéticas alteradas ex vivo, agentes farmacéuticos, lisados de plaquetas, materiales de la estructura principal tales como colágeno, laminina, o cualesquiera otras proteínas de la matriz extracelular.

En una realización adicional, el kit descrito en el presente documento puede incluir un catéter de acuerdo con los documentos PCTIEP20101055869, TW099113613, US 611312371, BE2009/0271, PCTIEP20101055856, IW099113627, o BE2009/0272.

En una realización adicional, el kit descrito en el presente documento puede incluir componentes adicionales, por ejemplo bolsas o medios adecuados para la refrigeración, congelación, crioconservación, liofilización, vitrificación, descongelación, rehidratación, lavado, clasificación, concentración, filtración, liofilización, centrifugación, resuspensión, muestreo, o distribución en alícuotas de la composición farmacéutica.

En una realización adicional, el kit descrito en el presente documento puede incluir termoseguimiento, dispositivo  
65 contra manipulaciones, o dispositivo de identificación mediante radiofrecuencia.

También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones concretas solamente, y no se pretende que sea limitante.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco, en el que dichas células muestran:
- 5
- i. un aumento observado en el nivel de expresión en comparación con un patrón de MEF2C y opcionalmente al menos un gen adicional seleccionado entre el grupo que consiste en Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1; y/o
  - 10 ii. una presencia observada de al menos una especie de polipéptido seleccionada entre el grupo que consiste en Nkx2.5, Tbx5, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1, en comparación con la referencia y la translocación nuclear hacia el núcleo de la célula de uno o más de Nkx2.5 y MEF2C;
- y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable es una solución conservante.
- 15
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el aumento observado en el nivel de expresión es un mínimo de 2 veces según se ha determinado por la qPCR, en comparación con un patrón.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución de 'conservación' se selecciona entre el grupo que comprende soluciones de conservación que permiten la crioconservación a temperaturas entre -196 °C y 0 °C y soluciones de conservación que permiten la conservación a temperaturas entre 0 °C y +40 °C.
- 20
4. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la solución de conservación es una solución de conservación que puede contener iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  y sus combinaciones), tampones de pH, ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico) (HEPES) y sus mezclas), impermeabilizantes (lactobionato, 'sacarosa, manitol, glucosa y sus combinaciones), coloides (Dextrano-40), y metabolitos (adenosina, glutatión, y combinaciones de los mismos), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, sacarosa, albúmina de suero, trehalosa, o cualquiera de sus combinaciones.
- 25
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende al menos un componente seleccionado entre el grupo que consiste en factores de crecimiento, citoquinas, proteínas implicadas en la señalización de la organogénesis, agentes farmacéuticos, lisados de plaquetas, suero, isótopos, medios para el seguimiento de células *in vivo*, diluyentes, lubricantes, materiales de matriz o de la estructura principal, y sus combinaciones.
- 30
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células comprometidas con la generación del tejido cardíaco son citoblastos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones humanos).
- 35
7. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco se derivan de citoblastos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones humanos).
- 40
8. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 en el que dichos citoblastos se seleccionan en el grupo que consiste en citoblastos adultos, que incluyen citoblastos mesenquimales; embriocitoblastos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones humanos); citoblastos pluripotentes inducidos (IPS); células inducibles multilíneaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI); citoblastos cardíacos residentes; citoblastos vegetales; y sus combinaciones.
- 45
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco son células de mamíferos.
- 50
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardíaco son células cardiopoyéticas que se pueden derivar de citoblastos mesenquimales adultos humanos, embriocitoblastos humanos (con la condición de que su producción no implique la destrucción de embriones), citoblastos de tipo embrionario, citoblastos pluripotentes inducibles, cardiocitoblastos residentes o cualquier otra fuente adaptada o sus combinaciones.
- 55
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 en la que entre 0 % y 50 % del número total de células, preferentemente entre 0 % y 15 % del número total de células son células no cardiopoyéticas, que incluyen, pero no se limitan a cardiomiocitos, células hematopoyéticas, células precursoras endoteliales, adipoblastos, adipocitos, condrioblastos, condriocitos, osteoblastos osteocitos, neuroblastos y neurocitos.
- 60
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de la cardiomiopatía, infarto agudo de miocardio, infarto de miocardio crónico, insuficiencia cardíaca de
- 65

origen no isquémico, insuficiencia cardiaca de origen isquémico, cardiomiopatía congénita, o una de sus combinaciones.

13. Un proceso para la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las siguientes etapas:

- obtener células a partir de las cuales se puedan derivar células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco;
- cultivar dichas células en condiciones que permitan obtener células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco;
- recoger dichas células que han iniciado su diferenciación;
- añadir a dichas células que han iniciado su diferenciación al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en el que dicho al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable es una solución de conservación.

14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que dichas células a partir de las cuales se pueden derivar células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco se ponen en contacto con una composición cardiogénica compuesta por una o más sustancias cardiogénicas seleccionadas entre el grupo que consiste en: Activina A, trombina  $\alpha$ , angiopoyetina, proteína morfogénica ósea (BMP) tal como BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, Cardiotrofina 1, Cardiotrofina C, Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Eritropoyetina (EPO), Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) tales como FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), Factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF-9), Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) tal como IGF-1, IGF-2, Miostatina (GDF-8), Neurotrofinas tales como NT-3, NT-4, NT-1 y Factor de crecimiento nervioso (NGF), Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) tal como PDGF-beta, PDGF-AA, PDGF-BB, Trombopoyetina (TPO), TGF - (Factor alfa de crecimiento transformante), Factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) tal como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) tal como VEGF-A, VEGF-C, TNF- $\alpha$ , Factor inhibidor de leucemia (LIF), interleuquina 6 (IL-6), ácido retinoico, C SDF-1 (Factor 1 derivado de célula estromales), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), Periostina, Angiotensina II, Ligando de Flt3, Factor neurotrófico derivado de glia, Proteína-3 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina, Proteína-5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina, La interleucina-3, La interleucina-8, Midkina, Progesterona, Putrescina, Factor citobástico, TGF-alfa, Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, la caspasa-4, ligando de quimioquina 1, ligando de quimioquina 2, ligando de quimioquina 5, ligando de quimioquina 7, ligando de quimioquina 11, ligando de quimioquina 20, haptoglobina, lectinas, colesterol 25-hidroxisilasa, sintaxina-8 sintaxina-11 ceruloplasmina, componente del complemento 1, componente del complemento 3, integrina alfa 6, lipasa 1 de ácido liposomal, microglobulina P-2, ubiquitina, factor inhibidor de la migración de macrófagos, cofilina, ciclofilina A, FKBP12, NOPK, profilina 1, cistatina C, calciclina, estatinocalcina- PGE-2, mpCCL2, 100, iNOS, HLA-G5, M-CSF, PIGF, MCP-1, moléculas de matrices extracelulares, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3a), CCL26 (eotaxin-3), CX3CL 1 (fractalkina), CXCL5 (ENA-78), CXCL 11 (i-TAC), CXCL 1 (GRO $\alpha$ ), CXCL2 (GRO $\beta$ ), CXCL8 (IL-8), CCL 10 (IP-10), y sus combinaciones.

15. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 en el que dicha composición cardiogénica se diluye en un medio que contiene los compuestos seleccionados entre el grupo que consiste en suero de feto bovino, sueros humanos, lisados de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, y sus mezclas y compuestos seleccionados entre:

- un primer grupo que consiste en: TGF $\beta$ -1, BMP-4, trombina  $\alpha$ , un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en Cardiotrofina 1 e IL-6, y un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en Cardiotrofina C y ácido retinoico;
- un segundo grupo que consiste en TGF $\beta$ -1, BMP-4, trombina  $\alpha$ , Cardiotrofina 1, IL-6, ácido retinoico y cardiotrofina C;
- un tercer grupo que consiste en Activina-A, FGF-2, IL-6, IGF-1 y ácido retinoico; y,
- un cuarto grupo que consiste en TGF $\beta$ -1, TGF $\beta$ -2, TNF- $\alpha$ , BMP-1, BMP-2, BMP-4, BMP-6, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-12, FGF-13, FGF-15, FGF-20, factor inhibidor de leucemia, VEGF-A, VEGF-C, factor 1 de crecimiento de tipo insulina, interleuquina 6 (IL-6), Activina A, trombina  $\alpha$ , ácido retinoico, Cardiotrofina 1, Cardiotrofina C, y combinaciones de los mismos.

16. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 o 15, en el que las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células cardiopoyéticas, la identidad de dichas células cardiopoyéticas corresponde a un aumento observado en el nivel de expresión de al menos un gen en el grupo Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 y sus homólogos.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 16 en el que el aumento de la expresión génica es un mínimo de 2 veces según se ha determinado mediante el método de la qPCR, en comparación con la referencia.

- 5 18. Proceso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 en el que cuando las células que han iniciado su diferenciación hacia la generación de tejido cardiaco son células cardiopoyéticas, la identidad de dichas células cardiopoyéticas se considera cumplida por la presencia observada de al menos una especie de polipéptido seleccionada entre el grupo que consiste en Nkx2.5, Tbx5, MEF2C, GATA4, GATA6, Mesp1, FOG1, FOG2, Flk1 y sus homólogos, en comparación con la referencia, y cualquiera de Nkx2.5 o MEF2C o translocándose ambos adicionalmente a los núcleos de las células cardiopoyéticas.
- 10 19. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 o 18, en el que la homogeneidad se cumple cuando al menos un 50 %, preferentemente al menos un 85 %, de una muestra dada son células cardiopoyéticas.
20. Kit para la administración de una composición farmacéutica de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende un recipiente que contiene dicha composición farmacéutica.

1/1

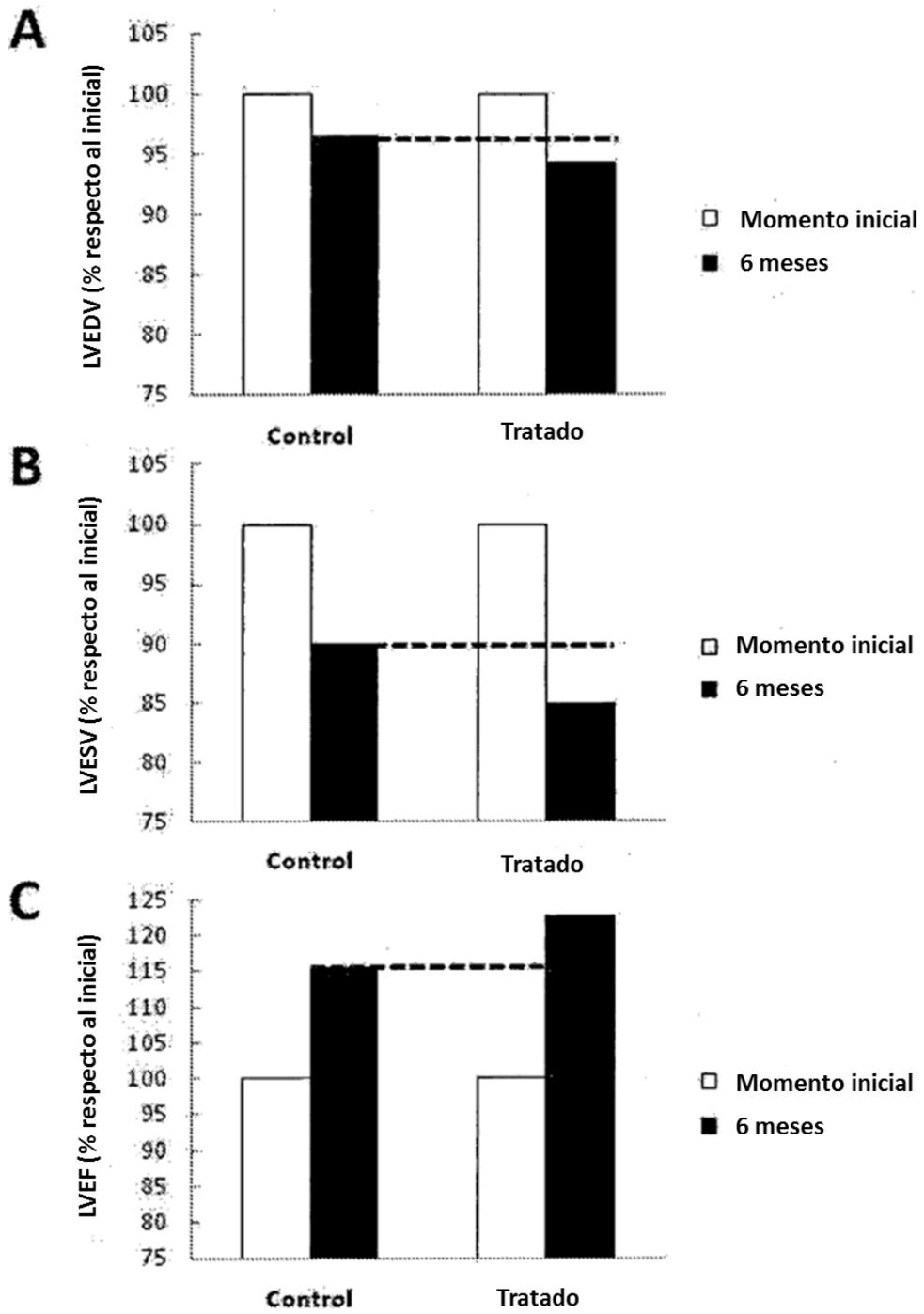


Figura 1