

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 631**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18	(2006.01) C12N 5/077	(2010.01)
A61K 38/48	(2006.01) A61K 31/505	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)	
A61K 38/19	(2006.01)	
A61K 38/22	(2006.01)	
A61K 38/30	(2006.01)	
A61K 31/529	(2006.01)	
A61K 35/28	(2015.01)	
A61K 35/34	(2015.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09763198 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2303310**

54 Título: **Composiciones y métodos para obtener células para tratar tejido cardíaco**

30 Prioridad:

27.05.2008 WO PCT/US2008/064895

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**TERZIC, ANDRE y
BEHFAR, ATTA**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 556 631 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

Composiciones y métodos para obtener células para tratar tejido cardíaco

5 Campo de la invención

Este documento se relaciona con métodos y materiales implicados en la obtención y utilización de células cardíacas. Por ejemplo, este documento se relaciona con métodos y materiales para proporcionar tejido cardíaco de mamífero con células (por ejemplo, células cardioprogenitoras diferenciadas o células cardiopoyéticas) que se incorporan en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales.

10

Información de antecedentes

15

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, a pesar de los avances en la gestión del paciente. En contraste con los tejidos con alta capacidad reparadora, el tejido del corazón es vulnerable a daños irreparables. La medicina cardiovascular regenerativa a base de células es, por lo tanto, muy demandada en el ámbito clínico.

20

La reciente llegada de la biología de células madre extiende el alcance de los modelos actuales de la práctica de la paliación tradicional hacia la reparación curativa. Por lo general, la experiencia clínica se ha basado en células madre adultas reclutadas de fuentes autólogas y suministradas en un estado inalterado. La primera generación de biológicos son células madre humanas no modificadas, identificadas como citotipos fácilmente accesibles. Se ha demostrado que individuos particulares mejoran el suministro de células madre humanas no modificadas.

25

Definiciones

Dentro del marco del presente documento, y a menos que se indique lo contrario, los términos designados a continuación entre comillas tienen las siguientes definiciones.

30

El término "hMSC", significa células madre mesenquimales humanas.

El 'potencial cardiogenerativo' de una célula designa la capacidad de esta célula para tener éxito en generar células cardíacas por ejemplo de miocardio, cuando se inyectan en un corazón infartado.

35

'Células cardiopoyéticas' (CP) son células comprometidas en la forma de diferenciación de una célula no diferenciada. Una 'célula cardiopoyética' exhibe una diferenciación cardíaca definida por la translocación nuclear del primer factor de transcripción cardíaco Nkx2.5 y el último factor de transcripción cardíaco MEF2C (Behfar y colaboradores, Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem yields progeny, Nature Clinical Practice, Cardiovascular Medicine, marzo de 2006, vol. 3 suplemento 1, páginas 578-582). Se puede observar la translocación nuclear del factor de transcripción cardíaco GATA4. Las células cardiopoyéticas pueden carecer de sarcómeros y pueden carecer de la expresión de proteínas sarcoméricas. Una célula cardiopoyética conserva la capacidad de dividirse por si misma. Las células cardiopoyéticas también se denominan 'precursoras de cardiomiocitos' o "células progenitoras de cardiomiocitos" debido a que se pueden diferenciar en cardiomiocitos. En el contexto del presente documento, las células cardiopoyéticas se pueden derivar de células madre mesenquimales adultas humanas (hMSC). 'CP-hMSC' designa a estas células cardiopoyéticas derivadas de células madre mesenquimales adultas humanas.

40

45

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

50

Una "sustancia cardiogénica" es una sustancia que mejora el potencial cardiogenerativo de una célula.

Una 'célula guiada por un cóctel' o 'célula guiada hacia la cardiopoyésis' es una célula que ha sido puesta en contacto con un cóctel y además entra en diferenciación.

55

La 'diferenciación' es el proceso mediante el cual una célula menos especializada se convierte en una célula más especializada.

60

La 'fracción de eyección' significa la fracción de sangre bombeada durante un latido cardíaco. Sin un índice, el término fracción de eyección se refiere específicamente a aquel del ventrículo izquierdo (fracción de eyección ventricular izquierda o LVEF).

65

El 'cambio de fracción de eyección' significa la diferencia entre la fracción de eyección del corazón de un animal tratado con células inyectadas en su corazón infartado, medida después de un tiempo determinado y la fracción de eyección medida antes de la inyección.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente invención tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente alguien con experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención. Los métodos y materiales para la práctica de la presente invención, se describen a continuación. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Resumen de la invención

La invención se relaciona con composiciones que comprenden TGF β 1, BMP4, α -trombina, Cardiotrofina, Cardiogenol C, FGF-2, IGF-1 y Activina A. Las composiciones de la invención pueden comprender al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de TGF α , FGF-4, LIF, VEGF-A y combinaciones de los mismos. Otras composiciones preferidas de la invención comprenden FGF-2, IL-6, IGF-1 y ácido retinoico. De acuerdo con una realización alternativa, las composiciones de la invención pueden carecer de al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de TNF- α , FGF-4, LIF, y VEGF-A.

Cuando está presente uno de los siguientes compuestos en una composición de la invención, puede estar presente en una cantidad entre 1 y 5 ng de dicho TGF β -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 α -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 Activina A por ml, entre 1 y 50 ng de dicho TNF- α por ml, entre 1 y 20 ng de dicho FGF-4 por ml, entre 10 y 100 ng de dicha 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 μ M de ácido retinoico por ml.

Las composiciones preferidas de acuerdo con la invención comprenden TGF β -1 recombinante (2.5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Cardiotrofina (1 ng/ml), Cardiogenol C (100 nM), utilizados en una forma combinatoria. Las composiciones particularmente preferidas de la invención comprenden estos compuestos y además comprenden α -trombina, (1 U/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml) y Activina A (5 ng/ml).

Otras composiciones preferidas de la invención comprenden TGF β -1 recombinante (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 (α -trombina, 1 U/ml), IGF-1 (50 ng/ml), y ácido retinoico (1 μ M) utilizados en una forma combinatoria.

De preferencia, las composiciones de la invención están contenidas en un medio seleccionado del grupo que consiste de medios que contienen suero fetal de ternera, suero humano, lisado de plaquetas, y mezclas de los mismos.

La invención también se relaciona con un método para obtener a partir de células iniciales, células diferenciadas que expresan un nivel elevado de al menos uno de los ARNm seleccionados del grupo que consiste de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA4, ARNm de Flk-1, ARNm de GATA6, ARNm de Fog-1, y combinaciones de los mismos, y/o tienen al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos de Nkx2.5, polipéptidos de MEF2c, polipéptidos de Tbx-5, polipéptidos de FOG-2, polipéptidos de GATA-4, polipéptidos de MESP-1, y combinaciones de los mismos, en donde al menos uno de dichos polipéptidos está asociado con los núcleos de dichas células diferenciadas, en donde dicho método comprende cultivar células iniciales en presencia de una composición de acuerdo con la invención. En tales métodos, las células diferenciadas expresan preferiblemente un nivel elevado de ARNm de MEF2C y ARNm de MESP-1.

En una realización preferida de la invención, las células iniciales son células madre mesenquimales. Tales células pueden ser células madre derivadas de médula ósea. Estas pueden expresar CD90, CD105, CD133, CD166, CD29, y CD44 sobre la superficie celular y no expresar CD14, CD34, y CD45 sobre la superficie celular.

Lo más preferible, las células diferencias son células cardiopoyéticas.

Otro aspecto de la divulgación es un método para suministrar células diferenciadas a un mamífero, en donde dicho método comprende:

(a) determinar que una muestra de células provenientes de una población de células diferenciadas comprende células que expresan un nivel elevado de al menos uno de los ARNm seleccionados del grupo que consiste de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA4, ARNm de Flk-1, ARNm de GATA6, ARNm de Fog-1, y combinaciones de los mismos, y/o tienen al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de los polipéptidos de Nkx2.5, los polipéptidos de MEF2c, los polipéptidos de Tbx-5, los polipéptidos de MESP-1, los polipéptidos de GATA-4, los polipéptidos de FOG-2, y combinaciones de los mismos, en donde dicho polipéptido se asocia con los núcleos de dichas células diferenciadas, y

(b) administrar células provenientes de dicha población de células diferenciadas a dicho mamífero. Dicha población de células diferenciadas se puede obtener de dichas células originales cultivadas en presencia de cualquiera de dichas composiciones de acuerdo con la invención. En una realización particular, dicha etapa (a) puede comprender la utilización de una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa o utilizar inmunocitoquímica.

Dicha etapa de administración puede comprender administrar dichas células a través de una administración seleccionada del grupo que consiste de administraciones sistémicas, intracardiacas, e intracoronarias.

5 Otro aspecto de la divulgación es un método para proporcionar tejido cardíaco con cardiomiocitos, en donde dicho método comprende administrar, a dicho tejido cardíaco, dichas células diferenciadas de las reivindicaciones que se pueden obtener mediante contacto con una composición de acuerdo con la invención.

10 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la siguiente descripción. Otras características, objetivos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

15 Este documento proporciona los métodos y materiales relacionados con células cardíacas (por ejemplo, células cardioprogenitoras diferenciadas). Por ejemplo, este documento proporciona células que tienen la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales, los métodos para producir dichas células, las composiciones para producir dichas células, y los métodos para determinar si una población de células (por ejemplo, células cardioprogenitoras diferenciadas) contiene o no células que tienen la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales. Este documento también proporciona los métodos y materiales para proporcionar tejido cardíaco (por ejemplo, tejido cardíaco humano) con cardiomiocitos funcionales.

20 Las células cardioprogenitoras diferenciadas proporcionadas en la presente invención pueden provenir de cualquier especie incluyendo, sin limitación, seres humanos, monos, caballos, perros, gatos, ratas o ratones. Por ejemplo, las células cardioprogenitoras diferenciadas pueden ser células cardioprogenitoras diferenciadas de mamífero (por ejemplo, de humano).

25 En algunos casos, las células cardioprogenitoras diferenciadas proporcionadas en la presente invención tienen la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales.

30 Se puede utilizar cualquier método adecuado para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas. Por ejemplo, las células cardioprogenitoras diferenciadas se pueden derivar de células madre tales como células madre de mamífero (por ejemplo, de humano).

35 En algunos casos, las células cardioprogenitoras diferenciadas se pueden derivar de células madre embrionarias. En algunos casos, las células cardioprogenitoras diferenciadas se pueden derivar de células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales se pueden obtener de cualquier fuente. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden obtener de tejido de mamífero (por ejemplo, de humano) tal como médula ósea y hueso trabecular. Las células madre mesenquimales se pueden cultivar *in vitro*. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden expandir en número *in vitro*. Las células madre mesenquimales pueden expresar o no expresar un marcador polipeptídico sobre la superficie de la célula. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden expresar CD133, CD90, CD105, CD166, CD29, y CD44 sobre la superficie de las células y no expresar CD14, CD34, y CD45 sobre la superficie de las células.

40 Se puede utilizar cualquier método adecuado para derivar células cardioprogenitoras diferenciadas a partir de células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales). Por ejemplo, las células cardioprogenitoras diferenciadas se pueden derivar de células madre mesenquimales al incubar las células madre mesenquimales con una composición (por ejemplo, medio de cultivo). La composición puede ser cualquier composición adecuada que contenga uno o más factores. Los factores pueden ser de cualquier tipo de factores tales como polipéptidos, esteroides, hormonas, y moléculas pequeñas. Los ejemplos de tales factores incluyen, sin limitación, TGFβ, BMP, FGF-2, IGF-1, Activina A, Cardiotrofina, α-trombina, y Cardiogenol C.

45 En una realización, los medios que contienen TGFβ, BMP, Cardiotrofina, α-trombina, y Cardiogenol C (se pueden utilizar para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas a partir de células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales). En tales casos, se pueden agregar al medio FGF-2, IGF-1, Activina A, o una combinación de los mismos después de un periodo de cultivo inicial (por ejemplo, uno o dos días) con medio que contenga TGFβ, BMP, Cardiotrofina, α-trombina, y Cardiogenol C.

50 TGFβ puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de TGFβ, tal como TGFβ humano. Por ejemplo, TGFβ puede ser TGFβ recombinante o TGFβ sintético. En una realización, TGFβ puede ser TGFβ1. Se puede utilizar cualquier concentración apropiada de TGFβ. Por ejemplo, se puede utilizar entre 1 y 10 ng de TGF-β por ml (por ejemplo, aproximadamente 2.5 ng de TGFβ1 por ml).

55 BMP puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de BMP, tal como BMP humano. Por ejemplo, BMP puede ser BMP recombinante o BMP sintético. En una realización, BMP puede ser BMP4. Se puede utilizar cualquier concentración de BMP. Por ejemplo, se puede utilizar entre 1 y 20 ng de BMP por ml (por ejemplo, aproximadamente 5 ng de BMP4 por ml).

- 5 FGF-2 puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de FGF-2, tal como FGF-2 humano. Por ejemplo, FGF-2 puede ser FGF-2 recombinante o FGF-2 sintético. Se puede utilizar cualquier concentración de FGF-2. Por ejemplo, se puede utilizar entre 1 y 20 ng de FGF-2 por ml (por ejemplo, aproximadamente 5 ng de FGF-2 por ml).
- 10 IGF-1 puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de IGF-1, tal como IGF-1 humano. Por ejemplo, IGF-1 puede ser IGF-1 recombinante o IGF-1 sintético. Se puede utilizar cualquier concentración de IGF-1. Por ejemplo, se puede utilizar entre 10 y 100 ng de IGF-1 por ml (por ejemplo, aproximadamente 50 ng de IGF-1 por ml).
- 15 Activina A puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de Activina A, tal como la Activina A humana. Por ejemplo, la Activina A puede ser Activina A recombinante o Activina A sintética. Se puede utilizar cualquier concentración de Activina A. Por ejemplo, se puede utilizar entre 1 y 50 ng de Activina A por ml (por ejemplo, aproximadamente 10 ng de Activina A por ml).
- 20 α -Trombina puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de α -trombina, tal como α -trombina humana. Por ejemplo, la α -trombina puede ser α -trombina recombinante o α -trombina sintética. Se puede utilizar cualquier concentración de α -trombina. Por ejemplo, se puede utilizar entre 0.5 y 10 unidades de α -trombina por ml (por ejemplo, aproximadamente 1 unidad de α -trombina por ml).
- 25 Cardiotrofina puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de Cardiotrofina, tal como Cardiotrofina-1 humana. Por ejemplo, la Cardiotrofina puede ser Cardiotrofina recombinante o Cardiotrofina sintética. Se puede utilizar cualquier concentración de Cardiotrofina. Por ejemplo, se puede utilizar entre 0.5 y 10 ng de Cardiotrofina por ml (por ejemplo, aproximadamente 1 ng de Cardiotrofina-1 por ml).
- 30 IL-6 puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de IL-6, tal como IL-6 humana. Por ejemplo, la IL-6 puede ser IL-6 recombinante o IL-6 sintética. Se puede utilizar cualquier concentración de IL-6. Por ejemplo, se puede utilizar entre 100 y 200 ng de IL-6 por ml.
- 35 Se puede utilizar cualquier concentración de Cardiogenol C o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, clorhidrato de Cardiogenol C). Por ejemplo, se puede utilizar entre 10 y 1000 nM de Cardiogenol C (por ejemplo, aproximadamente 100 nM de Cardiogenol C).
- 40 Ácido retinoico puede ser cualquier molécula que tenga actividad de ácido retinoico, tal como ácido retinoico sintético, ácido retinoico natural, un metabolito de vitamina A, un derivado natural de vitamina A, o un derivado sintético de vitamina A. Se puede utilizar cualquier concentración de ácido retinoico. Por ejemplo, se puede utilizar entre 1×10^{-6} y 2×10^{-6} μ M de ácido retinoico.
- 45 En algunos casos, se puede utilizar medio que contenga suero o libre de suero complementado con TGF β -1 (por ejemplo, 2.5 ng/ml), BMP4 (por ejemplo, 5 ng/ml), FGF-2 (por ejemplo, 5 ng/ml), IGF-1 (por ejemplo, 50 ng/ml), Activina A (por ejemplo, 10 ng/ml), Cardiotrofina (por ejemplo, 1 ng/ml), α -trombina (por ejemplo, 1 Unidad/ml), y Cardiogenol C (por ejemplo, 100 nM) para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas a partir de células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales). En algunos casos, los medios (por ejemplo, medios que contienen suero o libres de suero) pueden contener lisado de plaquetas (por ejemplo, un lisado de plaquetas humanas).
- 50 En algunos casos, la composición utilizada para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas a partir de células madre mesenquimales, puede contener factores opcionales adicionales tales como TNF- α , LIF, y VEGF-A.
- 55 TNF- α puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad TNF- α , tal como TNF- α humano. Por ejemplo, TNF- α puede ser TNF- α recombinante o TNF- α sintético. Se puede utilizar cualquier concentración de TNF- α . Por ejemplo, se puede utilizar entre 5 y 50 ng de TNF- α por ml.
- 60 LIF puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de LIF, tal como LIF humano. Por ejemplo, LIF puede ser LIF recombinante o LIF sintético. Se puede utilizar cualquier concentración de LIF. Por ejemplo, se puede utilizar entre 2.5 y 100 ng de LIF por ml.
- 65 VEGF-A puede ser cualquier polipéptido que tenga actividad de VEGF-A, tal como VEGF-A humano. Por ejemplo, VEGF-A puede ser VEGF-A recombinante o VEGF-A sintético. Se puede utilizar cualquier concentración de VEGF-A. Por ejemplo, se puede utilizar entre 5 y 200 ng de VEGF-A por ml.
- 70 Una composición proporcionada en la presente invención puede contener cualquier combinación de factores. Por ejemplo, una composición proporcionada en la presente invención puede contener TGF β -1, BMP4, Activina A, Cardiotrofina, α -trombina, y Cardiogenol C. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente invención puede contener TGF β -1, BMP4, FGF-2, IGF-1, Cardiotrofina, α -trombina, y Cardiogenol C. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente invención puede contener TGF β -1, BMP4, FGF-2, IGF-1, Cardiotrofina, α -trombina, y Cardiogenol C. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente

invención puede carecer de TNF- α , IL-6, LIF, VEGF-A, ácido retinoico, o cualquier combinación de los mismos (por ejemplo, IL-6, LIF, VEGF-A, y ácido retinoico; LIF, VEGF-A, y ácido retinoico; o TNF- α , IL-6, LIF, y VEGF-A).

5 Una composición proporcionada en la presente invención se puede preparar utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, una composición proporcionada en la presente invención se puede preparar utilizando factores comercialmente disponibles. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente invención se puede preparar para que contenga lisados celulares (por ejemplo, un lisado de plaquetas) o medios acondicionados a partir de células tales como células de cardiomiocitos o células endodérmicas estimuladas por TNF- α . Por ejemplo, una
10 composición proporcionada en la presente invención se puede preparar utilizando un lisado de plaquetas complementado con factores comercialmente disponibles. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente invención se puede preparar utilizando factores aislados de un medio acondicionado. En algunos casos, los factores se pueden disolver en medios tales como medios de cultivo celular que contengan o no contengan suero.

15 Se puede utilizar cualquier método adecuado para incubar células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales) con una composición proporcionada en la presente invención para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas que tengan la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,
20 30, 35, 40, 45, o 50 días. En algunos casos, una composición proporcionada en la presente invención y utilizada para incubar células madre mesenquimales se puede reemplazar diariamente o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días.

25 En algunos casos, las células madre mesenquimales se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención en presencia o en ausencia de suero. Se puede utilizar cualquier densidad celular adecuada cuando se incuban células madre con una composición proporcionada en la presente invención. Por ejemplo, se pueden incubar entre aproximadamente 1000 y 2000 de células madre mesenquimales por cm^2 (por ejemplo, entre aproximadamente 1500-2000 células/ cm^2) con una composición proporcionada en la presente invención para obtener células cardioprogenitoras diferenciadas.

30 Una vez que se hayan incubado las células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales) con una composición proporcionada en la presente invención o bien tratadas con factores de diferenciación, se puede controlar el estado de diferenciación para determinar si las células madre se diferenciaron o no en células cardioprogenitoras diferenciadas que tengan la capacidad de incorporarse en tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales. Por ejemplo, se puede recolectar una muestra de células y evaluarlas utilizando técnicas tales como,
35 transferencia tipo Western, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunocoloración, microscopía confocal láser, y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa). En algunos casos, se pueden seleccionar células que se encontró que expresan un nivel elevado de polipéptidos de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, Nkx2.5, GATA6, Flk-1, Fog 1 y Fog 2 o ARNm para administración en un mamífero para tratar tejido cardíaco.

40 Como se describe en la presente invención, las células cardioprogenitoras diferenciadas derivadas de células madre mesenquimales cultivadas con un lisado de plaquetas que contiene TGF β -1, BMP4, FGF-2, IGF-1, Activina A, Cardiotrofina, α -trombina, y Cardiogenol C exhibió un aumento de 2 a 5 veces en los niveles de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA6, ARNm de Flk-1 o Fog 1 en comparación con los niveles
45 observados con células madre mesenquimales pretratadas. Estas células cardioprogenitoras diferenciadas también exhibieron la capacidad de incorporarse en tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales cuando se inyectaron en el miocardio, en forma subcutánea, o en forma intravascular con una mejoría en la bomba cardíaca directamente correlacionada con la reparación estructural tanto en ambientes isquémicos como no isquémicos. El beneficio funcional se documentó tanto a través de una ecocardiografía *in vivo*, como histológicamente en la autopsia a través de la tinción de proteínas específicas humanas. También como se describe en la presente invención, las células cardioprogenitoras diferenciadas derivadas de células madre mesenquimales cultivadas con suero que contiene TGF β -1, BMP4, FGF-2, IGF-1, Activina A, Cardiotrofina, α -trombina, y Cardiogenol C, exhibieron un aumento de 5 a 10 veces en los niveles de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, y ARNm de Tbx-5 en comparación con los niveles observados en células madre mesenquimales pretratadas.

55 Estas células cardioprogenitoras diferenciadas también exhibieron la capacidad de incorporarse en tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales cuando se inyectaron en el miocardio (por ejemplo, a través del endocardio o el epicardio), en las arterias coronarias, infundidas en el corazón, o se administraron sistémicamente (por ejemplo, en forma subcutánea), con un mejoramiento de la función de la bomba cardíaca relacionado directamente con la
60 reparación estructural tanto en ambientes isquémicos como no isquémicos. El beneficio funcional se documentó mediante ultrasonido cardíaco *in vivo* y mediante análisis microscópico en la autopsia a través de la tinción de proteínas específicas humanas. De esta forma, se pueden usar criterios de liberación tales como niveles elevados de polipéptidos o ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, GATA6, Flk-1, Fog 1, FOG 2, o combinaciones de los mismos para evaluar células antes de la administración en un mamífero.

65

El término "nivel elevado" como se utiliza en la presente invención con respecto a los niveles de polipéptidos o de ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, GATA6, Flk-1, o Fog (por ejemplo, FOG 1 para el ARNm, FOG 2 para el polipéptido) dentro de una población de células se refiere a cualquier nivel que sea mayor que un nivel de referencia para ese polipéptido o ARNm.

5 El término "nivel de referencia" como se utiliza en la presente invención, con respecto a los niveles de polipéptidos o de ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, GATA6, Flk-1, o Fog (por ejemplo, FOG 1 para el ARNm, FOG 2 para el polipéptido) dentro de una población de células se refiere al nivel típicamente encontrado en células pretratadas (por ejemplo, células madre mesenquimales pretratadas). Por ejemplo, un nivel de referencia de ARNm de MEF2c, un nivel de referencia de ARNm de MESP-1, un nivel de referencia de ARNm de Tbx-5, un nivel de referencia de ARNm de GATA6, y un nivel de referencia de ARNm de FOG 1 puede ser el nivel promedio del ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, GATA6, Flk-1 y FOG 1, respectivamente, que está presente en un muestreo aleatorio de células madre mesenquimales no tratadas con una composición proporcionada en la presente invención o bien tratadas con factores de diferenciación. Se apreciará que se utilizan niveles provenientes de muestras comparables cuando se determina si un nivel particular es elevado o no.

Niveles elevados de polipéptidos y/o ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5, GATA4, GATA6, Flk-1, Fog 2 o FOG 1 pueden ser cualquier nivel siempre y cuando el nivel sea mayor que un nivel de referencia correspondiente.

20 Por ejemplo, un nivel elevado de ARNm de Tbx-5 puede ser 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces mayor que el nivel de referencia de ARNm de Tbx-5 observado en células madre mesenquimales sin tratar. Se observa que un nivel de referencia puede ser cualquier cantidad. Por ejemplo, un nivel de referencia para el ARNm de Tbx-5 puede ser cero. En este caso, cualquier nivel de ARNm de Tbx-5 mayor a cero sería un nivel elevado.

25 En algunos casos, los criterios de identificación pueden incluir análisis microscópico de células antes de la administración en un mamífero. Tales análisis microscópicos pueden incluir valorar en las células los polipéptidos del factor de transcripción asociados con el núcleo. Por ejemplo, se pueden evaluar las células adecuadas para liberar en un mamífero con respecto a la presencia de Nkx2.5, MEF2c, GATA4, MESP-1, FOG 2, Tbx-5, o cualquier combinación de los mismos asociados con el núcleo antes de ser liberados en el mamífero.

30 Se puede utilizar cualquier método adecuado para proporcionarle al tejido cardíaco células cardioprogenitoras diferenciadas que tengan la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales. Por ejemplo, se pueden inyectar células cardioprogenitoras diferenciadas en el miocardio (por ejemplo, a través del endocardio o el epicardio), en las arterias coronarias, infundidas en el corazón, o administradas sistémicamente (por ejemplo, en forma subcutánea).

35 Se le puede proporcionar a cualquier tejido cardíaco células cardioprogenitoras diferenciadas. Por ejemplo, se le puede proporcionar al tejido cardíaco de un mamífero (por ejemplo, de humano) células cardioprogenitoras diferenciadas. En algunos casos, se le puede proporcionar al tejido cardíaco que ha sufrido de cardiomiopatía isquémica, infarto al miocardio, o deficiencia cardíaca células cardioprogenitoras diferenciadas.

40 Se puede administrar cualquier tipo de células cardioprogenitoras diferenciadas al tejido cardíaco. Por ejemplo, se pueden administrar células cardioprogenitoras diferenciadas autólogas o heterólogas al tejido cardíaco. En algunos casos, las células madre (por ejemplo, células madre mesenquimales) que se incubaron con una composición proporcionada en la presente invención se pueden administrar al tejido cardíaco.

45 Las células madre se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención durante cualquier período de tiempo antes de que se administren al tejido cardíaco. Por ejemplo, las células madre se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención durante 6 a 24 horas (por ejemplo, 8, 10, 12, 18, o 22 horas) o durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días antes de ser administradas al tejido cardíaco. En algunos casos, las células madre que se incubaron con una composición proporcionada en la presente invención, se pueden administrar al tejido cardíaco junto con una composición proporcionada en la presente invención.

50 Las células madre se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención durante cualquier período de tiempo antes de ser administradas al tejido cardíaco junto con una composición proporcionada en la presente invención. Por ejemplo, las células madre se pueden incubar con una composición proporcionada en la presente invención durante 6 a 24 horas (por ejemplo, 8, 10, 12, 18, o 22 horas) o durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días antes de ser administradas al tejido cardíaco junto con una composición proporcionada en la presente invención.

55 En algunos casos, se pueden valorar las células cardioprogenitoras diferenciadas para determinar si cumplen o no con los criterios de liberación particulares antes de ser administradas a un mamífero. Por ejemplo, las células cardioprogenitoras diferenciadas se pueden valorar utilizando RT-PCR para confirmar que las células cardioprogenitoras diferenciadas expresan un nivel elevado de polipéptidos o de ARNm de MEF2c, MESP-1, Tbx-5,

65

GATA6, Flk-1, Fog, (FOG 1 para el ARNm, FOG 2 para el polipéptido) o combinaciones de los mismos antes de ser administradas en un mamífero.

5 La invención sea describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 representa el cambio de la fracción de eyección (ΔEF) en %, considerada antes y después del tratamiento con células madre mesenquimales humanas no modificadas (hMSC) derivadas de médula ósea de 11 pacientes con enfermedad en la arteria coronaria.

15 La figura 2 obtenida con microscopía confocal después de inmunocoloración con DAPI, muestra la expresión de proteínas del contenido del facto de transcripción cardíaco para el paciente 2 que no demostraron ningún cambio positivo de la fracción de eyección (izquierda) y para el paciente 9 (derecha) que demostró un cambio positivo de la fracción de eyección después del tratamiento.

20 La figura 3 muestra la expresión de ARNm de dos ARNm de factores de transcripción cardíaca significativos en las hMSC de los once pacientes.

La figura 4 muestra la expresión de ARNm, en unidades arbitrarias (A.U.) de factores de transcripción cardíaca para ARNm de Nkx2.5, ARNm de GATA-6 y ARNm de Fog-1, respectivamente, de las hMSC no modificadas, no tratadas (izquierda) y sobre las CP-hMSC, tratadas con un cóctel cardiogénico (derecha).

25 La figura 5 muestra imágenes obtenidas con microscopía confocal que muestran una translocación nuclear de polipéptidos de Nkx2.5, MEF2C, FOG-2 y GATA4 en las CP-hMSC tratadas con un cóctel cardiogénico (derecha), en comparación con las hMSC no modificadas (izquierda).

30 La figura 6 ilustran la conversión progresiva (en los días, D0, D5, D15 y día D20) de hMSC no modificadas en CP-hMSC 'guiadas por cóctel' y eventualmente cardiomiocitos (CM).

La figura 7 muestra la ultraestructura por microscopia electrónica de transición de hMSC no modificadas y cardiomiocitos guiados por cóctel.

35 La figura 8 muestra un cardiomiocito guiado por cóctel en microscopio de luz.

40 La figura 9 representa, en la primera gráfica a la izquierda, la expresión de ARNm de Tbx-5 (en AU) para hMSC sin modificar y CP-hMSC proveniente de cada paciente de la figura 1, estando los resultados para las células sin modificar a la derecha y estando la única para las células CP a la izquierda del histograma. La segunda gráfica en la mitad representa la expresión del ARNm de MEF2C, y la tercera gráfica a la derecha representa la expresión del ARNm de MESP-1. Los valores promedio para las células sin modificar provenientes de todos los pacientes y la única para las células CP para todos los pacientes se proporcionan en el fondo del histograma.

45 La figura 10 es una gráfica que representa el cambio de fracción de eyección (Δ de la fracción de eyección) después del tratamiento del corazón con diferentes cantidades de hMSC sin modificar (parte derecha del histograma para cada uno de los doce pacientes) versus el tratamiento de los corazones con CP-hMSC, es decir, hMSC guiado por cóctel (CP-hMSC).

50 La figura 11, representa la ecocardiografía de corazones infartados sin tratar (izquierda) y tratados con células cardiopoyéticas (derecha), que muestra una reanimación de la pared anterior mucho mejor después del tratamiento con las CP-hMSC.

55 La figura 12 es una gráfica similar a la de la figura 5 que muestra el cambio de la fracción de eyección (ΔEF) después de la inyección de células cardiopoyéticas (a la derecha) y sin modificar (a la izquierda) en el miocardio infartado. La simulación es la inyección sin células.

La figura 13 muestra corazones infartados de murinos tratados con hMSC sin modificar y las CP-hMSC, seis meses después del inicio del tratamiento. Los aneurismas y cicatrices, que permanecieron sin corregir en los corazones tratados con hMSC sin modificar, se resolvieron con el tratamiento de las CP-hMSC que indujo la remuscularización.

60 La figura 14 muestra que la resolución confocal reveló, en el miocardio de murino tratado con hMSC cardiopoyéticas, la presencia generalizada de células derivadas de humanos con tinción positiva para las secuencias de h-ALU-ADN específicas para la especie humana validada con inmunocoloración de lamina específica de humanos, todas las cuales están ausentes en controles infartados.

65 La figura 15 muestra que los cardiomiocitos de origen humano se rastrearon mediante colocalización de la troponina-I y α -actinina cardíacas humanas en corazones tratados con hMSC cardiopoyéticas. Los cardiomiocitos de

origen humano estaban ausentes de los corazones tratados con hMSC sin modificación. La cuantificación dentro de las paredes anteriores infartadas revelaron $3 \pm 2\%$ y $25 \pm 5\%$ de núcleos miocárdicos en corazones sin modificación versus tratados con CP-hMSC, lo que implica un injerto mejorado con el tratamiento con hMSC cardiopoyéticas.

5 La figura 16 contiene fotografías de hMSC sin modificar y CP teñidas para troponina humana, cadena ligera de miosina ventricular mIc2V, y DAPI. El fenotipo de células ventriculares se corroboró con una tinción de contraste de células positivas para troponina humana con inmunocoloración de cadena ligera de miosina ventricular mIc2V en la pared anterior reparada, como se muestra en la figura 15 o la resolución de cicatrices como se muestra en la figura 17.

10 La figura 17 es una fotografía de una cicatriz residual teñida para troponina humana, cadena ligera de miosina ventricular mIc2V, y DAPI.

15 La figura 18 contiene fotografías de miocardio de regeneración tratado con CP-hMSC que demuestra angiogénesis distal con el vaso coronario ocluido.

La figura 19 demuestra la contribución de las CP-hMSC a la neovascularización a través de la expresión de PECAM-1 humano (CD-31) dentro de la vasculatura miocárdica.

20 La figura 20 es una gráfica que representa la fracción de eyección Δ con relación a la simulación (%) versus el tiempo (meses) después del suministro de células. El impacto a largo plazo del tratamiento con las CP-hMSC se rastreó durante más de 1 año, o un tercio de la esperanza de vida del murino que se podría traducir en 25 años de la vida humana. Con relación a la simulación, el tratamiento con hMSC sin modificación mostró un 5% y un 2.5% del efecto de fracción de eyección a los 6 y 12 meses, respectivamente. Por el contrario, los ratones infartados tratados con hMSC cardiopoyéticas demostraron una mejora significativa en la fracción de eyección del 25% a los 6 y 12 meses con relación a la simulación.

25 La figura 21 es una gráfica que representa la fracción de eyección Δ (%) versus el tiempo (meses) después del trasplante de células. La cohorte infartada se estratificó para evaluar la eficacia en subgrupos con deficiencia cardíaca manifiesta documentada (fracción de eyección $<45\%$) en el momento de la intervención. A pesar de la fracción de eyección de pretratamiento equivalente en 35%, sólo el tratamiento con hMSC cardiopoyética mejoró la fracción de eyección absoluta en un 10% a los 6 y 12 meses, contrario a la declinación del 5% en la fracción de eyección en la cohorte tratada con hMSC sin modificación.

30 La figura 22 es una gráfica de barras que representa la tasa de supervivencia (%) para los subgrupos de ratones indicados. En los subgrupos con deficiencia cardíaca manifiesta a los 400 días de seguimiento, no quedaron supervivientes presentes en la simulación y se registró una mortalidad de $>50\%$ con el tratamiento de hMSC sin modificación. Por el contrario, se obtuvo una supervivencia de $>80\%$ con el tratamiento de hMSC cardiopoyética.

35 La figura 23 ilustra la seguridad del tratamiento con las CP-hMSC, determinada mediante examen patológico y electrocardiografía.

Ejemplos

40 Para la recolección de médula ósea se seleccionaron aleatoriamente pacientes que experimentaron una derivación arterial coronaria para una enfermedad cardíaca isquémica. Ellos proporcionaron un consentimiento informado, y los protocolos de estudio fueron aprobados por el Institucional Ethics Committee y el Institutional Animal Care and Use Committe pertinentes. Cabe señalar que no se inyectaron a los pacientes sino a ratones.

50 Ejemplo 1

Las células madre mesenquimales se derivaron de la extracción de médula ósea humana de la cresta ilíaca posterior del hueso pélvico de individuos sanos de 18 a 45 años de edad (Cambrex, East Rutherford, New Jersey). Con base en análisis de citometría de flujo, las células madre mesenquimales expresaron CD90, CD133, CD105, CD166, CD29, y CD44, y no expresaron CD14, CD34, y CD45.

55 Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana se cultivaron ya sea en lisado de plaquetas o en suero complementado con TGF β -1 (2.5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), FGF-2 (5 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml), Activina A (10 ng/ml), Cardiotrofina (1 ng/ml), α -trombina (1 Unidad/ml), y Cardiogenol C (100 nM). Después de 4-10 días en el cultivo que contenía el lisado de plaquetas a una densidad de aproximadamente 1000-2000 células por cm^2 , se encontró que las células expresan 2-5 veces más ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA6, ARNm de Flk-1 o de FOG 1 que las células madre mesenquimales sin tratar.

60 Después de 5-15 días en el cultivo que contenía suero a una densidad de aproximadamente 1000-2000 células por cm^2 , se encontró que las células expresan 5-10 veces más ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA 4, ARNm de GATA6, ARNm de Flk-1 o de FOG 1 que las células madre mesenquimales sin tratar.

Los pares cebadores utilizados para el análisis por RT-PCR fueron cebadores estándar obtenidos comercialmente a través de Applied Biosystems.

5 Los resultados que demuestran que las células cardioprogenitoras diferenciadas tienen la capacidad de incorporarse en el tejido cardíaco como cardiomiocitos funcionales, se obtuvieron tanto *in vivo* dentro del corazón latiendo, como *in vitro* después de la autopsia. *In vivo*, bajo anestesia con isoflurano, el suministro miocárdico directo de células cardioprogenitoras en corazones enfermos mejoró el desempeño cardíaco de acuerdo al seguimiento hecho mediante ecocardiografía en el eje corto con un sondeo en modo M bidimensional en el eje largo, análisis de onda del pulso Doppler, y electrocardiografía de 12 derivaciones.

10 El tejido cardíaco recolectado se fijó en paraformaldehído al 3%, se seccionó, y se sometió a inmunosondeo para rastrear células humanas. Los nuevos cardiomiocitos y vasculatura derivados de humano, con una mejora funcional y resolución de cicatrices, se documentó en análisis en ratones tratados con células cardioprogenitoras que cumplen con los criterios de liberación (por ejemplo, nivel de expresión elevado de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA 4, ARNm de GATA6, ARNm de Flk-1 o de FOG 1), en contraste con la ausencia de beneficios con las células que no pasaron los criterios de liberación.

15 Para aumentar la producción de células cardiopoyéticas para inyección autóloga en pacientes, se consideró un método alternativo ya que la inmunofluorescencia puede consumir mucho tiempo, ser cualitativa y potencialmente dependiente del operador. Un método de elección es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Este método proporciona a resultados más rápidos (en un día) que son independientes del operador y se cuantifican con relación a un estándar de referencia. Además, mientras que las muestras inmunoteñidas requieren una evaluación una por una mediante microscopía de fluorescencia, se pueden analizar hasta 48 muestras diferentes (o condiciones) por duplicado mediante RT-qPCR utilizando placas de 96 pozos.

20 Con el fin de identificar marcadores adecuados para RT-QPCR, se derivaron células cardiopoyéticas provenientes de muestras de médula ósea obtenidas de pacientes cardíacos (n = 7). Las células se evaluaron mediante tinción por inmunofluorescencia para MEF2C y Nkx2.5. Se extrajo el ARN de estas células y se midió la expresión de Nkx2.5 y, MEF2C mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

25 El estándar de referencia consistió de células provenientes del mismo lote, no cultivadas en presencia del cóctel cardiogénico.

30 Los resultados se calcularon utilizando el método delta-Ct doble que normaliza los datos obtenidos de las células tratadas con aquellas de células sin tratar.

35 Se identificó MEF2C como el marcador adecuado de células cardiopoyéticas tanto mediante qPCR como por inmunofluorescencia (translocación nuclear) en comparación con células sin modificación. Por el contrario, el cambio cualitativo en Nkx2.5 observado a nivel de proteínas mediante inmunofluorescencia (translocación nuclear) no se tradujo inicialmente en un cambio cuantitativo a nivel del ARN con relación a las células sin tratar. Luego se investigaron los genes en la dirección 3' de Nkx2.5, ya que la inducción de su expresión dependería de la translocación nuclear de Nkx2.5. Esto condujo a la identificación de MESP-1, Flk-1 y Tbx5 como genes adicionales adecuados para la identificación mediante QPCR.

40 Los aspirados de médula ósea humana (15-20 ml) se obtuvieron durante la cirugía de derivación de la arteria coronaria, después de la esternotomía. La médula ósea se almacenó congelada en una solución congelante libre de suero a base de DMSO. Se seleccionaron células madre mesenquimales mediante la colocación en placas de médula ósea cruda en placas de plástico con un lavado a las 12 horas de la selección de células adhesivas con identidad confirmada mediante análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) utilizando el panel de marcadores CDB4⁺/CD45⁻/CD133⁺. Las células se cultivaron a 37°C en DMEM complementado con 5% de lisado de plaquetas humanas (Mayo Clinic Blood Bank, Rochester, MN).

45 Se produjo infarto al miocardio en ratones inmunocomprometidos, sin pelo (Harlan, Indianápolis, IN). Después de un diseño ciego, un mes después del infarto, se inyectaron un total de 600.000 hMSC sin modificación o guiadas por cardiopoyésis, suspendidas en 12.5 µl de medio de propagación, bajo visualización microscópica en cinco sitios del epicardio en la pared anterior del ventrículo izquierdo. La simulación experimentó el mismo procedimiento quirúrgico sin inyección de células. La inyección en el miocardio de hMSC de médula ósea en este modelo de infarto crónico demostró heterogeneidad en los resultados con el trasplante de células provenientes únicamente de dos de los once individuos estudiados que mejoraron la fracción de eyección en la ecocardiografía.

50 Los pacientes 3 y 9 se identificaron como individuos con un alto potencial cardiogenerativo. Primero se observó a partir de la figura 1 que el cambio de la fracción de eyección en ratones (n = 3) tratados con hMSC de cada uno de los pacientes 3 y 9 fue significativamente positiva, mientras que el cambio para cada uno de los otros pacientes no lo fue.

La expresión de proteína de los factores de transcripción cardiaca se observó en hMSC en microscopia confocal, como se muestra en la figura 2. La barra corresponde a 20 µm representativos para todos los paneles.

5 Se realizó una inmunocoloración con anticuerpos específicos para MEF2C (1:400, Cell Signaling Technologies, Danvers, MA), Nkx2.5 (1:150, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), GATA4 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), Fosfo-AKT^{Ser473} (1:100, Cell Signaling Technologies), Tbx5 (1:5000, Abcam, Cambridge, MA), Mesp-1 (1:250, Novus Bio, Littleton, CO), Fog-2 (1:100, Santa Cruz Biotechnology), proteína sarcomérica α -actinina (1:500, Sigma-Aldrich) y Troponina-1 específica de humanos (1:100, Abcam), mIc2v (1:500, Synaptic Systems, Gottigen, Alemania), Sca-1 (1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN), CD-31/PECAM-1 (1:500, Beckman Coulter, Fullerton, CA), actina α de músculo liso (Abcam) Troponina-1 específica de humanos (1:100, Abcam), Lamina A/C humana (1:50, Novacastra, New Castle, RU), y Ki67 (1:500, Abcam) después de la fijación en paraformaldehído al 3% y la permeabilización con 1% de Triton X-100, y junto con tinción con DAPI para visualizar los núcleos en microscopia confocal realizada con un microscopio confocal de escaneo láser LSM 510 (Carl Zeiss Inc., Jena, Alemania).

10 Los primeros factores de transcripción cardiaca Nkx2.5, Tbx-5 y MESP1 y el último factor de transcripción cardiaca MEF2C se observaron bajo tinción con DAPI. Los resultados para el paciente 2 están a la izquierda; el resultado para el paciente 9 a la derecha. Las imágenes obtenidas muestran que la expresión de los factores de transcripción cardiaca es débil para las hMSC del paciente 2 y alta para el paciente 9. Esto corrobora el hecho de que las hMSC provenientes del paciente 9 proporcionan un beneficio terapéutico eficiente mientras que las hMSC provenientes del paciente 2 no lo hace. La coloración producida por DAPI es azul.

15 En la figura 2, la primera serie de imágenes para Nkx2.5 muestra los núcleos de las células coloreadas con DAPI (izquierda) únicamente azules para las hMSC del paciente 2 (izquierda). También aparece una coloración verde débil que corresponde a la presencia de Nkx2.5 en el citoplasma. La imagen correspondiente al paciente 9 (derecha) muestra una mayor expresión de Nkx2.5 (verde) en el citoplasma y también en los núcleos de las células.

20 La segunda serie de imágenes muestra los factores de transcripción cardiaca Tbx-5 (verde) y MESP-1 (rojo) para el paciente 2, los núcleos de las células y coloreados en azul por el DAPI, no es visible el color verde o rojo, que corresponde a la falta de expresión de Tbx-5 y MESP-1. Para el paciente 2, los citoplasmas de las células se colorean de color rojo y los núcleos de color verde, lo cual corresponde a una fuerte expresión tanto de factores de transcripción cardiaca como a una translocación de Tbx-5 a los núcleos de las células.

25 La tercera serie de imágenes proporciona los resultados para MEF2C, similares a aquel para Nkx2.5.

30 La figura 3 muestra la expresión de ARNm estudiada en qPCR que revela la expresión del factor de transcripción cardiaca (MEF2C y Tbx-5) para las hMSC de los once pacientes del estudio.

35 La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando un kit de PCR TaqMan con un sistema de detección de secuencia Applied Biosystems 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de expresión génica TaqMan se incubaron en una placa de 96 pozos y se corrieron por triplicado. El ciclo de umbral (C_T) se definió como el número de ciclo fraccional en el cual la fluorescencia pasa un umbral fijo. Los valores de C_T de TaqMan se convirtieron en cambios relativos determinados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ normalizado para la expresión de GAPDH (P/N 435.2662-0506003).

40 Se evaluaron los genes enlistados en la tabla 1, que son representativos de la actividad transcripcional cardiaca.

45 Las células se evaluaron a los niveles de ARNm y de proteína antes y después de la estimulación de 5 días con un cóctel cardiogénico que comprende TGF β -1 recombinante humano (2.5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Cardiotrofina (1 ng/ml), α -trombina (1 U/ml), y Cardiogenol C (100 µM). Tanto la expresión del ARNm de MEF2C como del ARNm de Tbx-5 (en unidades arbitrarias AU) son mucho mayores para las hMSC de los pacientes 2 y 9 que para cualquiera de los otros pacientes.

Tabla 1

Identificación del ensayo de Applied Biosystems	Nombre del gen	Símbolo del gen
Hs00231763_m1	-Factor de transcripción de la homeocaja o - factor de transcripción relacionado de NK2, locus 5	Nkx2.5 o NKX2-5 o NKX2.5
Hs00171403_m1	- factor de transcripción cardiaco del dedo de zinc o -proteína de enlazamiento 4 de GATA	GATA-4 o, GATA4 (AB)
Hs00231149_m1	-factor reforzador de miocitos 2C	MEF2c o MEF2C
Hs00361155_m1	-factor de transcripción de caja T o -T-caja 5	Tbx5 o TBX5
Hs00542350_m1	-Cofactor de GATA ("Amigo de GATA") o -proteína del dedo de zinc, tipo múltiple 1	FOG 1 de FOG-1 o FOG1
Hs00251489_m1	-Factor de transcripción de hélice-bucle-hélice -homologo del	Mesp1 o MESP1

	mesodermo posterior 1 (ratón) (AB)	
Hs00232018_m1	-Proteína de enlazamiento 6 de GATA (AB)	GATA-6 o GATA6
Hs00911699_m1	-Receptor del dominio de inserto de quinasa (un tipo III del receptor tirosina quinasa)	Flk-1, o FLK1 o KDR

5 La función y la estructura ventricular izquierda fueron seguidas en serie mediante ecocardiografía transtorácica (Sequoia 512; Siemens, Malvern, PA y VisualSonics Inc., Toronto, Canadá). Se calculó la fracción de eyección como $[(LWd-LWs)/LWd] \times 100$, donde LWd es el volumen diastólico final ventricular izquierdo (μ l), y LWs es el volumen sistólico final ventricular izquierdo (μ l).

10 La figura 4, muestra la expresión de ARNm, en unidades arbitrarias (A.U.) de los factores de transcripción cardiaca para el ARNm de Nkx2.5, el ARNm de GATA-6 y el ARNm de Fog-1, respectivamente, de hMSC (izquierda) sin modificación y en CP-hMSC tratado con un cóctel cardiogénico (derecha). Resulta claro, en cada caso, que los resultados son mucho mejores con la utilización de células tratadas con un cóctel cardiogénico.

15 La figura 5, muestra imágenes obtenidas en microscopía confocal que muestran la translocación nuclear de los polipéptidos de Nkx2.5, MEF2c, GATA4 y FOG-2 en CP-hMSC sin modificación tratada con un cóctel cardiogénico. Nkx2.5, MEF2c, GATA4 y FOG-2 aparecen en verde y DAPI en azul. En las imágenes de las hMSC sin modificación, no aparece ningún factor de transcripción. Los polipéptidos se translocaron en los núcleos de los CP-hMSC (derecha) como se indica por el color verde concentrado.

20 La figura 6, ilustra la conversión progresiva (en los días D0, D5, D15 y el día D20) de las hMSC sin modificación a las CP-hMSC 'guiadas por cóctel' y eventualmente cardiomiocitos, CM. En D0, se colorean los núcleos de color azul mediante DAPI. En D5, el polipéptido MEF2C se transloca en los núcleos (verde). En D15, está presente α -actinina sarcomérica (rojo), que muestra que los sarcómeros están presentes y por lo tanto que las células se acoplan definitivamente en la diferenciación cardiomiocítica y ya no son cardiopoyéticas. Una gran cantidad de troponina-1 está presente en los cardiomiocitos en D20 (diferenciación terminal).

25 La figura 7, muestra la ultraestructura por microscopía electrónica de transición de hMSC sin modificación (izquierda) y el cardiomiocito guiado por cóctel (derecha). Para este fin, se cultivaron las células en lisado de plaquetas al 1% durante 15 días. Los cardiomiocitos presentan una maduración mitocondrial, una sarcomerogénesis y formación de miotubos.

30 La figura 8, muestra un cardiomiocito guiado por cóctel en microscopía de luz. La maduración del sistema de excitación-contracción se valoró a través de la inducción de corrientes transitorias de calcio. Para este fin, se cultivaron las células durante 15 días después de 5 días de estimulación con cóctel y se cargaron durante 30 minutos a 37°C con 5 μ M de la sonda selectiva de calcio del éster de fluo-4-acetoximetilo (Molecular Probes, Carlsbad, CA) para la formación de imágenes *in vivo* utilizando un microscopio Zeiss LSM 510 controlado por temperatura (Zeiss) e imágenes de barrido en línea obtenidas durante una estimulación de 1 Hz.

35 La figura 9, muestra un aumento de 3, 8, y 8 veces en Tbx-5, MEF2C y MESP-1 en hMSC tratada versus no tratada.

40 Como se muestra en la figura 10, las CP-hMSC que reúnen con los criterios CARPI se suministraron *in vivo* un mes después del infarto y mejoraron significativamente la fracción de eyección con respecto a hMSC sin modificación de pacientes coincidentes.

45 La figura 11, representa una ecocardiografía de corazones infartados sin tratar (izquierda) y tratados con células cardiopoyéticas (derecha), que muestra una reanimación de la pared anterior mucho mejor después del tratamiento con CP-hMSC. Los electrocardiogramas se registraron utilizando electrocardiografía de cuatro cables para extremidades (MP150; Biopac, Goleta, CA) bajo anestesia ligera (isoflurano al 1.5%).

50 En la ecocardiografía, la contractilidad mejoró en un 15% y un 20% a uno y dos meses, respectivamente, después del tratamiento con CP-hMSC (n = 14), en contraste con el cambio marginal registrado con hMSC sin modificación (n = 17) o simulación (n = 10; Figura 9). En la parte superior: la ecocardiografía de corazones infartados 4 semanas después de la ligación coronaria y 1 día después antes del trasplante celular (4 semanas después de MI - sin Tx) reveló en el modo M una pared anterior acinética en ambos grupos de estudio. En la mitad: 4 semanas después del trasplante celular (4 semanas después de Tx cel.), los corazones tratados con hMSC sin modificación demostraron acinesia mantenida en la pared anterior, en contraste con la reanimación en el grupo tratado con las CP-hMSC. Parte inferior: 8 semanas después del trasplante celular (8 semanas después de tx cel.), los corazones tratados con hMSC sin modificación siguieron mostrando evidencia limitada de reparación del miocardio versus una actividad contráctil robusta en los corazones infartados tratados con CP hMSC. Los paneles a la izquierda representan vistas del eje largo para-esternal (PS), con una línea punteada que indica el nivel de la captura en modo M 2-D. Las cabezas de flecha en los paneles a la derecha indican la reanimación de la pared anterior.

60 La figura 12 muestra que en promedio, las hMSC cardiopoyéticas guiadas lograron una mejora marcada al mes y a los dos meses de seguimiento después de la inyección en el miocardio infartado. En contraste, los controles de

hMSC sin modificaciones o de simulación tuvieron un impacto limitado en la fracción de eyección. Un asterisco y dos asteriscos indican un $p < 0.01$ con respecto a hMSC sin modificación para los dos puntos de tiempo.

- 5 En corazones tratados con células cardiopoyéticas derivadas de hMSC, la mejora funcional se correlaciona a los tres meses y 18 meses de evaluación histopatológica con la regeneración del miocardio. Los aneurismas y cicatrices, que permanecieron sin corregir en los corazones tratados con hMSC sin modificaciones, se resolvieron con el tratamiento de hMSC cardiopoyéticas que indujeron remuscularización (figura 13).
- 10 Una evaluación patológica general demostró la resolución de las cicatrices más debajo de la ligación de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) (círculo amarillo en los corazones) con, en sección transversal, remuscularización robusta y remodelación disminuida en corazones infartados tratados con hMSC cardiopoyéticas (CP, derecha) en contraste con el que están sin modificación (izquierda) a los 6 meses después del inicio del tratamiento. Estos resultados son particularmente buenos.
- 15 El sondeo para ADN ALU se realizó utilizando una sonda de ALU humana (Biogenex, San Ramon, CA) mediante hibridación a 85°C durante 5-10 minutos e incubaciones a 37°C durante la noche seguido por detección secundaria marcada con GFP anti-fluoresceína.
- 20 La resolución confocal reveló, en el miocardio de murino tratado con CP-hMSC, una presencia extendida de células derivadas de humano con tinción positiva para secuencias de ADN ALU específicas para la especie humana validadas con inmunocoloración con lamina específica humana, todas ausentes en controles infartados (figura 14).
- 25 En contraste con la simulación (izquierda), los corazones tratados con hMSC cardiopoyéticas en evaluación por microscopía confocal reveló la presencia dramática de núcleos humanos como los teñidos por una sonda de ADN h-ALU humana (en la mitad) incrustada dentro del miocardio infartado de murino, confirmado además con una tinción adicional para un anticuerpo de lamina específica humana (derecha, recuadro mostrado en la figura 14). Las secciones congeladas de miocardio se elaboraron a partir de paraformaldehído al 3% súper oxigenado en corazones fijados por perfusión de PBS. La barra indica 50 μM .
- 30 La figura 15 muestra que el anticuerpo troponina-I específica humana no reveló tinción en células sin modificaciones (izquierda) versus una tinción significativa en la pared anterior de los corazones tratados con hMSC cardiopoyéticas (paneles medio y derecho).
- 35 Además, como se muestra en la figura 16, la tinción con troponina-I humana de corazones tratados con hMSC sin modificaciones (parte superior) versus cardiopoyéticas (parte inferior), teñidas con colorante de contraste mIC2v, demostró la generación del miocardio ventricular a partir de células humanas injertadas. Las barras indican 20 μm (parte superior) y 50 μm (parte inferior).
- 40 Como se ilustra en la figura 17, dentro de la cicatriz restante de células cardiopoyéticas derivadas de corazones tratados con hMSC, el miocardio derivado de células madre humanas podía distinguirse del miocardio nativo de murino con colocalización de troponina humana con mIC2V. La barra indica 50 μm .
- 45 En la figura 18, la microscopía superficial detectó angiogénesis distal para la LAD ligada (círculo negro) en corazones tratados con CP-hMSC que surgen de la arteria coronaria derecha (RCA; parte inferior izquierda) y circunflejo (parte inferior derecha).
- 50 La figura 19, muestra la evaluación confocal de vasos colaterales de corazones tratados con hMSC cardiopoyéticas, que demostraron tinción con CD-31 humano específica (PECAM-1). La barra representa 20 μm .
- 55 La figura 20, muestra la evolución del cambio de la fracción de eyección con relación a la simulación en %, durante 12 meses, para el tratamiento tanto con hMSC guiadas por cóctel (CP) como sin modificaciones. Con relación a la simulación, el tratamiento con hMSC sin modificaciones mostró un efecto de fracción de eyección del 5% y 2.5% a los 6 y 12 meses, respectivamente.
- 60 En contraste, los ratones infartados tratados con CP-hMSC demostraron una mejora significativa de la fracción de eyección del 25% a los 6 y 12 meses con relación a la simulación (figura 20). Además, la cohorte infartada se estratificó para evaluar la eficacia en los subgrupos con una deficiencia cardíaca manifiesta documentada (fracción de eyección <45%) al momento de la intervención. A pesar de la fracción de eyección equivalente previa al tratamiento del 35%, sólo el tratamiento con hMSC cardiopoyéticas mejoró la fracción de eyección absoluta en un 10% a los 6 y 12 meses, en contraste con una declinación del 5% en la fracción de eyección en la cohorte tratada con hMSC sin modificaciones (figura 23). Como se muestra en la figura 22, se determinó un beneficio de supervivencia superior en el grupo tratado con hMSC cardiopoyéticas en contraste con la cohorte tratada con células sin modificaciones y la simulación, a través de la aplicación de la función de Kaplan-Meier con limitación de observaciones.
- 65 La eficacia del hMSC cardiopoyéticas (CP) se demostró mediante ecocardiografía al primer año de seguimiento (véase la figura 25). La formación de imágenes de eje largo de corazones tratados con células madre sin

modificaciones, reveló una pared anterior fibrótica e hipocinética más evidente en la evaluación en modo M apical (paciente 11, paneles izquierdos). Por el contrario, los corazones tratados con CP-hMSC revelaron un perfil contráctil robusto a todo lo largo de la pared anterior que refleja un beneficio sostenido de la terapia de células madre guiadas (paciente 11, paneles derechos).

5

Ejemplo 2

Se han observado resultados similares mediante el tratamiento de las células madre con un cóctel que contiene TGFβ-1 recombinante (2.5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Cardiotrofina (1 ng/ml), Cardiogenol C (100 μM) y α-trombina, (1 U/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml) y Activina A (5 ng/ml) utilizados en forma de combinación.

10

Ejemplo 3

Se han observado resultados similares mediante el tratamiento de células madre con un cóctel que contiene TGFβ-1 recombinante (2.5 ng/ml), BMP-4 (5 ng/ml), Activina A (5 ng/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml), Factor IIa (α-trombina, 1 U/ml), IGF-1 (50 ng/ml), y ácido retinoico (1 μM) utilizados en forma de combinación.

15

OTRAS REALIZACIONES

Se debe entender que aunque la invención ha sido descrita junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende TGFβ-1, BMP4, α-trombina, Cardiotrofina, Cardiogenol C, FGF-2, IGF-1 y la Activina A.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste de FGF-4, LIF, VEGF-A y combinaciones de los mismos.
- 10 3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende IL-6, y ácido retinoico.
4. La composición de la reivindicación 1 que carece de al menos un compuesto elegido entre el grupo que consiste de TNF-α, FGF-4, LIF, y VEGF-A.
- 15 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde cuando un compuesto está presente en dicha composición, está presente en una cantidad de entre 1 y 5 ng de dicho TGFβ-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 α-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 y 20 ng de dicho FGF-4 por ml, entre 10 y 100 ng de dicha 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 μM de dicho ácido retinoico por ml.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1 que contiene TGFβ-1 recombinante (2,5 ng/ml), BMP4 (5 ng/ml), Cardiotrofina (1 ng/ml), Cardiogenol C (100 nM), α-trombina, (1 U/ml), FGF-2 (10 ng/ml), IGF-1 (50 ng/ml) y Activina A (5 ng/ml) utilizados en forma de una combinación.
- 25 7. Un medio seleccionado del grupo que consiste en medios que contienen de suero de ternera fetal, suero humano, lisado de plaquetas, y mezclas de los mismos, que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Un método para obtener, a partir de células iniciales, células diferenciadas que expresan un nivel elevado de al menos uno de los ARNm seleccionados del grupo que consiste de ARNm de MEF2c, ARNm de MESP-1, ARNm de Tbx-5, ARNm de GATA4, ARNm de Flk-1, ARNm de GATA6, ARNm de Fog-1, y combinaciones de los mismos, y/o tienen al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de polipéptidos de Nkx2.5, polipéptidos de MEF2c, polipéptidos de Tbx-5, polipéptidos de FOG-2, polipéptidos de GATA-4, polipéptidos de MESP-1, y combinaciones de los mismos, en donde dicho método al menos un polipéptido está asociado con los núcleos de dichas células diferenciadas, en donde dicho método comprende el cultivo de células iniciales en presencia de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Método de la reivindicación 8 en donde las células diferenciadas expresan un nivel elevado de ARNm de MEF2c y ARNm de MESP-1.
- 40 10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, en donde las células iniciales son células madre mesenquimales.
- 45 11. Método de la reivindicación 10 en donde las células madre mesenquimales son células madre derivadas de médula ósea.
- 50 12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 8 y 11, en donde dichas células madre mesenquimales expresan CD90, CD105, CD133, CD166, CD29 y CD44 en la superficie celular y no expresan CD14, CD34, CD45 y en la superficie celular.
- 55 13. Método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde las células diferenciadas son células cardiopoyéticas.
- 60
- 65

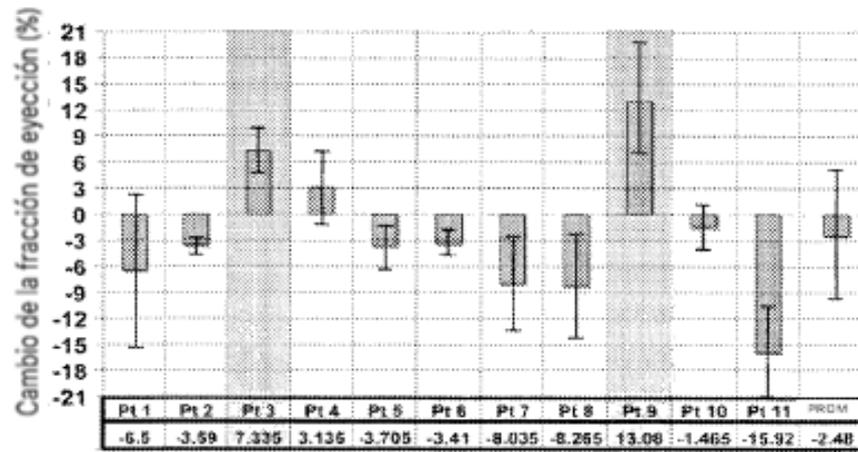


Fig. 1

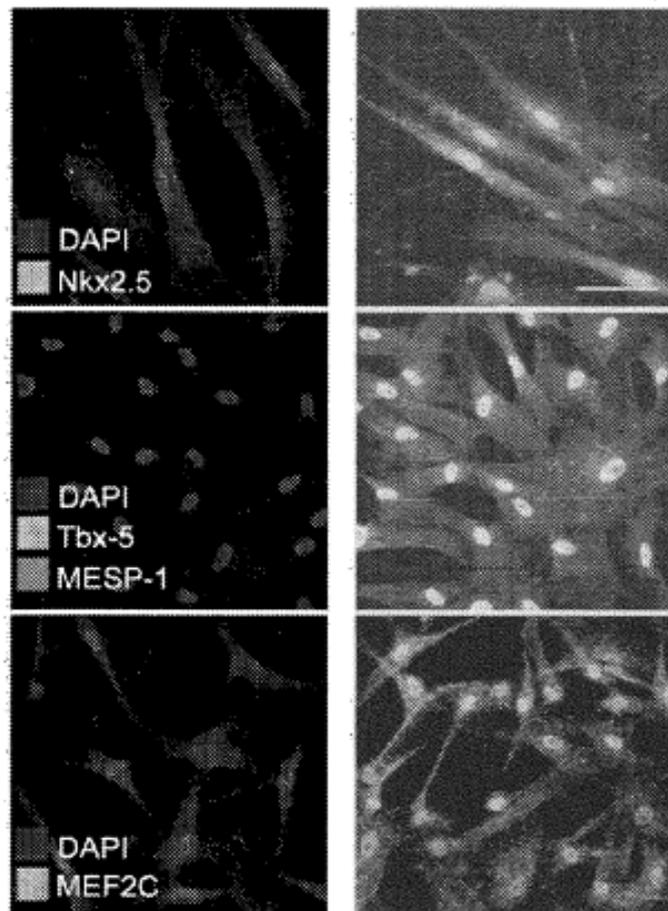


Fig. 2

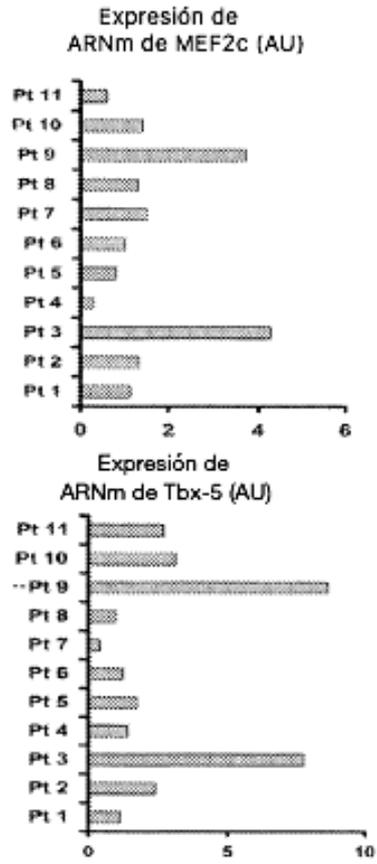


Fig.3

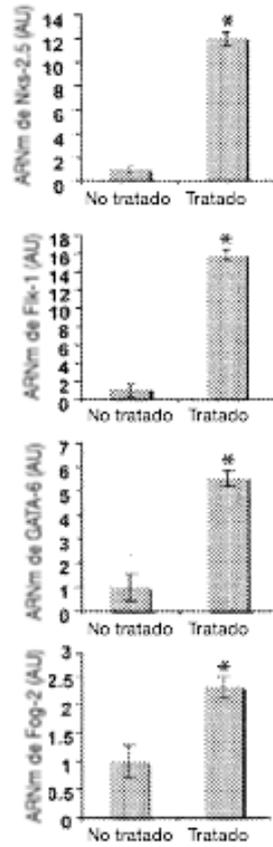


Fig. 4

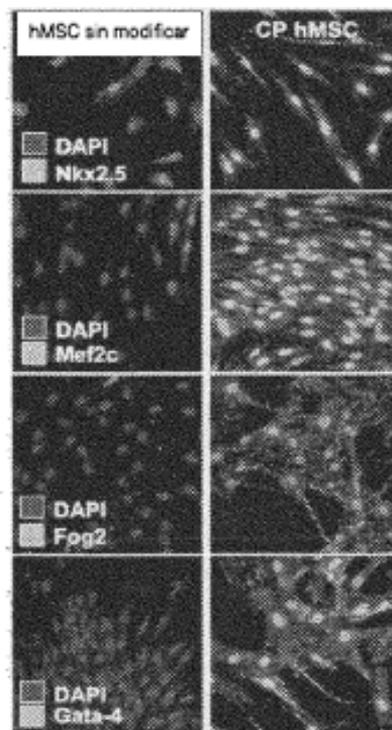


Fig.5

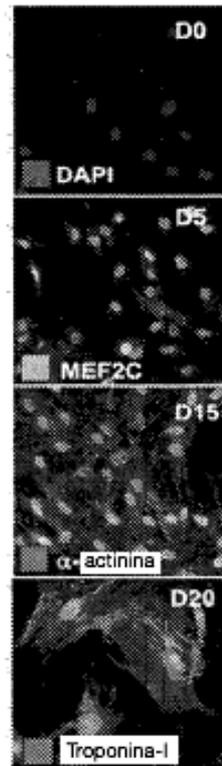
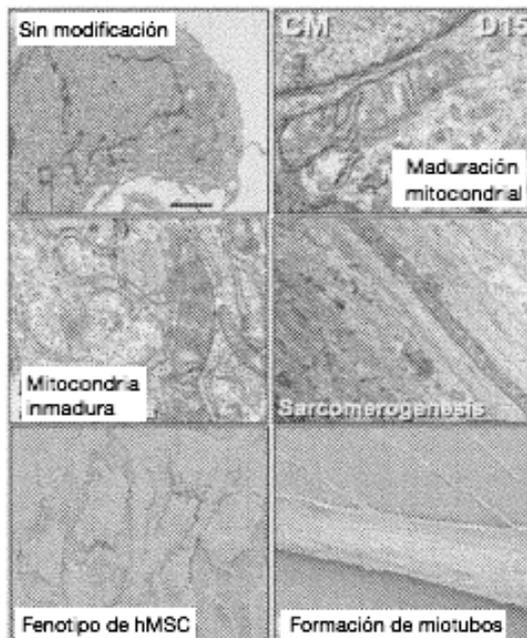


Fig.6



Figura

Fig. 7



Fig. 8

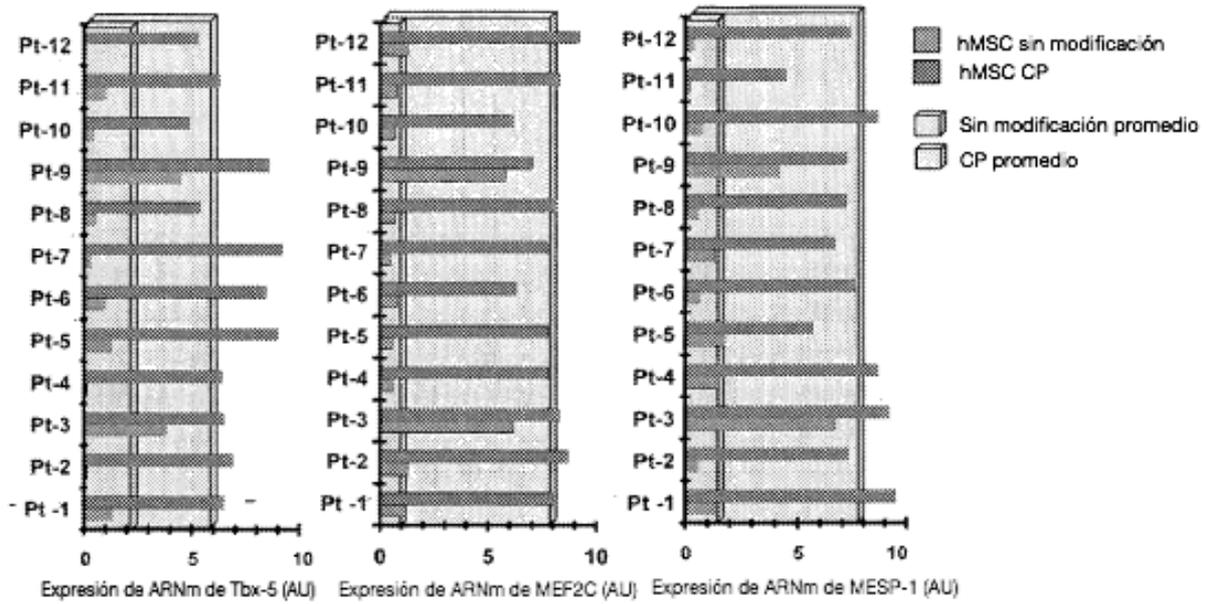


Fig. 9

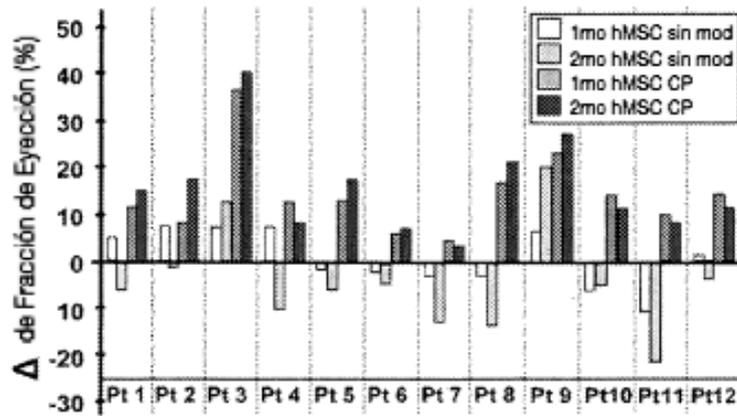


Fig. 10

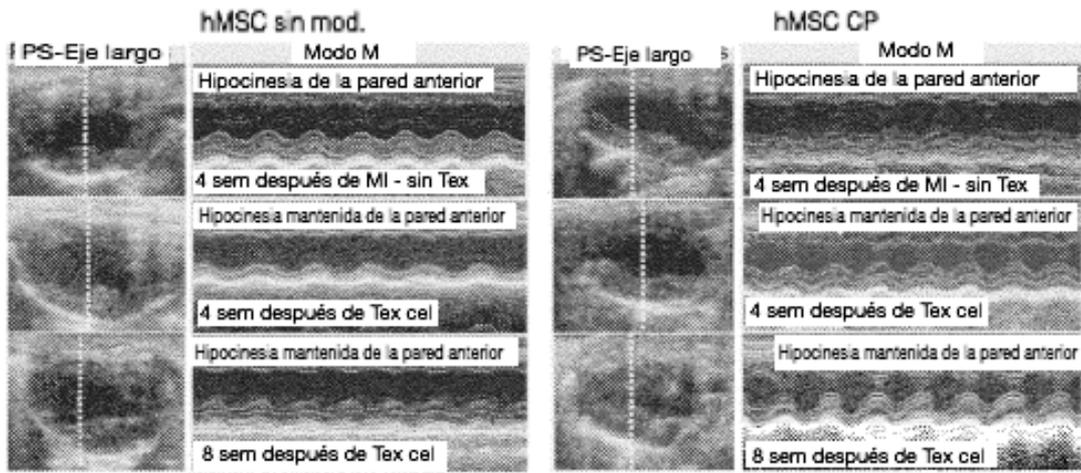


Fig. 11

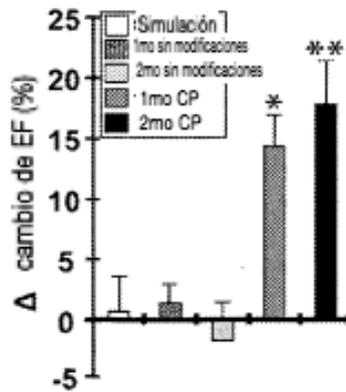


Fig. 12

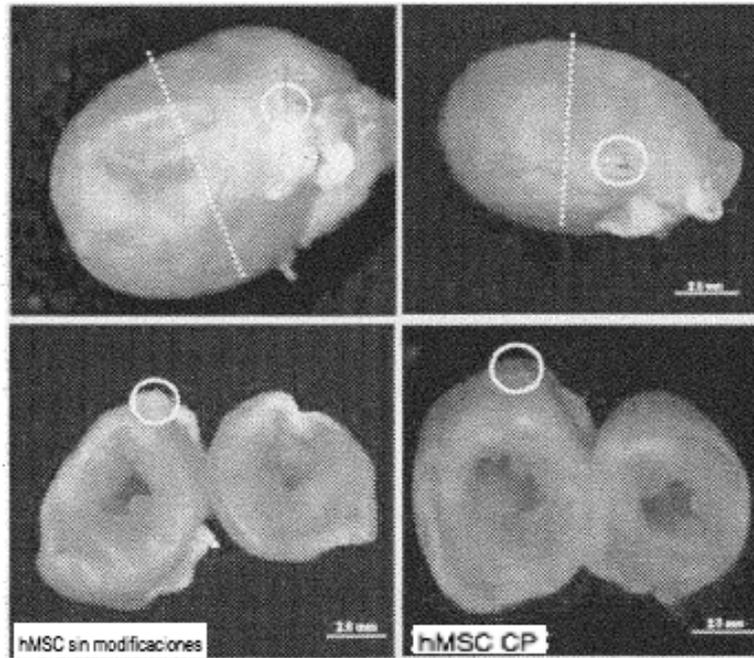


Fig. 13

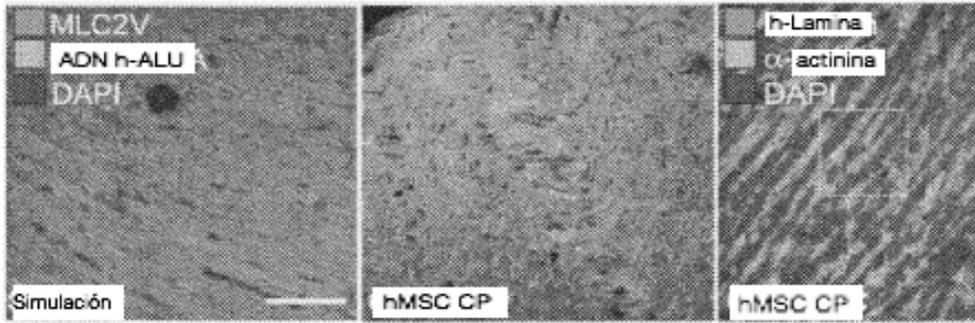


Fig. 14

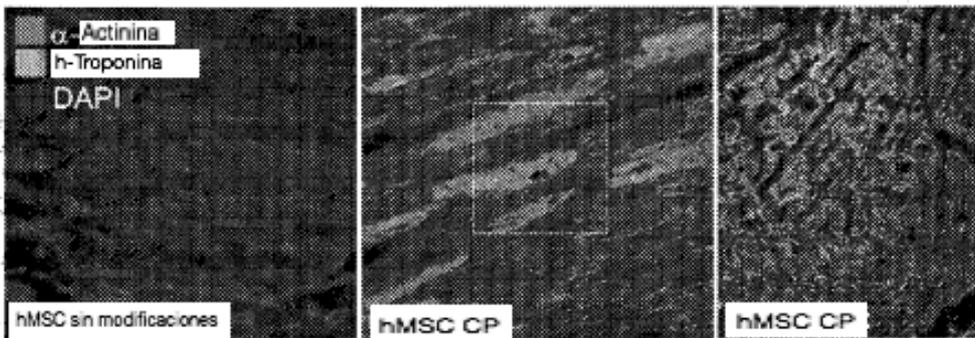


Fig. 15

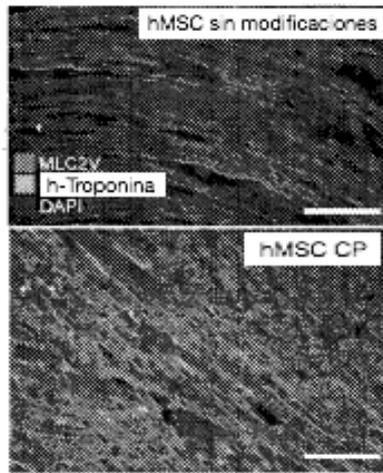


Fig. 16

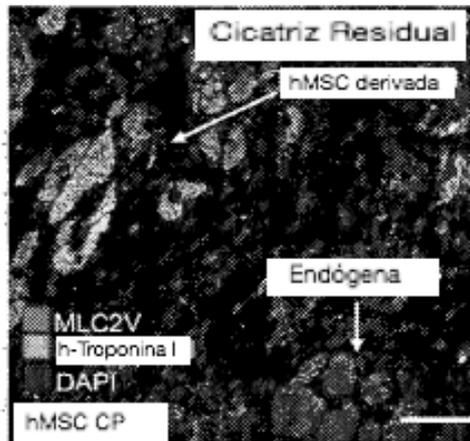


Fig. 17

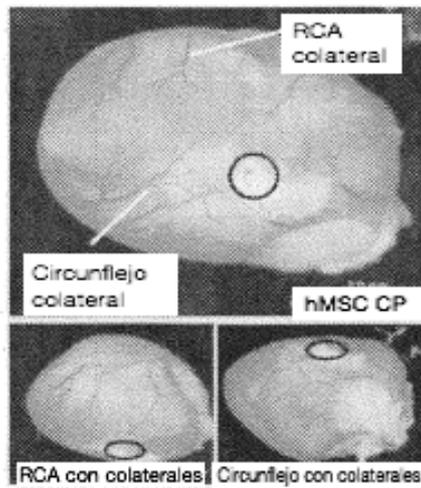


Fig. 18

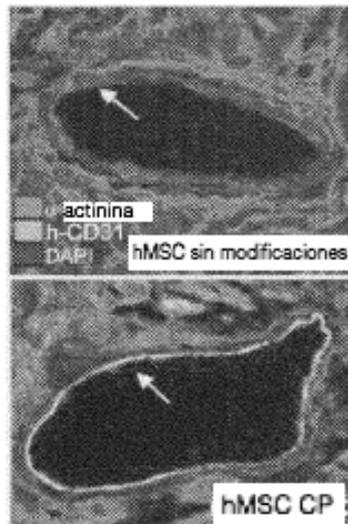


Fig. 19

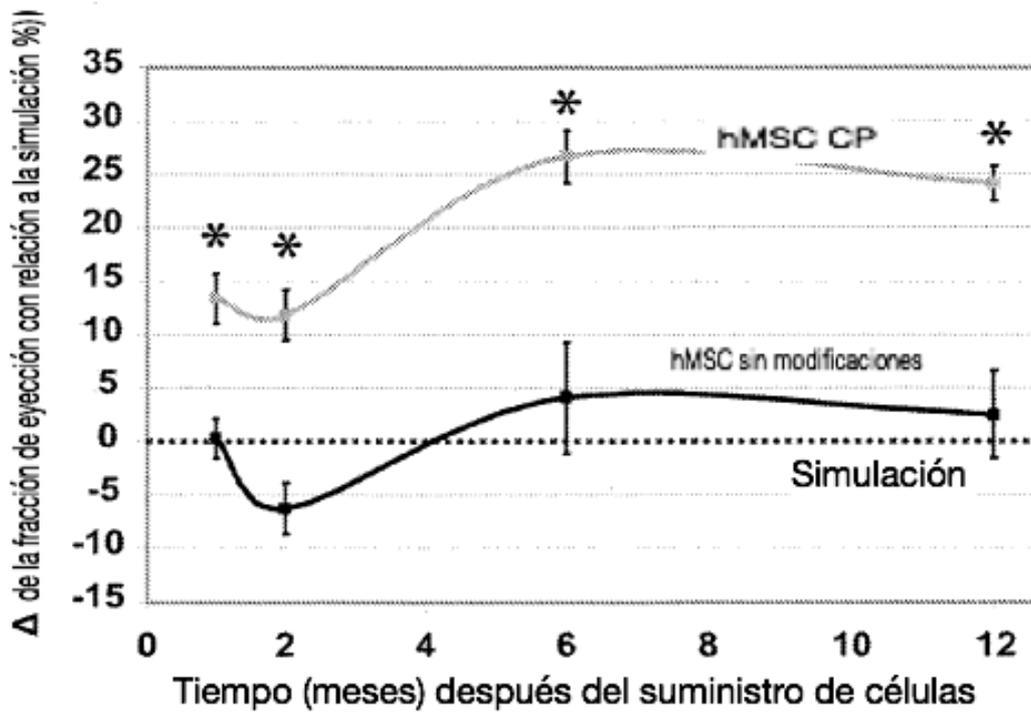


Fig. 20

Análisis del subgrupo - EF <45%

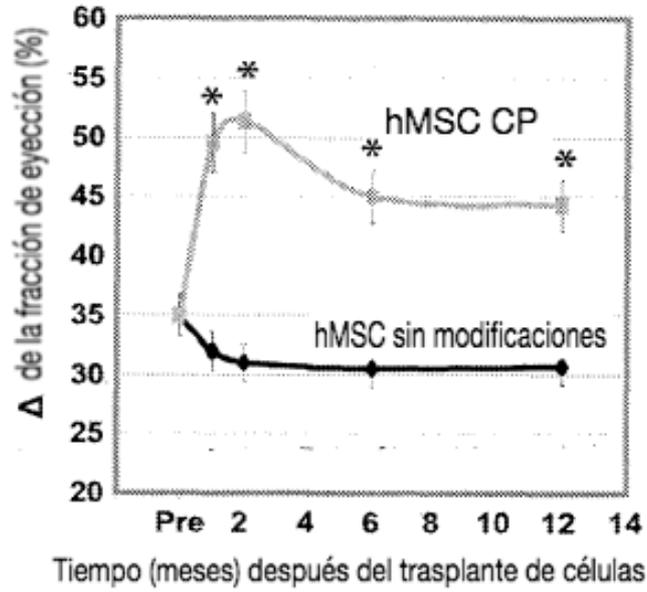


Fig. 21

Análisis del subgrupo - EF <45%

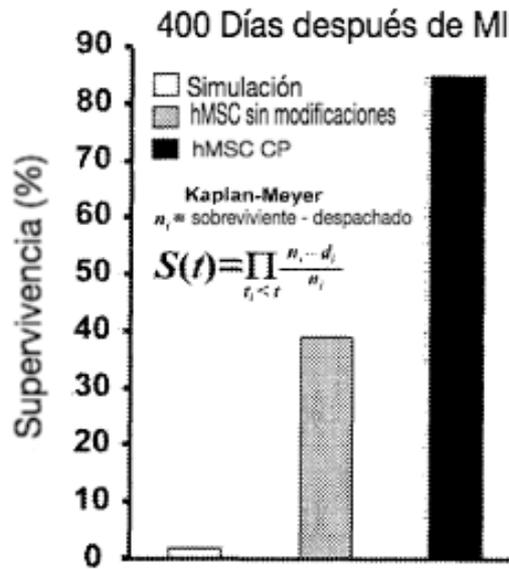


Fig. 22

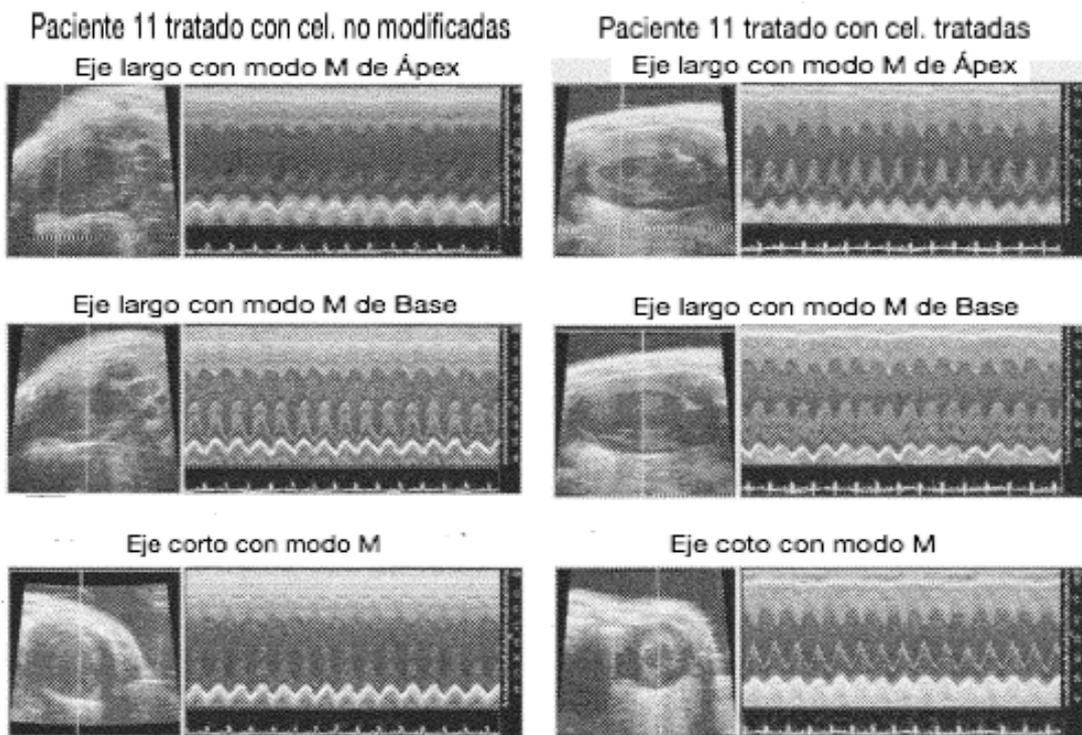


Fig. 23