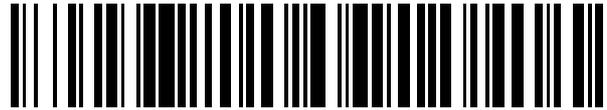


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 961**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 11820774 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2608797**

54 Título: **Células precursoras CD271 derivadas de la médula ósea para reparación cardiaca**

30 Prioridad:

27.08.2010 US 377661 P

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

21.01.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
Office of Technology Transfer 1400 N.W. 10th
Avenue Suite 906
Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**HARE, JOSHUA M. y
MCNIECE, IAN K.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 556 961 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

Células precursoras CD271 derivadas de la médula ósea para reparación cardíaca

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la invención se refieren a procedimientos para tratar enfermedades cardiovasculares usando células precursoras mesenquimales derivadas de médula ósea.

Antecedentes

10 La insuficiencia cardíaca es responsable de 33.200 millones de dólares en costes directos e indirectos al sistema de salud de Estados Unidos (1, 2) y la mayor parte de pacientes con este diagnóstico tienen miocardio cicatrizado a partir de un IM previo. La función ventricular izquierda es el determinante más importante de supervivencia y calidad de vida en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio (IM) (1, 3). El miocardio tiene un potencial regenerativo muy limitado después de infarto y una búsqueda principal en medicina actualmente es la de regeneración de tejido basada en células. Esta búsqueda mantiene la promesa de transformar el tratamiento de numerosas enfermedades crónicas. En el área de cardiomiopatía isquémica crónica (un trastorno que afecta a más de 4 millones de estadounidenses), un producto terapéutico basado en células exitoso tendrá un efecto enorme en la morbilidad del paciente, y reducirá las cargas sociales de este trastorno. Para avanzar en este campo, se han realizado intentos significativos para lograr un producto terapéutico celular exitoso a lo largo de los últimos cinco años y se han analizado estrategias que usan células derivadas de médula ósea en ensayos clínicos tempranos (4, 5). Estos ensayos se han realizado para avanzar en el entendimiento de procedimientos de suministro de células y para establecer perfiles de seguridad; no obstante, una fuente celular ideal sigue sin estar totalmente establecida.

20 **Sumario**

El presente sumario se proporciona para presentar un resumen de la invención que indique brevemente la naturaleza y la sustancia de la invención. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones.

25 Las realizaciones de la invención se refieren a composiciones que comprenden precursores de células mesenquimales derivadas de médula ósea adulta. Estas células se administran *in vivo*, como, por ejemplo, al corazón y regeneran el miocardio.

En una realización preferente, se usan precursores de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ de médula ósea de un sujeto en un procedimiento de prevención o de tratamiento de enfermedades o trastornos cardiovasculares.

30 En una realización, las MSC CD271⁺ se aíslan de células de médula ósea que tienen un receptor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR; CD271). Las células madre CD271⁺ se aíslan de donantes (o fuentes) que comprenden: autólogos, singénicos, alogénicos o xenogénicos. Las células precursoras de MSC se diferencian en al menos un linaje que comprende: linajes miocárdicos, vasculares o endoteliales.

35 En otra realización, las células madre mesenquimales precursoras aisladas se cultivan *ex vivo* y se expanden antes de su administración a un paciente. En una realización, las células madre no adherentes se expanden y se administran a un paciente. En otra realización, las células madre mesenquimales precursoras se administran opcionalmente a un paciente en concentraciones variables a lo largo de un periodo de tiempo. En una realización las células madre mesenquimales precursoras se acondicionan opcionalmente con medios acondicionados con células estromales derivadas del corazón.

40 En otra realización, se administran opcionalmente uno o más agentes al paciente, comprendiendo los agentes al menos uno de: citocinas, factores quimiotácticos, factores de crecimiento o factores de diferenciación.

En una realización, una célula madre adulta comprende una célula derivada de un precursor de células madres mesenquimales (MSC) de médula ósea que tiene un fenotipo CD271⁺.

Otros aspectos se describen más adelante.

45 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra la morfología de células CD271⁺. Se prepararon citospinas y se tiñeron con Wright Giemsa.

Las figuras 2A-2C muestran la formación de MSC a partir de células CD271⁺ (figura 2A; 170.000 células por matraz T75 cm²); MNC de MO (Figura 2B; 15 millones de células por matraz T75 cm²) y C) células CD271 (Figura 2C; 17 millones de células por matraz T75 cm²).

50 La figura 3 muestra una colonia de CFU-F el día 10 de cultivo.

La figura 4 muestra el cultivo de células CD271⁺ en bolsas de teflón durante 7, 14 y 21 días.

La figura 5 muestra el análisis de flujo de células madre mesenquimales no adherentes (NA-MSC). Se muestra la tinción de control de isótopos en la línea verde y CD105-FITC en el área sombreada.

5 Las figuras 6A y 6B muestran la diferenciación osteogénica y de adipocitos de células CD271⁺ de médula ósea humana. La diferenciación osteogénica y de adipocitos se realizó como se describe en los procedimientos. La presencia de diferenciación osteogénica se mostró mediante la expresión de fosfatasa alcalina (AP) teñido con FAST BCIP/NBT (Figura 6A; x/100) el día 14. La diferenciación a adipocitos se mostró mediante tinción de aceite rojo O (Figura 6B; x/100) el día 11. Se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos.

La figura 7 muestra la expresión de marcadores cardiacos en células CD271⁺ cultivadas.

10 La figura 8 muestra la comparación ecocardiográfica de grupos de tratamiento.

15 Las figuras 9A-9D muestran la inmunohistoquímica de secciones cardiacas a partir de ratones NOD/SCID a los que se inyectó células CD271⁺. Las secciones cardiacas se tiñeron con secuencia de Alu y se tiñeron conjuntamente con marcadores cardiacos (α -SA, troponina I (Tnl), conexina 43 (Cx)(40X). La figura 9A muestra una rodaja de la zona periférica con células positivas embebidas en la pared celular y también entre miocitos del huésped. La figura 9B muestra una zona remota hacia la base del corazón que muestra aún células humanas inyectadas. La figura 9C: muestra un vaso sanguíneo grande con células positivas a alu en zona remota. La figura 9D: muestra la zona periférica de otro corazón con numerosas células positivas.

Descripción detallada

20 Las células madres muestran un potencial para muchas áreas diferentes de la salud y la investigación médica. Algunas de las afecciones médicas más graves, tales como cáncer y defectos de nacimiento, están provocadas por problemas que tienen lugar en algún momento en el proceso de diferenciación o de mantenimiento de células madre. En general, existen dos tipos diferentes de células madre, células madre embrionarias y células madre adultas. Las células madre embrionarias se encuentran en blastocitos y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tejidos embrionarios especializados. Las células madre adultas son células no diferenciadas que se encuentran en todo el cuerpo después del desarrollo embrionario. Las células madre adultas son capaces de dividirse y de reponer células moribundas y de regenerar el tejido dañado. Además, las células madre adultas pueden mantener el recambio normal de órganos regenerativos tales como sangre, piel y tejido intestinal. Las células madre adultas tienen la capacidad de dividirse y de autorrenovarse indefinidamente y son capaces de regenerar todos los tipos celulares del órgano del que se han originado.

30 Las células madre pueden clasificarse en totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes en base a su potencial para diferenciarse en diferentes tipos celulares. Las células madre totipotentes se producen a partir de la fusión de gametos y las primeras divisiones del huevo fertilizado. Estas células pueden diferenciarse en tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales. Las células multipotentes pueden producir solo células de una familia estrechamente relacionada. Las células unipotentes pueden producir solo un tipo celular, pero tienen propiedades de autorrenovación que las distingue de las células no madre. La mayor parte de las células madre adultas son células madre multipotentes de linaje restringido y se denominan mediante su tejido de origen. Las células madre adultas pluripotentes son raras y generalmente reducidas en número, pero pueden encontrarse en una serie de tejidos que incluyen sangre del cordón umbilical (Ratajczak M. Z. y col., *Leukemia* 21(5): 860-867 (2007)). Existen varios tipos diferentes de células madre adultas que incluyen, pero sin limitación, células madre derivadas de tejido adiposo (Zuk, P. A. y col., *Tissue Engineering* 7:211-216) (2001)), células madre epiteliales, células madre hematopoyéticas, células madre mamarias (Shackleton, M. y col., *Breast Cancer R E.* 7:86-95 (2005)), células madre mesenquimales, células madre endoteliales, células madre neuronales (Alvarez-Bullta, A. y col., *Brain Res. Bull.* 57:751-758 (2002)), células madre olfativas (Murrel, W. y col., *Dev. Dyn.* 233:496-515 (2005)), células madre testiculares, células madre derivadas de pulpa dental y células progenitoras hematopoyéticas de sangre del cordón umbilical.

45 Cuando una célula madre adulta se divide, crea otra célula similar a sí misma y una célula más diferenciada de sí misma. El proceso de división de células asimétrica proporciona una célula hija idéntica y una célula de amplificación transitoria (TA temprana) que posee una capacidad proliferativa alta. Por medio de una serie de divisiones celulares, la célula de TA temprana proporciona una célula de TA tardía seguida por una célula progenitora específica del tejido y finalmente una cantidad de células diferenciadas que recuperan el órgano o el tejido (Ribacka, C. y col. *Ann. Med.* epub ahead of print: 1-10 (2008)).

55 Más adelante se describen varios aspectos de la invención con referencia a las aplicaciones de ejemplo con fines de ilustración. Debe entenderse que se establecen numerosos detalles específicos, relaciones y procedimientos para proporcionar un entendimiento completo de la invención. Un experto en la técnica en cuestión, no obstante, reconocerá fácilmente que la invención puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente invención no está limitada por la disposición ilustrada de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden tener lugar en un orden diferente y/o concurrentemente con otros actos o acontecimientos. Además, no se requieren todos los actos o acontecimientos ilustrados para implementar una

metodología según la presente invención.

Las realizaciones de la invención pueden ponerse en práctica sin los aspectos teóricos presentados. Además, los aspectos teóricos se presentan con el entendimiento de que los solicitantes no buscan vincularse a la teoría presentada.

5 Definiciones

La terminología usada en el presente documento tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar la invención. Como se usan en el presente documento, las formas del singular "un", "una", "el" y "la" incluyen las formas de plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se pretende que en la medida en que se usen los términos y expresiones "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones dichos términos y dichas expresiones sean inclusivas de un modo similar a la expresión "que comprende".

El término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se determina por parte de un experto en la técnica, que dependerá, en parte, de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar una desviación típica de 1 o más de 1, para la puesta en práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente de hasta el 10 %, más preferentemente de hasta el 5 % y aún más preferentemente de hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, en particular con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, debe asumirse que el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Una "célula madre", como se usa en el presente documento, es una célula no diferenciada que es capaz de propagación esencialmente ilimitada, *in vivo* o *ex vivo*, capaz de diferenciación en otros tipos celulares. Esta puede ser en determinados tipos celulares diferenciados, comprometidos, inmaduros, progenitores o maduros presentes en el tejido del que se han aislado, o tipos celulares drásticamente diferenciados, tales como, por ejemplo, los eritrocitos y linfocitos que se derivan de una célula precursora común, o incluso en tipos celulares en cualquier etapa en un tejido completamente diferente del tejido del que se ha obtenido la célula madre. Por ejemplo, las células madre sanguíneas pueden volverse células cerebrales o células hepáticas, las células madre neuronales pueden volverse células sanguíneas, de modo que las células madre son pluripotenciales, y según las señales apropiadas de su entorno, pueden diferenciarse en cualquier tejido del cuerpo.

La "propagación" puede determinarse, por ejemplo, mediante la capacidad de una célula madre aislada para propagarse a través de al menos 50, preferentemente 100 e incluso hasta 200 o más divisiones celulares en un sistema de cultivo celular. Las células madre pueden ser "totipotentes", lo que significa que pueden producir todas las células de un organismo como células germinales. Las células madre también pueden ser "pluripotentes", lo que significa que pueden producir muchos tipos celulares diferentes, pero no todas las células de un organismo. Cuando una célula madre se diferencia produce en general un tipo celular más adulto, que puede ser una célula parcialmente diferenciada como una célula progenitora, una célula diferenciada o una célula terminalmente diferenciada. Las células madre pueden ser muy móviles.

El "aislamiento" de una célula madre se refiere a un proceso de retirada de una célula madre de una muestra de tejido y de separación de otras células que no son células madre del tejido. Una célula madre aislada estará generalmente exenta de contaminación con otros tipos celulares, es decir, "homogeneidad" o "pureza" y tendrá generalmente la capacidad de propagación y diferenciación para producir células maduras del tejido del que se han aislado. Una célula madre aislada puede existir en presencia de una fracción pequeña de otros tipos celulares que no interfieren en el uso de la célula madre para el análisis o la producción de otros tipos celulares diferenciados. Las células madre aisladas tendrán generalmente al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o el 99,9 % de pureza. Preferentemente, las células madre aisladas según la invención tendrán al menos el 98 % o al menos el 99 % de pureza.

Como se usa en el presente documento, "cultivar" se refiere a propagar o criar una célula, colección de células, tejido u órgano, mediante la incubación durante un periodo de tiempo en un entorno y en condiciones que apoyan la viabilidad o la propagación celular. El cultivo puede incluir una o más etapas de expansión y proliferación de una célula, colección de células, tejido u órgano según la invención.

"Célula progenitora derivada de médula ósea" (BMDC) o "célula madre derivada de médula ósea" se refiere a una célula madre primitiva con la maquinaria para una autorrenovación constitutivamente activa. Incluidas en esta definición están las células madre que son totipotentes, pluripotentes y precursores. Una "célula precursora" puede ser cualquier célula en una ruta de diferenciación celular que sea capaz de diferenciación en una célula más madura. Como tal, la expresión "población de células precursoras" se refiere a un grupo de células capaz de desarrollarse en una célula más madura. Una población de células precursoras puede comprender células que son totipotentes, células que son pluripotentes y células que son células madre de linaje restrictivo (es decir, células

capaces de desarrollarse en menos de todos los linajes hemetopoyéticos o en, por ejemplo, solo células de linaje eritroide).

Como se usa en el presente documento, "autólogo" se pretende que se refiera a cualquier material derivado del mismo individuo al que es tarde que se reintroduzca en el individuo.

- 5 La expresión "célula xenogénica" se refiere a una célula que se deriva de una especie animal diferente a la especie animal que se convierte en el huésped animal receptor en un procedimiento de transporte o de vacunación.

La expresión "célula alogénica" se refiere a una célula que es de la misma especie animal pero genéticamente diferente en uno o más loci genéticos que el animal que se convierte en el "huésped receptor". Esto se aplica habitualmente a células transplantadas desde un animal a otro animal no idéntico de la misma especie.

- 10 La expresión "célula singénica" se refiere a una célula que es de la misma especie animal y tiene la misma composición genética para la mayor parte de los marcadores genotípicos y fenotípicos que el animal que se convierte en el huésped receptor de esa línea celular en un procedimiento de trasplante o vacunación. Esto se aplica habitualmente a células transplantadas desde gemelos idénticos o puede aplicarse a células transplantadas entre animales muy consanguíneos.

- 15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad segura y eficaz" o "cantidad terapéutica" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para proporcionar la respuesta terapéutica deseada sin excesivos efectos secundarios adversos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcionales a una relación beneficio/riesgo cuando se usa del modo de la presente invención. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se quiere decir una cantidad de un compuesto de la presente invención eficaz para proporcionar la respuesta terapéuticamente deseada. La cantidad segura y eficaz específica o la cantidad terapéuticamente eficaz variará con factores tales como la afección particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de mamífero o animal que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concurrente (si lo hay) y las formulaciones específicas usadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.
- 20

"Paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos e incluye sujetos humanos y veterinarios.

- 25 Como se usa en el presente documento, el término "diagnosticar" se refiere a clasificar una enfermedad o un síntoma que determina la gravedad de la enfermedad, realizar un seguimiento de la progresión de la enfermedad, predecir las consecuencias de una enfermedad y/o las perspectivas de recuperación. El término "detectar" también puede abarcar opcionalmente cualquier de los anteriores. Debería indicarse que una "muestra biológica obtenida del sujeto" también puede comprender opcionalmente una muestra que no se ha extraído físicamente del sujeto, como se describe con más detalle más adelante.
- 30

"Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología o los síntomas de un trastorno. En consecuencia, "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. Como se usa en el presente documento, "mejorado" o "tratamiento" se refiere a un síntoma que se enfoca en un valor normalizado (por ejemplo un valor obtenido en un paciente o individuo sano), por ejemplo tiene una diferencia inferior al 50 % con un valor normalizado, preferentemente una diferencia inferior a aproximadamente el 25 % de un valor normalizado, más preferentemente tiene una diferencia inferior al 10 % de un valor normalizado y de modo aún más preferente no es significativamente diferente de un valor normalizado determinado usando ensayos estadísticos rutinarios.

35

- 40 Como se define en el presente documento, "una cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente o compuesto, células, etc., (es decir, una dosificación eficaz) significa una cantidad suficiente para producir un resultado terapéuticamente (por ejemplo, clínicamente) deseable. Las composiciones pueden administrarse de una o más veces por día a una o más veces por semana; incluyendo una vez cada dos días. El experto apreciará que determinados factores pueden influir en la dosificación y la agenda temporal requerida para tratar eficazmente un sujeto, incluidos, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la invención puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" puede referirse a la cantidad de células madre mesenquimales precursoras suficiente para prevenir la recurrencia de enfermedades o trastornos cardiacos, por ejemplo, isquemia, o la aparición de las mismas en un paciente, incluidos, pero sin limitación, los predispuestos a enfermedades cardiacas, por ejemplo los predispuestos genéticamente a enfermedad cardiaca, apoplejía, etc. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse también a la cantidad del agente profiláctico que proporciona un beneficio profiláctico en la prevención de la enfermedad.
- 45
- 50

- 55 El término "muestra" se pretende que se interprete en su sentido más amplio. Una "muestra" se refiere a una muestra biológica, tal como, por ejemplo, una o más células, tejidos o fluidos (incluidos, sin limitación, plasma, suero, sangre completa, líquido cefalorraquídeo, linfa, lágrimas, orina, saliva, leche, pus y exudados y secreciones de tejidos) aislados de un individuo o de constituyentes de cultivo celular, así como muestras obtenidas mediante, por ejemplo, un procedimiento de laboratorio. Una muestra biológica puede comprender cromosomas aislados a partir

de células (por ejemplo, una dispersión de cromosomas de metafase), orgánulos o membranas aislados a partir de células, células completas o tejidos, ácido nucleico tal como ADN genómico en solución o unido a un soporte sólido tal como para análisis de inmunotransferencia Southern, ARN en solución o unido a un soporte sólido como para análisis de inmunotransferencia Northern, ADNc en solución o unido a un soporte sólido, oligonucleótidos en solución o unidos a un soporte sólido, polipéptidos o péptidos en solución o unidos a un soporte sólido, un tejido, una impronta de tejido y similares.

Pueden usarse numerosos procedimientos de recogida de tejido o fluido bien conocidos para recoger la muestra biológica del sujeto para determinar el nivel de ADN, ARN y/o polipéptidos de la variante de interés en el sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, biopsia con aguja fina, biopsia con aguja, biopsia con aguja gruesa y biopsia quirúrgica (por ejemplo, biopsia cerebral) y lavado. Independientemente del procedimiento usado, una vez se obtiene una biopsia/muestra el nivel de la variante puede determinarse y realizarse, de este modo, un diagnóstico.

Como se usa en el presente documento, "enfermedades o trastornos cardiacos" o "enfermedades o trastornos cardiovasculares" se refiere a cualquier tipo de enfermedad o trastorno cardiaco, incluidos cardiomiopatía, aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, cardiopatía isquémica, miocarditis, infección vírica, heridas, cardiopatía hipertensiva, enfermedad vascular, cardiopatía congénica, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, arritmias, enfermedades resultantes en la remodelación del corazón, insuficiencia cardiaca, isquemia, infarto de miocardio, trasplante, hipertensión, reestenosis, angina de pecho, cardiopatía reumática o defectos cardiovasculares congénitos. Las enfermedades o trastornos del corazón pueden deberse a cualquier motivo, tal como por ejemplo daño a tejido cardiaco tal como una pérdida de contractibilidad (por ejemplo, como puede demostrarse por medio de una fracción de eyección reducida).

Los daños o trastornos cardiacos caracterizados por una función cardiaca insuficiente incluyen cualquier alteración o ausencia de una función cardiaca normal o la presencia de una función cardiaca anormal. La función cardiaca anormal puede ser el resultado de una enfermedad, una lesión y/o envejecimiento. Como se usa en el presente documento, la función cardiaca anormal incluye anomalía morfológica y/o funcional de un cardiomiocito, una población de cardiomiocitos, o el corazón mismo. Ejemplos no limitantes de anomalías morfológicas y funcionales incluyen deterioro físico y/o muerte de cardiomiocitos, patrones de crecimiento anormal de cardiomiocitos, anomalías en la conexión física entre cardiomiocitos, subproducción o sobreproducción de una sustancia o sustancias por cardiomiocitos, insuficiencia de cardiomiocitos para producir una sustancia o sustancias que producen normalmente y la transmisión de impulsos eléctricos en patrones anormales o en momentos anormales. Las anomalías en un nivel más burdo incluyen disquinesia, fracción de eyección reducida, cambios observados mediante ecocardiografía (por ejemplo, dilatación), cambios en ECG, cambios en tolerancia del ejercicio, perfusión capilar reducida y cambios observados mediante angiografía. La función cardiaca anormal se observa con muchos trastornos que incluyen, por ejemplo, cardiopatía isquémica, por ejemplo angina de pecho, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica crónica, cardiopatía hipertensiva, cardiopatía pulmonar (cor pulmonale), cardiopatía valvular, por ejemplo fiebre reumática, prolapso de válvula mitral, calcificación de anillo mitral, cardiopatía carcinoide, endocarditis infectiva, cardiopatía congénita, enfermedad de miocardio, por ejemplo miocarditis, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía hipertensiva, trastornos cardiacos que tienen como consecuencia insuficiencia cardiaca congestiva y tumores del corazón, por ejemplo sarcomas primarios y tumores secundarios. El daño cardiaco también incluye heridas, tales como, por ejemplo, heridas por cuchillo; biológicas (por ejemplo víricas, enfermedades autoinmunitarias) o químicas (por ejemplo, quimioterapia, fármacos); cirugía, trasplante y similares.

"Isquemia miocárdica" se refiere a una carencia del flujo de oxígeno al corazón que tiene como consecuencia un daño isquémico miocárdico. Como se usa en el presente documento, la frase daño isquémico miocárdico incluye daño provocado por un flujo de sangre reducido al miocardio. Ejemplos no limitantes de causas de isquemia miocárdica y daño isquémico miocárdico incluyen: presión diastólica aórtica reducida, presión intraventricular aumentada y contracción miocárdica, estenosis arterial coronaria (por ejemplo, ligación coronaria, estenosis coronaria fijada, cambio de placa agudo (por ejemplo, ruptura, hemorragia), trombosis arterial coronaria, vasoconstricción), estenosis de válvula aórtica y regurgitación, y presión atrial derecha aumentada. Los ejemplos no limitantes de efectos adversos de isquemia miocárdica y daño isquémico miocárdico incluyen: daño a miocitos (por ejemplo, pérdida de células miocíticas, hipertrofia miocítica, hiperplasia celular miocítica, angina (por ejemplo, angina de pecho, angina variante, angina inestable, muerte cardiaca súbita), infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca congestiva. El daño debido a isquemia miocárdica puede ser agudo o crónico y las consecuencias pueden incluir formación de cicatrices, remodelación cardiaca, hipertrofia cardiaca, reducción del espesor de pared, dilatación y cambios funcionales asociados. La existencia y la etiología de daño miocárdico agudo o crónico y/o isquemia miocárdica puede diagnosticarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos y técnicas bien conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, toma de imágenes no invasiva (por ejemplo, MRI, ecocardiografía), angiografía, análisis de estrés, ensayos para proteínas específicas cardiacas tales como troponina cardiaca y síntomas clínicos. Estos procedimientos y técnicas así como otras técnicas apropiadas pueden usarse para determinar qué sujetos son candidatos adecuados para los procedimientos de tratamiento descritos en el mismo.

Células CD271⁺ derivadas de médula ósea

La cardiomiopatía isquémica es la causa principal de insuficiencia cardiaca en los países desarrollados; existen

pocos tratamientos que mejoren la función cardiaca una vez ha tenido lugar la remodelación del infarto y hay una carencia de tratamientos que realmente invierten la remodelación perjudicial del corazón después de un infarto de miocardio (IM). La administración de células progenitoras derivadas de médula ósea adulta en el corazón se muestra prometedora en la regeneración del miocardio. Los inventores han demostrado en modelos preclínicos (y por primera vez en seres humanos en datos preliminares) la capacidad de células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea (MO) suministradas al corazón mediante sistemas de suministro quirúrgicos y por catéter para injertarse, apoyar la remodelación inversa, mejorar la función cardiaca y reducir el tamaño de la cicatriz. Aunque las MSC han demostrado ser muy prometedoras, estas células requieren de 4 a 5 semanas de cultivo para obtener cantidades suficientes para su inyección. Un precursor de MSC puede aislarse de la médula ósea en base a la expresión del receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR; CD271) y las células CD271⁺ son una fuente de células fácilmente disponible para uso terapéutico. De forma importante, las células CD271⁺ derivadas de médula ósea pueden obtenerse a partir de la aspiración de médula ósea y aislarse en cantidades suficientes en 4 o 5 horas, proporcionando una ventaja logística para su uso inmediato. Además, estas células son drásticamente superiores en eficacia a MSC cultivadas. El objetivo de los estudios es realizar ensayos preclínicos que analicen células CD271⁺ de MO en un modelo de roedor o de cerdo de infarto de miocardio y traducir este trabajo a un ensayo clínico de inyecciones quirúrgicas directas de células CD-271+ después de una cirugía de derivación arterial coronaria. Sin desear vincularse a ninguna teoría, la hipótesis central es que las células CD271⁺ de MO administradas mediante inyección quirúrgica se injertarán, mejorarán la función cardiaca y reducirán el tamaño de la cicatriz.

La terapia celular para cardiomiopatías isquémicas crónicas ofrece el potencial de evitar daños posteriores al tejido que podrían derivar en una insuficiencia cardiaca. Los inventores han demostrado que las células CD271⁺ humanas son de hecho precursores de MSC y tienen el potencial de reparar tejido isquémico en un modelo de ratón de infarto de miocardio (IM). Las células CD271⁺ son más potentes y tienen una capacidad superior para la diferenciación en cardiomiocitos que las MSC cultivadas. De forma importante, pueden aislarse números adecuados de células CD271⁺ de MO en cuatro o cinco horas, lo que proporciona un avance logístico principal para tratar pacientes inmediatamente con terapia derivada de médula ósea autóloga.

En una realización preferente se usan células CD271⁺ mesenquimales precursoras derivadas de médula ósea (MO) en el tratamiento de tejido isquémico en pacientes con insuficiencia cardiaca.

En otra realización se usan células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ en un procedimiento de prevención o de tratamiento de enfermedades o trastornos cardiovasculares. Preferentemente, las células CD271⁺ se aíslan de células de médula ósea que tienen un receptor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR; CD271).

En otra realización preferente, las células madre CD271⁺ son autólogas, singénicas, alogénicas, xenogénicas o combinaciones de las mismas. Las células madre administradas pueblan y reparan el tejido dañado, por ejemplo, el tejido cardiaco. Estas células se diferencian en los diversos linajes que dan como resultado la regeneración y la reparación del tejido dañado.

En otra realización preferente, se administran opcionalmente uno o más agentes al paciente, comprendiendo los agentes al menos uno de: citocinas, factores quimiotácticos, factores de crecimiento o factores de diferenciación.

En un aspecto, se usan células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ en procedimientos de tratamiento a pacientes con una enfermedad o lesión cardiaca que comprenden la administración de una composición celular terapéutica a un paciente con una enfermedad o una lesión del corazón o del aparato circulatorio, y evaluar al paciente para determinar mejoras en la función cardiaca, en los que dicha composición celular comprende CD271⁺ como se ha descrito en el presente documento. En una realización, la cardiopatía es una cardiomiopatía. En realizaciones específicas, la cardiomiopatía es idiopática o una cardiomiopatía con una causa conocida. En otras realizaciones, la cardiomiopatía es isquémica o no isquémica en naturaleza. En otras realizaciones, la enfermedad del corazón o del sistema circulatorio comprende una o más de angioplasia, aneurisma, angina (angina de pecho), estenosis aórtica, aortitis, arritmias, arteriosclerosis, arteritis, hipertrofia septal asimétrica (ASH), aterosclerosis, fibrilación y aleteo atrial, endocarditis bacteriana, síndrome de Barlow (prolapso de válvula mitral), bradicardia, enfermedad de Buerger (thromboangiitis obliterans), cardiomegalia, cardiomiopatía, carditis, enfermedad de la arteria carótida, coartación de la aorta, cardiopatía congénica (defectos cardiacos congénitos), insuficiencia cardiaca congestiva (insuficiencia cardiaca), enfermedad arterial coronaria, síndrome de Eisenmenger, embolismo, endocarditis, eritromelalgia, fibrilación, displasia fibromuscular, bloqueo cardiaco, soplo al corazón, hipertensión, hipotensión, calcificación arterial infantil idiopática, enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglio linfático mucocutáneo, enfermedades de ganglios linfáticos mucocutáneos, poliarteritis infantil), síndrome metabólico, angina microvascular, infarto de miocardio (ataque al corazón), miocarditis, taquicardia atrial paroxismal (PAT), periarteritis nodosa (poliarteritis, poliarteritis nodosa), pericarditis, enfermedad vascular periférica, isquemia crítica de los miembros, vasculopatía diabética, flebitis, estenosis de válvula pulmonar (estenosis pulmonica), enfermedad de Raynaud, estenosis de arteria renal, hipertensión renovascular, cardiopatía reumática, defectos septales, isquemia silenciosa, síndrome X, taquicardia, arteritis de Takayasu, tetralogía de Fallot, transposición de los vasos grandes, atresia de tricúspide, trunco arterioso, cardiopatía valvular, úlceras varicosas, venas varicosas, vasculitis, defecto septal ventricular, síndrome de Wolf-Parkinson-White o defecto de la almohadilla endocárdica.

En otras realizaciones, la enfermedad del corazón o el sistema circulatorio comprende uno o más de fiebre reumática aguda, pericarditis reumática aguda, endocarditis reumática aguda, miocarditis reumática aguda, cardiopatías reumáticas crónicas, enfermedades de la válvula mitral, estenosis mitral, insuficiencia mitral reumática, enfermedades de válvula aórtica, enfermedades de otras estructuras endocárdicas, cardiopatía isquémica (aguda y subaguda), angina de pecho, enfermedades de la circulación pulmonar (cardiopatía pulmonar aguda, embolismo pulmonar, cardiopatía pulmonar crónica), cardiopatía quifosciliótica, miocarditis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibroelastosis endocárdica, bloqueo atrioventricular, disritmias cardíacas, degeneración miocárdica, enfermedades del aparato circulatorio que incluyen enfermedades cerebrovasculares, oclusión y estenosis de arterias precerebrales, oclusión de arterias cerebrales, enfermedades de arterias, arteriolas y capilares (aterosclerosis, aneurisma), o enfermedades de venas y vasos linfáticos.

En una realización, el tratamiento comprende el tratamiento de un paciente con una cardiomiopatía con una composición celular terapéutica que comprende células CD271⁺ con o sin otro tipo celular. En otras realizaciones preferentes, el paciente experimenta beneficios a partir del tratamiento, por ejemplo a partir de la capacidad de las células para apoyar el crecimiento de otras células, que incluyen células madre o células progenitoras presentes en el corazón, a partir del crecimiento hacia dentro o la vascularización del tejido y a partir de la presencia de factores celulares beneficiosos, quimiocinas, citocinas y similares.

La mejora en un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del sistema circulatorio en la que se administran al individuo las células CD271⁺ o composiciones terapéuticas que proporcionan las mismas puede evaluarse o demostrarse mediante una mejora detectable en uno o más síntomas de la enfermedad o el trastorno del aparato circulatorio.

En otra realización, la mejora en un individuo que tiene una enfermedad o trastorno del aparato circulatorio, en la que se administran al individuo las células CD271⁺ o composiciones terapéuticas que las proporcionan puede evaluarse o demostrarse mediante una mejora detectable en uno o más indicios de función cardíaca, por ejemplo, demostración de mejora detectable en uno o más de gasto cardíaco (CO) de pecho, índice cardíaco (CI), presión arterial pulmonar (PAWP) e índice cardíaco (CI), % de acortamiento fraccional (% FS), fracción de eyección (FE), fracción de eyección ventricular izquierda (LVEF); diámetro diastólico del extremo ventricular izquierda (LVEDD), diámetro sistólico del extremo ventricular izquierdo (LVESD), contractilidad (por ejemplo, dP/dt), bucles de presión-volumen, medidas del trabajo del corazón, un aumento en el funcionamiento atrial o ventricular; un aumento en la eficacia de bombeo, un aumento en la tasa de pérdida de eficacia de bombeo, un aumento en la pérdida de funcionamiento hemodinámica y una reducción en complicaciones asociadas con cardiomiopatías, en comparación con el individuo antes de la administración de células CD271⁺.

La mejora en un individuo que recibe las composiciones terapéuticas proporcionadas en el presente documento también puede evaluarse mediante parámetros subjetivos, por ejemplo la autoevaluación del individuo sobre su estado de salud después de la administración.

En determinadas circunstancias, los procedimientos de tratamiento proporcionados en el presente documento que inducen a las células CD271⁺ terapéuticas a diferenciarse a lo largo del linaje mesenquimal, por ejemplo hacia un fenotipo cardiomiogénico, angiogénico o vasculogénico, o en células tales como miocitos, cardiomiocitos, células endoteliales, células miocárdicas, células epicárdicas, células endoteliales vasculares, células de músculos lisos (por ejemplo, células de músculos lisos vasculares).

La administración de células CD271⁺ o composiciones terapéuticas que comprenden dichas células a un individuo con necesidad de ello, puede realizarse, por ejemplo, por trasplante, implante (por ejemplo, de las células mismas o las células como parte de una combinación célula-matriz), inyección (por ejemplo, directamente al sitio de la enfermedad o la afección, por ejemplo, directamente a un sitio isquémico en el corazón de un individuo que ha tenido un infarto de miocardio), infusión, administración mediante catéter, o cualquier otro medio conocido en la técnica para proporcionar una terapia celular.

En una realización, las composiciones celulares terapéuticas se proporcionan a un individuo con necesidad de las mismas, por ejemplo, mediante inyección en uno o más sitios en el individuo. En una realización específica, las composiciones celulares terapéuticas se proporcionan mediante inyección intracardiaca, por ejemplo a una zona isquémica del corazón. En otras realizaciones específicas, las células se inyectan a la superficie del corazón, a una zona adyacente o incluso a una zona más remota. En realizaciones preferentes, las células pueden administrarse a la zona enferma o lesionada.

Se pueden administrar células CD271⁺ a un individuo que tenga una enfermedad o afección de los aparatos coronario o vascular en cualquier momento en el que las células sean terapéuticamente beneficiosas. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las células o composiciones terapéuticas de la invención se administran dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas o 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, 26, 27, 28, 29 o 30 días del infarto de miocardio. La administración próxima en el tiempo a un infarto de miocardio, por ejemplo dentro de un periodo de 1-3 o 1-7 días, es preferible a la administración distal en el tiempo, por ejemplo después de 3 o 7 días después de un infarto de miocardio. En otras realizaciones, por ejemplo, las células o composiciones terapéuticas de la invención se

administran dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas o 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, 26, 27, 28, 29 o 30 días del diagnóstico de la enfermedad o afección.

5 También se proporciona en el presente documento kits para usar en el tratamiento de infarto de miocardio. Los kits proporcionan la composición celular terapéutica que puede prepararse en una forma farmacéuticamente aceptable, por ejemplo mezclándola con un vehículo farmacéuticamente aceptable. De forma ideal el kit puede usarse en el campo, por ejemplo en el despacho de un médico, o mediante un proveedor de cuidados de emergencia que se aplican a un paciente al que se ha diagnosticado que ha tenido un infarto de miocardio o acontecimiento cardiaco similar.

10 En algunos aspectos de los procedimientos de tratamiento proporcionados en el presente documento, las células CD271⁺ se administran con células madre que no son células CD271⁺, mioblastos, miocitos, cardiomiocitos o progenitores de mioblastos, miocitos, cardiomioblastos y/o cardiomiocitos.

15 En una realización específica, los procedimientos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprenden la administración de células CD271⁺, por ejemplo una composición terapéutica que comprende las células, a un paciente con una enfermedad del corazón o del sistema circulatorio; y evaluar al paciente para determinar mejoras en la función cardiaca, en los que la composición celular terapéutica se administra como complejo matriz-célula. En determinadas realizaciones, la matriz es un andamiaje, preferentemente bioabsorbible, que comprende al menos las células.

20 En algunas realizaciones, las poblaciones de células CD271⁺ se incuban o se administran a un paciente en presencia de uno o más factores que estimulan la diferenciación de células madre o progenitoras a lo largo de una ruta cardiogénica, angiogénica, hemangiogénica o vasculogénica. Dichos factores son conocidos en la técnica; la determinación de condiciones adecuadas para la diferenciación puede realizarse con experimentos rutinarios. Dichos factores incluyen, pero sin limitación, factores tales como factores de crecimiento, quimiolinas, citocinas, productos celulares, agentes de desmetilación y otros estímulos que son ahora conocidos o se determinan posteriormente para estimular la diferenciación, por ejemplo de células madre, a lo largo de rutas o linajes cardiogénicos, angiogénicos, hemangiogénicos o vasculogénicos. Por ejemplo, las células CD271⁺ pueden diferenciarse a lo largo de rutas o linajes cardiogénicos, angiogénicos, hemangiogénicos o vasculogénicos mediante cultivo de las células en presencia de factores que comprenden al menos uno de un agente de desmetilación, un BMP, FGF, proteína de factor Wnt, Hedgehog y/o factores anti-Wnt.

30 La inclusión de agentes de desmetilación tiende a permitir a las células diferenciarse a lo largo de líneas mesenquimales, hacia una ruta cardiomiogénica. La diferenciación puede determinarse mediante, por ejemplo, la expresión de al menos uno de cardiomiosina, miosina esquelética o GATA4; o mediante la adquisición de un ritmo de latido, espontáneo o inducido de otro modo; o mediante la capacidad para integrarse al menos parcialmente en un músculo cardiaco del paciente sin inducir arritmias. Los agentes de desmetilación que pueden usarse para iniciar dicha diferenciación incluyen, pero sin limitación, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, dimetilsulfóxido, cloruro de queleritrina, ácido retinoico o sales del mismo, ácido 2-amino-4-(etiltilio)butírico, procainamida y procaina.

35 En determinadas realizaciones en el presente documento, las células se vuelven células cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas, o progenitoras. Preferentemente las células se integran en un sistema cardiovascular del receptor, incluidos, pero sin limitación, músculo cardiaco, vascular y otras estructuras del corazón, vasos cardiacos o periféricos y similares. En otras determinadas circunstancias, las células CD271⁺ se diferencian en células que adquieren dos o más de los indicios de células cardiomiogénicas o sus progenitores y son capaces de integrarse en el corazón o la vasculatura del receptor. En realizaciones específicas, las células que se administran a un individuo no dan como resultado ningún aumento de arritmias, defectos cardiacos, defectos de vasos sanguíneos u otras anomalías del sistema circulatorio del individuo o la salud del mismo. En determinadas realizaciones, las células CD271⁺ actúan promoviendo la diferenciación de células madre presentes de forma natural en músculos cardiacos, vasos sanguíneos, sangre y similares del paciente diferenciándose a sí mismas en, por ejemplo, cardiomiocitos, o al menos a lo largo de líneas cardiomiogénicas, angiogénicas, hemangiogénicas o vasculogénicas.

40 Las células CD271⁺ y poblaciones de dichas células pueden proporcionarse terapéuticamente o profilácticamente a un individuo, por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o afección del corazón o del sistema circulatorio o que afecta a los mismos. Dichas enfermedades, trastornos o afecciones pueden incluir insuficiencia cardiaca congestiva debida a aterosclerosis, cardiomiopatía o lesión cardiaca, por ejemplo una lesión isquémica, tal como de infarto o herida de miocardio (agudo o crónico).

45 Las células CD271⁺ pueden administrarse a un individuo en forma de una composición terapéutica que comprende las células y otro agente terapéutico, como factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), IL-8, un agente antitrombogénico (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa y PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona); compuestos antitrombina, antagonistas del receptor de plaquetas, anticuerpos anti-

trombina, anticuerpos del receptor anti-plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina y/o inhibidores de plaquetas, un agente antiapoptótico (por ejemplo, EPO, derivados y análogos de EPO y sus sales, TPO, IGF-I, IGFII, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o inhibidores de caspasa), un agente antiinflamatorio (por ejemplo, inhibidores de quinasa P38 MAP, estatinas, inhibidores de IL-6 y IL-1, pemirolast, tranilast, remicade, sirolimus, compuestos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, tepoxalina, tolmetina o suprofen), un agente inmunodepresor o inmunomodulatorio (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, por ejemplo ciclosporina, tacrolimus, inhibidores de mTOR tales como sirolimus o everolimus; antiproliferativos tales como azatioprina y micofenolato mofetilo; corticosteroides, por ejemplo, prednisolona o hidrocortisona; anticuerpos tales como anticuerpos del receptor de anti-IL-2Ra monoclonales, basiliximab, daclizuma, anticuerpos anti-linfocitos T monoclonales tales como globulina anti-timocitos (ATG), globulina anti-linfocitos (ALG) y el anticuerpo anti-linfocitos T monoclonales OKT3 y/o un antioxidante (por ejemplo, probucol; vitaminas A, C y E, coenzima Q-10, glutatión, L cisteína, N-acetilcisteína o derivados antioxidantes, análogos o sales de los anteriores). En determinadas realizaciones, las composiciones terapéuticas que comprenden las células CD271⁺ comprenden además uno o más tipos celulares adicionales, por ejemplo células adultas (por ejemplo fibroplastos o células endodérmicas) o células madre o progenitoras. Dichos agentes terapéuticos y/o una o más células adicionales pueden administrarse a un individuo con necesidad de ello individualmente o en combinaciones de dos o más de dichos compuestos o agentes.

En determinadas realizaciones, el individuo que se va a tratar es un mamífero. En una realización específica, el individuo que se va a tratar es un ser humano. En determinadas realizaciones, el individuo es un animal de ganadería o un animal doméstico. En otra realización específica, el individuo que se va a tratar es un caballo, una oveja, una vaca o un toro, un cerdo, un perro o un gato.

En otra realización preferente, la población de células madre tiene al menos aproximadamente el 80 % de pureza en comparación con una muestra de control aislada de un tejido cardíaco, preferentemente la población de células madre tiene aproximadamente el 90 % de pureza en comparación con una muestra de control de células, preferentemente la población de células madre tiene aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 % de pureza en comparación con una muestra de control de células.

En otra realización preferente, las poblaciones de células madre CD271⁺ aisladas pueden usarse en cualquier ensayo deseado por el usuario final, tal como, por ejemplo, la expresión de una molécula extraña no nativa, una molécula nativa que puede o no puede activarse en las células. Ejemplos de dichas moléculas pueden ser factores de crecimiento, receptores, ligandos, agentes terapéuticos, etc. Las moléculas pueden seleccionarse por parte del usuario final para la expresión mediante células madre aisladas que dependen de la necesidad del usuario final. Las moléculas comprenden, por ejemplo, un polipéptido, un péptido, un oligonucleótido, un polinucleótido, una molécula orgánica o inorgánica.

En otra realización preferente, las células madre pueden ser células madre embriónicas, células madre adultas, células madre de sangre del cordón umbilical o células madre cancerosas. En realizaciones preferentes, las células madre son células madre adultas, preferentemente células madre cardíacas.

Adicionalmente, las células madre de la presente invención pueden ser células madre hematopoyéticas o células madre mesenquimales. Las células madre de la presente invención pueden ser células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes. Las células madre según la presente invención pueden seleccionarse mediante la presencia de uno o más marcadores de células madre que incluyen, pero sin limitación: CD133, CD34, CD38, CD117/c-kit, OCT3/4, Nanog, RUNX2, SOX9, Integrina, SPARC, osteocalcina, endoglin y STRO-1.

Las células madre de la presente invención pueden ser células madre primarias o pueden derivarse de una línea de células madre establecida, línea de células madre premalignas, línea celular cancerosa o cualquier línea celular que manifieste cualquier marcador de células madre. Las células madre primarias pueden derivarse de un paciente con cáncer o un paciente sano.

Administración: El aislamiento de poblaciones de células madre CD271⁺ es útil para muchos tipos de aplicaciones, por ejemplo, trasplante en el corazón u otros órganos para el tratamiento de enfermedades o trastornos cardíacos, tales como miocardio dañado. Como se usa en el presente documento, "miocardio dañado" se refiere a células de miocardio que se han expuesto a condiciones isquémicas. Estas condiciones isquémicas pueden estar provocadas por un infarto de miocardio u otras enfermedades cardiovasculares o dolencias relacionadas. La carencia de oxígeno causa la muerte de las células en la zona circundante, dejando un infarto, que formará, eventualmente, cicatrices. Como se usa en el presente documento, "cardiopatía relacionada con la edad" se refiere al deterioro del miocardio como consecuencia de mecanismos intrínsecos que tienen lugar cuando el organismo envejece.

En una realización preferente, las células madre se usan en procedimientos de reparación y/o regeneración del miocardio dañado o cardiomiopatía relacionada con la edad en un sujeto con necesidad de ello administrando células madre aisladas a zonas de miocardio dañado, en las que las células madre administradas se diferencian en uno o más miocitos, células endoteliales o células del músculo liso. Las células diferenciadas pueden proliferar y forman diversas estructuras cardíacas que incluyen arterias coronarias, arteriolas, capilares y miocardio, que son todas estructuras esenciales para una función apropiada en el corazón. La capacidad de restaurar la integridad tanto

funcional como estructural es otro aspecto más de la presente invención. En una realización preferente, las células madre son células madre cardíacas adultas. En otra realización, las células madre cardíacas adultas se aíslan de tejido cardíaco recogido del sujeto con necesidad de tratamiento terapéutico para una de las afecciones cardíacas o de vasculatura y se implantan de nuevo en el sujeto.

- 5 En otra realización preferente, las células madre CD271⁺ aisladas se cultivan y se expanden *ex vivo* antes de la administración de las células madre a un paciente. Las células pueden ser, por ejemplo, autólogas, singénicas, alogénicas, xenogénicas o cualquier combinación de las mismas. La misma fuente de células madre no debe usarse si se requieren administraciones sucesivas.

10 Así, en realizaciones preferentes, la invención implica la administración de una dosis o una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre al corazón. Una dosis eficaz es una cantidad suficiente para obtener un resultado clínico beneficioso o deseado. La dosis podría administrarse en una o en más administraciones. La determinación precisa de qué podría considerarse una dosis eficaz puede basarse en factores individuales a cada paciente, incluidos su tamaño, edad, zona de daño de miocardio y cantidades de tiempo desde el daño. Un experto en la técnica, específicamente un médico o cardiólogo, sería capaz de determinar el número de células madre que
15 constituirían una dosis eficaz sin una gran experimentación.

En algunas realizaciones de la invención, las células madre aisladas se activan antes de la administración a un sujeto. La activación de las células madre puede realizarse exponiendo las células madre aisladas a una o más citocinas, tales como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) o variantes de los mismos. El HGF incluye positivamente en la migración y alojamiento mediante la activación del
20 receptor de c-Met (Kollet y col. (2003) J. Clin. Invest. 112: 160-169; Linke y col. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 8966-8971; Rosu-Myles y col. (2005) J. Cell. Sci. 118: 4343-4352; Urbanek y col. (2005) Circ. Res. 97: 663-673). De forma similar, el IGF-1 y su receptor correspondiente (IGF-1R) inducen la división de células madre, regulan al alza la actividad de telomerasa, impiden la senescencia replicativa y conservan el conjunto de células madre cardíacas funcionalmente competentes en el corazón (Kajstura y col. (2001) Diabetes 50: 1414-1424; Torella y col. (2004) Circ. Res. 94: 514-524; Davis y col. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 8155-8160). En una
25 realización preferente, las células madre aisladas se ponen en contacto con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1).

Algunos de otros ejemplos no limitantes de citocinas que son adecuadas para la activación de las células madre aisladas incluyen activina A, proteína morfogénica de huesos 2, proteína morfogénica de huesos 4, proteína morfogénica de huesos 6, cardiotrofina 1, factor de crecimiento de fibroblastos 1, factor de crecimiento de fibroblastos 4, ligando Flt3, factor neurotrófico derivado de glial, heparina, factor de crecimiento similar a insulina II, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 3, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 5, interleucina 3, interleucina 6, interleucina 8, factor inhibidor de leucemia, midkina, factor de crecimiento derivado de plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, progesterona, putrescina, factor de células madre, factor derivado de estroma 1, trombopoyetina, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante P2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento endotelial vascular, Wnt1, Wnt3a y Wnt5a, como se describe por Kanemura y col. (2005) Cell Transplant. 14:673-682; Kaplan y col. (2005) Nature 438:750-751; Xu y col. (2005) Methods Mol. Med. 121:189-202; Quinn y col. (2005) Methods Mol. Med. 121:125-148; Almeida y col. (2005) J Biol. Chem. 280:41342-41351; Bamabe-Heider y col (2005) Neuron 48:253-265; Madlambayan y col. (2005) Exp Hematol 33: 1229-1239; Kamanga-Sollo y col. (2005) Exp Cell Res 311:167-176; Heese y col. (2005) Neuro-oncol. 7:476-484; He y col. (2005) Am J. Physiol. 289:H968H972; Beattie y col. (2005) Stem Cells 23:489-495; Sekiya y col. (2005) Cell Tissue Res 320:269-276; Weidt (2004) Stem Cells 22:890-896; Encabo y col. (2004) Stem Cells 22:725-740; y Buytaeri-Hoefen y col. (2004) Stem Cells 22:669-674, la totalidad del texto de cada una de las mismas se incorpora al presente documento
30 por referencia.

Las variantes funcionales de las citocinas mencionadas anteriormente también pueden usarse en la invención. Las variantes de citocina funcionales mantendrían su capacidad para unirse a sus receptores correspondientes y activarlos. Las variantes pueden incluir sustituciones, inserciones, deleciones de aminoácidos, variantes de ajuste alternativas o fragmentos de la proteína nativa. Por ejemplo, NK1 y NK2 son variantes de ajuste naturales de HGF, que son capaces de unirse al receptor de c-MET. Estos tipos de variantes de ajuste de origen natural, así como
35 variantes obtenidas mediante ingeniería genética de las proteínas citocinas que conservan la función se contemplan por parte de la invención.

En algunas realizaciones, la administración de células madre a un sujeto con necesidad de ello viene acompañada por la administración de una o más citocinas al corazón. Las citocinas pueden seleccionarse del grupo que consiste en factor de células madre (SCF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor destimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor derivado de célula estromal 1, factor de acero, factor de crecimiento endothelial vascular, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), interleucina 3, o cualquier citocina capaz de la estimulación y/o movilización de células madre. En una realización preferente, las citocinas se seleccionan de HGF, IGF-1, variantes funcionales de HGF o IGF-1, o combinaciones de los mismos. Las citocinas pueden administrarse simultáneamente con las poblaciones de células madre CD271⁺.
40
55
60

Alternativamente, la administración de las citocinas puede preceder o ser posterior a la administración de las células madre en un periodo de tiempo específico. El periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 mes o aproximadamente 6 meses.

Las citocinas pueden administrarse al corazón en una o más administraciones. En una realización, las citocinas se administran mediante una única administración. En otra realización, las administraciones múltiples de la misma dosificación de citocinas se realizan al corazón. Una realización preferente de la invención incluye la administración de múltiples dosis de las citocinas al corazón, de modo que se forme un gradiente quimiotáctico. Un gradiente quimiotáctico que se extiende del atrio y/o ápex del corazón a la región central de ventrículo izquierdo puede establecerse administrando múltiples dosis de concentración de citocinas creciente. Alternativamente, el gradiente quimiotáctico puede formarse desde el sitio de implante de las células madre a la región central del ventrículo izquierdo o la región periférica del miocardio infartado.

En una realización, se usan al menos dos citocinas en la formación del gradiente quimiotáctico. En otra realización, la concentración de la primera citocina permanece constante mientras que la concentración de la segunda citocina es variable, formando, por lo tanto, el gradiente quimiotáctico.

En una realización preferente, el gradiente quimiotáctico se forma mediante administraciones múltiples de IGF-1 y HGF, en las que las concentraciones de IGF-1 permanecen constantes y la concentración de HGF es variable. En algunas realizaciones, las concentraciones variables de HGF pueden variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 400 ng/ml. En otras realizaciones, la concentración de IGF-1 puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 ng/ml.

La población de células madre CD271⁺ aisladas y citocinas puede administrarse al corazón mediante inyección. La inyección es preferentemente intramiocárdica. Como será consciente un experto en la técnica, este es el procedimiento preferente de administración para células madre y/o citocinas ya que el corazón es un músculo en funcionamiento. La inyección por esta vía asegura que el material inyectado no se perderá debido a los movimientos de contracción del corazón.

En otro aspecto de la invención, las células madre y/o las citocinas se administran mediante inyección por vía transendocárdica o transepicárdica. Esta realización preferente permite que las citocinas penetren la membrana circundante protectora, necesario para la realización en la que las citocinas se inyección por vía intramiocárdica. Otra realización preferente de la invención incluye el uso de un enfoque basado en catéter para administrar las inyecciones transendocárdicas. El uso de un catéter evita procedimientos más invasivos de administración en los que sería necesaria la apertura de la cavidad pectoral. Como apreciará un experto en la técnica, el tiempo óptimo de recuperación se permitiría mediante el procedimiento menos invasivo. Un enfoque de catéter implica el uso de técnicas tales como el catéter NOGA o sistemas similares. El sistema de catéter NOGA facilita la administración guiada proporcionando un mapeo electromecánico de la zona de interés, así como una aguja retráctil que pueda usarse para administrar inyecciones dirigidas o para bañar una zona diana con un producto terapéutico. Cualquiera de las realizaciones de la presente invención puede administrarse usando dicho sistema para administrar inyecciones o proporcionar un producto terapéutico. Un experto en la técnica reconocerá que también pueden usarse con la presente invención sistemas alternativos que también proporcionan la capacidad de proporcionar un tratamiento dirigido mediante la integración de toma de imágenes y un sistema de administración de catéter. Puede hallarse información con respecto al uso de NOGA y sistemas similares en, por ejemplo, Sherman (2003) Basic Appl. Myol. 13: 11-14; Patel y col (2005) The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 130:1631-38; y Perrin y col. (2003) Circulation 107: 2294-2302; el texto de cada uno de los mismos se incorpora al presente documento en su totalidad. En otra realización, las células madre cardíacas aisladas se administran por una vía de administración intracoronaria. Un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse con la presente invención otras procedimientos útiles de administración o implante, incluidos los descritos por Dawn y col. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3766-3771, el contenido del cual se incorpora al presente documento en su totalidad.

La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ de la presente invención es útil para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, incluidas, pero sin limitación, aterosclerosis, isquemia, hipertensión, reestenosis, angina de pecho, cardiopatía reumática, defectos cardiovasculares congénitos, cardiomiopatía relacionada con la edad e inflamación arterial y otra enfermedad de las arterias, arteriolas y capilares. Específicamente, los procedimientos de la presente invención proporcionan la reparación y/o la regeneración de miocardio dañado consecuencia de una o más de las enfermedades enumeradas anteriormente o de la disminución general de células de miocardio con la edad.

La presente invención también abarca el uso para prevenir o tratar insuficiencia cardíaca en un sujeto que comprende administrar una población de células madre cardíacas adultas CD271⁺ aislada al corazón de un sujeto y administrar un antagonista del receptor de angiotensina II. En una realización, la población de células madre cardíacas adultas CD271⁺ se activa antes de su administración mediante exposición a una o más citocinas como se describe en el presente documento. En otra realización, se administran una o más citocinas al corazón para formar un gradiente quimiotáctico que provoca que las células madre cardíacas adultas administradas migren a zonas de

daño miocárdico. En otra realización las, una o más, citocinas son HGF, IGF-1 o variantes de las mismas. El sistema renina-angiotensina (RAS) es un sistema hormonal que facilita la regulación de la presión sanguínea y el volumen extracelular en el cuerpo. Cuando la perfusión renal se reduce, las células presentes en el riñón liberan la enzima renina. La renina escinde el angiotensinógeno, un péptido precursor inactivo segregado por el hígado, en angiotensina I. La angiotensina I se convierte subsiguientemente en angiotensina II (Ang II) mediante la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que se encuentra predominantemente en los pulmones. La Ang II produce muchos efectos, incluidos vasoconstricción y secreción de aldosterona y vasopresina, mediante la activación del receptor de AT1. La Ang II se ha implicado en la acumulación dependiente de la edad del daño oxidativo en el corazón (Fiordaliso y col. (2001) Diabetes 50: 2363-2375; Kajstura y col. (2001) Diabetes 50: 1414-1424), y se ha informado que inducen senescencia y reduce el número y la función de células progenitoras endoteliales (Kobayashi y col. (2006) Hypertens. Res. 29: 449-455). Además, la Ang II desencadena apoptosis en miocitos (Leri y col. (1998) J. Clin. Invest. 101: 1326-1342) y puede contribuir a la progresión de insuficiencia cardiaca (McMurray y col. (2003) Lancet 362: 767-771). De hecho, la inhibición de receptores de AT1 se ha demostrado que mejora el rendimiento clínico de pacientes con insuficiencia cardiaca crónica y prolonga la vida en seres humanos (McMurray y col. (2003) Lancet 362: 767-771).

La invención proporciona procedimientos de prevención de insuficiencia cardiaca y/o tratamiento de insuficiencia cardiaca crónica en un sujeto administrando un antagonista del receptor de Ang II en combinación con la administración de células madre cardiacas adultas al corazón del sujeto. Preferentemente, el antagonista del receptor de Ang II es un antagonista del receptor de AT1. Algunos ejemplos no limitantes de antagonistas del receptor de Ang II que estarían abarcados por la invención incluyen valsartán, telmisartán, losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán y eprosartán.

Además pueden administrarse inhibidores de enzima convertidora de angiotensina (ACE) adicionalmente o en lugar del antagonista del receptor de Ang II. Como se ha descrito anteriormente, la ACE convierte angiotensina I en angiotensina II. La inhibición de esta enzima produciría niveles reducidos de Ang II y, así, reduciría los efectos perjudiciales de Ang II sobre células madre cardiacas. Los inhibidores de ACE que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, venazepril, enalapril, lisinopril, captopril, fosinopril, ramipril, perindopril, quinapril, moexipril y trandolapril.

Los antagonistas del receptor de Ang II o inhibidores de ACE pueden administrarse al sujeto en dosis múltiples subsiguientemente a la administración de las células madre cardiacas adultas. Los antagonistas o inhibidores pueden administrarse en una agenda rutinaria durante un periodo de tiempo establecido. Por ejemplo, los inhibidores pueden administrarse una vez al día durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 12 meses o aproximadamente 24 meses después de la administración de las células madre cardiacas adultas. Pueden usarse otras agendas de dosificación. Un experto en la técnica, particularmente un médico o cardiólogo, sería capaz de determinar la dosis y la agenda apropiada para la administración de los inhibidores de ACE o antagonistas del receptor de Ang II. Preferentemente, uno o más síntomas de insuficiencia cardiaca se reducen o se alivian siguiendo la administración de las células madre cardiacas y el antagonista del receptor de angiotensina II y/o inhibidor de ACE. Los síntomas de insuficiencia cardiaca incluyen, pero sin limitación, fatiga, debilidad, ritmo cardiaco rápido o irregular, disnea, tos o jadeos persistentes, edema en las piernas y los pies e hinchazón del abdomen.

La invención también comprende procedimientos para preparar composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que incluyen células madre adultas y/o al menos una citosina, por ejemplo, para usar en procedimientos de la invención para tratar enfermedades cardiovasculares, insuficiencia cardiaca u otras afecciones cardiacas. En una realización, la composición farmacéutica comprende células madre cardiacas humanas aisladas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto preferente, los procedimientos y/o composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, comprenden cantidades eficaces de células madre cardiacas humanas o dos o más citocinas en combinación con un agente farmacéutico apropiado útil en el tratamiento de afecciones cardiacas y/o vasculares.

En un aspecto adicionalmente preferente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran por inyección. Estas vías de administración incluyen, pero sin limitación, administración por vía subcutánea o parenteral, incluidas intravenosa, intraarterial (por ejemplo, intracoronaria), intramuscular, intraperitoneal, intramiocárdica, transendocárdica, transepicárdica, intranasal, así como intratecal y técnicas de infusión. En consecuencia, la composición farmacéutica se encuentra preferentemente en una forma que es adecuada para inyección. Cuando se administra un producto terapéutico de la presente invención por vía parenteral, se formulará generalmente en una forma inyectable de dosis unidad (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. Como sistemas disolventes para composiciones de compuestos también pueden usarse vehículos no

acuosos tales como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete y sus ésteres, tales como miristato de isopropilo. Adicionalmente pueden añadirse otros aditivos que mejoran la estabilidad, la esterilidad y la isotonicidad de las composiciones, incluidos conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede provocar mediante el uso de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, no obstante, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con los compuestos. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos usados en la puesta en práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversas cantidades de los otros ingredientes, si se desea.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, que por ejemplo comprenden una dosis terapéutica de células madre CD271⁺, pueden administrarse al sujeto en una formulación inyectable que contiene cualquier excipiente compatible, tal como diversos vehículos, coadyuvantes, aditivos y diluyentes; o los compuestos usados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al sujeto en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de administración dirigida tales como anticuerpos monoclonales, matrices poliméricas iontoforéticas, liposomas y microesferas. Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención pueden administrarse por vía oral al sujeto. Se pueden usar procedimientos convencionales tales como la administración de los compuestos en comprimidos, suspensiones, soluciones, emulsiones, cápsulas, polvos, jarabes y similares. Son preferentes técnicas conocidas que suministran el compuesto por vía oral o intravenosa y conservan su actividad biológica.

En una realización, una composición de la presente invención puede administrarse inicialmente y mantenerse después mediante otra administración. Por ejemplo, una composición de la invención puede administrarse en un tipo de composición y después posteriormente administrarse en un tipo diferente o en el mismo que la composición. Por ejemplo, una composición de la invención puede administrarse mediante inyección intravenosa para llevar niveles de sangre a un nivel adecuado. Los niveles del sujeto se mantienen después mediante una forma de dosificación oral, aunque pueden usarse otras formas de administración, dependiendo de la afección del sujeto. La cantidad de la composición farmacéutica que se va a administrar variará para el sujeto que se va a tratar. En una realización preferente, 2×10^4 a aproximadamente 1×10^5 células madre cardíacas adultas y, opcionalmente, 50-500 µg/kg por día de una citosina o variante de dicha citosina se administran a un sujeto. No obstante, la determinación precisa de qué se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales en cada paciente, incluidos su tamaño, edad, zona de miocardio dañado y periodo de tiempo desde el daño. Así, el experto puede determinar fácilmente las dosificaciones y la cantidad de compuestos y aditivos, vehículos y/o excipientes opcionales en composiciones que se van a administrar en procedimientos de la invención. Normalmente, cualesquiera aditivos (además de la(s) célula(s) madre activa(s) y/o la(s) citocina(s)) están presentes en una cantidad del 0,001 al 50 % en peso de solución en solución salina tamponada con fosfato, y el ingrediente activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente del 0,0001 a aproximadamente el 5 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1 % en peso, del modo más preferente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05 % en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 % en peso, y del modo más preferente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5 % en peso. Por supuesto, para cualquier composición que se va a administrar a un animal o ser humano y para cualquier procedimiento de administración particular, es preferente determinar, por lo tanto: toxicidad, determinando la dosis letal (DL) y DL₅₀ en un modelo animal adecuado, por ejemplo, un roedor tal como un ratón; la dosificación de las composiciones, la concentración de componentes en las mismas y la agenda de administración de las composiciones, que produzcan una respuesta adecuada. Dichas determinaciones no requieren excesiva experimentación a partir del conocimiento del experto, la presente divulgación y los documentos citados en la misma. El tiempo para administraciones secuenciales puede determinarse sin una excesiva experimentación. Los ejemplos de composiciones que comprenden un producto terapéutico de la invención incluyen preparaciones líquidas para orificio, por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal, peroral, intragástrico, mucosal (por ejemplo, perlingual, alveolar, gingival, mucosa olfatoria o respiratoria), etc., la administración tal como suspensiones, jarabes o elixires; y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable), tal como suspensiones o emulsiones estériles. Dichas composiciones pueden mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente adecuado tal como agua estéril, solución salina fisiológica, glucosa o similar. Las composiciones también pueden liofilizarse. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares tales como agente humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, aditivos gelificantes o potenciadores de la viscosidad, conservantes, sabores, colorantes y similares, dependiendo de la vía de administración y la preparación deseada. Pueden consultarse textos estándar, tales como "REMYNGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17ª edición, 1985, que se incorpora al presente documento por referencia, para preparar preparaciones adecuadas sin una excesiva experimentación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan de forma conveniente como preparaciones líquidas, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones o composiciones viscosas acuosas isotónicas que

pueden tamponarse a un pH seleccionado.

Obviamente, la elección de los vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma de dosificación particular, por ejemplo una forma de dosificación líquida (por ejemplo si la composición se formula en una solución, una suspensión, un gel u otra forma líquida) o una forma de dosificación sólida (por ejemplo si la composición se va a formular en una píldora, un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo, una forma de liberación temporal o una forma rellena de líquido). Las soluciones, las suspensiones y los geles contienen normalmente una cantidad principal de agua (preferentemente agua purificada) además del compuesto activo. También pueden estar presentes cantidades secundarias de otros ingredientes tales como ajustadores del pH (por ejemplo, una base como NaOH), agentes emulsionantes o dispersantes, agentes tamponadores, conservantes, agentes humectantes, agentes gelificantes (por ejemplo, metilcelulosa), colorantes y/o aromas. Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre o el fluido lagrimal. La isotonicidad deseada de las composiciones de la presente invención puede realizarse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánico u orgánicos. El cloruro de sodio es preferente, en particular, para tampones que contienen iones sodio.

La viscosidad de las composiciones puede mantenerse al nivel seleccionado usando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Es preferentemente la metilcelulosa debido a que está fácilmente y económicamente disponible y es fácil de manipular. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma xantana, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. Puede usarse un conservante farmacéuticamente aceptable para aumentar la vida en almacenamiento de las composiciones. Puede ser adecuado el alcohol bencílico, aunque también pueden usarse una diversidad de conservantes que incluyen, por ejemplo, parabenos, trimerosal, clorobutanol o cloruro de benzalconio. Una concentración adecuada del conservante será del 0,02 % al 2 % en base al peso total aunque pueden existir variaciones apreciables en función del agente seleccionado. Los expertos en la técnica reconocerán que los componentes de la composición deberían seleccionarse para que fueran químicamente inertes con respecto al compuesto activo. Esto no presentará problemas a los expertos en principios químicos y farmacéuticos, o pueden evitarse fácilmente problemas mediante la referencia a textos estándar o mediante experimentos sencillos (que no implican una experimentación excesiva) a partir de la divulgación y los documentos citados en la misma.

Las composiciones pueden administrarse en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médica y veterinaria tomando en consideración factores tales como la edad, el sexo, el peso y la afección del sujeto particular, y la forma de composición usada para administración (por ejemplo, sólida frente a líquida). Las dosificaciones para seres humanos u otros mamíferos pueden determinarse sin una excesiva experimentación por parte del experto a partir de la presente divulgación, los documentos citados en la misma y el conocimiento en la técnica. Los regímenes adecuados para la administración inicial y dosis posteriores o para administraciones secuenciales también son variables, pudiendo incluir una administración inicial seguida por administraciones subsiguientes, pero de todas las maneras, pueden evaluarse por parte del experto a partir de la presente divulgación, los documentos citados en el mismo y el conocimiento en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan para tratar insuficiencia cardíaca y enfermedades cardiovasculares, incluidas, pero sin limitación, aterosclerosis, isquemia, hipertensión, reestenosis, angina de pecho, cardiopatía reumática, defectos cardiovasculares congénitos e inflamación arterial y otras enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares o dolencias relacionadas. En consecuencia, la invención implica la administración de células madre adultas como se discute en el presente documento, solas o en combinación con una o más citocinas o variantes de dicha citosina, como se discute en el presente documento, para el tratamiento o la prevención de una cualquiera o más de estas afecciones u otras afecciones que implican enfermedades o trastornos cardíacos. Las vías de administración ventajosas implican aquellas más adecuadas para el tratamiento de estas afecciones, tales como la vía por inyección, que incluye, pero sin limitación, administración por vía subcutánea o parenteral, incluidas intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intramiocárdica, transendocárdica, transepicárdica, intranasal, así como intratecal y técnicas de infusión.

Aunque se han descrito anteriormente diversas realizaciones de la presente invención, debería entenderse que se han presentado solo a modo de ejemplo y no de limitación. Pueden realizarse numerosos cambios a las realizaciones divulgadas según la divulgación del presente documento sin apartarse del espíritu o el ámbito de la invención. Por lo tanto, la amplitud y el ámbito de la presente invención no deberían estar limitados por cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

Todos los documentos mencionados en el presente documento se incorporan al presente documento por referencia. Todas las publicaciones y documentos de patente citados en la presente solicitud se incorporan por referencia para todos los fines en la misma medida que si se denotara individualmente cada publicación o documento de patente individual. Por medio de la mención de diversas referencias en el presente documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "técnica anterior" a su invención. Las realizaciones de las composiciones y los procedimientos de la invención se ilustran en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Los ejemplos no limitantes siguientes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención. Se apreciará que serán evidentes variaciones en proporciones y alternativas en elementos de los componentes mostrados para los expertos en la técnica y están dentro del ámbito de realizaciones de la presente invención.

Materiales y procedimientos

5 *Abreviaturas y acrónimos no estándares:* médula ósea (MO); unidad de formación de colonias-fibroblasto (CFU-F); injerto de derivación arterial coronaria (CABG); fracción de eyección (FE); volumen diastólico final (EDV); volumen sistólico final (ESV); célula madre mesenquimal (MSC); célula mononuclear (MNC); medio acondicionado con células estromales de corazón de ratón (MsHrtStr CM); infarto de miocardio (IM); MSC no adherentes (NA-MSC); factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (rhbFGF).

10 *Ratones:* Se transplantaron células humanas a ratones NOD/SCID que se habían sometido a ligación arterial coronaria izquierda e inducción de infarto de miocardio (IM). Solo se estudiaron ratones macho de 2 meses de edad. Las cohortes fueron los siguientes: 1) 10 ratones inyectados con MSC humana; 2) 10 ratones inyectados con células CD271⁺ de MO.

15 *Procedimiento de ligación de la arteria coronaria izquierda:* Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 5 % para la inducción y después etomidato 20 mg/kg i.p. La intubación endotraqueal se realizó y el ratón se dispuso después en un monitor cardiaco y se ventiló mecánicamente. La piel del sitio de toracotomía lateral izquierda se preparó para la cirugía y se cubrió de forma estéril usando solución al 10 % de povidona yodada. Se usó una almohadilla térmica para mantener los ratones calientes durante los procedimientos para evitar la pérdida de calor. Se aplicó pomada oftálmica no medicada quirúrgicamente estéril a los ojos preoperativamente para evitar el secado de la córnea.

20 Una vez se logró una sedación adecuada, se abrió el pecho mediante toracotomía lateral izquierda. La arteria coronaria izquierda se expuso y se ligó para producir un IM anterior. 10 minutos después de la oclusión se infundió eritropoyetina (2-6 µg/kg) a través de un catéter yugular interno. El pecho se cerró en capas con sutura absorbible 0 y 3,0 (para músculo) y se administró buprenorfina (0,05-0,1 mg/kg s.c.) postoperativamente contra el dolor. Los ratones se vendaron y se mantuvieron en alojamientos aislados estériles estándar en los que se recuperaron durante 3 a 4 días después de la cirugía. El control del dolor se logró con buprenorfina 0,05-0,1 mg/kg s.c. q12 h x 6 dosis. Se realizó un seguimiento estrecho (4 veces al día) de los animales para determinar dolor e infección en el periodo postoperatorio, buscando signos tales como anorexia, fracaso en la recuperación, agresividad y respiración laboriosa. Los animales que mostraron parálisis, úlceras abiertas, respiración laboriosa o reticencia a moverse se retiraron del estudio y se sacrificaron.

30 Los ratones operados simuladamente que experimentaron todo menos la disposición de la ligadura de la arteria coronaria sirven como controles. La mortalidad perioperativa fue baja en el grupo de simulación (< 15 %) y ligeramente superior en las cohortes con infarto. De los ratones restantes, aproximadamente el 75 % sobrevivió al menos dos meses después del IM. Los ratones se estudiaron normalmente durante cuatro semanas después de la cirugía.

35 Se administraron células madre mediante inyección intramiocárdica usando una aguja de calibre 30. El día del infarto, mientras se abrió el pecho para la inducción de IM, las células se inyectaron directamente en el miocardio. Se administraron tres inyecciones de 100 µl.

40 *Procedimiento para las mediciones hemodinámicas:* El análisis hemodinámico de corazón intacto se realizó usando micromanometría de conductancia miniaturizada. Los animales se anestesiaron del modo siguiente: gas isoflurano seguido de etomidato 12 mg/kg i.p., uretano 600 mg/kg i.p. y morfina 1 mg/kg i.p. Se realizó la intubación endotraqueal y el ratón se dispuso después en un monitor cardiaco y se ventiló mecánicamente. La vena yugular interna izquierda se expuso y se canuló con una aguja de calibre 30 para la administración de los fármacos. Se insertó un catéter de presión-volumen de 4 electrodos (SPR-839, Millar Instruments Inc) en la arteria carótida derecha y se avanzó hacia el interior del ventrículo izquierdo. Las medidas de bucles de presión-volumen se realizaron en la línea base y después de la infusión de isoproterenol (1 a 100 ng/min). Por último, se redujo la precarga pinzando la vena cava inferior mediante una incisión torácica. Se realizó un seguimiento de la profundidad de la anestesia observando el movimiento de la pared del pecho, el ritmo cardiaco, la presión sanguínea, el tono muscular y la percepción de estímulos. Al finalizar los experimentos, el animal (bajo una anestesia profunda como anteriormente) se sacrificó y se recogió el corazón para estudios biológicos moleculares futuros e inmunohistoquímica.

50 *Modelo de cardiomiopatía isquémica crónica:* Se usaron minicerdos de Gottingen (25-30 kg, hembras, 10-12 meses de edad) y se sometieron a un modelo de animal grande de insuficiencia cardiaca isquémica. Para crear el modelo preclínico de cardiomiopatía isquémica crónica se administró al minicerdo quetamina para la inducción de anestesia, se realizó una intubación endotraqueal y se administró isoflurano para el mantenimiento de la anestesia general. Se realiza un seguimiento continuo de los cerdos para determinar BP no invasiva, el ritmo cardiaco, la temperatura, oximetría de pulso y capnografía. Se realiza una incisión longitudinal en el centro del cuello y se expusieron la arteria carótida común derecha y la vena yugular interna. Se obtiene un control proximal y distal con bucles de vasos, y una funda de acceso vascular 7 Fr se dispuso después tanto en la arteria carótida común derecha como en la vena

yugular interna derecha. Se obtuvieron bucles de presión-volumen con oclusión IVC antes y después del IM. Se realizaron angiogramas coronarios izquierdos y derechos con un catéter JR 4. Después, los minicerdos se sometieron a infarto de pared anterior experimental mediante la oclusión de globos de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) justo distal a la primera rama diagonal durante 2,5 horas. Se realizó un seguimiento en el cerdo para determinar arritmias y se inició, si era necesario, un soporte vital cardiaco avanzado. Al completar la angioplastia con globo, la arteria carótida se repara con suturas de proleno 6-0 y la vena yugular interna se liga. La incisión del cuello se cierra en 3 capas; la fascia, tejido subcutáneo y la piel se vuelven a aproximar con polisorb 3-0. El minicerdo se recuperó después y la cicatriz, normalmente un infarto transmural aproximadamente al 20 % del ventrículo izquierdo y localizado en la pared anteroseptal, se dejó curar durante 3 meses mientras el corazón experimentaba remodelación.

Administración de MSC de MO humanas o células CD271⁺ de MO humanas: A los 3 meses después del IM, se administró al minicerdo quetamina para la inducción de anestesia, se dispuso en posición supina en la mesa de operación, se administró isoflurano por medio de una máscara, se realizó la intubación endotraqueal y se continuó con isoflurano para mantener la anestesia general. Se obtuvo un acceso vascular de la arteria carótida izquierda y la vena yugular interna como se ha descrito anteriormente para realizar la evaluación hemodinámica con bucles de presión-volumen. Se realizó una incisión de toracotomía lateral anterior en el 5^o-6^o espacio intercostal con un escalpelo del número 10; los tejidos blandos se diseccionaron con electrocauterización para controlar la hemorragia; la pleura parietal se identificó; usando tijeras de Metzenbaum se abrió para penetrar en la cavidad pleural izquierda con cuidado de no dañar el parenquima pulmonar; se usó un retractor de costillas para separar las costillas. Se identificó el pericardio y se realizó una incisión longitudinal con tijeras de Metzenbaum con cuidado de que esté anterior al nervio frénico y de no dañar el miocardio. El corazón se expuso y se realizaron 10 inyecciones en la zona de la cicatriz y la zona periférica con una jeringa rellena con 0,5 cm³ de MSC o células CD271⁺. El volumen total inyectado fue de 5 cm³. Algunas zonas de hemorragia se controlaron con suturas con compresas. La incisión de toracotomía se cerró en tres capas con suturas de polisorb 2-0 con un tubo pectoral 18Fr para succionar por debajo del agua dispuesto en el aspecto lateral de la incisión. Después el cerdo se deshabituó al ventilador y se recuperó. El tubo pectoral se retiró el día siguiente. Las cohortes fueron las siguientes: 1) Inyección de 200 millones de MSC a 3 meses post-IM (n=6); 2) Inyección de 2 millones de células CD271⁺ a 3 meses después del IM (n=6).

Evaluación de la función cardiaca: Los efectos de células CD271⁺ y MSC transplantadas se evaluaron con bucles de presión-volumen del ventrículo izquierdo y MR cardiaca seriada. La hemodinámica del ventrículo izquierdo (LV) se evaluó con un catéter transductor de presión-volumen Millar dispuesto en el LV durante la cateterización cardiaca antes y después de IM agudo, en el momento de la inyección y en el sacrificio. Los datos de función cardiaca no invasiva concurrente se adquirieron usando un escáner Siemens 1.5T MRI. La MR cardiaca se ha convertido en una modalidad de toma de imágenes comprensible y muy precisa para evaluar la función general, la función regional, el tamaño de la cicatriz y parámetros de perfusión. Muchos consideran que la MR cardiaca es una ventanilla única para la toma de imágenes del corazón ya que se evalúan numerosos parámetros cardiacos con un estudio. El protocolo de MR cardiaca incluye imágenes de cine producidas por ECG, toma de imágenes de perfusión de gadolinio del primer pase, imágenes de MR etiquetadas e imágenes con hiperrealce tardío. Los barridos de MR obtienen aproximadamente 1.200 imágenes del corazón que requieren un análisis después del procesamiento amplio. Todas las imágenes se mantuvieron en el sistema WebPax de la Universidad de Miami y cada estudio se descargó a una estación de trabajo Dell Precision 690. Se usaron dos programas informáticos aprobados por la FDA para el análisis, Segment (Medviso AB y Universidad de Lund, Lund, Suecia) y Diagnosoft (Cary, NC). Las imágenes de cine y con realce tardío se analizaron usando el programa informático Segment. Las imágenes etiquetadas y las imágenes de perfusión de primer pase se analizaron con el programa Diagnosoft para obtener la disfunción circunferencial euleriana máxima y la subida miocárdica y el área bajo la curva, respectivamente.

Sacrificio e histología: A los 3 meses después de la inyección de células todos los animales se sacrificaron bajo anestesia profunda como se ha discutido anteriormente. El corazón se detuvo mediante infusión central de 40 meq de cloruro de potasio que detuvo el corazón en diástole. Se recogió el corazón de los cerdos y se conservó en formaldehído. Cada corazón se seccionó en el eje corto y se analizaron biopsias del infarto, la zona periférica y la zona remota con microscopia confocal para determinar injerto y diferenciación. Además, se realizó una necropsia de cuerpo entero a los cerdos para evaluar la formación de tejido ectópico.

Ratones: Se usaron ratones NOD-SCID ya que son inmunodeficientes y un receptor apropiado de células madre humanas. La función cardiaca de ratones que se han sometido a IM fue menor que la de los ratones operados simuladamente dentro de un periodo de cuatro semanas después de la cirugía. En base a cálculos se necesitó incluir 8 ratones en cada cohorte para lograr una potencia de 0,90 y $\alpha = 0,05$. No obstante, la mortalidad después de IM para ratones de tipo silvestre fue de aproximadamente el 25 % a lo largo de las seis primeras semanas después de la operación. Así, para realizar estudios de IM se usaron al menos 10 ratones para cada cohorte.

Cerdos: Se usaron minicerdos de Gottingen en estudios preclínicos debido a su anatomía coronaria similar a un ser humano y en aproximadamente 12-15 meses de edad tiene una curva de crecimiento estable que los permite seguir en estudios de supervivencia a largo plazo con un crecimiento de confusión mínimo del corazón. Los cálculos mostraron que era necesario incluir 6 cerdos en cada cohorte para lograr una potencia de 0,90 y $\alpha = 0,05$.

Cirugías en ratones: Las cirugías en ratones se realizaron con precaución para prevenir dolor y molestias. Como se

ha indicado anteriormente, se usaron agentes apropiados durante cualquiera de los procedimientos quirúrgicos para proporcionar anestesia y analgesia. Para la ligación arterial coronaria, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 5 % para la inducción y después etomidato 20 mg/kg i.p. El control del dolor se logró con buprenorfina 0,05-0,1 mg/kg s.c. q12 h. Además, la temperatura corporal del ratón se mantuvo usando mantas térmicas o lámparas. Aunque algunos ratones desarrollaron hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca debido a los diferentes procedimientos quirúrgicos, se evaluaron ratones que experimentaron una pérdida de peso excesiva, respiración laboriosa, cianosis y falta de respuesta, y si era apropiado, se sacrificaron de forma temprana.

Cirugías en cerdos: Todos los procedimientos en cerdos se realizaron con consciencia de prevención de dolor y sufrimiento. Como se ha discutido anteriormente, todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia general. El dolor post-operatorio se controló con una inyección postoperatoria de buprenorfina 0,05-0,1 mg/kg subcutánea y un parche de 25 mcg de fentanila se dispuso en el dorso del cerdo durante 72 horas. El que en cualquier momento durante el transcurso del estudio un cerdo padecía sufrimiento se evaluó por el veterinario y el equipo de investigación. Muchos casos de sufrimiento son debidos a una infección de la herida o los pulmones que puede gestionarse con antibióticos de uso oral o intramuscular.

Eutanasia: Estos procedimientos son coherentes con las recomendaciones de las 2007 American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia (directrices de la Asociación veterinaria estadounidense sobre eutanasia).

Todos los cerdos y ratones se sacrificaron por una o dos indicaciones: 1) muestran un dolor o sufrimiento postoperatorio significativo que no se ha aliviado mediante analgésicos, antibióticos y otras medidas; 2) completan el periodo de tiempo diseñado para el estudio de fisiología. Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de ketamina (150 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y después mediante dislocación cervical. Los cerdos se dispusieron bajo anestesia profunda como se ha discutido previamente y el corazón se detuvo con 40 meq de cloruro de potasio.

Ejemplo 1: Comparación de MSC de MO y células CD271⁺ de MO humanas en un modelo de ratón (NOD/SCID) de infarto de miocardio.

Para analizar esto, se usó un modelo de ratón de infarto de miocardio establecido mediante ligación temporal a pecho abierto de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (LAD) en ratones NOD/SCID. Después de 1 hora de isquemia se retiró la ligación de sutura desde la LAD para permitir la reperusión total. Los ratones se aleatorizaron después de un modo 1:1 a MSC de MO o células 271⁺ de MO humanas. Se usaron grupos adicionales de animales para establecer controles apropiados y comparaciones. Estos incluyen células derivadas de médula ósea CD34⁺ y CD133⁺, que contienen células madre/progenitoras hemotopoyéticas y precursores endoteliales. Después de la reperusión, las células se inyectaron después bajo visión directa a la zona de la cicatriz y a la zona periférica con un volumen inyectado total de 10 µl. Después, se realizó un seguimiento de los ratones durante 8 semanas mediante ecocardiografía seriada para evaluar la eficacia de la terapia celular. A las 8 semanas después de la inyección, los ratones se sometieron a una evaluación hemodinámica detallada, se sacrificaron y los corazones se recogieron para el análisis inmunohistoquímico para determinar injerto y diferenciación de células inyectadas.

Histopatología: Después de las mediciones hemodinámicas al final del estudio, el corazón del ratón se perfundió con cloruro de potasio y fijadores para estudios inmunohistoquímicos. Se midieron el peso del cadáver total, el corazón, el pulmón y el hígado y la longitud de la tibia para detectar hipertrofia del tejido ventricular no infartado. Se tiñeron secciones del corazón con hematoxilina y eosina para la inspección general. La fracción de la circunferencia del ventrículo izquierdo teñido en secciones transversales de azul mediante Masson proporciona una medida del tamaño del infarto.

Se realizó un seguimiento de las células madre diferenciadas mediante inmunotinción. Se detectaron células humanas dentro de los corazones de los ratones usando tinción con alu. La tinción para troponina I, α -actina sarcomérica, miocito cardíaco, desmina, α -actinina cardíaca, conexina-43, GATA-4, Nkx-2.5 y MEF2 indicaron miocitos. Se usó tinción con CD31 y vimentina para identificar células endoteliales, mientras que se usaron α -actina de músculo liso y SMA22 para identificar células de músculo liso. Así, pueden identificarse todas las células resultantes de inyección de CD271 o MSC humanos y el potencial para que estas células regeneren linajes diferentes.

Una descripción completa de la regeneración cardíaca también incluía la medición total de números y tamaño de células miocíticas. El número de miocitos por ventrículo izquierdo se estimó contando núcleos usando el procedimiento de Bruel y Nyengaard. Para medir el área de sección transversal de miocitos se tiñeron rodajas con aglutinina de germen de trigo conjugada con fluoresceína (Invitrogen) y Hoechst 33258. El volumen de los miocitos se calculó usando una combinación de principios de Cavalieri y disectores. Alternativamente, pueden medirse miocitos individuales mediante microscopia confocal después de disociación aguda usando un programa informático morfométrico. Para detectar la fibrosis asociada a remodelación patológica, se tiñeron secciones con rojo sirio (colágeno) y verde rápido (células). Los resultados se corroboraron mediante tricromía de Masson. Para detectar cualesquiera miocitos apoptóticos que podrían asociarse con remodelación creciente, se tiñeron secciones embebidas con parafina usando el kit de detección de apoptosis in situ Apoptag Red (Millipore) basado en el procedimiento TUNEL indirecto. Otros ensayos incluyen inmunohistoquímica con un anticuerpo específico para caspasa-3 escindida, detección mediante inmunotransferencia Western de escisión de PKC δ dependiente de

caspara y escalonado de ADN.

Estudios en ratones: Las células CD271 de MO inyectadas al corazón de ratones NOD/SCID siguiendo un IM experimental mejoran la fracción de eyección (FE) y el acortamiento fraccional se comparó con placebo y células madre mesenquimales. De forma importante, las células CD271 fueron muy potentes mejorando FE y la mejora aumenta en tamaño la cámara del corazón en un grado superior a un número muy superior de MSC cultivadas. La inyección de células CD271 también produce una contractilidad de miocardio mejorada en comparación con el placebo, como se evidencia mediante la pendiente aumentada y el desplazamiento hacia la izquierda de la curva de presión-volumen sistólica final. Cuando se evalúan histológicamente, las células CD271 muestran un grado alto de injerto y evidencias de diferenciación de miocitos, apoyando la idea de que la recuperación cardiaca es debida a injerto celular en el miocardio dañado. Estos estudios analizan definitivamente la hipótesis de que los precursores de MSC CD271 son capaces de diferenciación de miocitos y vascular y que reparan el corazón dañado en un grado superior a las MSC cultivadas.

Ejemplo 2: *Comparación de MSC de MO y células CD271⁺ de MO humanas en un modelo de cerdo de infarto de miocardio.*

Se usó un modelo de animal grande de cardiomiopatía isquémica crónica y bien establecido en este laboratorio (7, 8) para analizar si las células CD271 se injertan y se diferencian en miocitos, células endoteliales y células de músculo liso vasculares. También se usó MRI cardiaco para analizar los efectos de células CD271⁺ sobre la función cardiaca, el tamaño de la cicatriz y la perfusión miocárdica. Los inventores tienen una experiencia amplia en la creación de modelos de cardiomiopatía isquémica en diversas razas de cerdos (8, 9). Para este estudio, 10 minicerdos de Gottingen adultos se sometieron a una angioplastia de globo de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda durante 2,5 horas, dando como resultado un infarto transmural de la pared del septo anterior que abarcaba aproximadamente el 20 % del miocardio ventricular izquierdo, seguido por repercusión total después de la deflación del globo. Los animales se recuperaron después y se continuó con MR cardiaca seriada mientras el corazón experimenta una remodelación amplia. A los 3 meses después del IM, los cerdos se aleatorizaron de un modo 1:1 para MSC de MO humanas o células CD271⁺ de MO humanas. Después los animales tenían una minitoracotomía izquierda en la que se inyectaron células CD271⁺ derivadas de médula ósea humana o MSC bajo visión directa con una aguja de calibre 22. Se ligaron con sutura todas las zonas de hemorragia. Después se cerró el pecho y se continuó con MR cardiaca de forma seriada con los animales. Todos los minicerdos se inmunodeprimieron con ciclosporina A (CsA) de administración oral para evitar el rechazo inmunitario de xenotransplante de células humanas en el corazón del cerdo (10, 11).

La eficacia de las células CD271⁺ se evaluó con toma de imágenes de resonancia magnética cardiaca (MRI) de forma seriada. Esta modalidad de toma de imágenes permite el análisis fenotípico detallado de la función cardiaca general, la función cardiaca regional usando HARP, el tamaño de la cicatriz usando toma de imágenes con hiperrealce tardío y subida de perfusión miocárdica y área bajo la curva mediante perfusión de primer pase de gadolinio. A los 3 meses después de la inyección, los animales se sacrificaron y los corazones se recogieron para el análisis inmunohistoquímico para determinar injerto y diferenciación de células CD271⁺. Se realizó una necropsia de cuerpo completo a cada animal para evaluar la formación de tejido ectópico.

La evaluación detallada de seguridad y eficacia se realizó en estos estudios animales como se describe (7-9). El objetivo general era establecer seguridad a largo plazo que incluye libertad de neoplasia o formación de tejido ectópico y añadir a la base de datos en crecimiento que la administración quirúrgica aguda de células en el corazón con insuficiencia era segura. Además, en paralelo se realizaron estudios mecanísticos detallados usando toma de imágenes, evaluación hemodinámica e inmunohistoquímica para analizar la hipótesis de que la inyección de células CD271⁺ era muy eficaz en la creación de remodelación inversa en cardiomiopatía isquémica crónica y que el mecanismo de este efecto era al menos en parte debido a injerto y diferenciación celular.

Las células madre mesenquimales autólogas producen remodelación inversa en cardiomiopatía isquémica crónica: El trabajo en este laboratorio en modelos de animales grandes con cicatrices totalmente curadas después de infarto de miocardio mostró que la administración de MSC puede mejorar significativamente la estructura ventricular izquierda e índices funcionales, lo que indica una reparación significativa. Mediante la explotación de esta experiencia con técnicas de imagen se realizó un seguimiento de las mejoras fenotípicas desencadenadas mediante implante de MSC en el modelo porcino de cardiomiopatía isquémica crónica y se cuantificaron estos cambios morfológicamente. Se creó un IM en cerdo; después de 12 semanas, el segmento de infarto se había reducido en espesor, dejando la cicatriz transmural. Se expandieron MSC autólogas para cada animal, y estas células o placebo se administraron a la zona de infarto y periférica circundante en este momento. Durante otro periodo de seguimiento de 12 semanas, la MRI reveló que las inyecciones intramiocárdicas de MSC no solo redujeron la carga de cicatriz (masa de LV) en 21,8 + 3,9 % ($p < 0,05$ frente a placebo y semana 12 frente a semana 24), sino que también mejoraron significativamente la contractibilidad regional, la función de LV general, fracción de eyección y flujo sanguíneo miocárdico. De forma importante, la terapia produjo remodelación inversa y redujo la medida circunferencial de la cicatriz del infarto. El conjunto de efectos evidencia una reparación muy eficaz en cardiomiopatía isquémica.

Las células madre mesenquimales alogénicas restauran la función cardiaca en cardiomiopatía isquémica crónica

mediante capacidad de diferenciación en tres linajes: La hipótesis se analizó para determinar si la reparación cardiaca basada en MSC regenera el corazón mediante mecanismos que comprenden injerto a largo plazo y mediante diferenciación tanto en elementos miocárdicos como vasculares. Las MSC alogénicas se generaron a partir de donantes cerdos macho, y se administraron células de sexo desigual mediante inyección transendocárdica en cerdo hembra 12 semanas después del IM. Se continuó con los animales con MRI seriada, y 12 semanas más tarde los corazones se recogieron para evaluación inmunohistológica. El destino de las células de donantes macho se determinó mediante colocación de células de cromosoma Y (Y^{pos}) con marcadores de linajes cardiacos, vasculares y endoteliales. Las MSC se injertaron en zonas de infarto y periféricas y se diferenciaron en cardiomiocitos determinados mediante colocación con marcadores GATA-4, Nkx2.5 y α -actina sarcomérica. Además, las MSC Y^{pos} muestran diferenciación de células de músculo liso vascular y endotelial, lo que contribuye a la formación de vasos grandes y pequeños. El número de células que se injertan se correlaciona con los cambios funcionales que ocurren. La supervivencia de MSC a largo plazo, el injerto y la diferenciación en linajes miocárdico, vascular y endotelial se demostraron después de trasplante en miocardio crónicamente cicatrizado. La capacidad de estas células para cardiomiogénesis y vasculogénesis contribuye probablemente, en ambos casos, a su capacidad para reparar miocardio crónicamente cicatrizado.

Ejemplo 3: Análisis de células CD271⁺ en un ensayo clínico de pacientes con un IM que se someten a cirugía de derivación y un ensayo clínico de células CD271⁺⁺ en pacientes que se someten a cirugía de derivación.

Se va a realizar un ensayo clínico de fase I/II [denominado "Prospective Randomized Study of CD271⁺ Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (Estudio prospectivo aleatorizado de tratamiento con células CD271⁺ en pacientes que se someten a cirugía cardiaca)" (PROMETHEUS-II)]. Es un ensayo de doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo, que compara células CD271⁺ con el placebo en 15 pacientes que se someten a cirugía de derivación. Los puntos finales de este ensayo son seguridad y eficacia. El punto final de eficacia usa toma de imágenes de resonancia magnética (MRI) cardiaca para evaluar el tamaño del infarto de miocardio, función ventricular izquierda (LV) general y perfusión de miocardio. También se recoge un biorrepositorio de médula ósea del paciente y muestras de sangre en circulación para determinar biomarcadores que puedan predecir una respuesta exitosa al tratamiento. Los productos celulares CD271⁺ usados en este ensayo se aislaron en el Cell Manufacturing Program (programa de fabricación de células) que se facilita en la Universidad de Miami. La célula CD271⁺ para su uso en este ensayo es una célula madre adulta derivada de médula ósea que es un precursor de MSC.

Datos preliminares del ensayo clínico: Células autólogas transendocárdicas en ensayo de insuficiencia cardiaca isquémica (TAC-HFT): La TAC-HFT es un estudio de fase I/II, aleatorizado, de doble ciego que está aprobado por la Food and Drug Administration (Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos) para la inscripción en 2009. Este estudio inscribirá a 60 pacientes con disfunción ventricular izquierda isquémica crónica (FE entre el 20-50 %) secundaria respecto a un infarto de miocardio. Se usó el catéter de infusión de hélice (BioCardia, San Jose, CA) para la administración mediante inyecciones transendocárdicas de: MSC, médula ósea completa o placebo durante la cateterización cardiaca.

El ensayo TAC-HFT se diseñó para que se inscribieran 8 pacientes como una serie abierta en fase con datos de seguridad establecidos preliminares antes de la fase de doble ciego aleatorizada de 60 pacientes. Estos primeros 8 pacientes recibieron o bien médula ósea completa (n=4) o bien células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de un modo no ciego. Los ocho pacientes toleraron las inyecciones de células madre sin ningún evento adverso importante, permitiendo la fase de doble ciego a pacientes inscritos subsiguientemente. Dado que los primeros ocho pacientes recibieron todos inyecciones celulares, se analizaron sus imágenes por MR cardiaca. Las imágenes de cine y las imágenes con realce tardío se analizaron usando el programa informático Segment (Medviso AB y Universidad de Lund, Lund, Suecia) y las imágenes cardiacas etiquetadas se analizaron usando el programa informático HARP (Diagnosoft, Inc.). Los datos preliminares de estos pacientes revelan que en 6 meses después de la inyección de células madre, mejoras en la función general demostraron una reducción en volumen diastólico final del $11,2 \pm 3,4$ % ($p < 0,05$), una reducción del $13,5 \pm 4,2$ % ($p < 0,01$) en volumen sistólico final y un aumento promedio en la fracción de eyección de $4,9 \pm 6,7$ %. En imágenes con realce tardío, el tamaño de la cicatriz como porcentaje de masa ventricular izquierda se redujo un promedio del $13,3 \pm 7,2$ % ($p = 0,06$). Las imágenes de MR etiquetadas mostraron una mejora regional en contractilidad en la zona de infarto y la zona periférica demostrada mediante disfunción circunferencial euleriana. Estos datos muestran que las MSC son seguras, mejoran la función cardiaca, apoyan la remodelación inversa y reducen el tamaño de cicatriz.

Estos datos se establecieron de forma precedente ya que ninguna otra estrategia terapéutica logra este grado de remodelación inversa acompañada de la reducción real de la cicatriz miocárdica. Estos hallazgos, excitantes, apoyan significativamente el imperativo de investigación clínica acelerada en este campo.

Un Estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, de escalado de dosis de células madre mesenquimales humanas adultas intravenosas (proquimales) después de infarto de miocardio agudo: Los datos de seguridad y eficacia del estudio de fase I de 53 pacientes inscritos se publicaron recientemente en el Journal of the American College of Cardiology (18) y proporcionaron datos de seguridad fundamentales de MSC alogénicas. En este ensayo, pacientes con IM agudo reperfundido se aleatorizaron a una infusión intravenosa única de placebo o MSC aislada de médula ósea obtenidas a partir de un donante no relacionado único que no coincidía en antígeno

leucocítico humano con los receptores. Las tasas de eventos adversos fueron similares en los tratados con hMSC (5,3 por paciente) y los tratados con placebo (7,0 por paciente). Los registros de ECG ambulatorio demostraron un número reducido de episodios de taquicardia ventricular en pacientes tratados con hMSC en comparación con el placebo. La ecocardiografía en pacientes con IM mostraron una fracción de eyección mejorada en pacientes tratados con hMSC. De forma importante, este ensayo proporcionó datos de seguridad fundamentales para el uso de MSC alogénicas en cardiopatía isquémica.

Se han obtenido datos de seguridad y de eficacia preclínicos adicionales a partir del laboratorio del inventor (7, 8, 15) en una diversidad de razas de modelos porcinos con IM agudo y crónico. La inyección de MSC mediante catéter en tejido infartado reduce el tamaño del infarto de miocardio mejora la función de LV general y regional, normaliza la energía cardíacas y restaura la perfusión del tejido (7, 8, 16).

Aislamiento de células CD271⁺ de MO humana normal: Se obtuvieron aspirados de médula ósea a partir de la cresta iliaca del paciente bajo sedación consciente y analgesia local por un hematólogo/oncólogo experimentado. Las células mononucleares de MO se aislaron usando centrifugación de gradiente de densidad y después las células se marcaron con microperlas unidas a un anticuerpo a CD271 y las células CD271⁺ se aislaron con el dispositivo clínico CliniMACS (Miltenyi Biotech, Colonia, Alemania). Las células se lavaron después y se prepararon para la infusión. Este proceso precisa de aproximadamente 4 a 5 horas. Todas las células CD271⁺ (1-5 M) se usaron para la inyección al paciente.

El trabajo previo de este laboratorio ha demostrado la fiabilidad de células CD271⁺ aisladas. Las células CD271⁺ se aislaron de células de médula ósea de donante normal usando un etiquetado indirecto de células con microperlas anti-CD271-APC y anti-APC. La mediana en el número de células de MNC de MO inicial fue de $1,4 \times 10^8$ células nucleadas (intervalo de $2,9 \times 10^7$ a $3,3 \times 10^8$, N=7) dando como resultado una mediana de $4,2 \times 10^5$ células CD271⁺ después de la selección (intervalo de $3,9 \times 10^4$ a $9,4 \times 10^5$). Esto representa una frecuencia del 0,3 % de células CD271⁺ en el producto de MNC de MO. Las células CD271⁺ aisladas demostraron una morfología primitiva con una relación citoplasma con respecto al núcleo baja. Cuando se dispusieron en cultivo líquido, las células CD271⁺ formaron MSC en un periodo de 7 días, mientras que las MNC de MO completas formaron menos MSC. La generación de MSC de células CD271⁺ se comparó con células CD271 y mientras 170.000 células CD271⁺ generaron MSC significativamente después de 7 días de cultivo en un matraz T162 cm², cien veces más células CD271 ($1,7 \times 10^7$ células en un matraz T162 cm²) no pudieron generar MSC significativamente en 7 días. Había algunas células adherentes en el cultivo de células CD271, pero estas parecieron ser células endoteliales no MSC. Las células CD271⁺ se enriquecieron para CFU-F, con 1 en 222 células CD271⁺ formando CFU-F en comparación con 1 en 12.500 MNC de MO. También la fracción negativa de CD271 contenía muy pocas CFU-F con menos de 1 en 100.000 células.

Administración de células: Al completar la cirugía de derivación de arteria coronaria, las células CD271⁺ de MO o placebo se inyectaron por el cirujano cardíaco bajo visión directa a través del epicardio a la zona de cicatriz y la zona periférica. Algunas zonas de hemorragia se controlaron con suturas con compresas.

MRI cardíaca: Este grupo tiene una experiencia amplia en la determinación de la estructura y la función cardíaca mediante explotación de técnicas de imagen no invasivas de borde del corte (17, 19, 20). Se usó MR cardíaco para evaluar la eficacia de la terapia celular. La función miocárdica, la perfusión de tejido y la determinación no invasiva del tamaño del infarto se determinaron mediante etiquetado de tejido en fase armónica (HARP), cinética de absorción de gadolinio y protocolos de MRI de realce de contraste tardío, respectivamente. Los pacientes se tumban en posición supina sobre la mesa magnética y se obtienen todas las imágenes manteniendo la respiración a 12-15 de ritmo cardíaco hasta la expiración final, promediando 10-15 s con periodos de descanso adecuados entre intervalos sin respirar (10-15 s). El protocolo de toma de imágenes incluyó en primer lugar imágenes de exploración sagitales, axiales y oblicuas para localizar el corazón. Se estima que cada sesión de MRI dura 45-60 min. Para determinar la función miocárdica se realizaron protocolos de etiquetado de tejidos como se ha descrito previamente. El protocolo se basó en secuencia de pulsos de eco de gradiente rápido desencadenada por ECG que dio como resultado una separación etiquetada de 6 mm del miocardio. Este procedimiento proporciona la moción cuantitativa y parámetros de disfunción sobre una base regional que pueden usarse para la comparación a lo largo de sujetos en diferentes puntos temporales después de la intervención, proporcionando de este modo un procedimiento rápido y repetible para evaluar la función de LV seriada y cuantitativa. Después, los pacientes recibieron una inyección intravenosa en embolada de 0,2 mmol/kg de gadolinio-DTPA. Las imágenes con realce tardío de alta resolución se obtuvieron a partir de ocho a diez secciones transversales de eje corto del LV (asegurando la cobertura cardíaca completa) usando una recuperación de inversión preparada de secuencia de eco de gradiente rápido accionada. Se ha mostrado que las regiones hiperaumentadas adquiridas obtenidas con este procedimiento estaban dentro del 10 % del tamaño del infarto medido post-mortem mediante tinción con cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC), indicando este procedimiento, por lo tanto, un modo muy preciso para determinar el tamaño del infarto (19).

Ejemplo 4: Potencial cardíaco de células precursoras de MSC CD271⁺ de médula ósea

Procedimientos

Aislamiento de células CD271⁺: Se obtuvieron aspirados de médula ósea (25 a 50 ml) de AllCells LLC (Emeryville,

CA) bajo consentimiento informado apropiado y aprobación por IRB . Las células de médula ósea (MO) se diluyeron 1:1 con PBS + 1 % de FCS y se formaron capas sobre ficol para aislar la fracción celular mononuclear de baja densidad (MNC). Las MNC se etiquetaron después con microperlas CD271 (Miltenyi Biotech, Colonia, Alemania) y las células CD271⁺ se aislaron usando un dispositivo de selección celular MiltenyiMACS (VarioMACS) según procedimientos recomendados por los fabricantes. Las células CD271⁺ se contaron y se prepararon citospinas para el análisis morfológico.

Aislamiento y expansión de células madre mesenquimales (MSC): Se aislaron MNC de MO como se ha descrito anteriormente y las células se cultivaron en matraces de cultivo T162 cm² en 1 a 3 millones de MNC por ml de alfa-MEM que contenía el 20 % de FBS más el 1 % de glutamina, penicilina y estreptomina. El medio se cambió cada 3 a 4 días sin descartar las células no adherentes. Los MSC crecieron como células adherentes sobre la superficie de los matraces y los cultivos se pasaron cuando había confluencia usando tratamiento con tripsina. Las MSC se recogieron en el pasaje 4 o 5 y se congelaron en nitrógeno líquido. Antes de la inyección las células se descongelaron y se lavaron.

Ensayo de CFU-F: El potencial clonogénico de MNC de MO, células CD271⁺ y CD271 se evaluó usando el ensayo de unidad de formación de colonias-fibroblasto (CFU-F). Las células se plaquero en placas de 35 mm en 2 ml de medio estimulante de células madre mesenquimales más suplementos (Stem Cell technologies, Vancouver, Canadá). Se plaquero células en densidades celulares diferentes que varían de 10.000 células por placa hasta 1 millón de células por placa. Se cultivaron cultivos a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 10 días y después se tiñeron con tinción de Giemsa y se clasificaron usando un microscopio de disección. Normalmente las colonias de CFU-F tienen entre 1 y 8 mm en diámetro y pueden clasificarse macroscópicamente.

Inducción y evaluación del potencial de diferenciación adipocítica y osteogénica: Las células CD271⁺ se cultivaron en condiciones no adherentes en bolsas de teflón y las células se recogieron y se plaquearon en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) para ensayos de diferenciación. La diferenciación adipocítica se indujo cultivando estas células en medio NH AdipoDiff (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, Estados Unidos) a una concentración de 5 x 10⁴ células/ml durante 2 semanas. Estas células se usaron para la tinción de gotas de lípidos usando aceite rojo O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La diferenciación osteogénica se indujo cultivando estas células en medio NH AdipoDiff (Miltenyi Biotec Inc.) a una concentración de 3 x 10⁴ células/ml durante 3 semanas. Después, las células se tiñeron con comprimido de sustrato tamponado SIGMA FAST BCIP/NBT (Sigma) para detectar su expresión de fosfatasa alcalina (AP), una enzima que está implicada en la mineralización de la matriz ósea. Las células que se cultivaron en alfa-MEM durante este periodo se usaron como controles.

Modelo animal, infarto de miocardio y trasplante celular. Todos los experimentos sobre animales vivos se realizaron según el protocolo aprobado mediante el programa de cuidado y uso de animales en la Universidad de Miami. Los animales se anestesiaron usando inhalación de isoflurano mediante intubación endotraqueal (1-2 %) mientras se controlaban niveles de anestesia con la temperatura del cuerpo y el ritmo cardiaco. Se usó buprenorfina (0,3 mg/kg, inyección SQ) en periodos prequirúrgicos y postquirúrgicos (Q6 horas) para la gestión del dolor. Usando una toracotomía anterior izquierda se expuso el corazón de ratones hembra NOD/SCID (NOD/SCID; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) de 8-10 semanas de edad y la arteria LAD se ligó permanentemente con sutura de proleno 7-0. El infarto se confirmó mediante blanqueo visual distal a la ligación y elevación del segmento ST en electrocardiograma (ECG). El primer ECG de seguimiento se usó 48 horas después de la cirugía como un criterio de inscripción para el estudio, por lo que todos los animales tenían un IM de igual tamaño. Se establecieron cuatro grupos experimentales que consistían en animales que recibieron inyecciones de solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control; células CD271⁺ (1,2 x 10⁵ células), MSC de MO humanas en dos dosis diferentes de 1,2 x 10⁵ (dosis baja) o células 1 x 10⁶ (dosis alta). Inmediatamente después del infarto, cada animal recibió tres inyecciones (10 µl/inyección) de PBS o células en los límites y el centro de la región infartada usando una aguja de calibre 30. La mortalidad quirúrgica fue del 11,5 % y la mortalidad en las primeras 48 horas después de la inyección celular fue del 5 % (la mortalidad total para el tiempo perquirúrgico es del 16,5 %). Ocho semanas después del trasplante, los animales se sacrificaron y los corazones se prepararon para el análisis inmunohistológico.

Ecocardiografía: Se realizó un seguimiento de la función cardiaca mediante el sistema de imágenes Vevo 770 (VisualSonic Inc., Toronto, Canadá) en línea base antes de la cirugía, 48 horas, 1, 2, 4 y 8 semanas después del infarto y la inyección celular. Las imágenes se registraron bajo anestesia con inhalación de isoflurano (1-2 %) a ritmos cardiacos superiores a 400 lpm y temperaturas corporales de (37 ± 10 °C). Se calcularon los parámetros de estructura del corazón y anatomía que incluían volumen diastólico final (EDV), volumen sistólico final (ESV) y fracción de eyección (FE) usando imágenes bidimensionales.

Análisis de bucle de presión-volumen: Ocho semanas después de la inyección de células y usando el enfoque de carótida derecha progresó un catéter monométrico de conductancia Millar (SPR 839) (Millar Instruments, TX) al ventrículo izquierdo. Durante el procedimiento, se infundió una solución de albúmina al 6,25 % diluida en la vena yugular a una velocidad de 5 µl/min y se obtuvo la anestesia con inhalación de isoflurano al 1-2 % a través de intubación traqueal. Los datos de presión-volumen se obtuvieron usando el sistema MPVS Ultra (Millar Instruments, TX) en línea base y después de la oclusión de la vena cava inferior (IVC). La calibración del volumen se realizó usando un procedimiento de cubeta e infusión de solución salina hipertónica.

Preparación del tejido e histopatología: Después de finalizar los registros de bucles de PV, se recogieron los corazones y se perfundieron durante 10 minutos con solución de cloruro de potasio 20 μ M y formalina al 10 % en 1 ml/min a través de canulación aórtica para fijar los corazones en diástole. Los corazones se partieron en rodajas y los cortes de histología se tiñeron con Mason Trichrome (TM) y H&E o se usaron para inmunohistoquímica.

5 Se usaron sondas de ADN específicas humanas (Human Alu Probe, BioGenex, CA) y el procedimiento de hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para realizar un seguimiento de células humanas inyectadas en el tejido de ratón (conjugado de anti-fluoresceína-HRP, Perkin Elmer, Boston, MA). Las muestras de corazón fetal humano y de ratones inyectados con PBS se usaron como controles positivo y negativo respectivamente. Las rodajas teñidas con Alu se escanearon con un escáner de láser fluorescente Zeiss y las imágenes se analizaron usando un programa informático de visión Mirax a un aumento de 20 X. Las imágenes se tomaron por separado y se combinaron usando Adobe Photoshop CS3 y las células positivas se contaron en dos zonas separadas del mismo corte.

15 *Inmunohistoquímica:* Las muestras se tiñeron con anticuerpos específicos cardíacos, alfa actina sarcomérica (α -SA) (Sigma, St. Louis, MO), troponina I (Tnl) (Abcam, Cambridge, MA) y conexina 43 (Cx43) (Santa Cruz, CA). Se usó tinción con laminina (Abcam) para delinear células. Las muestras teñidas se estudiaron en primer lugar mediante microscopía inmunofluorescente y después microscopio confocal Zeiss LSM710 para preparar imágenes.

20 *Análisis estadístico:* Los datos se analizaron usando el programa informático Graph Pad Prism y los valores se expresaron como promedio \pm error típico de media (SEM). Se usó análisis de varianza con mediciones repetidas (ANOVA de dos vías con ensayo de Bonferroni post hoc para analizar datos de eco y ANOVA de una vía para comparar datos hemodinámicas terminales con ensayo de comparación múltiple de Newman-Keuls post hoc.

Resultados

25 *Aislamiento de células CD271⁺ de MO humana normal:* Las células CD271⁺ se aislaron de células de MO de donante normal usando un etiquetado indirecto de células con microperlas anti-CD271-APC y anti-APC. La mediana en el número de células de MNC de MO inicial fue de $1,4 \times 10^8$ células nucleadas (intervalo de $2,9 \times 10^7$ a $3,3 \times 10^8$, N=7) dando como resultado una mediana de $4,2 \times 10^5$ células CD271⁺ después de la selección (intervalo de $3,9 \times 10^4$ a $9,4 \times 10^5$). Esto representa una frecuencia del 0,3 % de células CD271⁺ en el producto de MNC de MO. Las células CD271⁺ aisladas demostraron una morfología primitiva con una relación citoplasma con respecto al núcleo baja (figura 1).

30 Cuando se dispusieron en cultivo líquido, las células CD271⁺ formaron MSC en un periodo de 7 días (figura 2A), mientras que las MNC de MO completas formaron menos MSC (figura 2B). La generación de MSC a partir de células CD271⁺ se comparó con células CD271 y mientras 170.000 células CD271⁺ generaron MSC significativamente después de 7 días de cultivo en un matraz T162 cm², cien veces más células CD271 ($1,7 \times 10^7$ células en un matraz T162 cm²) no pudieron generar MSC significativamente en 7 días (figura 2C). Como se muestra en la figura 2C había algunas células adherentes en el cultivo de células CD271, pero estas parecieron ser células endoteliales no MSC.

35 Las células CD271⁺ se enriquecieron para CFU-F (figura), con 1 en 250 células CD271⁺ formando CFU-F en comparación con 1 en 12.500 MNC de MO. También la fracción negativa de CD271 contenía muy pocas CFU-F con menos de 1 en 100.000 células.

40 *Cultivo in vitro de células CD271⁺ en condiciones no adherentes:* Las células CD271⁺ se cultivaron en condiciones de cultivo no adherentes en bolsas de teflón durante 1 a 3 meses y las etapas tempranas de crecimiento se presentan en la figura 4. El medio para estos cultivos consistía en alfa-MEM + 20 % de FCS con 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos recombinantes (rhbFGF). En la primera semana pudieron observarse agrupaciones de células formadas por algunas células sobre la superficie de la bolsa de teflón de forma similar en morfología a MSC adherente a plástico. Se masajearon las bolsas para separar las células adherentes y el medio se cambió semanalmente. Las agrupaciones de células continuaron proliferando y formaron esferas como se muestra en la figura 4 desarrollándose esferas grandes el día 21. Estas células se analizaron después de 4 semanas en cultivo por citometría de flujo y la figura 5 muestra que la mayor parte expresó CD105, un marcador MSC típico.

45 El potencial de diferenciación adipocítico y osteoblástico de las células CD271⁺ cultivadas en condiciones no adherentes también se evaluó. Las células se recogieron de las bolsas de cultivo y se plaquearon en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) para ensayos de diferenciación. Como se muestra en la figura 6, las células CD271⁺ cultivadas se diferenciaron tanto en adipocitos como en osteoblastos.

50 Las células también se cultivaron en condiciones de cultivo de MSC típicas, es decir cultivo en matraces de cultivo tisular con medio alfa MEM más el 20 % de FCS. Las esferas mostradas en la figura 4 se unieron a la superficie del plástico de los matraces y las MSC crecieron a partir de las esferas y formaron cultivos confluentes después de 1 a 2 semanas.

55 Estos resultados demostraron que las células CD271⁺ cultivadas en condiciones no adherentes forman esferas de células que son CD105+, tienen potencial de adipocitos y osteoblastos y forman células similares a MSC adherentes

al plástico con propiedades de MSC.

Usando el medio acondicionado por células estromales de ratón derivadas de tejido cardíaco (MsHtStr CM) se evaluó el potencial cardíaco de células CD271⁺ cultivadas en condiciones no adherentes durante 2 semanas. La MSC no adherente (NA-MSC) expresó alfa-actinina sarcomérica, Nkx2.5 y conexina-43, GAT-4 y N-cadherina (figura 7). Estos resultados demuestran que las células CD271⁺ tienen el potencial de diferenciarse en células cardíacas, así como adipocitos y osteoblastos y evidencian que las células CD271⁺ tienen un potencial de diferenciación superior en comparación con MSC generadas como células adherentes al plástico. Ya que CD271 es un receptor neuronal se propuso que estas células también pueden poseer potencial de diferenciación neuronal y actualmente se llevan a cabo experimentos para evaluar esta cuestión.

Potencial in vivo de células CD271⁺ de MO: Para evaluar el potencial cardíaco *in vivo* de células CD271⁺ de MO, células CD271⁺ humanas aisladas recientemente se inyectaron en corazones infartados de ratones NOD/SCID. La lesión de IM produjo una dilatación y una disfunción ventricular dependiente del tiempo (figura 8). El efecto inicial de infarto entre todos los grupos fue igual. La comparación de volumen ventricular en la diástole final (EDV) (figura 8) mostró una remodelación inversa marcada en los ratones tratados con células CD271⁺ ($112,8 \pm 13,6 \mu\text{l}$) en comparación con el control ($128,1 \pm 15,7 \mu\text{l}$) ($P=0,02$). El grupo tratado con CD 271 también lo hizo marcadamente mejor que animales tratados con una dosis igual de MSC (dosis baja; $145,5 \pm 14,9 \mu\text{l}$) ($p=0,0001$) pero similar a animales tratados con la dosis alta de MSC ($116,5 \pm 14,5 \mu\text{l}$). Se demostró una respuesta de dosis en los animales tratados con MSC con una diferencia significativa entre animales tratados con la dosis baja de MSC en comparación con la dosis alta ($p=0,0001$). Las mismas tendencias resultaron en el volumen sistólico final (ESV): los animales tratados con CD 271 tenían un ESV significativamente inferior ($81,5 \pm 12,4 \mu\text{l}$) en comparación con animales de control ($119,7 \pm 17,8 \mu\text{l}$, $p<0,0001$) y animales tratados con MSC de dosis baja ($117,1 \pm 13,4 \mu\text{l}$, $p<0,0001$) pero no los animales tratados con MSC de dosis elevada ($91,2 \pm 12,6 \mu\text{l}$). Los animales tratados con CD 271 mostraron una fracción de eyección (FE) superior al final de 8 semanas ($32,3 \pm 3,7 \%$) en comparación con animales tratados con control ($17,6 \pm 4,1 \%$, $p<0,0001$) y animales tratados con MSC de dosis baja ($19,7 \pm 3,1 \%$, $p=0,0005$) pero no animales tratados con MSC de dosis alta ($24,7 \pm 2,9 \%$).

Análisis de bucle de presión-volumen: La evaluación hemodinámica de corazones tratados y de control se realizó 8 semanas después de la inyección. Se usó manometría de conductancia mediante enfoque de transcarótida. La elastancia arterial (Ea) se calculó y los ratones tratados con CD271 tenían una Ea más baja ($3,0 \pm 0,2 \text{ mm de Hg}/\mu\text{l}$) en comparación con animales de control ($4,7 \pm 0,2 \text{ mm de Hg}/\mu\text{l}$, $p<0,05$), pero no se diferenciaba significativamente a ratones tratados con dosis bajas o altas de MSC ($4,3 \pm 0,6$ y $3,5 \pm 0,4 \text{ mm de Hg}/\mu\text{l}$, respectivamente). La constante de relajación isovolumétrica (Tau_ Weiss) mostró propiedades diastólicas mejoradas de corazones con CD271 ($12,3 \pm 0,8 \text{ ms}$) que los controles ($15,2 \pm 1,0 \text{ ms}$, $p<0,05$).

Inmunohistoquímica: Secciones de tejido de corazones de animales tratados con células CD271⁺, MSC y placebo se tiñeron con sondas de Alu específicas humanas 8 semanas después de la inyección. Como se muestra en las figuras 9A-9D, los animales inyectados con células CD271⁺ demostraron la presencia de células humanas en zonas remotas o periféricas de los corazones. Un gran número de células humanas se detectaron bien embebidas en la pared vascular o entre células del huésped. Además, algunos cardiomiocitos fueron positivos para Alu y las células positivas a Alu expresaron troponina I (figura 9B) y alfa-actinina de músculo liso (figura 9D). Esto evidencia algún potencial de diferenciación cardíaca de células CD271⁺. También se detectaron células humanas en los corazones de animales inyectados con la dosis alta de MSC y de nuevo estas células estaban embebidas en la pared vascular o entre cardiomiocitos del huésped. No hubo detección de cardiomiocitos teñidos con Alu o la expresión de marcadores cardíacos en células positivas a Alu en los corazones de animales inyectados con la dosis alta de MSC.

Discusión

Las células CD271⁺ estaban presentes en una frecuencia baja en células de MO que consistían en el 0,3 % de la población de MNC de MO. Usando reactivos y dispositivos de selección de Miltenyi MACS, se aisló una población muy purificada de células CD271⁺ que tenían una pureza superior al 90 % con una recuperación promedio de $4,2 \times 10^5$ células a partir de 25 cm^3 de aspirado de MO. La morfología de las células CD271⁺ demostró un fenotipo primitivo de blastocitos uniformes que consistían en una relación citoplasma con respecto al núcleo. Los datos confirmaron que el enriquecimiento de células formadoras de MSC en la población de CD271⁺ con un nivel 60 veces superior de CFU-F en células CD271⁺ en comparación con MNC de MO. Además, la frecuencia de CFU-F en poblaciones negativas a CD271 se redujo ampliamente a 1 en 100.000 células en comparación con 1 en 12.500 en la población de MNC de MO y 500 veces inferior a la población de CD271⁺. Las MSC generadas a partir de células CD271⁺, mediante adherencia a matraces de plástico, presentaron idénticas propiedades *in vitro* que las MSC generadas a partir de MNC de MO con expresión de CD105⁺ y capaces de formar adipositos y osteoblastos *in vitro*. Estudios previos han demostrado que el potencial de MSC reside en la población de células CD271⁺CD45. Además, el análisis fenotípico demostró que las células CD271⁺ eran negativas para marcadores MSC típicos que incluyen CD105 y CD90, no obstante, después del cultivo las células expresaron marcadores de MSC clásicos, CD105, CD90 y CD73. La expresión de CD271 posterior inhibe la diferenciación de MSC a linajes osteogénicos, adipogénicos, condrogénicos y miogénicos. Los datos del presente documento son coherentes con la literatura y apoyan la propuesta de que células CD271⁺ son una población de células madre que es un precursor de MSC y que la diferenciación de células CD271⁺ a MSC adherentes al plástico da como resultado la disponibilidad de linajes

adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos.

Experimentos adicionales se realizaron *in vitro* para evaluar metodologías para generar MSC en condiciones de cultivo no adherentes. Dado este enfoque de laboratorio sobre la reparación cardiaca se planteó la hipótesis de que las MSC generadas como células adherentes a plástico pueden no ser óptima para regeneración cardiaca. En la MO, las MSC tienen la superficie ósea para que actúe como un sustrato para el crecimiento de células adherentes, no obstante, no existe un sustrato equivalente en el tejido cardiaco. Se desarrollaron condiciones de cultivo, por lo tanto, para la expansión de MSC en condiciones no adherentes (NA-MSC). Las células CD271⁺ se cultivaron en bolsas de teflón que minimizaron la adherencia de células y el masaje regular de las bolsas mantuvo las células en suspensión. Como se muestra en la sección resultados, los MSC proliferaron en las bolsas formando esferas de células con propiedades de MSC, formando células similares a MSC adherentes clásicas cuando se disponen en matraces de plástico estándar y que expresan CD105. Las NA-MSC también se diferenciaron en adipocitos y condrocitos en condiciones de cultivo apropiadas. La capacidad osteogénica de las NA-MSC se está evaluando actualmente. Además, se ha demostrado en el presente documento de que las células CD271⁺ pueden inducirse para expresar genes específicos cardiacos cuando se cultivan en presencia de medios acondicionados mediante células estromales derivadas de corazón murino. Los medios acondicionados con células estromales derivadas de tejido de corazón fetal humano también estimulan la expresión génica cardiaca. Estos datos evidencian que las células CD271⁺ puede tener una capacidad de diferenciación superior en comparación con MSC generadas adherentes a plástico que no pudieron expresar genes cardiacos cuando se cultivaron en condiciones idénticas.

El potencial *in vivo* de células CD271⁺ humanas se evaluó en ratones NOD/SCID inmunodeprimidos después de la inducción de un infarto de miocardio. Con fines comparativos las MSC humanas aisladas y expandidas usando adherencia estándar a matraces de plástico se inyectaron y un grupo de control de animales recibió inyección de placebo. La inyección de 120.000 células CD271⁺ dio como resultado una función cardiaca mejorada en comparación con ratones inyectados con el número equivalente de MSC y animales de control con fracción de eyección aumentada. Los resultados equivalentes se obtuvieron para animales inyectados con una dosis más alta de MSC. Estos datos evidenciaron que el potencial de células CD271⁺ es superior al de MSC en dosis de células equivalentes. Además, la expresión de marcadores cardiacos se detectó en células humanas en animales inyectados con células CD271⁺, pero no animales inyectados con MSC, lo que es coherente con los datos *in vitro* que demuestran un potencial cardiaco de las células CD271⁺ pero no de las MSC.

Un número de grupos han evaluado el potencial de varias poblaciones derivadas de médula ósea que incluyen células mononucleares, células CD34⁺, células CD133⁺ y MSC. En este estudio, el potencial de MSC derivadas de MO se evaluó en estudios preclínicos en animales grandes y se demostró que las MSC pueden injertarse en y adyacentemente a cicatrices de infarto crónico y estimulan la recuperación miocárdica significativa que incluye reducciones sustanciales en tamaño de infarto, remodelación inversa de corazones dañados y aumento tanto en contractibilidad miocárdica y perfusión de tejido. Estos estudios preclínicos han conducido a ensayos clínicos constantes de MSC en la Universidad de Miami. Uno de estos estudios se ha realizado en pacientes con disfunción ventricular izquierda isquémica crónica secundaria a infarto de miocardio que se han sometido a cirugía cardiaca para injerto de derivación de arteria coronaria (CABG). La inscripción a este ensayo se ha limitado debido a la urgencia de pacientes por someterse a cirugía de derivación y solo un número pequeño de pacientes fue capaz de esperar las 5 o 6 semanas necesarias para generar MSC autólogas. Estas células CD271⁺ derivadas de MO representan una fuente de células autólogas para estos pacientes. Las células CD271⁺ pueden aislarse de un aspirado de MO dentro de un periodo de 4 a 5 horas proporcionando una población de células fácilmente disponible para el tratamiento de pacientes con CABG que requieren una cirugía urgente. Estos estudios proporcionan evidencias de que las células CD271⁺ derivadas de MO ofrecen una población de células única para el estudio de reparación cardiaca. En comparación con MSC aisladas mediante adherencia a plástico, las células CD271⁺ tenían un potencial de diferenciación cardiaca *in vitro* superior y el tratamiento de ratones después de un IM dio como resultado una mejora superior de la función cardiaca. Las células CD271⁺ pueden aislarse rápidamente usando una selección de células magnéticas, por lo tanto podrían ser una fuente de células potencial para pacientes que requieren cirugía de derivación.

Aunque la invención se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, tendrán lugar alteraciones y modificaciones equivalentes para otros expertos en la técnica después la lectura y el entendimiento de la presente memoria descriptiva y los dibujos anexos. Además, aunque una característica particular de la invención puede haberse divulgado con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica puede combinarse con una o más de otras características de las otras implementaciones si es deseable y ventajoso para cualquier aplicación dada o particular.

El resumen de la divulgación permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Se presenta con la convicción de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o el significado de las reivindicaciones.

Listado de referencias

(1) Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De SG, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, GoA, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M,

- Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009; 119(3):480-486. PMID: 19171871
- 5 (2) Fang J, Mensah GA, Croft JB, Keenan NL. Heart failure-related hospitalization in the U.S., 1979 to 2004. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(6):428-434. PMID: 18672162
- (3) Verma A, Meris A, Skali H, Ghali JK, Arnold JM, Bourgoun M, Velazquez EJ, McMurray JJ, Kober L, Pfeffer MA, Califf RM, Solomon SD. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction: the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial infarction) Echocardiographic Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2008; 1(5):582-591. PMID: 19356485
- 10 (4) Krause K, Jaquet K, Schneider C, Haupt S, Lioznov MV, Otte KM, Kuck KH. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. *Heart* 2009; 95(14):1145-1152. PMID: 19336430
- (5) Hirsch A, Nijveldt R, van d, V, Tio RA, van der Giessen WJ, Marques KM, Doevendans PA, Waltenberger J, Ten Berg JM, Aengevaeren WR, Biemond BJ, Tijssen JG, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71(3):273-281. PMID: 18288734
- 15 (6) Hare JM. Translational development of mesenchymal stem cell therapy for cardiovascular diseases. *Tex Heart Inst J* 2009; 36(2):145-147. PMID: 19436809
- 20 (7) Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(33):14022-14027. PMID: 19688564
- 25 (8) Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodeling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2009; 30(22):2722-2732. PMID: 19586959
- (9) Schuleri KH, Boyle AJ, Centola M, Amado LC, Evers R, Zimmet JM, Evers KS, Ostbye KM, Scorpio DG, Hare JM, Lardo AC. The adult Gottingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies. *Comp Med* 2008; 58(6):568-579. PMID: 19149414
- 30 (10) Avison DL, DeFaria W, Tryphonopoulos P, Tekin A, Attia GR, Takahashi H, Jin Y, Palaios E, Pararas N, Carreno MR, Santiago S, Bazer F, Ruiz P, Tzakis A. Heterotopic uterus transplantation in a swine model. *Transplantation* 2009; 88(4):465-469. PMID: 19696628
- 35 (11) Ishikawa Y, Hirakata A, Griesemer AD, Etter J, Moran S, Weiner J, Shimizu A, Yamada K. Tolerance and Long-Lasting Peripheral Chimerism After Allogeneic Intestinal Transplantation in MGH Miniature Swine. *Transplantation* 2010; 89(4):417-426. PMID: 20177343
- (12) Pijnappels DA, Schaliij MJ, Ramkisoensing AA, van TJ, de Vries AA, van der LA, Ypey DL, Atsma DE. Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. *Circ Res* 2008;103(2):167-176. PMID: 18556577
- 40 (13) Kruglyakov PV, Sokolova IB, Zin'kova NN, Viide SK, Aleksandrov GV, Petrov NS, Polyntsev DG. *In vitro* and *in vivo* differentiation of mesenchymal stem cells in the cardiomyocyte direction. *Bull Exp Biol Med* 2006;142(4):503-506. PMID: 17415448
- (14) Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111(2):150-156. PMID: 15642764
- 45 (15) Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St JM, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(32):11474-11479. PMID: 16061805
- 50 (16) Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskouei B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima JA, Lardo AC, Heldman AW, Hare JM. Multimodality noninvasive imaging demonstrates *in vivo* cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(10):2116-2124. PMID: 17113001

(17) Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Zimmet JM, Young RG, Heldman AW, Lardo AC, Hare JM. Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294(5):H2002H2011. PMID: 18310523

5 (18) Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB, Jr., Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(24):2277-2286. PMID: 19958962

10 (19) Amado LC, Gerber BL, Gupta SN, Rettmann DW, Szarf G, Schock R, Nasir K, Kraitchman DL, Lima JA. Accurate and objective infarct sizing by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a canine myocardial infarction model. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(12):2383-2389. PMID: 15607402

(20) Schuleri KH, Centola M, George RT, Amado LC, Evers KS, Kitagawa K, Vavere AL, Evers R, Hare JM, Cox C, McVeigh ER, Lima JA, Lardo AC. Characterization of peri-infarct zone heterogeneity by contrast-enhanced multidetector computed tomography: a comparison with magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(18):1699-1707. PMID: 19406346

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas de médula ósea de un sujeto y cultivadas en condiciones no adherentes para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos cardiovasculares, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ son capaces de injertarse en un corazón *in vivo* en zonas de infarto y periféricas.
2. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según la reivindicación 1, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se aíslan de células de médula ósea que tienen un receptor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR; CD271).
- 10 3. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se aíslan de donantes que comprenden: autólogos, singénicos, alogénicos o xenogénicos.
4. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1-3, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se diferencian en al menos un linaje que comprende: linajes miocárdicos, vasculares o endoteliales.
- 15 5. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1-4, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se diferencian en linajes que comprenden: linajes miocárdicos, vasculares o endoteliales.
- 20 6. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según la reivindicación 4, en la que las células miocárdicas se identifican por marcadores que comprenden: GATA-4, Nkx2.5 o α -actina sarcomérica.
7. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 4 o 5, en la que las células vasculares se identifican por marcadores que comprenden: α -actina de músculo liso o SMA22.
- 25 8. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 4 o 5, en la que las células endoteliales se identifican por marcadores que comprenden: CD31 o vimentina.
9. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1-8, usada conjuntamente con uno o más agentes, comprendiendo los agentes al menos uno de: citocinas, factores quimiotácticos, factores de crecimiento o factores de diferenciación.
- 30 10. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1-9, en la que las enfermedades o los trastornos cardiovasculares comprenden: insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, isquemia, infarto de miocardio, trasplante, hipertensión, reestenosis, angina de pecho, cardiopatía reumática o defecto cardiovascular congénito.
- 35 11. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según la reivindicación 1, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se administran a un paciente en concentraciones variables a lo largo de un periodo de tiempo.
- 40 12. La cantidad terapéuticamente eficaz de células precursoras de células madre mesenquimales (MSC) CD271⁺ aisladas para su uso según las reivindicaciones 1-11, en la que las células precursoras de MSC CD271⁺ se acondicionan con medios acondicionados con células estromales derivadas del corazón.

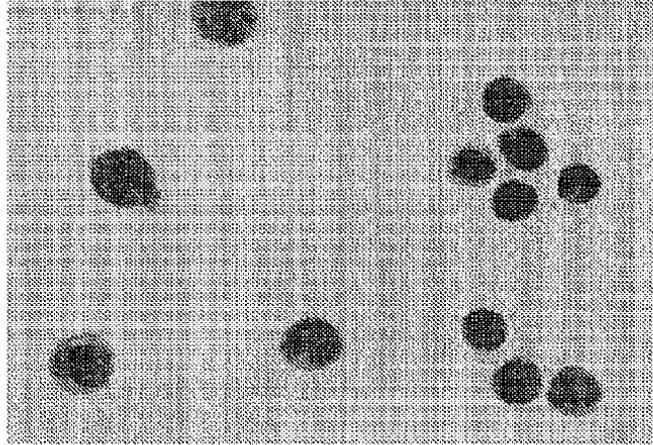
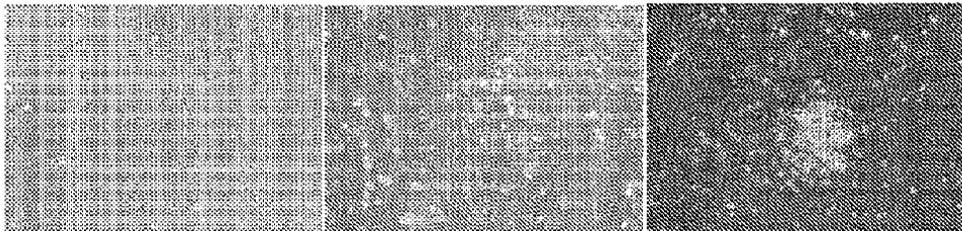


FIGURA 1



2A

2B

2C

FIGURAS 2A, 2B, 2C

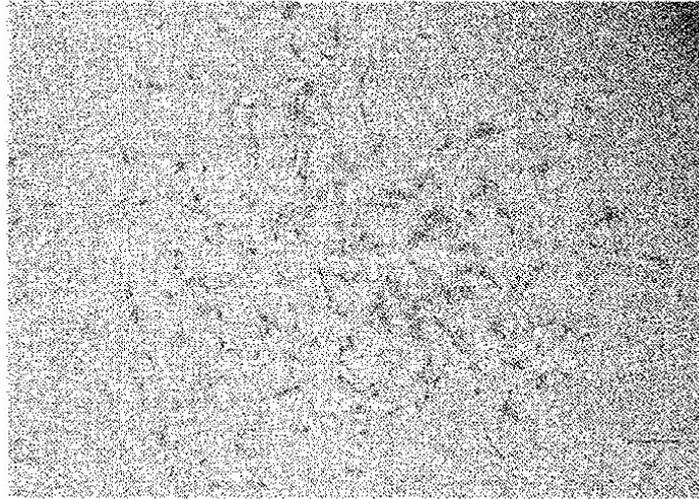


FIGURA 3

DÍA 7

DÍA 14

DÍA 21



FIGURA 4

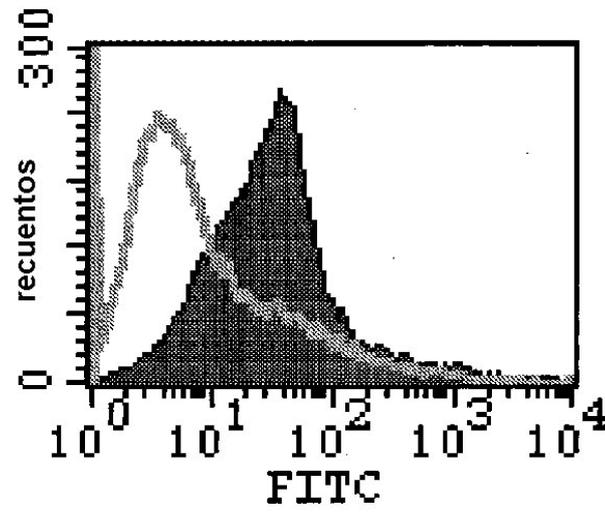
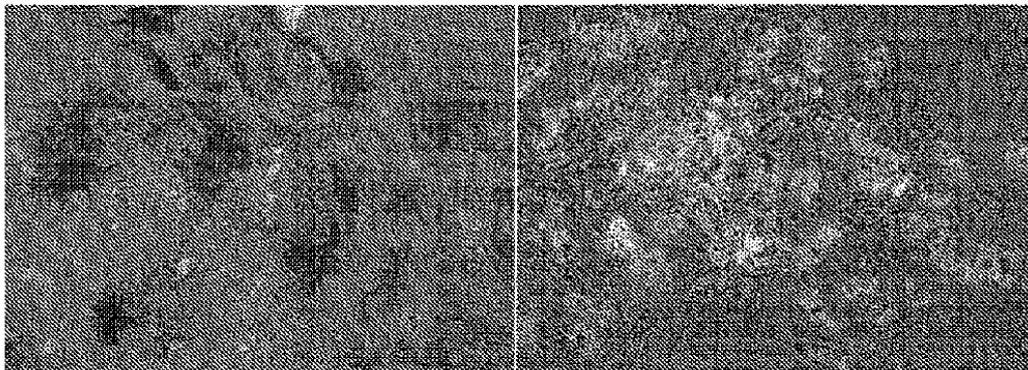


FIGURA 5



6A

6B

FIGURAS 6A, 6B

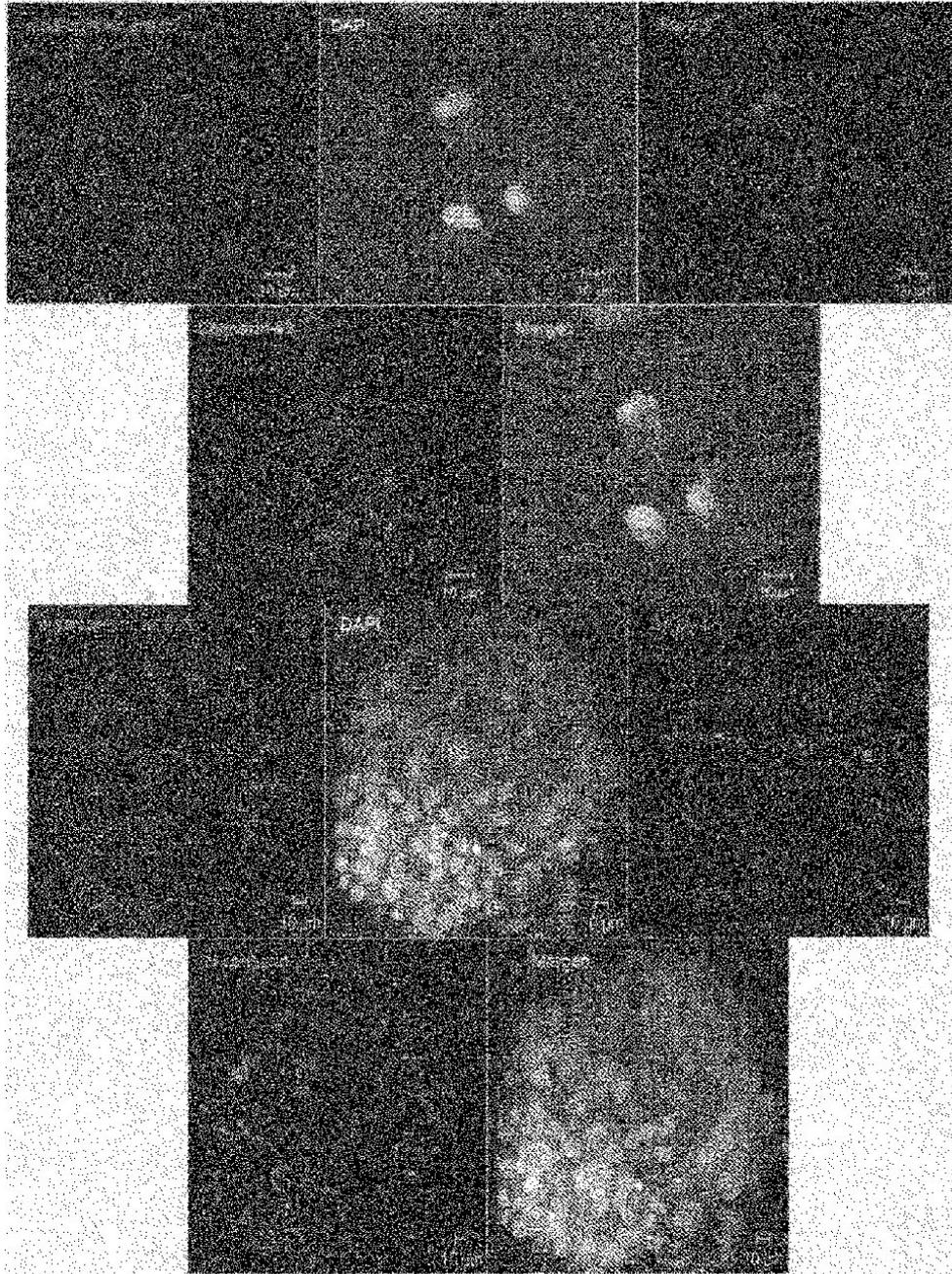


FIGURA 7

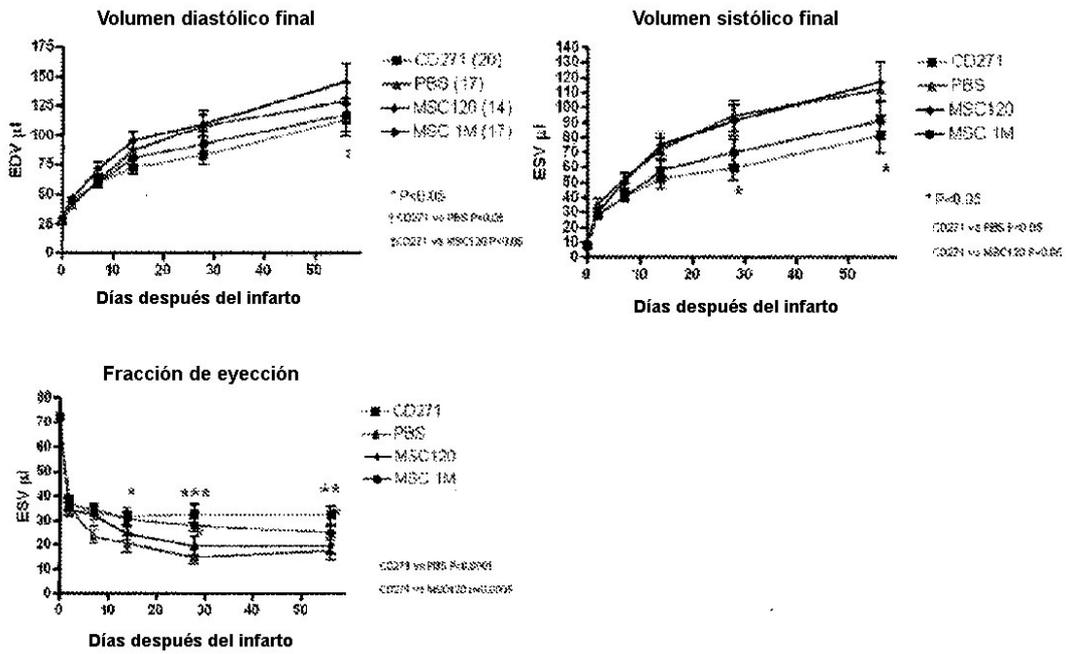
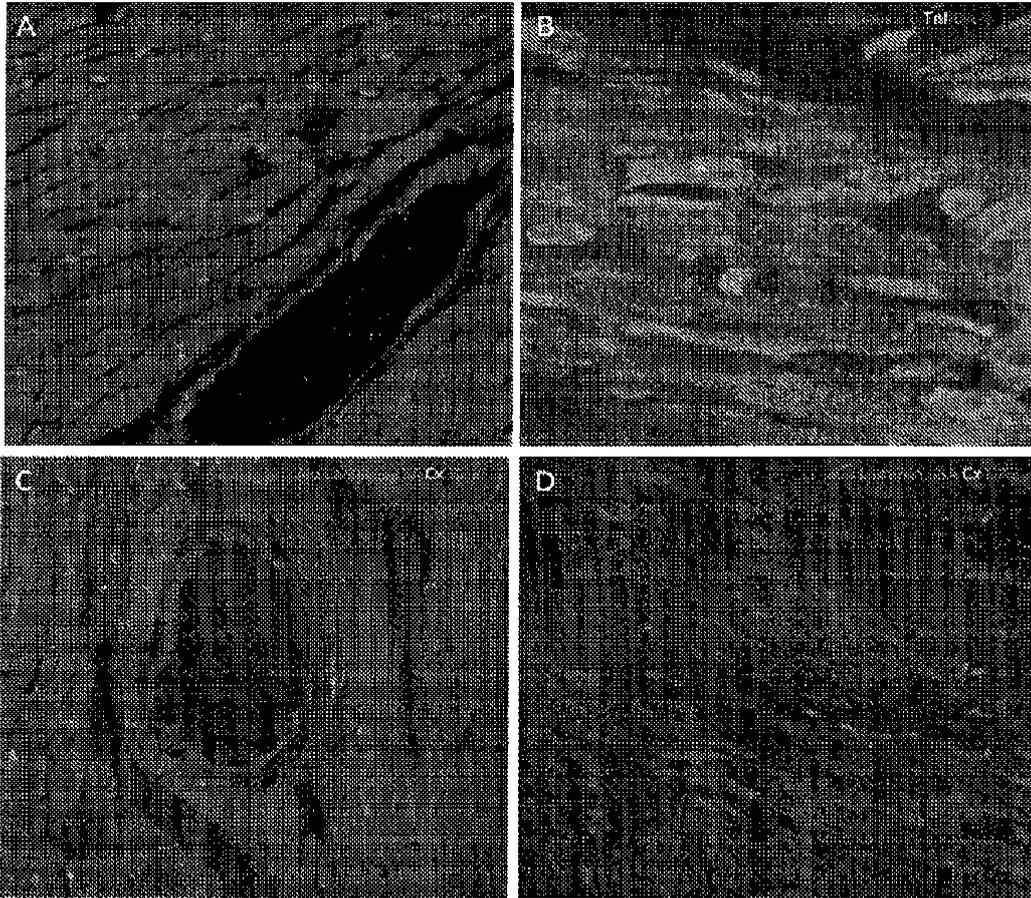


FIGURA 8



FIGURAS 9A-9D