

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 158**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 35/30** (2006.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10703115 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2393920**

54 Título: **Tratamiento de la isquemia de extremidades**

30 Prioridad:

**06.02.2009 GB 0902034**

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

**17.05.2016**

73 Titular/es:

**RENEURON LIMITED (100.0%)  
10 Nugent Road Surrey Research Park  
Guildford Surrey GU2 7AF, GB**

72 Inventor/es:

**SINDEN, JOHN;  
MILJAN, ERIK y  
MADEDDU, PAOLO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 570 158 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

Tratamiento de la isquemia de extremidades

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a terapias celulares para el tratamiento de arteriopatías periféricas, que incluyen, pero sin limitación: isquemia crítica de extremidades aguda y crónica, enfermedad de Buerger e isquemia crítica de extremidades en la diabetes.

**Antecedentes de la invención**

10 La arteriopatía oclusiva periférica de extremidades inferiores plantea un desafío único para las terapias endovasculares tradicionales. La naturaleza difusa de la enfermedad aterosclerótica de las extremidades inferiores, la presencia de oclusiones totales crónicas, la salida distal escasa, y la presencia de isquemia de las extremidades han contribuido a los resultados decepcionantes del tratamiento. La arteriopatía periférica (APP) afecta a ~12 millones de personas en los Estados Unidos, y se llevan a cabo aproximadamente 220.000 a 240.000 amputaciones al año en EE.UU. y Europa. La APP abarca la isquemia crónica de extremidades, que progresa hasta la isquemia crítica de extremidades que conduce a que la extremidad distal corra riesgo de amputación, y la isquemia aguda de extremidades, con una pérdida rápida del flujo sanguíneo que daña el tejido en horas. La isquemia crítica de extremidades (ICE) está asociada a menudo con la diabetes, y da como resultado una vasculatura comprometida y un daño tisular exagerado. Una afección crónica diferente, la enfermedad de Buerger, compromete el flujo sanguíneo en las manos y pies, lo que da como resultado la pérdida de dedos de las manos y de los pies. La APP crónica da como resultado en general la cicatrización escasa de heridas, úlceras y necrosis tisular en extremidades y miembros, lo que puede dar como resultado la pérdida de la extremidad afectada como resultado de una amputación no traumática.

25 En ICE, los pacientes presentan dolor de reposo isquémico crónico, presencia de úlceras tisulares, o gangrena como resultado del flujo sanguíneo reducido debido a una enfermedad oclusiva demostrada. La afección es la progresión de la APP diagnosticada por un pulso bajo o inexistente en el pie, índice tobillo-brazo bajo (ITB, tensión arterial en el tobillo/tensión arterial en el brazo <0,6) tensión arterial reducida en un dedo del pie (<30-50 mmHg), oxígeno transcutáneo reducido (<30-50 mmHg). La oclusión de las arterias está provocada normalmente por la aterosclerosis en arterias de gran tamaño comunicantes, y se confirma mediante el uso de angiografía o ecografía dúplex. Una vez diagnosticado de isquemia crítica de extremidades, los pacientes tienen un riesgo de pérdida de la extremidad del 10 al 40% en el primer año. Los pacientes de ICE normalmente también tienen riesgo de infarto de miocardio, ictus y arteriopatía coronaria.

35 La APP es una complicación cardiovascular habitual en los pacientes de diabetes. En contraste con la arteriopatía periférica en los individuos no diabéticos, es más prevalente y, debido a la zona distal de implicación de los vasos y su asociación a la neuropatía periférica, más habitualmente es asintomática. Se estima que aproximadamente un 20% de los pacientes de APP sintomática son diabéticos. Los diabéticos con isquemia de extremidades tienen un riesgo mayor de lesión tisular. El dolor sentido al andar por las personas no diabéticas, es decir, la primera indicación de isquemia de extremidades, puede no ser percibido por las personas diabéticas debido a la presencia de neuropatía periférica. Los pacientes diabéticos pueden notar dolor al andar en los muslos y nalgas debido a la pérdida del flujo sanguíneo de reserva o tener una sensación de músculos cansados.

40 Los pacientes con casos leves de isquemia de extremidades se tratan médicamente con terapia antiplaquetaria (clopidogrel) y vasodilatadora (pentoxifilina). La modificación de riesgos también se usa para eliminar el tabaquismo y controlar la hipertensión, que son factores contribuyentes a APP. Los regímenes de ejercicio monitorizado son el tratamiento más eficaz de APP, con sesiones que duran más de 30 minutos al menos tres veces por semana, con programas que duran al menos seis meses (Gey *et al* 2004).

45 Los pacientes con isquemia moderada de extremidades, claudicación moderada a grave y distancias de marcha de 200 metros o menos son candidatos a la angioplastia transluminal percutánea junto con terapia médica (Gray *et al* 2008). Los pacientes con síntomas graves, que incluyen dolor isquémico en reposo y úlceras crónicas, son candidatos a la angioplastia con y sin inserción de endoprótesis vascular y/o cirugía de derivación. Desgraciadamente, los procedimientos quirúrgicos que restablecen el flujo sanguíneo habitualmente dan como resultado la pérdida de permeabilidad de los vasos en uno a dos años, y hasta un 20% de pacientes tienen reestenosis de las arterias afectadas. También surgen complicaciones en hasta un 25% de los pacientes que tienen una cicatrización escasa en el sitio de la herida.

55 Aproximadamente del 20 al 30% de los pacientes con los síntomas más graves de ICE no se consideran candidatos para procedimientos vasculares o endovasculares y, por lo tanto, se consideran para la amputación. Los pacientes con tejido necrótico y gangrena húmeda o seca se consideran normalmente candidatos para la amputación, aunque ciertos casos de amputación seca se resuelven eliminando el tejido afectado. La amputación también se considera en casos de isquemia avanzada asociada a un valor bajo del índice tobillo-brazo (<0,3).

La isquemia aguda de extremidades (IAE) se define como cualquier disminución o empeoramiento repentino de la

5 perfusión de la extremidad (Gray et al 2008). Las causas de IAE normalmente son una oclusión trombótica aguda de un segmento arterial estenótico preexistente (60% de los casos) o un émbolo (coágulo) originado normalmente en el corazón o en un segmento de una placa aterosclerótica (30% de los casos) que detiene el flujo sanguíneo en una arteria periférica. Los bloqueos también se dan por traumatismo, fracturas, contusiones y lesiones penetrantes y por complicaciones de procedimientos quirúrgicos. La lesión por IAE se da en los músculos afectados en horas desde el inicio.

10 Los pacientes con IAE presentan un grupo generalizado de síntomas que son el resultado de la pérdida del flujo sanguíneo en la extremidad. Estos síntomas incluyen; Dolor, palidez (blancura de la extremidad), extremidad sin pulso, poiquiloterma (la extremidad asume la temperatura del entorno), parestesia (sensación de hormigueo) y parálisis. A medida que el periodo de IAE se prolonga, la extremidad comienza a tener un aspecto moteado, a medida que la sangre comienza a coagularse. La presencia de anestesia, cuando el paciente es incapaz de sentir el tacto en la extremidad, y es incapaz de mover los dedos del pie o de la mano, son la clave para diagnosticar la isquemia completa, que requiere un tratamiento quirúrgico urgente (Callum y Bradbury 2000).

15 Es necesario el tratamiento rápido de la IAE, ya que unas cuantas horas en la resolución pueden marcar la diferencia entre la amputación de la extremidad (y la posible muerte) y la recuperación de la función de la extremidad. La administración de heparina normalmente es la primera línea de tratamiento para limitar la propagación de un trombo y para proteger la circulación colateral de la extremidad afectada (Gray et al 2008). Los pacientes con extremidades que son viables o con un riesgo mínimo (pérdida sensorial mínima o inexistente y señales venosas audibles) se tratan normalmente con terapia trombolítica dirigida por catéter. Los casos con un riesgo inmediato de lesión (dolor, debilidad muscular y señales arteriales inaudibles) se pueden tratar mediante el uso de terapia trombolítica, un dispositivo de trombectomía percutánea o derivación quirúrgica. Los pacientes que presentan extremidades inviables que tienen una lesión irreversible (pérdida de sensación, parálisis con rigidez muscular y señales arteriales y venosas inaudibles) afrontan la amputación de la extremidad.

25 Los pacientes con IAE todavía corren el riesgo de lesión secundaria en la extremidad tras el restablecimiento del flujo sanguíneo debido a la lesión por reperfusión. El tejido padece peroxidación e invasión de neutrófilos, junto con hinchazón de la extremidad. La lesión del nervio periférico padecida por el periodo isquémico y la reperfusión resultante pueden conducir a dolor crónico. La agresión en los órganos periféricos por los productos de la sangre como resultado del episodio isquémico puede conducir a la lesión e insuficiencia del órgano. Los pacientes que padecen arteriopatía coronaria tienen un riesgo incrementado de muerte tras IAE.

30 Hay aproximadamente 200.000 casos de IAE en EE.UU. cada año. De esos casos, del 10 al 20% de casos tienen mortalidad hospitalaria debida a insuficiencia cardiaca y/o embolia recurrente.

También existe una respuesta angiogénica a la isquemia. La angiogénesis inducida por la isquemia implica el crecimiento de una nueva microvasculatura y lechos capilares. Las células en el tejido isquémico responden a la hipoxia (niveles bajos de oxígeno) e inducen la angiogénesis por medio del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1).

35 Los estados patológicos relacionados con las reducciones de la perfusión vascular se pueden tratar mediante el uso de estrategias que estimulan la revascularización del tejido. La mayoría de aproximaciones para la estimulación de la vascularización se han centrado en la administración de un gen o factor de crecimiento, en general VEGF y/o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Aunque se ha mostrado que los ensayos clínicos para la terapia angiogénica mitigan los síntomas secundarios, no se han podido demostrar mejoras en el rendimiento en el ejercicio, el criterio de valoración principal de la FDA de EE.UU. para la aprobación de un agente angiogénico. Se han asociado algunos efectos secundarios a la administración de VEGF y FGF, que incluyen hipotensión, edema, insuficiencia renal y exudación vascular.

45 La angiogénesis estimulada por la exposición a VEGF no forma sistemáticamente una vasculatura funcional estable. La exposición a largo plazo a VEGF es necesaria para producir una microvasculatura estable que no se degrade tras la retirada del estímulo de VEGF. Las concentraciones de VEGF también son cruciales, ya que las dosis bajas de VEGF dan como resultado vasos con una permeabilidad incrementada que conduce a edema, y las dosis elevadas de VEGF pueden dar como resultado la formación de un hemangioma y exudado vascular.

50 Se puede usar la implantación de matrices disolubles incrustadas con factores de crecimiento como fuente de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento (FGF y VEGF) se pueden incorporar en armazones biodegradables (por ejemplo, basados en PLGA) que se liberan lentamente a medida que se degrada la matriz. Tal aproximación permite una liberación regulada de los factores de crecimiento administrados localmente en el sitio de interés. Una vez que se establece la vasculatura nueva, se pueden administrar factores de crecimiento de manera controlada para mantener la funcionalidad óptima de los vasos nuevos.

55 También se han propuesto terapias basadas en células. Las células progenitoras endoteliales (CPE) que se originan en la médula ósea desempeñan un papel significativo en la neovascularización endógena de vaso lesionados. Se ha demostrado que el trasplante de CPE induce la formación de vasos nuevos en miocardio y extremidades inferiores con isquemia, y acelera la reendotelización de vasos lesionados e injertos protésicos vasculares en seres humanos y en diversos modelos animales. Se han demostrado las CPEs como terapia potencial para una estrategia basada en

5 células para el rescate y la reparación de tejidos isquémicos y vasos sanguíneos lesionados. Se cree que las CPEs se originan a partir de múltiples precursores en la médula ósea. Las células tienen un potencial proliferativo elevado, aunque con un número limitado de divisiones celulares. El número de CPEs es bajo en condiciones normales, sin embargo, la estimulación con citocinas y hormonas exógenas eleva el número de CPEs varias veces. Los mecanismos que controlan la movilización, el destino y la diferenciación de las CPEs *in vivo* siguen siendo en gran medida desconocidos. Se pueden aislar CPEs de sangre periférica y expandirlas para proporcionar un número suficiente para el trasplante autólogo.

10 El número de CPEs es reducido en los pacientes con un riesgo significativo de enfermedad cardiovascular. En pacientes con arteriopatía coronaria grave, la potencia de las CPEs tal como se define mediante la capacidad de formación de colonias y la actividad migratoria estuvo notablemente reducida y asociada a una neovascularización reducida en la isquemia de extremidades inferiores (Heeschen et al 2004). De forma similar, el número de CPEs está reducido en los pacientes con diabetes de tipo I o tipo II. También está reducida la capacidad de las CPEs de inducir la angiogénesis *in vitro*. La reducción del número de CPEs y de su actividad sugiere que su déficit está implicado en algunas de las complicaciones vasculares asociadas a diabetes, tal como la disfunción endotelial, que predispone a los pacientes a aterosclerosis difusa y neovascularización alterada tras sucesos isquémicos.

15 Se ha demostrado que la implantación de células progenitoras CPE en la extremidad isquémica estimula la formación de vasos nuevos (neoangiogénesis) en la extremidad afectada. La administración de células de médula ósea en un modelo de ratón de isquemia de extremidades posteriores fue la primera observación de que la terapia celular puede contribuir a la neoangiogénesis tras una agresión isquémica (Asahara et al 1999). En 2002, Tateishi - Yuyama et al. informaron primero de que la implantación de células mononucleares de médula ósea autólogas era un tratamiento eficaz para los pacientes con extremidades isquémicas debido a arteriopatía periférica (Tateishi-Yuyama et al 2002). En estudios adicionales, se informó que la dosis óptima de células derivadas de médula ósea autóloga para el tratamiento de la isquemia de extremidades fue como mínimo  $1 \times 10^5$  células, y la dosis de implantación óptima fue  $1 \times 10^8$  células (Gu et al 2006; Liao y Zhao 2008).

20 Los estudios funcionales que monitorizan la carrera sobre cinta en ratas con isquemia de extremidades posteriores han mostrado incrementos tanto en la perfusión de la extremidad como en el rendimiento de los animales tratados. La administración de médula ósea también ha incrementado la angiogénesis en ratas diabéticas con isquemia de extremidades posteriores.

25 Diversas variaciones del tratamiento con poblaciones de células de médula ósea en el músculo de una extremidad posterior isquémica han demostrado una estimulación de la angiogénesis por medio de la generación de factores angiogénicos y mediante la estimulación de células progenitoras endoteliales.

30 Se ha demostrado la viabilidad de la implantación de células mediante el uso de células derivadas de médula ósea autóloga, que incluyen células madre hematopoyéticas, endoteliales y mesenquimatosas o sus combinaciones, en varios estudios clínicos, y se han observado niveles variables de beneficio. Aunque se han observado resultados positivos globales, las limitaciones son claras: para pacientes ancianos y diabéticos, el potencial terapéutico de las propias células de los pacientes está disminuido. Además, la molestia y el coste de extracción, aislamiento, purificación, ensayo de liberación y readministración de las células madre específicas del paciente es un obstáculo para la aplicación médica reembolsable generalizada.

35 El progreso clínico e industrial real en la implantación de células para el tratamiento de la isquemia periférica en todas sus manifestaciones requiere un producto de células madre que sea capaz de cumplir todas las características deseadas:

- 40 ▪ Eficacia terapéutica elevada
- Perfil de seguridad excelente
- Estandarizado para todos los pacientes (es decir, no es específico de paciente)
- 45 ▪ Disponible por encargo, incluso en situaciones de urgencia.
- Bajo coste de bienes (comparado con los tratamientos específicos de paciente)

Por lo tanto, existe una necesidad clara de tratamientos mejorados para la arteriopatía periférica, que incluye la isquemia de extremidades.

### Sumario de la invención

50 La presente invención se basa en el desarrollo de líneas celulares que tienen características favorables que las hacen útiles en el tratamiento de la arteriopatía periférica.

Según un primer aspecto de la presente invención, se usan células neuroepiteliales pluripotentes en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado a la arteriopatía periférica.

Según un segundo aspecto, hay un método para tratar la arteriopatía periférica en un paciente que comprende administrar al paciente una dosis terapéutica de células madre neuronales.

Según un tercer aspecto, las células madre neuronales son para el uso en el tratamiento de un paciente que padece arteriopatía periférica.

- 5 Las células son especialmente adecuadas para el tratamiento de la isquemia de extremidades.

**Descripción de los dibujos**

La presente invención se describe con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

10 La Figura 1A) es un gráfico de líneas que muestra que la extremidad isquémica tratada con células madre neuronales tiene un flujo sanguíneo incrementado y sostenido en comparación con la extremidad isquémica tratada con vehículo solamente. Las medidas de flujo sanguíneo se hicieron mediante el uso de Doppler láser en los días 0, 3, 7, 14 y 21. Los datos se expresan como la proporción media de flujo sanguíneo medida en la extremidad isquémica respecto de la extremidad no isquémica (contralateral). B) es un histograma que representa el área bajo cada curva mostrada en A). B) muestra la mejora global a lo largo del transcurso del estudio en la extremidad isquémica tratada con células en comparación con la extremidad isquémica tratada con vehículo solamente;

15 La Figura 2 A) es un gráfico de dispersión que muestra que el músculo de las extremidades tratadas con células madre neuronales tiene un incremento del flujo sanguíneo (ml/min/gramo de tejido) comparado con el músculo de extremidades isquémicas tratadas con vehículo solamente a los 21 días. Los animales se perfundieron de manera intravenosa con microesferas fluorescentes al final del estudio de 21 días, y se midió la cantidad de microesferas fluorescentes presentes en el tejido muscular de las extremidades isquémicas (EI) y de las extremidades contralaterales (CL). La cantidad de microesferas fluorescentes presentes en el tejido muscular de las extremidades se correlaciona directamente con la cantidad de flujo sanguíneo en la extremidad afectada. B) Datos de flujo sanguíneo medio representados mostrados en A) en formato de tabla numérica;

20

25 La Figura 3A) es un histograma que muestra la densidad de capilares medida a los 21 días en la extremidad isquémica y contralateral. Se observa un incremento significativo de la densidad de capilares en todos los grupos de extremidades isquémicas tratadas con células en comparación con el grupo de extremidades isquémicas tratadas con vehículo. B) Datos de densidad media de capilares mostrados en A) en formato de tabla numérica;

30 La Figura 4A) es un gráfico de líneas que muestra que la extremidad isquémica tratada con células madre neuronales tiene un flujo sanguíneo incrementado y sostenido en comparación con la extremidad isquémica tratada con vehículo solamente en un modelo de ratón diabético inmunocompetente. Las medidas de flujo sanguíneo se hicieron mediante el uso de Doppler láser en los días 0, 3, 7, 14 y 21. Los datos se expresan como la proporción media de flujo sanguíneo medida en la extremidad isquémica respecto de la extremidad no isquémica (contralateral). B) es un histograma que representa el área bajo cada curva mostrada en A). B) muestra la mejora global a lo largo del transcurso del estudio en la extremidad isquémica tratada con células en comparación con la extremidad isquémica tratada con vehículo solamente;

35 La Figura 5 es un gráfico de dispersión que muestra que el músculo de las extremidades tratadas con células madre neuronales tiene un incremento del flujo sanguíneo (ml/min/gramo de tejido) comparado con el músculo de extremidades isquémicas tratadas con vehículo solamente a los 21 días en animales diabéticos inmunocompetentes. Los animales se perfundieron de manera intravenosa con microesferas fluorescentes al final del estudio de 21 días, y se midió la cantidad de microesferas fluorescentes presentes en el tejido muscular de las extremidades isquémicas (EI) y de las extremidades contralaterales (CL). La cantidad de microesferas fluorescentes presentes en el tejido muscular de las extremidades se correlaciona directamente con la cantidad de flujo sanguíneo en la extremidad afectada. y

40

45 La Figura 6A) es un gráfico de dispersión que muestra la densidad de capilares medida a los 21 días en la extremidad isquémica y contralateral en un modelo diabético inmunocompetente. B) es un gráfico de dispersión que muestra la densidad de arteriolas medida a los 21 días en la extremidad isquémica y contralateral en un modelo diabético inmunocompetente. Se observa un incremento significativo de la densidad de capilares y de la densidad de arteriolas en todos los grupos de extremidades isquémicas diabéticas tratadas con células en comparación con el grupo de extremidades isquémicas diabéticas tratadas con vehículo.

**Descripción detallada de la invención**

50 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que un tipo de células madre somáticas alternativas a las células de médula ósea y de origen mesenquimatoso, concretamente células madre neuronales, proporcionan un tratamiento alogénico ampliable, seguro y muy potente para la arteriopatía periférica.

55 Las células madre neuronales (CMNs) se pueden obtener de las regiones ventricular y del hipocampo del cerebro fetal y adulto, y se pueden aislar clasificando las células cerebrales mediante el uso de marcadores específicos de la superficie celular (Uchida et al., 2000) y expandirlas en medios definidos con factores de crecimiento adicionales

(Reynolds y Weiss, 1992; Carpenter et al., 1999; Vescovi et al., 1999). Las CMNs se pueden generar también a partir de células pluripotentes directamente, tales como células madre embrionarias (Conti et al. 2005). Aunque tales células son adecuadas, la capacidad de expansión de las CMNs se limita a un número relativamente pequeño de pases de células, que necesitan técnicas adicionales para permitir una aplicación ampliable, estandarizada, estable y, por lo tanto, comercial. Las células se pueden modificar, por lo tanto, para permitir múltiples pases de células, o se pueden cultivar en condiciones que favorezcan los múltiples pases de células. Las condiciones adecuadas serán evidentes para la persona experta.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "células madre neuronales" tiene su significado habitual en la técnica, y se refiere a células que tienen la capacidad de diferenciarse hasta células con fenotipos neuronales diferentes. Las células están limitadas en cuanto al linaje, y pueden ser pluripotentes, multipotentes u oligopotentes. La expresión también incluye las células denominadas células "progenitoras".

El término "pluripotente" es muy reconocido en la técnica, y se refiere a la capacidad de las células de convertirse en más de dos tipos de células. Las células neuroepiteliales pluripotentes son capaces de diferenciarse hasta células neuronales de un fenotipo diferente.

El término "progenitor" es muy reconocido en la técnica, y se refiere a la capacidad de las células de diferenciarse hasta un fenotipo definido. Las células progenitoras neuronales se pueden diferenciar solamente hasta células con un fenotipo neuronal.

Las células madre neuronales de la invención se pueden obtener a partir de una fuente fetal o adulta. Las células también se pueden obtener en un principio a partir de células madre embrionarias, que se han inducido para que experimenten una diferenciación hasta células madre neuronales. Las células se pueden inducir también a partir de células pluripotentes, es decir, células reprogramadas genéticamente que, por medio del uso de factores de transcripción, se han inducido hasta un fenotipo pluripotente.

En una realización, las células pueden tener presente un oncogén inducible de manera condicional. La expresión "inducible de manera condicional" se usa en la presente memoria para referirse a oncogenes, cuya expresión se puede regular en ciertas condiciones. El oncogén experimentará expresión cuando se apliquen las condiciones denominadas permisivas. Por ejemplo, algunos oncogenes son sensibles a la temperatura, y se expresan solamente cuando la temperatura de su medio está por debajo de cierto valor. Los oncogenes se pueden cambiar, por lo tanto, desde un "estado oncogénico" hasta un "estado no oncogénico" mediante condiciones reguladoras. En una realización de la invención, el oncogén que se usa es un mutante sin unión al ADN, sensible a la temperatura, del gen de antígeno T grande de SV40 (U19tsA58). También se conocen alternativas adecuadas, e incluyen el oncogén del antígeno T de polioma.

La expresión del transgén genético de c-myc, un protooncogén que se da de manera natural que se expresa normalmente durante el desarrollo celular, es un medio para estimular de manera estable la proliferación celular y prevenir los cambios en el cariotipo celular durante la expansión a gran escala necesaria para fabricar una línea celular. Para el uso terapéutico de las células myc inmortalizadas, una realización preferida permitiría el control sobre la función de la proteína Myc. La aproximación para abordar la ampliabilidad, seguridad y estabilidad en la fabricación de células madre neuronales para la terapia es generar líneas celulares clonales mediante la modificación genética de células madre neuronales del pase 0-1 en condiciones aseguradas de calidad. La tecnología (c-mycER<sup>TAM</sup>) empleada para llevar a cabo el control del crecimiento condicional es una proteína de fusión que comprende un gen estimulador del crecimiento, c-myc, y un receptor de hormonas que se regula mediante un fármaco sintético, 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) (Littlewood *et al.*, 1995). En una realización preferida, la línea celular usada es la descrita como CTX0E03 en la Solicitud de Patente Europea N° 05255932.5. La línea CTX0E03 no es una línea celular prototipo, sino una línea celular "de grado clínico" que se ha sometido a fabricación de células cGMP y ha sido aprobada por la autoridad competente del R.U. (Autoridad Reguladora de Medicamentos y Asistencia Sanitaria) para un ensayo clínico de Fase I en el R.U. sobre ictus.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "arteriopatía periférica" o "APP" se refiere a la isquemia de extremidades crítica aguda y crónica, la enfermedad de Buerger y la isquemia de extremidades crítica en la diabetes.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero que incluye un mamífero que no es primate (p.ej. una vaca, cerdo, caballo, perro, gato, rata y ratón) y un primate (p.ej. un mono y ser humano), y más preferiblemente un ser humano.

La presente invención proporciona un medicamento que comprende células madre (o células progenitoras) neuronales para el tratamiento terapéutico de pacientes con arteriopatía periférica.

Los métodos para la preparación de las formulaciones para la administración a un paciente serán evidentes para la persona experta. Los excipientes adecuados, diluyentes, etc., de nuevo serán evidentes basándose en la práctica actual en la preparación de terapias basadas en células madre neuronales, y se describen en la bibliografía. La cantidad de células necesarias para la administración variará dependiendo de la forma de tratamiento, la gravedad de la enfermedad/lesión, y la necesidad de aplicar múltiples dosis a lo largo de un periodo de tratamiento. Sin embargo, la persona experta puede determinar fácilmente el tratamiento adecuado basándose en las terapias de

trasplante celular existentes.

En una realización preferida, las células para trasplante se suspenden en una composición que comprende Trolox, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión. La composición preferiblemente no incluye un disolvente aprótico dipolar, p.ej. DMSO. Hay disponibles comercialmente composiciones adecuadas, p.ej. HypoThermosol<sup>®</sup>-FRS.

5 Se prefieren tales composiciones, ya que permiten que las células se almacenen a una temperatura de 4 °C a 25 °C durante periodos prolongados (horas a días) o se conserven a temperaturas criotérmicas, es decir, temperaturas por debajo de -20 °C. Las células se pueden administrar después en esta composición sin necesidad de eliminar DMSO u otros compuestos tóxicos.

10 La vía de administración de dichas células al paciente puede ser por medio de inyección intravenosa o intramuscular. La dosis celular dependerá del grado y de la gravedad de la isquemia, pero un intervalo preferido es de 5 x 10<sup>4</sup> a 5 x 10<sup>8</sup> células por dosis.

15 Por lo tanto, en una realización de la invención, las células son capaces de expandirse en el laboratorio de cultivo de tejidos, de forma que el número de células obtenidas es suficiente para tratar a más de un paciente y, en la realización preferida, se podrá crear un banco de células.

Las células madre o células progenitoras neuronales son adecuadas para dicho tratamiento, y la realización preferida usa células madre neuronales humanas (hCMNs). El método de la invención se basa en el hallazgo sorprendente de que las hCMNs proporcionan un tratamiento eficaz para la arteriopatía periférica. Las hCMNs se pueden obtener a partir de una diversidad de fuentes, que incluyen, pero sin limitación:

- 20 i) sistema nervioso central fetal o adulto (p.ej. cerebro y médula espinal);  
 ii) tejido fetal o adulto que contiene sistema nervioso periférico;  
 iii) diferenciación de células madre embrionarias humanas hasta el fenotipo de hCMN; y  
 iv) diferenciación de células madre humanas pluripotentes inducidas (iPS) hasta un fenotipo de hCMN.

25 Las células usadas en la invención incrementarán el suministro de sangre en un tejido isquémico. En una realización preferida, un incremento terapéutico del suministro de sangre es el resultado de un incremento de la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) tras la implantación de dichas células. El método de esta invención proporciona células que son proangiogénicas tras el trasplante.

La invención se describirá a continuación mediante referencia al siguiente ejemplo no limitante.

## MÉTODO

### 30 Preparación de células para implantación

La obtención de líneas de células madre neuronales humanas estables inmortalizadas con el transgén c-mycER se ha descrito previamente (Patente de Estados Unidos: 7416888; Miljan et al 2008; Pollock et al 2006). El método descrito en la presente memoria usa una línea de células madre neuronales humanas inmortalizadas de manera condicional con el transgén c-mycER, denominadas células CTX0E03, con N° de Acceso de la ECACC 04091601 o derivados de las mismas.

40 Los experimentos iniciales usaron cultivos de células que se expandieron en frascos T hasta una confluencia del 70% al 90%. El medio gastado se aspiró y después la monocapa de células se lavó con HBSS sin magnesio ni iones de calcio (Invitrogen). El lavado se aspiró y después las células se disociaron con tripsina bovina recombinante (Lonza TrypZean/EDTA) durante 5 min a 37 °C. La suspensión celular disociada se mezcló con una disolución de inhibidor de tripsina (0,55 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja [Sigma], 1% de HSA [Grifols], 25 U/ml de benzon nucleasa [VWR] en DMEM:F12 [Invitrogen]), y se centrifugó durante 5 min a ~500 ×g. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se lavó en un 50% de HypoThermosol<sup>®</sup>-FRS (BioLife Solutions) en DMEM:F12 seguido de centrifugación a ~500 ×g durante 5 min. El sedimento celular se suspendió después en HypoThermosol<sup>®</sup>-FRS a una concentración de 10.000 células por microlitro (dosis baja), 33.000 células por microlitro (dosis media) y 100.000 células por microlitro (dosis alta). Se prepararon diez alícuotas que contenían 45 microlitros de suspensión celular a cada concentración. A las alícuotas de suspensión celular se les asignó una caducidad de 24 hr, y en la presente memoria se denominan suspensiones celulares nuevas. Se prepararon diez alícuotas que contenían 45 microlitros de HypoThermosol<sup>®</sup>-FRS que no contenía células para usarlas para las inyecciones de control.

50 En experimentos posteriores, se investigó una formulación de suspensión celular crioconservada "preparada para inyectar" completamente fabricada. Este proceso de fabricación usó frascos T [Nunc] de triple capa para expandir los cultivos celulares. Para el pase, el medio gastado se decantó desde los frascos T de triple capa y se añadió reactivo de disociación de tripsina bovina recombinante (Lonza TrypZean/EDTA) durante 5 min a 180 min a 37 °C, sin lavado previo. La suspensión celular disociada se mezcló con una disolución de inhibidor de tripsina (0,55 mg/ml de

inhibidor de tripsina de soja [Sigma], 1% de HSA [Grifols], 25 U/ml de benzon nucleasa [VWR] en DMEM:F12 [Invitrogen]), y esta suspensión celular se añadió directamente a múltiples frascos T de triple capa que contenían medio de cultivo nuevo mediante el uso de una proporción de dilución en el intervalo de 1:2 a 1:4, sin centrifugación. Se llevó a cabo un cambio de medio completo al día siguiente. La formulación final de la suspensión celular de los frascos T de triple capa necesitó una centrifugación de la suspensión celular disociada, como se describió en el párrafo anterior. El sedimento celular se suspendió después en HypoThermosol®-FRS a una concentración de 50.000 células por microlitro y se crioconservó para el almacenamiento congelado. Esta fabricación en frascos T de triple capa ampliada representa una ventaja respecto de la expansión en frascos T de capa simple, ya que se omitieron las etapas de lavado y centrifugación. La formulación crioconservada de la suspensión celular es ventajosa porque se puede almacenar en un estado congelado durante periodos prolongados de tiempo, y descongelarla e inyectarla directamente sin manipulación adicional, según sea necesario.

#### Modelo de isquemia en extremidad posterior de ratón

Todo el trabajo con animales se llevó a cabo de acuerdo con la Ley sobre Animales del R.U. (Procedimientos Científicos) (1986), y fue aprobado por el Comité de Revisión Ética animal local. Se albergaron ratones Nu/Nu- con inactivación génica ICRF inmunodeficientes (Harlan) durante 7 días antes de la cirugía de isquemia de extremidades posteriores. Los ratones se anestesiaron con 2,2,2-tribromoetanol (Avertin) y se expuso la arteria femoral izquierda. La arteria femoral expuesta se separó de la vena femoral de manera tan proximal como fue posible mediante el uso de fórceps finos. La arteria femoral se ligó después en el sitio proximal y distal mediante el uso de sutura de seda 6-0, seguido de cauterización eléctrica de la arteria entre los puntos suturados. Durante el mismo procedimiento, se llevaron a cabo tres inyecciones de 10 microlitros (volumen de inyección total de 30 microlitros por animal) de las suspensiones celulares o del vehículo (control) en tres sitios diferentes en el músculo aductor isquémico mediante el uso de una jeringa desechable con una aguja fina (calibre 30). La herida se cerró después mediante el uso de sutura 6-0 y se monitorizó hasta la recuperación. En el primer experimento, se usó un total de 10 animales para cada grupo de tratamiento (es decir, se usaron 40 animales en el estudio completo), que consistieron en: i) control (vehículo solamente); ii) células nuevas, Dosis Alta (total de  $3 \times 10^6$  células implantadas por animal); iii) células nuevas, Dosis Media (total de  $1 \times 10^6$  células implantadas por animal); y iv) células nuevas, Dosis Baja (total de  $0,3 \times 10^6$  células implantadas por animal). En un segundo experimento, el rendimiento de la suspensión celular recién preparada se comparó directamente con la suspensión celular crioconservada. Se usó un total de 10 animales por cada grupo de tratamiento (es decir, 80 animales usados en el estudio completo), que consistieron en: i) control nuevo (vehículo solamente); ii) células nuevas (total de  $3 \times 10^3$  células implantadas por animal); iii) células nuevas (total de  $3 \times 10^4$  células implantadas por animal); iv) células nuevas (total de  $3 \times 10^5$  células implantadas por animal); v) control congelado (vehículo solamente); vi) células crioconservadas (total de  $3 \times 10^3$  células implantadas por animal); vii) células crioconservadas (total de  $3 \times 10^4$  células implantadas por animal); viii) células nuevas crioconservadas (total de  $3 \times 10^5$  células implantadas por animal). El cirujano desconoció los tratamientos que recibieron los animales a lo largo del transcurso del estudio y del análisis.

Se llevó a cabo un tercer experimento para investigar la implantación de las células mediante el uso del modelo de isquemia de extremidades posteriores en un ratón inmunocompetente con diabetes. La diabetes se indujo en ratones CD1 de tipo natural mediante inyección de estreptozocina (40 mg/g/día X5 días) 4 semanas antes de llevar a cabo la isquemia de extremidad unilateral, como se describió para los ratones Nu/Nu- con inactivación génica ICRF inmunodeficientes usados en los dos primeros experimentos. En el momento de la ligadura, se administraron tres dosis diferentes de células crioconservadas o vehículo (control) mediante inyección en el músculo aductor de la extremidad isquémica. Se usó un total de 10 animales, que se confirmó que desarrollaron diabetes, para cada grupo de tratamiento (es decir, 40 animales usados en el estudio completo), que consistieron en: i) control (vehículo solamente); ii) células crioconservadas (total de  $3 \times 10^4$  células implantadas por animal); iii) células crioconservadas (total de  $3 \times 10^5$  células implantadas por animal); iv) células crioconservadas (total de  $1,5 \times 10^6$  células implantadas por animal). Se tomaron medidas Doppler en los días 3, 7, 14 y 21. Se tomaron medidas del flujo sanguíneo, la presión parcial de oxígeno tisular (Oxford Optronix) y la densidad de capilares del músculo aductor isquémico tratado en el día 21.

#### Resultado clínico de la isquemia

La extremidad posterior se midió mediante Doppler láser tras la cirugía. Este es el día 0 Doppler. Se realizaron medidas Doppler de seguimiento en todos los animales en los Días 3, 7, 14 y 21 tras la cirugía. Las medidas Doppler se llevaron a cabo en el animal anestesiado con 2,2,2-tribromoetanol (Avertin), seguido de la recuperación del animal en una almohadilla de calentamiento y un incubador hasta que se recuperó completamente. Se calculó la proporción de perfusión entre la pata isquémica respecto de la no isquémica. Las extremidades isquémicas tratadas con células mostraron una perfusión incrementada respecto de las extremidades isquémicas tratadas con vehículo de control solamente (Figura 1). La perfusión mejorada de la extremidad isquémica tratada con células se mantuvo a lo largo del transcurso del estudio. Se observa una recuperación espontánea de la extremidad isquémica tratada sin células de control mediante Doppler láser, sin embargo, la tasa de recuperación observada en la extremidad isquémica tratada con células es más rápida que en el tratamiento sin células. Es importante indicar que las medidas de Doppler láser son ventajosas, ya que se pueden hacer en animales vivos, pero la penetración del láser y la profundidad de la medida es limitada.



Tras la finalización del estudio en el día 21, se llevaron a cabo medidas del flujo sanguíneo absoluto a través de todo el músculo aductor mediante el uso de microesferas fluorescentes. Se sometió a este procedimiento a cinco animales de cada grupo. Bajo anestesia, se inyectaron microesferas fluorescentes (Invitrogen, 0,02 µm de diámetro) en el ventrículo izquierdo del corazón en cinco intervalos de 10 segundos. Tras la inyección final, se toma la muestra sanguínea de referencia, se sacrifica al animal y se recogen los músculos aductores (tanto los isquémicos como los no isquémicos). También se recogieron los riñones y se analizaron como órganos de control internos para demostrar la distribución homogénea de las microesferas por todo el torrente sanguíneo del animal. Los órganos recogidos se pesaron, se digirieron con hidróxido potásico y se cuantificó la cantidad de microesferas fluorescentes presentes mediante el uso de un espectrofotómetro fluorescente. Estos datos, junto con la muestra sanguínea de referencia, se usaron para calcular el flujo sanguíneo absoluto en el tejido, expresado en mililitros por minuto por gramo de tejido. Las medidas de flujo sanguíneo absoluto mostraron una mejora drástica, cerca de los niveles de control en algunos casos, de la extremidad isquémica tratada con células en comparación con la extremidad no isquémica normal (Figura 2). La extremidad isquémica tratada con vehículo de control solamente tuvo aproximadamente un 60% del flujo sanguíneo en comparación con la extremidad sana; mientras, la extremidad isquémica tratada con células tuvo aproximadamente un 85% del flujo sanguíneo en comparación con la extremidad no isquémica sana.

Las medidas de Doppler láser y las medidas del flujo sanguíneo apoyan el hecho de que la extremidad isquémica se ha recuperado y tiene una mejora sostenida que resulta directamente de la implantación de las células en el músculo aductor en el punto de ligadura de la arteria. Para proporcionar pruebas adicionales del potencial proangiogénico de las células humanas implantadas, los cinco animales restantes de cada grupo se sacrificaron en el día 21 y los músculos aductores se procesaron con parafina para el análisis de densidad de capilares mediante histología. Se recogieron tres cortes de 5 micras de cada extremidad isquémica y no isquémica y se tiñeron para el marcador de células endoteliales isolectina B4. La isolectina B4 tiñó los capilares del corte de músculo. La densidad de capilares se determinó contando manualmente la densidad de vasos en 10 campos de visión en cada uno de los tres cortes procesados. La extremidad isquémica tratada con células tiene un incremento de casi el doble de la densidad de capilares en comparación con la extremidad isquémica tratada con vehículo de control solamente (Figura 3). Los datos de densidad de capilares demuestran de manera concluyente que el incremento del flujo sanguíneo observado en la extremidad isquémica tratada con células se consigue por una densidad de capilares incrementada. Además, la densidad de capilares incrementada surge directamente de la implantación de las células, ya que la extremidad isquémica tratada con vehículo de control tiene poca o ninguna densidad incrementada de capilares en comparación con la extremidad no isquémica.

#### Histopatología

Se analizó adicionalmente en los cortes de histología del músculo aductor, excedentes del análisis de densidad de capilares, la patología adversa y la supervivencia de células humanas. Se llevó a cabo una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en una muestra de todas las muestras de músculo aductor que incluyeron: muestras de músculo isquémico, no isquémico, tratado con control y células. No se halló una histopatología adversa en ninguno de los grupos tratados con células, lo que indica que la inyección intramuscular de estas células no es tóxica. Se llevó a cabo el examen de la supervivencia de células humanas en las muestras de músculo aductor murino implantadas fijadas en parafina mediante el uso de anticuerpos generados contra el antígeno mitocondrial humano (Millipore), y se generaron anticuerpos específicos humanos contra nestina (Millipore). Estos anticuerpos reconocen de manera específica las células humanas implantadas y no reaccionan de manera cruzada con los antígenos murinos del hospedador. Aunque no se llevó a cabo una toma de muestras exhaustiva del tejido muscular para la supervivencia de las células humanas, se demostró la supervivencia de las células humanas solamente en alguna de las muestras de músculo isquémico implantado, pero no en todas. Como todos los animales con extremidades isquémicas tratadas con células tuvieron un flujo sanguíneo mejorado, la supervivencia a largo plazo de las células implantadas de manera intramuscular puede no ser una necesidad absoluta para conseguir un efecto proangiogénico terapéutico del tratamiento con células.

#### Formulación de células

Las células se deberían presentar en una suspensión que sea compatible con la administración al paciente. Las células usadas en el primer experimento (Figuras 1-3) se prepararon a partir de cultivos recién recogidos y se usaron en 24 hr. La formulación de estas células en Hypothermosol<sup>®</sup>-FRS es compatible con la administración al paciente, sin embargo, en la práctica una caducidad de 24 hr del producto de células limita la distribución a una gran población de pacientes. La suspensión celular criopreservada se formula en la disolución atóxica Hypothermosol<sup>®</sup>-FRS, pero tiene las ventajas añadidas de que se puede almacenar en un estado congelado durante un periodo de tiempo prolongado, y descongelarla para la administración directa al paciente sin una manipulación adicional. Es importante indicar que la criopreservación de las células no altera ni cambia la actividad biológica de las células para tratar el músculo isquémico. En un estudio comparativo directo entre concentraciones equivalentes de suspensiones celulares nuevas y criopreservadas, en las tres dosis de células ensayadas y cuatro ensayos, las células nuevas y congeladas proporcionaron resultados estadísticamente equivalentes en el tratamiento del modelo de isquemia de extremidades posteriores, tal como se muestra en la Tabla 1.

60

Tabla 1

Parámetro de Ensayo <sup>1</sup>	Dosis de Células CTX0E03		
	3x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>3</sup>
Doppler	✓	✓	×
Flujo sanguíneo de microesferas (ml/min/gm)	✓	✓	✓
PO <sub>2</sub> (mm/Hg)	✓	×	×
Densidad de capilares	✓	✓	✓

Resultado clínico para la isquemia en diabetes

5 La diabetes es un factor contribuyente significativo en el desarrollo de ICE. Se usó un modelo diabético inmunocompetente de isquemia de extremidades posteriores para demostrar que las células son eficaces para tratar la isquemia de extremidades en presencia de una enfermedad crónica subyacente. Los animales diabéticos tratados con vehículo mostraron una capacidad de flujo sanguíneo reducida en comparación con los ratones de control (no diabéticos) tratados con vehículo. La dosis más baja de células (3x10<sup>4</sup> células) no produjo mejoras significativas, y 10 las dos dosis mayores (3 x 10<sup>5</sup> células y 1,5 x 10<sup>6</sup> células) mostraron una recuperación notablemente incrementada del flujo sanguíneo para la extremidad isquémica, medida mediante Doppler (Figura 4), flujo sanguíneo del músculo aductor (Figura 5) y densidad de capilares y arteriolas (Figura 6).

Sumario

15 El método presentado en esta invención describe células madre neuronales adecuadas para el tratamiento terapéutico de la isquemia de extremidades, una forma de arteriopatía periférica. La tecnología c-mycER se presenta como un método para inmortalizar de manera condicional líneas celulares de forma que se pueda disponer de un número suficiente de células para tratar más de un número limitado de pacientes con dicho producto de células. Además, las células madre neuronales humanas proporcionaron un efecto proangiogénico terapéutico concluyente en el modelo murino de isquemia de extremidades posteriores, incluso en presencia de una enfermedad crónica tal como diabetes. El Doppler láser, el flujo sanguíneo de microesferas fluorescentes y el análisis de densidad de 20 capilares apoyan y corroboran esta conclusión. De hecho, los beneficios de la implantación de células se consiguieron en días tras la implantación, y se mantuvieron durante tres semanas. Todas las dosis de células presentadas en este método (0,3 x 10<sup>6</sup> células por animal a 3 x 10<sup>6</sup> células por animal) alcanzaron un beneficio terapéutico en el análisis llevado a cabo.

## Referencias

- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, et al. 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8
- 5 Callum K, Bradbury A. 2000. ABC of arterial and venous disease: Acute limb ischemia. *Bmj* 320:764-7
- Carpenter M K, Cui X, Hu Z Y, Jackson J, Sherman S et al. 1999. In Vitro Expansion of a Multipotent Population of Human Neural Progenitor Cells. *Exp Neurol* 158:265-278
- Conti L, Pollard SM, Gorba T, Reitano E, Toselli M, et al. 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3(9).
- 10 Gey DC, Lesho EP, Manngold J. 2004. Management of peripheral arterial disease. *Am Fam Physician* 69:525-32
- Gray BH, Conte MS, Dake MD, Jaff MR, Kandarpa K, et al. 2008. Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Symposium II: lower-extremity revascularization: state of the art. *Circulation* 118:2864-72
- Gu Y, Zhang J, Qi L. 2006. [Effective autologous bone marrow stem cell dosage for treatment of severe lower limb ischemia]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 20:504-6
- 15 Liao L, Zhao RC. 2008. An overview of stem cell-based clinical trials in China. *Stem Cells Dev* 17:613-8
- Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 23:1686-90
- Miljan EA, Hines SJ, Pande P, Corteling RL, Hicks C, et al. 2008. Implantation of c-mycERTAM immortalized human mesencephalic derived clonal cell lines ameliorates behaviour dysfunction in a rat model of Parkinsons disease. *Stem Cells Dev*
- 20 Pollock K, Stroemer P, Patel S, Stevanato L, Hope A, et al. 2006. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 199:143-55
- Reynolds BA y Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255: 1707-1710
- 25 Stevanato L, Corteling RL, Stroemer P, Hope A, Heward J, Miljan EA, Sinden JD. 2009; c-MycERTAM transgene silencing in a genetically modified human neural stem cell line implanted into MCAo rodent brain. *BMC Neurosci.* 10:86
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, et al. 2002. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360:427-35
- 30 Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, et al. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14720-14725
- Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, Poulin P, Ferrario M. et al. 1999, Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp. Neurol.* 156:71-83
- 35

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de células madre neuronales en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que padece arteriopatía periférica, en el que la enfermedad es isquemia de extremidades aguda o crítica, enfermedad de Buerger o isquemia de extremidades crítica en la diabetes.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento está en una forma para administración intravenosa o intramuscular.
3. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que las células son células madre neuronales pluripotentes, preferiblemente en el que las células son células humanas, y preferiblemente en el que las células son células adultas.
- 10 4. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que las células están inmortalizadas de manera condicional.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que las células se inmortalizan mediante la incorporación de un oncogén sensible a la temperatura, preferiblemente en el que el oncogén codifica el antígeno T de SV40, o en el que el oncogén es myc, preferiblemente c-mycER, o en el que las células son las denominadas CTX0E03.
- 15 6. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que las células para trasplante se suspenden en una composición que comprende Trolox, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HEPES, lactobionato, sacarosa, manitol, glucosa, dextrano-40, adenosina y glutatión.
7. Células madre neuronales para el uso en el tratamiento de un paciente que padece arteriopatía periférica.
- 20 8. Las células madre neuronales para el uso según la reivindicación 7, en el que las células son como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.

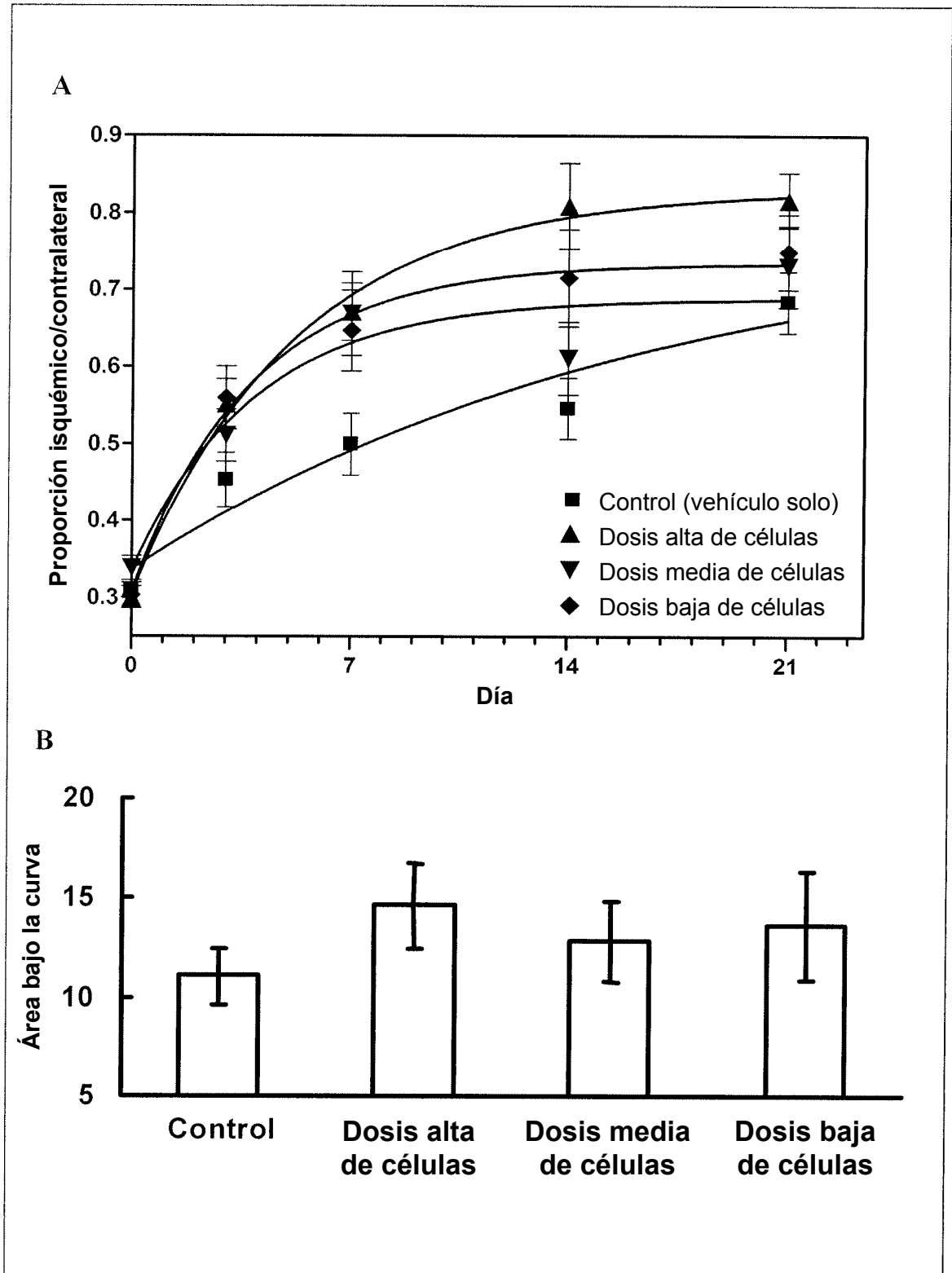
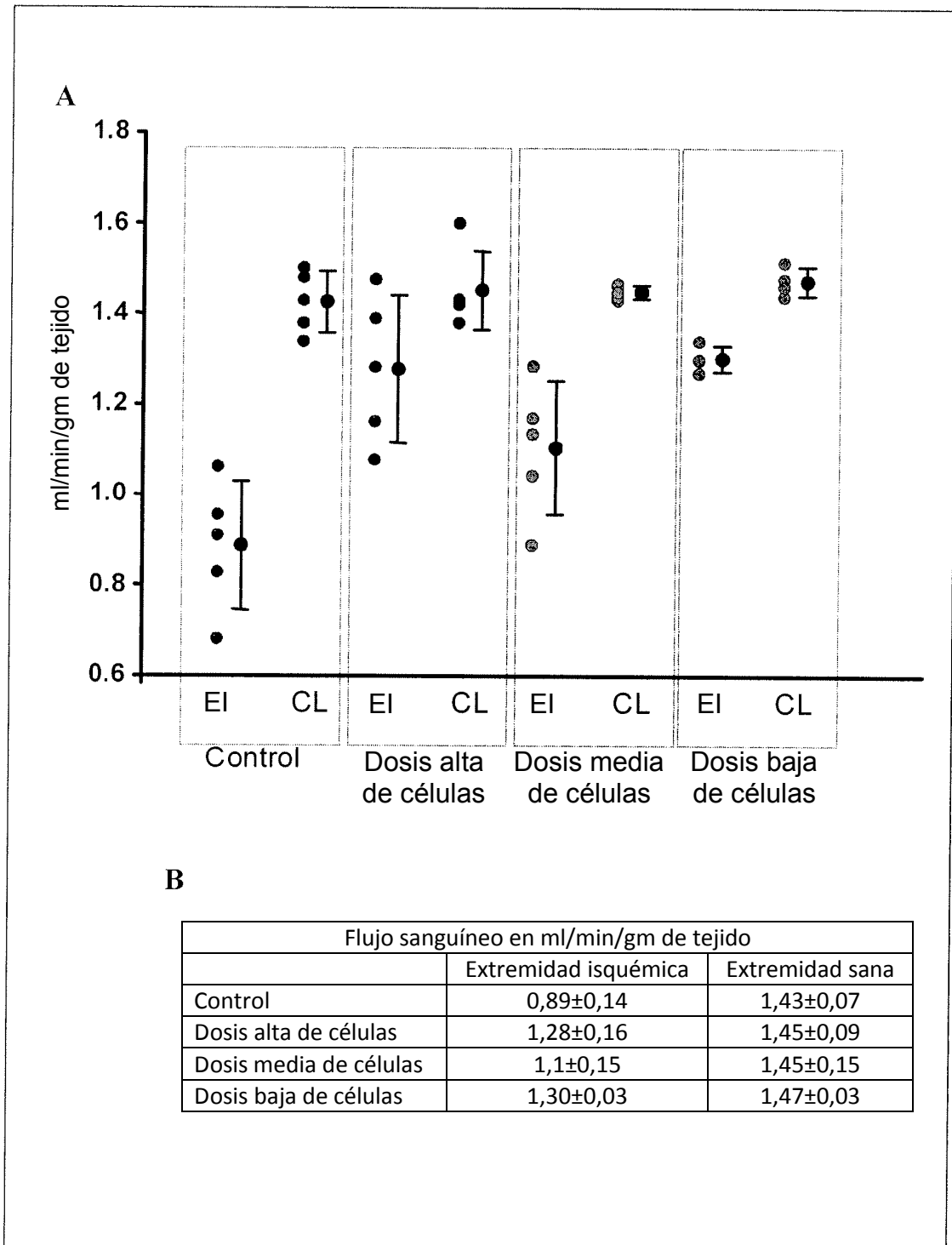
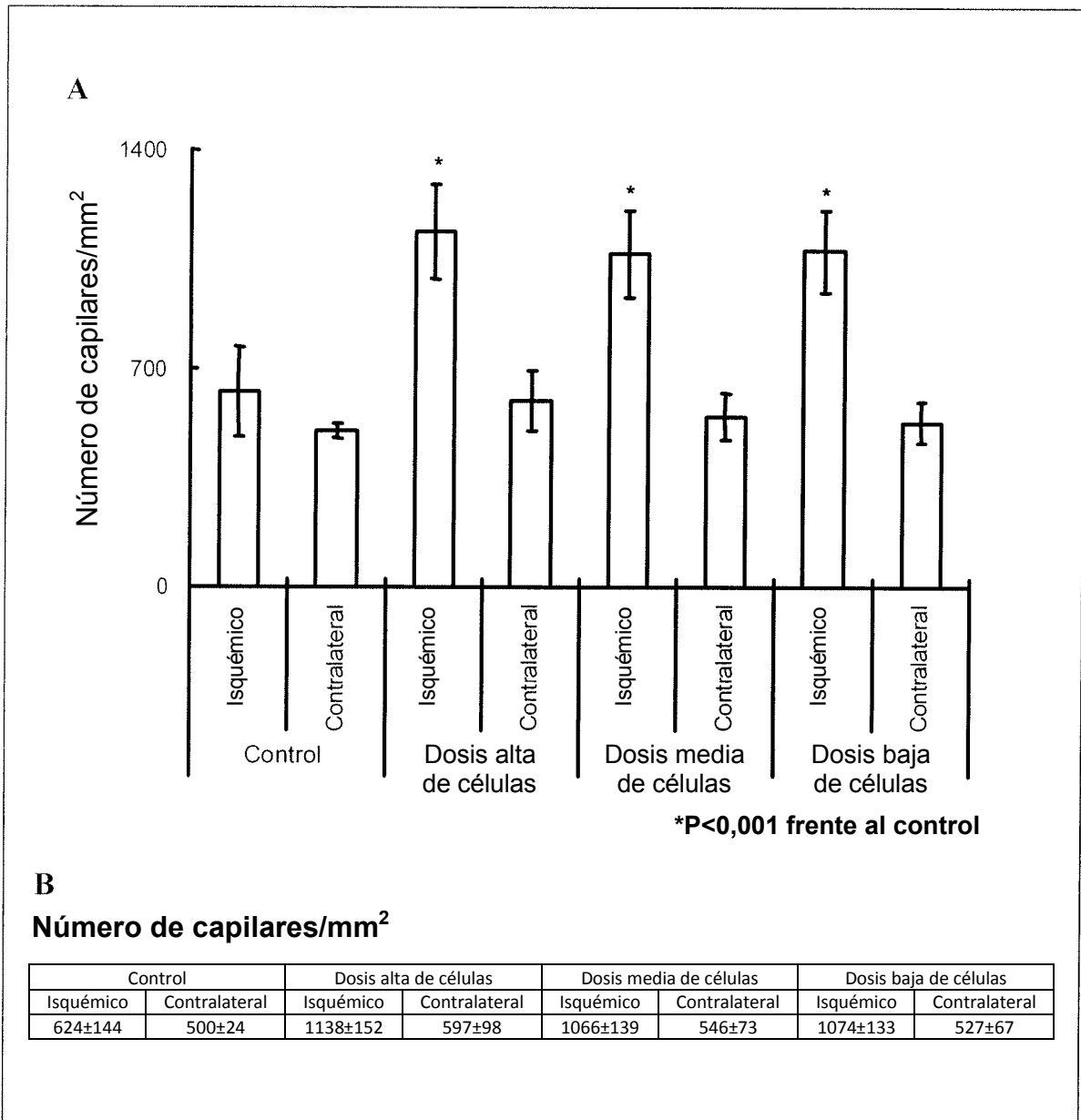


Figura 1



**Figura 2**



**Figura 3**

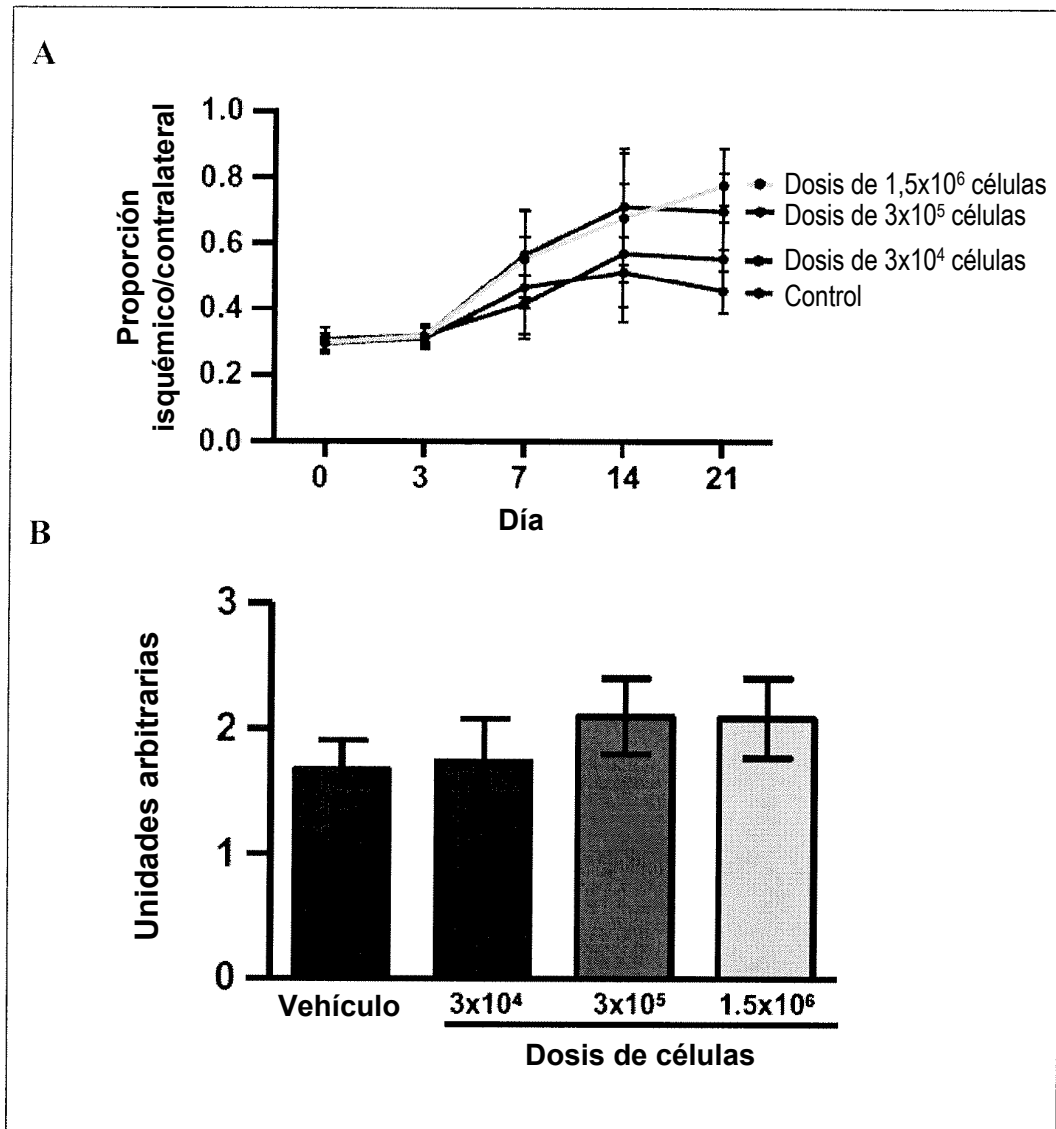


Figura 4



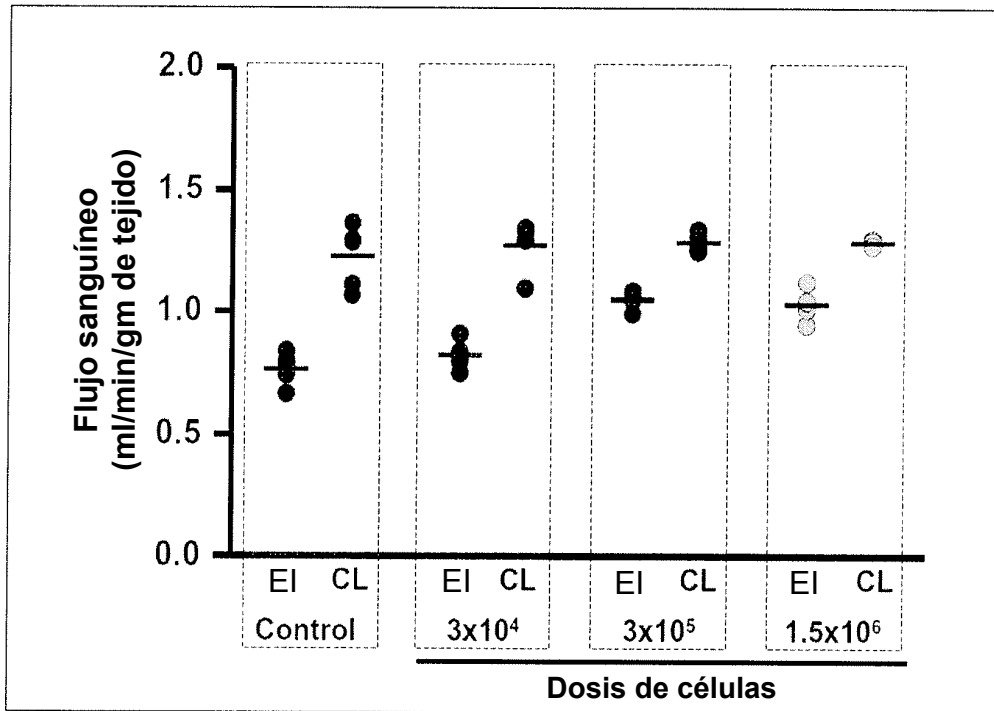


Figura 5

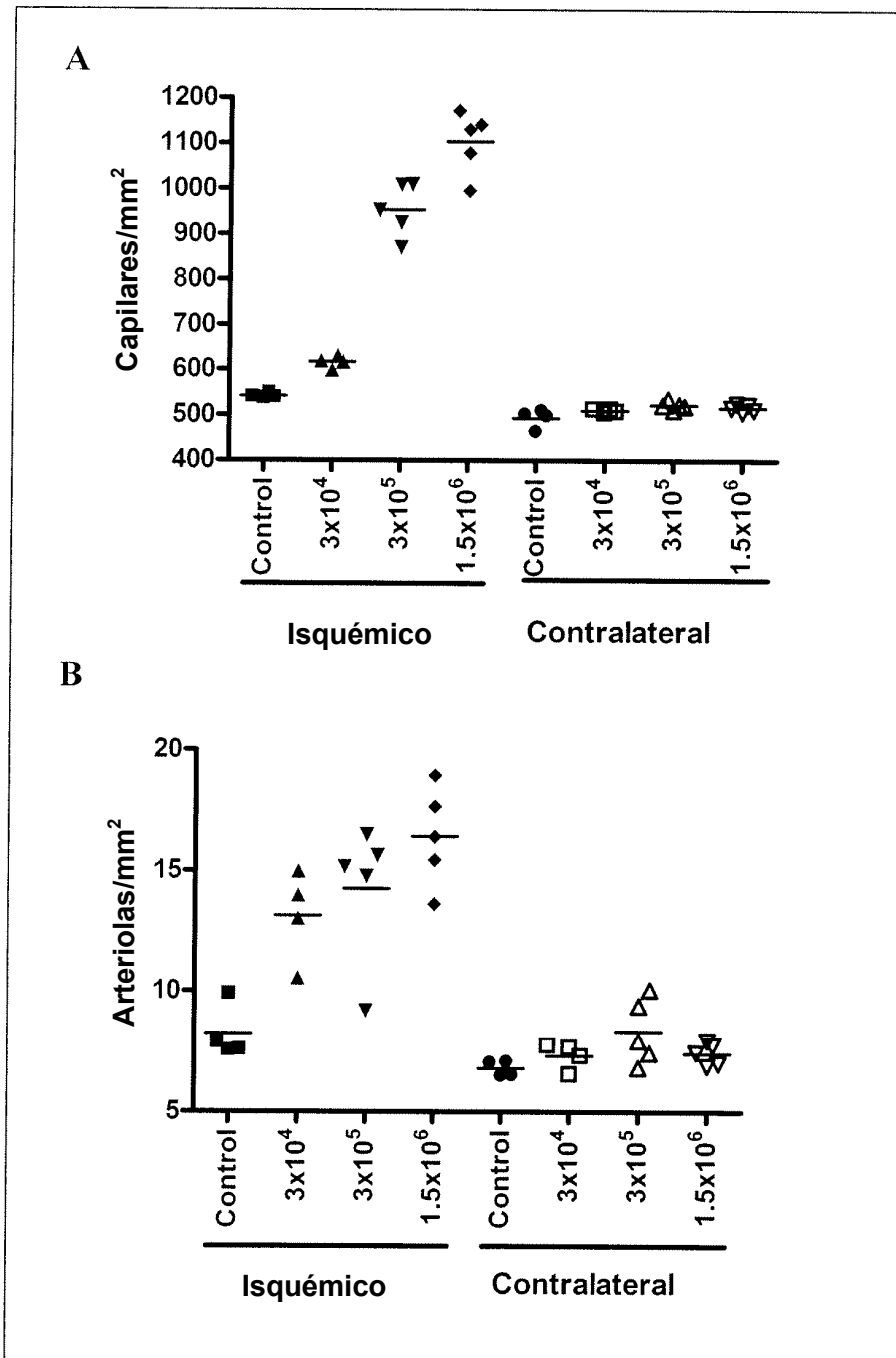


Figura 6