

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 078**

51 Int. Cl.:

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13159548 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2777703**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar el potencial terapéutico de las células madre**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2017

73 Titular/es:

LONZA COLOGNE GMBH (100.0%)
Nattermannallee 1
50829 Köln, DE

72 Inventor/es:

VAN DEN BOS, CHRISTIAN;
REINISCH, BARBARA;
ROSENBAUM, CLAUDIA y
SCHENK, JUDITH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 078 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para mejorar el potencial terapéutico de las células madre

Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones y métodos relacionados con células madre.

5 Antecedentes de la invención

La terapia de células madre es una estrategia auspiciosa relacionada con el trasplante de médula ósea, piel, corazón y córnea, la enfermedad del injerto contra el hospedador, la insuficiencia hepática y renal, la lesión pulmonar, la artritis reumatoide, el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, la esclerosis múltiple, el lupus y la diabetes; la prevención del rechazo del aloinjerto, los trastornos neurológicos y la medicina cardiovascular.

Se pueden aislar células madre mesenquimales (MSC) y/o células progenitoras o precursoras a partir de una variedad de tejidos, tales como la médula ósea, el músculo esquelético, la pulpa dental, los huesos, el cordón umbilical y el tejido adiposo. Las MSC están siendo objeto de un interés en aumento como fuente potencial para estrategias terapéuticas en la medicina regenerativa. Las células madre pueden autorrenovarse y tienen la capacidad de diferenciarse en tipos de células específicos o pueden usarse terapéuticamente para la producción y la secreción de factores solubles que promoverán la regeneración de los tejidos. En particular, las células madre/progenitoras adultas de origen autólogo abundante tienen ventajas adicionales con respecto a los tipos de células madre embrionarias («ES») dada su gran disponibilidad, su tumorigenicidad baja y que permiten evitar cuestiones éticas controversiales asociadas a las células ES.

Para facilitar la capacidad de reparar o regenerar con eficiencia órganos y tejidos con defectos o enfermedades, las células madre/progenitoras donantes deberían poseer propiedades terapéuticas convenientes, por ejemplo, efectos secundarios mínimos, la capacidad de integrarse al tejido hospedador, la diferenciación en linajes celulares deseados, efectos paracrinos, la regulación de la remodelación de tejidos y la activación de mecanismos de reparación/regeneración endógenos.

Se han empleado MSC en numerosos estudios preclínicos en roedores, conejos y babuinos, entre otros, para el trasplante de médula ósea, piel, corazón y córnea, la enfermedad del injerto contra el hospedador, la insuficiencia hepática y renal, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, las enfermedades del lupus y la diabetes. Los resultados preliminares de algunos de estos estudios han llevado a que en la actualidad se estén realizando ensayos clínicos en humanos. Estos ensayos involucran el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, la esclerosis múltiple y la diabetes mellitus tipo 1; la prevención del rechazo del aloinjerto; y la mejora de la supervivencia de los injertos de médula ósea y riñones; y el tratamiento de la enfermedad del injerto contra el hospedador resistente.

Un componente principal de la morbilidad y la mortalidad que se puede atribuir a la enfermedad cardiovascular se produce como consecuencia del bloqueo completo o parcial de vasos que transportan sangre en la vasculatura coronaria y/o periférica. Cuando esos vasos se encuentran parcialmente obstruidos, la falta de flujo sanguíneo provoca isquemia en los tejidos musculares alimentados por ese vaso, lo cual inhibe la contracción muscular y/o por función. La oclusión total del flujo sanguíneo provoca la necrosis del tejido muscular.

La enfermedad arterial periférica (PAD, por sus siglas en inglés) afecta a 8 millones de estadounidenses. Es el resultado de la contracción de las arterias en las piernas. Los síntomas más comunes de PAD son los calambres, el dolor o el cansancio al caminar. Sin embargo, algunos pacientes con PAD pueden perder la capacidad de caminar y pueden sufrir amputaciones.

En algunos individuos, la obstrucción de los vasos sanguíneos es compensada parcialmente por procesos naturales, en los cuales se forman nuevos vasos (un proceso que a menudo se denomina «angiogénesis») y se agrandan los vasos pequeños (lo cual se denomina «arteriogénesis») para remplazar la función de los vasos deteriorados. Estos nuevos conductos pueden facilitar la restauración del flujo sanguíneo hacia el tejido que lo necesite, constituyendo de esa manera «bypasses naturales» alrededor de los vasos obstruidos.

Sin embargo, algunos individuos con la angiogénesis obstaculizada son incapaces de generar suficientes vasos colaterales para compensar de manera adecuada la disminución del flujo sanguíneo provocada por la enfermedad cardiovascular. Existe la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para tratar las enfermedades isquémicas.

Diversos estudios han evaluado el efecto terapéutico de las MSC en modelos animales preclínicos y han demostrado un gran potencial clínico. Sin embargo, persisten interrogantes importantes con respecto a la dosificación óptima de MSC, la vía de administración y el destino celular de las MSC después de la infusión.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de composiciones de MSC terapéuticas optimizadas y métodos para su uso, para mejorar los síntomas de diversas enfermedades en general y en el tratamiento de enfermedades vasculares en

particular.

Walker et al., Nat Commun. Manuscrito del autor; disponible en 2010, describe en términos generales que el tratamiento de células madre pluripotentes humanas (hPS, por sus siglas en inglés) tales como células madre embrionarias humanas (hES, por sus siglas en inglés) y células madre pluripotentes inducidas (hiPS, por sus siglas en inglés) con el inhibidor de la miosina no muscular II (NMII), la blebistatina, mejora la supervivencia de células hPS en condiciones de suspensión e identidad clonal. La publicación estadounidense n.º 20100216181 describe el cultivo de células madre pluripotentes en un medio libre de suero y células de alimentación mediante el uso de blebistatina como factor de supervivencia. Se generan mayores cantidades de células mediante el cultivo de las células en matraces de agitación o biorreactores. La solicitud PCT publicada WO2012062819 describe un método para controlar la unión de células a un sustrato mediante el uso de la blebistatina como promotora para la adhesión de células con las cuales las células habitualmente tienen una afinidad nula o limitada.

Sin embargo, ninguna de estas referencias indica o sugiere los resultados inesperadamente superiores observados al tratar pacientes con una composición que contiene células madre y un antagonista de la miosina no muscular II.

Compendio de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad vascular que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición que comprende una población de células y blebistatina, tratándose de ese modo la enfermedad vascular.

En una realización, la enfermedad vascular es una consecuencia de la diabetes. En una realización, la enfermedad vascular es una consecuencia de la aterosclerosis. En una realización adicional, la enfermedad vascular es una enfermedad vascular periférica (PVD, por sus siglas en inglés). En incluso otra realización, la enfermedad vascular es una enfermedad arterial periférica (PAD, por sus siglas en inglés). En incluso otra realización adicional, la enfermedad vascular está asociada a un índice de presión tobillo-brazo de aproximadamente o menos de 0.9. En aun otra realización, la enfermedad vascular está asociada a un índice de presión tobillo-brazo de aproximadamente o menos de 0.7. En incluso otra realización, la enfermedad vascular ha provocado una isquemia crítica de las extremidades. En otra realización, la enfermedad vascular ha provocado ulceraciones en la piel o gangrena. En una realización adicional, la composición provoca o potencia la angiogénesis. En incluso otra realización, la composición provoca o potencia la angiogénesis en al menos aproximadamente 20 por ciento en comparación con el control.

En aun otra realización, una parte de la población de las células comprende células pluripotentes. En incluso otra realización adicional, las células pluripotentes son células madre pluripotentes inducidas. En otra realización, una parte de la población de las células comprende células multipotentes. En incluso otra realización, las células multipotentes son células madre mesenquimales o células estromales multipotentes. En incluso otra realización adicional, las células multipotentes derivan de células madre pluripotentes inducidas. En incluso otra realización, la composición comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la función de las extremidades en el paciente mejora en aproximadamente o al menos 2-3 grados en comparación con el mismo paciente sin recibir la composición. En otra realización, el flujo sanguíneo en las extremidades del paciente mejora en aproximadamente o al menos 65-85 % con respecto al flujo sanguíneo normal o sin tratamiento de las extremidades. En aun otra realización adicional, el daño isquémico en el paciente mejora en aproximadamente o al menos 2, 3 o 4 grados en comparación con el mismo paciente sin recibir la composición. En aun otra realización adicional, el daño isquémico en el paciente mejora a una velocidad más rápida (o velocidad acelerada) en comparación con el mismo paciente sin recibir la composición.

En aun otra realización adicional, la composición se administra por vía intravenosa. En incluso otra realización, la composición se administra por vía intramuscular. En otra realización, la composición se administra por vía intramuscular en un sitio de daño isquémico o cerca de este.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende una población de células multipotentes; blebistatina; un portador farmacéuticamente aceptable; y, opcionalmente, instrucciones para administrar estos a un paciente diagnosticado con una enfermedad susceptible de tratamiento mediante el uso de una terapia de células madre. En una realización, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular. En otra realización, la enfermedad es una enfermedad arterial periférica.

En una realización, las células son MSC. En otra realización, el antagonista de la miosina no muscular II es la blebistatina. En otra realización, la enfermedad cardiovascular es una enfermedad arterial periférica. En una realización adicional, las células son MSC, el antagonista de la miosina no muscular II es la blebistatina y la enfermedad cardiovascular es una enfermedad arterial periférica. En incluso otra realización, el kit comprende además un fármaco cardiovascular. En una realización adicional, el kit comprende además un estent. En aun otra realización, el kit comprende además un estent de elución de fármacos. En una realización, los artículos que componen el kit se encuentran en envases separados. En otra realización, la población de células multipotentes; el antagonista de la miosina no muscular II; y el portador farmacéuticamente aceptable se encuentran en el mismo envase, por ejemplo, una jeringa o un dispositivo de administración automática. El kit puede ser para una enfermedad arterial periférica. El kit puede tener células que sean MSC. Lo ideal es que el antagonista de la miosina no muscular II sea la blebistatina y

la enfermedad sea una enfermedad arterial periférica. El kit puede comprender además un fármaco cardiovascular y/o un estent y/o un estent de elución de fármacos. Los artículos pueden encontrarse en envases separados, en el mismo envase o en una jeringa.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para reducir la tasa de amputación en un paciente con una enfermedad arterial periférica que se trata con una composición que comprende MSC, que comprende la puesta en contacto con las MSC, en donde el antagonista de la miosina no muscular II es la blebistatina. En otra realización, la tasa se reduce en al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % o más.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición de células madre para tratar una enfermedad susceptible de tratamiento con una terapia de células madre que comprende una población de células multipotentes; y un antagonista de la miosina no muscular II, en donde el antagonista de la miosina no muscular II es la blebistatina. En una realización de este aspecto de la invención, las células son MSC.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para elaborar una composición de células madre para tratar una enfermedad susceptible de tratamiento con una terapia de células madre que comprenda una población de células multipotentes; y el antagonista de la miosina no muscular II blebistatina; en donde la población de células multipotentes y la blebistatina se incuban juntas durante un período de tiempo antes de la administración a un paciente.

20 Un aspecto adicional de la invención está dirigido a un método de aceleración de la curación de una enfermedad susceptible de tratamiento con una terapia de células madre que comprende tratar a un paciente con una composición que comprende una población de células multipotentes; y el antagonista de la miosina no muscular II blebistatina; en donde la composición provoca que la enfermedad se cure con mayor rapidez que con la misma composición sin el antagonista de la miosina no muscular II.

En determinadas realizaciones de estos aspectos, las células son MSC. En otras realizaciones, el antagonista de la NM II es la blebistatina. En aun otras realizaciones adicionales, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular.

Breve descripción de las figuras

25 Se puede obtener una comprensión más completa de la presente invención por referencia a los dibujos anexos, considerados junto con la descripción detallada posterior. Se pretende que las realizaciones que se ilustran en las figuras solamente ejemplifiquen la invención y no debería interpretarse que limiten la invención a las realizaciones ilustradas.

30 Las Figuras 1A-B muestran el flujo sanguíneo (%) a lo largo del tiempo: La mediana en el grupo se calculó en todos los animales válidos. La blebistatina (BB) acelera y potencia la regeneración del flujo sanguíneo mediante el implante de células madre mesenquimales. Las células madre administradas en presencia de blebistatina (1A, Grupo 4, diamante) mostraron una regeneración más rápida y mejorada del flujo sanguíneo en los animales en comparación con las células madre que se habían tratado previamente con blebistatina pero que se implantaron en ausencia de blebistatina (1A, Grupo 5, cuadrado negro relleno). El control de medios que contenía blebistatina (1A, Grupo 2, círculo) mostró efectos de recuperación marginales así como las MSC, que retomaron la recuperación en instancias temporales posteriores (1A, Grupo 3, triángulo). La aplicación intramuscular de MSC mostró efectos sistemáticamente superiores con respecto a la aplicación intravenosa. Los datos muestran que la blebistatina (BB) sola no tuvo efecto alguno en la regeneración del flujo sanguíneo pero que la blebistatina mejora y/o colabora con el potencial regenerativo de las MSC cuando se aplica junto con células madre.

40 Las Figuras 2A-B muestran la función de las extremidades (%) a lo largo del tiempo: La mediana en el grupo se calculó en todos los animales válidos. Los datos muestran que la presencia de la blebistatina (BB) con MSC colabora con la rápida mejora de la función de las extremidades. A pesar de la mejora de la perfusión sanguínea en otros grupos tratados, se observó un deterioro de la función de las extremidades y necrosis de las extremidades a partir del día 28 después del tratamiento. El Grupo 3 mostró una mayor aparición de amputaciones y una mayor distribución entre los animales. Los datos muestran que el tratamiento intravenoso (2B) fue de alguna manera menos eficaz y provocó más complicaciones en comparación con el régimen de tratamiento intramuscular local (Figura 2A). Los ratones que recibieron MSC implantadas en presencia de blebistatina (2A, Grupo A, cuadrado sin relleno) mostraron una mejora constante y rápida de la función de las extremidades en forma sistemática a lo largo del tiempo después del implante. Se detectó la misma tendencia en ratones con MSC tratadas previamente con blebistatina en un menor grado (2A, Grupo 5, triángulo). En cambio, la aplicación de MSC solas mostró una ligera mejora hasta el día 20 y la función de las extremidades empeoró en instancias temporales posteriores. Los controles de medios presentaron solamente efectos marginales. Cabe señalar que una pendiente negativa significa una mejora de la función de las extremidades. Nuevamente, la aplicación intramuscular de MSC (2A) mostró efectos sistemáticamente superiores con respecto a la aplicación intravenosa (2B). La aplicación de MSC en presencia de la blebistatina tiene un mejor rendimiento que el potencial regenerativo de las MSC. Esta aplicación mostró la mejora más rápida en el potencial regenerativo.

55 La Figura 3A-B muestra el índice de gravedad isquémica (%): La mediana en el grupo se calculó en todos los animales válidos. Las MSC aplicadas junto con la blebistatina impiden la gravedad en el índice isquémico. El análisis del índice de gravedad isquémica a lo largo del tiempo muestra resultados sistemáticamente mejores para el Grupo 4 y 5 con la aplicación intramuscular, si bien los controles de medios variaron dentro de la dispersión. Cabe señalar que las MSC

(Grupo 3) mostraron una alta varianza en el índice para las aplicaciones intramuscular e intravenosa mientras que el Grupo 5 solo lo hizo para la aplicación intravenosa. Nuevamente, la aplicación intramuscular de las MSC se muestra en 3A; la aplicación intravenosa se muestra en 3B.

5 La Figura 4 muestra la distribución de pendientes de diagramas de caja para el flujo sanguíneo (%), calculada como la tendencia lineal desde la cirugía hasta el Día 35 para el flujo sanguíneo (%). El número individual para cada animal representa su cambio en un criterio de valoración a lo largo del tiempo. Estos diagramas proporcionan un método conveniente para presentar muchos grupos en un único gráfico. A modo de ejemplo, la evaluación del flujo sanguíneo (%) se ilustra como diagramas de caja de pendientes por grupo con el fin de señalar la baja variación (indicada por los tamaños pequeños de las cajas) dentro de los controles y el grupo con el mejor rendimiento en el estudio BMMSC en DMEM + BB para la aplicación intramuscular así como la intravenosa.

10 La Figura 5 muestra que la blebistatina impide complicaciones graves durante el proceso de curación. A menudo, un problema importante en los estudios preclínicos es la alta tasa de deserción de los animales debido a fallas relacionadas con el tratamiento (amputaciones después del día 14 luego de la cirugía) o no relacionadas con el tratamiento (por ejemplo, la muerte durante la anestesia o amputaciones antes del día 14 luego de la cirugía). Solamente se han excluido unos pocos animales del análisis estadístico por este último motivo. Sin embargo, estos animales que mostraron efectos secundarios graves (amputación) se clasificaron y sus datos se ingresaron en los análisis estadísticos. Los datos demuestran claramente que la blebistatina (Grupos 4 y 8) mejora drásticamente el potencial regenerativo de las MSC y se destaca por tasas sorprendentemente bajas de complicaciones graves.

Descripción detallada de la invención

20 En la presente memoria se describen composiciones de MSC y métodos que permiten una curación más rápida y una regeneración mejorada de tejidos enfermos o dañados y al mismo tiempo reducen en gran medida las complicaciones durante la curación. En particular, se describe en la presente memoria que las composiciones de MSC de la invención tienen un gran potencial regenerativo en un modelo animal validado. En particular, se ha descubierto que la blebistatina acelera y mejora el potencial terapéutico de las MSC de manera drástica e inesperada, al tiempo que reduce complicaciones graves de la curación.

25 El uso de los artículos «un» o «una» junto con la expresión «que comprende» en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva pueden referirse a «uno/a», pero también concuerdan con el significado de «uno/a o más», «al menos uno/a» y «uno/a o más de uno/a».

30 En toda la solicitud, la expresión «aproximadamente» se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, donde el método se utiliza para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Normalmente, se pretende que el término abarque aproximadamente o menos de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % de variabilidad, dependiendo de la situación.

35 El uso del término «o» en las reivindicaciones se emplea para hacer referencia a «y/o», a menos que se indique explícitamente que hace referencia solamente a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, si bien la descripción admite una definición que haga referencia solamente a alternativas y a «y/o».

40 Como se emplea en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones «que comprende» (y cualquier forma de «que comprende», tal como «comprender» y «comprende»), «que tiene» (y cualquier forma de «que tiene», tal como «tener» y «tiene»), «que incluye» (y cualquier forma de «que incluye», tal como «incluye» e «incluir») o «que contiene» (y cualquier forma de «que contiene», tal como «contiene» y «contener») son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales que no se hayan nombrado. Se contempla que se pueda implementar cualquier realización descrita en la presente memoria descriptiva con respecto a cualquier método o composición de la invención y viceversa. Asimismo, se pueden usar composiciones de la invención para lograr métodos de la invención.

45 «Tratar», «que trata» o «tratamiento» se usan en la presente memoria para hacer referencia a la administración de una sustancia a un sujeto con el objetivo de curar, aliviar, mitigar, curar, prevenir o mejorar un trastorno, síntomas del trastorno, un estado de enfermedad secundario con respecto al trastorno o una predisposición al trastorno. Una «cantidad efectiva» es una cantidad de la sustancia que es capaz de producir un resultado conveniente desde el punto de vista médico como se indica en la presente memoria en un sujeto tratado. El resultado conveniente desde el punto de vista médico puede ser objetivo (es decir, se puede medir mediante alguna prueba o indicador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto).

50 Una «enfermedad susceptible de tratamiento con una terapia de células madre» se usa en la presente memoria para hacer referencia a cualquier procedimiento, condición, trastorno, mal y/o enfermedad que pueda tratarse mediante la administración de células madre. Esas enfermedades incluyen, pero no se limitan, al trasplante de médula ósea, piel, corazón y córnea, la enfermedad del injerto contra el hospedador, la insuficiencia hepática y renal, la lesión pulmonar, la artritis reumatoide, el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, la esclerosis múltiple, el lupus y la diabetes; la prevención del rechazo del aloinjerto, los trastornos neurológicos y la medicina cardiovascular; así como la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), la

leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés), el linfoma de Burkitt, la leucemia mieloide crónica (CML, por sus siglas en inglés), la leucemia mielomonocítica juvenil (JMML, por sus siglas en inglés), el linfoma no Hodgkin, el linfoma de Hodgkin, la granulomatosis linfomatoide, el síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés), la leucemia mielomonocítica crónica (CMML, por sus siglas en inglés), los síndromes de insuficiencia de la médula ósea, la trombocitopenia amegacariocítica, la neutropenia autoinmunitaria (grave), la anemia diseritropoyética congénita, la neutropenia cíclica, la anemia de Diamond-Blackfan, el síndrome de Evan, la anemia de Fanconi, la enfermedad de Glanzmann, la dermatomiositis juvenil, el síndrome de Kostmann, la aplasia de los glóbulos rojos, el síndrome de Shwachman, la anemia aplásica grave, la anemia sideroblástica congénita, la trombocitopenia con ausencia de radio (síndrome TAR), la disqueratosis congénita, los trastornos de la sangre, la anemia de células falciformes (hemoglobina SS), la enfermedad de HbSC, la β talasemia falciforme, la α -talasemia mayor (hdropesía fetal), la β -talasemia mayor (anemia de Cooley), la β -talasemia intermedia, la E- β talasemia, la E- β + talasemia, los trastornos metabólicos, la adrenoleucodistrofia, la enfermedad de Gaucher (infantil), la leucodistrofia metacromática, la enfermedad de Krabbe (leucodistrofia de células globoides), la enfermedad de Gunther, el síndrome de Hermansky-Pudlak, el síndrome de Hurler, el síndrome de Hurler-Scheie, el síndrome de Hunter, el síndrome de Sanfilippo, el síndrome de Maroteaux-Lamy, la mucopolidosis tipo II, III, la alfa manosidosis, el síndrome de Niemann Pick, tipo A y B, el síndrome de Sandhoff, la enfermedad de Tay-Sachs, la enfermedad de Batten (lipofuscinosis cerioide neuronal heredada), la enfermedad de Lesch-Nyhan, las inmunodeficiencias, la ataxia-telangiectasia, la enfermedad granulomatosa crónica, el síndrome de DiGeorge, la deficiencia de IKK gamma, la poliendocrinopatía por desregulación inmunitaria, la mucopolidosis unida a X, tipo II, la mielocatexis, la inmunodeficiencia unida a X, la inmunodeficiencia combinada grave, la deficiencia de adenosina desaminasa, el síndrome de Wiskott-Aldrich, la agammaglobulinemia unida a X, la enfermedad linfoproliferativa unida a X, el síndrome de Omenn, la displasia reticular, la displasia tímica, la deficiencia de adhesión leucocitaria, otra osteopetrosis, la histiocitosis de células de Langerhans, la linfohistiocitosis hemofagocítica, la enfermedad renal aguda y crónica, la enfermedad de Alzheimer, el antienvjecimiento, la artritis, el asma, la terapia de células madre cardíacas, el infarto cerebral (apoplejía), la parálisis cerebral (apoplejía), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la insuficiencia cardíaca congestiva, la diabetes mellitus (tipo I y II), la fibromialgia, las deficiencias inmunitarias, la enfermedad cardíaca isquémica, el lupus, la esclerosis múltiple, el infarto de miocardio, la osteoartritis, la osteoporosis, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad arterial periférica, la artritis reumatoide, la terapia de células madre en la cirugía plástica, la lesión cerebral traumática y las enfermedades neurológicas.

Una «enfermedad vascular o cardiovascular» como se emplea en la presente memoria se caracteriza por eventos clínicos que incluyen síntomas clínicos y signos clínicos. Los síntomas clínicos son aquellas experiencias señaladas por un paciente que indican al médico la presencia de una patología. Los signos clínicos son aquellos hallazgos objetivos en exámenes físicos o de laboratorio que indican al médico la presencia de una patología. «Enfermedad cardiovascular» incluye «enfermedad arterial coronaria» y «enfermedad vascular periférica», como se definirán estos términos más adelante. Los síntomas clínicos en la enfermedad cardiovascular incluyen dolor en el pecho, dificultad para respirar, debilidad, desmayos, alteraciones de la conciencia, dolor en las extremidades, disnea nocturna paroxística, ataques isquémicos transitorios y otros fenómenos de ese tipo experimentados por el paciente. Los signos clínicos en la enfermedad cardiovascular incluyen hallazgos tales como anomalías en ECG, pulsos periféricos alterados, soplos arteriales, sonidos cardíacos anormales, estertores y sibilancias, distensión venosa yugular, alteraciones neurológicas y otros hallazgos de ese tipo definidos por el médico. Los síntomas clínicos y signos clínicos pueden combinarse en una enfermedad cardiovascular tal como un infarto de miocardio (MI, por sus siglas en inglés) o una apoplejía (también denominada «accidente cerebrovascular» o «ACV»), en donde el paciente señalará determinados fenómenos (síntomas) y el médico percibirá otros fenómenos (signos), todos estos indicadores de una patología subyacente. La «enfermedad cardiovascular» incluye enfermedades relacionadas con los trastornos cardiovasculares del trastorno de placas frágiles, el trastorno obstructivo y la estenosis. Por ejemplo, una enfermedad cardiovascular que surge a partir de un trastorno de placas frágiles, como se definirá ese término más adelante, puede denominarse «enfermedad de placas frágiles». Los eventos clínicos asociados a la enfermedad de placas frágiles incluyen los signos y síntomas en los que la ruptura de una placa frágil con una trombosis aguda posterior o con una embolización distal constituye una marca distintiva. Los ejemplos de enfermedad de placas frágiles incluyen determinadas apoplejías e infartos de miocardio. En otro ejemplo, una enfermedad cardiovascular que surge a partir de un trastorno obstructivo puede denominarse «enfermedad obstructiva». Los eventos clínicos asociados a una enfermedad obstructiva incluyen aquellos signos y síntomas en los que la obstrucción progresiva de una arteria afecta el grado de circulación que llega a un tejido objetivo. La obstrucción arterial progresiva puede derivar en una isquemia progresiva que puede devenir en última instancia en la muerte de tejido si el grado de circulación es insuficiente para mantener los tejidos. Los signos y síntomas de la enfermedad obstructiva incluyen la claudicación, el dolor durante el reposo, la angina y la gangrena, así como los hallazgos físicos y de laboratorio que indican una estenosis de los vasos y una perfusión distal disminuida. En aun otro ejemplo, una enfermedad cardiovascular que surge a partir de la restenosis trastorno obstructivo puede denominarse «enfermedad de estenosis en el estent». La enfermedad de estenosis en el estent incluye los signos y síntomas que surgen a partir del bloqueo progresivo de un estent arterial que se ha colocado como parte de un procedimiento tal como una angioplastia transluminal percutánea, en donde se pretende que la presencia del estent ayude a mantener el vaso en su configuración recién expandida. Los eventos clínicos que acompañan a la enfermedad de estenosis en el estent se pueden atribuir a la restenosis de la arteria reconstruida.

Una «enfermedad arterial coronaria» (EAC) se refiere a un trastorno vascular relacionado con el bloqueo de arterias

que irrigan al corazón. El bloqueo puede producirse de manera repentina, mediante mecanismos tales como la ruptura de placas o la embolización. El bloqueo puede producirse de manera progresiva, con la contracción de la arteria a través de la hiperplasia miointimal y la formación de placas. Esos signos y síntomas clínicos que surgen a partir del bloqueo de arterias que irrigan al corazón son manifestaciones de una enfermedad arterial coronaria. Las manifestaciones de la enfermedad arterial coronaria incluyen la angina, la isquemia, el infarto de miocardio, la cardiomiopatía, la insuficiencia cardíaca congestiva, las arritmias y la formación de aneurismas. Se entiende que la enfermedad de placas frágiles en la circulación coronaria está asociada a la trombosis arterial o la embolización distal que se manifiesta como un infarto de miocardio. Se entiende que la enfermedad obstructiva en la circulación coronaria está asociada a la estenosis arterial acompañada por síntomas de angina, una afección que comúnmente se trata con intervenciones farmacológicas y con la angioplastia.

Una «enfermedad vascular periférica» (o «PVD») es una enfermedad cardiovascular que surge a partir del bloqueo de las arterias periféricas (es decir, no coronarias). El bloqueo puede producirse de manera repentina, mediante mecanismos tales como la ruptura de placas o la embolización, como ocurre en la enfermedad de placas frágiles. El bloqueo puede producirse de manera progresiva, con la contracción de la arteria a través de la hiperplasia miointimal y la formación de placas, como en la enfermedad obstructiva. El bloqueo puede ser completo o parcial. Los signos y síntomas clínicos que surgen del bloqueo de arterias periféricas son manifestaciones de la enfermedad vascular periférica. Las manifestaciones de enfermedades vasculares periféricas incluyen, entre otras, la claudicación, la isquemia, la angina intestinal, la insuficiencia renal vascular, los ataques isquémicos transitorios, la formación de aneurismas, la embolización periférica y la apoplejía. La enfermedad cerebrovascular isquémica es un tipo de enfermedad vascular periférica.

Ante la sospecha de PVD, se puede determinar el índice de presión tobillo-brazo (ABPI, por sus siglas en inglés/ABI). Cuando los valores de la presión sanguínea en los tobillos son menores que en los brazos, se puede sospechar de bloqueos en las arterias que proporcionan sangre del corazón al tobillo. Una relación de ABI de aproximadamente 0,9 o menos concuerda con la PVD; los valores de ABI de aproximadamente 0,8 o menos indican una enfermedad moderada y aproximadamente 0,5 o menos involucran una enfermedad isquémica grave. Una relación de ABI de aproximadamente 0,5 o 0,4 o menos puede usarse como un umbral para el diagnóstico.

Es posible que las condiciones que refuerzan las paredes de los vasos (tales como las calcificaciones que se producen en el marco de la diabetes crónica) produzcan falsos negativos que habitualmente, aunque no siempre, son indicados por ABI anormalmente altos (aproximadamente $> 1,3$). Esos resultados y sospechas ameritan una investigación adicional y estudios de nivel superior. Si los ABI son anormales, el siguiente paso por lo general es un examen de ultrasonido doppler de las extremidades inferiores para observar el sitio y la extensión de la aterosclerosis. Se puede realizar otro tipo de imagenología mediante angiografía, en donde un catéter se inserta en la arteria femoral común y se guía de manera selectiva hasta la arteria en cuestión. Durante la inyección de un agente de contraste radiodenso, se pueden realizar rayos X. Se puede identificar una estenosis limitante del flujo en los rayos X y tratarse mediante la aterectomía, la angioplastia o la colocación de un estent. Los escáneres de tomografía computarizada (TC) multicorte pueden proporcionar la imagenología directa del sistema arterial como alternativa a la angiografía. La TC puede facilitar la evaluación de las arterias aorta y de la extremidad inferior sin la necesidad de la inyección arterial del agente de contraste de un angiograma.

La enfermedad arterial periférica (PAD) es una forma de enfermedad vascular periférica (PVD) en la que existe un bloqueo parcial o total del suministro de sangre a una extremidad, habitualmente la pierna, que lleva a un deterioro del flujo sanguíneo e hipoxia en el tejido. Cuando la PAD avanza, llega a la etapa de isquemia crítica de las extremidades (CLI, por sus siglas en inglés) con ulceraciones en la piel, gangrena y potencialmente amputaciones inevitables. Se han usado modelos animales con isquemia en las extremidades posteriores para evaluar diversas estrategias terapéuticas dirigidas al trasplante de células madre.

El estándar de cuidado para la PAD actual incluye dejar de fumar, la reducción del colesterol, los agentes antiplaquetarios, el tratamiento de la diabetes, el tratamiento de la presión sanguínea alta, los inhibidores de la ECA, el ejercicio y el cilostazol. Otras opciones de tratamiento pueden involucrar estents, por ejemplo, estents de elución de fármacos. Tales como estents de elución de paclitaxel. Se prevé que todos los métodos y las composiciones que se describen en la presente memoria se proporcionen con esas opciones de tratamiento. Véase, por ejemplo, Bums et al., BMJ. 15 de marzo de 2003; 326(7389): 584-588.

La enfermedad arterial periférica comúnmente se divide en las etapas de Fontaine, presentadas por René Fontaine en 1954 para la isquemia: 1) Dolor leve al caminar (claudicación), obstrucción incompleta de vasos sanguíneos; 2) Dolor grave al caminar distancias relativamente cortas (claudicación intermitente), dolor desencadenado al caminar «después de una distancia de > 150 m en la etapa IIa y después de < 150 m en la etapa II-B»; 3) Dolor durante el reposo (dolor al reposar), principalmente en las patas, que aumenta cuando se levanta la extremidad; 4) Pérdida de tejido biológico (gangrena) y dificultad al caminar. Se prevé que las composiciones y los métodos que se describen en la presente provoquen la mejora de la enfermedad arterial periférica al mejorar la etapa de Fontaine de un paciente en aproximadamente o al menos 1, 2, 3 o 4 etapas en un período de al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 horas, días, semanas o meses a partir del inicio del tratamiento o en comparación con el control.

De manera alternativa, la clasificación de la enfermedad arterial periférica según Rutherford consiste en seis etapas: 1) Claudicación leve; 2) Claudicación moderada; 3) Claudicación grave; 4) Dolor isquémico al reposar; 5) Pérdida de tejido menor; y 6) Pérdida de tejido mayor. Se prevé que las composiciones y los métodos que se describen en la presente memoria provoquen la mejora de la enfermedad arterial periférica al mejorar la etapa de Rutherford de un paciente en aproximadamente o al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 etapas en un período de al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 horas, días, semanas o meses a partir del inicio del tratamiento o en comparación con el control.

En una realización de la invención, la composición que se reivindica en la presente provoca o mejora la angiogénesis.

Lo ideal es que la composición provoque o potencie la angiogénesis en al menos 20 por ciento en comparación con el control.

En una realización de la invención, la composición que se reivindica en la presente comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

La «evaluación de la función de las extremidades» se usa en la presente memoria para hacer referencia a una medición relativa de la eficacia de los métodos y las composiciones que se describen en la presente. De manera alternativa, los grados de la función de las extremidades son: «0» para la flexión de los dedos para resistir el movimiento suave de la cola, «1» para la flexión plantar, «2» para el arrastre sin flexión plantar y «3» para el arrastre de la pata. Se prevé que las composiciones y los métodos que se describen en la presente memoria provoquen la mejora de la función de las extremidades de un paciente en aproximadamente o al menos 1, 2, 3 o 4 grados en un período de al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 horas, días, semanas o meses a partir del inicio del tratamiento o en comparación con el control.

Se puede usar una «evaluación del daño isquémico» para evaluar diversas tácticas terapéuticas dirigidas al trasplante de células madre. En una realización, el daño isquémico puede expresarse como un grado morfológico. Los grados morfológicos son: «0» para la ausencia sustancial de necrosis, «1» para la necrosis sustancialmente limitada a los dedos (pérdida de dedos), «2» para la necrosis que se extiende hasta el dorso de la pata (pérdida de la pata), «3» para la necrosis que se extiende hasta la pierna (pérdida de la rodilla); y «4» para la necrosis que se extiende hasta un muslo (pérdida total de la extremidad posterior). Se prevé que las composiciones y los métodos que se describen en la presente memoria provoquen la reducción del daño isquémico en un paciente en aproximadamente o al menos 1, 2, 3 o 4 grados en un período de al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 horas, días, semanas o meses a partir del inicio del tratamiento o en comparación con el control.

La «evaluación del flujo sanguíneo en las extremidades» se usa en la presente memoria para hacer referencia a una medición relativa adicional de la eficacia de los métodos y las composiciones que se describen en la presente. Preferiblemente, el flujo sanguíneo en las piernas de ambos lados se mide, por ejemplo, con un Doppler láser sin contacto, antes y después del tratamiento. Se prevé que las composiciones y los métodos que se describen en la presente memoria provoquen la mejora del flujo sanguíneo en las extremidades de un paciente hasta aproximadamente o al menos 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 o 100 por ciento de los niveles de perfusión sanguínea normales en un período de al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 horas, días, semanas o meses a partir del inicio del tratamiento o en comparación con el control.

«Reducir la tasa de amputación en un paciente con una enfermedad arterial periférica» hace referencia a la tasa de pacientes con PAD que requieren la amputación de extremidades, dedos y/o tejidos debido a, por ejemplo, una infección o necrosis. Existen tasas de amputación estándares asociadas al tratamiento con MSC que pueden determinarse fácilmente. Preferiblemente, el tratamiento de pacientes con una composición que incluye una combinación de MSC y un antagonista de la NM II reduce las tasas de amputación en aproximadamente o al menos 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500 o más por ciento en relación con un estándar (por ejemplo, estándar de cuidado) o control (por ejemplo, tratamiento con MSC o tratamiento con antagonista de la NM II solos y no en combinación).

Los «fármacos para enfermedades cardiovasculares» tal como se definen en la presente memoria hacen referencia a medicamentos útiles para el manejo de la diabetes, la hipertensión (por ejemplo, inhibidores de la ECA), el colesterol (por ejemplo, estatinas) y los fármacos antiplaquetarios (por ejemplo, aspirina, clopidogrel), anticoagulantes (por ejemplo, warfarina), diuréticos y betabloqueadores. De manera adicional, el cilostazol o la pentoxifilina son fármacos para la diabetes cardiovascular.

El término «angiogénesis» se define como un proceso fisiológico que involucra el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. «Vasculogénesis» es el término que se usa para la formación espontánea de vasos sanguíneos e «intususcepción» es el término que se usa para la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la división de algunos ya existentes. La angiogénesis es un proceso normal en el crecimiento y desarrollo, así como en la curación de heridas. También es una etapa fundamental en la transición de tumores de un estado inactivo a un estado maligno. Se dice que la angiogénesis tiene lugar cuando hay un aumento de aproximadamente o al menos 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500 o más por ciento en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un área determinada en comparación con el mismo tejido antes de la angiogénesis o de un estándar (por ejemplo, estándar de cuidado) o control (por ejemplo, tratamiento con MSC o tratamiento con antagonista de la NM II solos y no en combinación).

La «aceleración de la curación» se refiere al aumento de la velocidad con la que una enfermedad susceptible de tratamiento con células madre muestra signos de mejora (con respecto a una medición morfológica o funcional, cualitativa o cuantitativa asociada a la enfermedad en cuestión) en respuesta a la terapia con las composiciones que se describen en la presente. Preferiblemente, la velocidad de la curación aumenta en aproximadamente o al menos 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500 o más por ciento un estándar (por ejemplo, estándar de cuidado) o control (por ejemplo, tratamiento con MSC o tratamiento con antagonista de la NM II solos y no en combinación).

«Paciente», como se emplea en la presente memoria, se refiere a un sujeto mamífero al que se diagnostica una enfermedad cardiovascular o del que se sospecha que tiene o está desarrollando una enfermedad cardiovascular. Los pacientes pueden ser, a modo de ejemplo, humanos, simios, perros, cerdos, vacas, gatos, caballos, cabras, ovejas, roedores y otros mamíferos que puedan beneficiarse con la terapia de células madre.

«Administrar» se usa en la presente memoria para hacer referencia al suministro de las composiciones de la invención a un paciente. A modo de ejemplo, y sin limitación, la administración de la composición, por ejemplo, inyección, puede realizarse mediante inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.) o inyección intramuscular (i.m.). Se puede emplear una o más de esas vías. La administración parenteral puede ser, por ejemplo, mediante inyección en bolo o mediante perfusión gradual con el tiempo. De manera alternativa, o simultánea, la administración puede ser por vía oral. De manera adicional, la administración también puede ser mediante deposición quirúrgica de un bolo o gránulo de células o mediante la colocación de un dispositivo médico, por ejemplo, un estent, cargado con células. Preferiblemente, las composiciones de la invención se administran en el sitio de la enfermedad cardiovascular isquémica, por ejemplo, en el sitio o cerca de (por ejemplo, aproximadamente o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 milímetros con respecto a) a de la lesión de la enfermedad cardiovascular isquémica (por ejemplo, bloqueo/estenosis vascular, tejido necrótico o el sitio de infección gangrenosa). La administración puede ser intravenosa, intramuscular, en el sitio de una lesión asociada a la enfermedad o cerca de este y/o intramuscular en el sitio de daño isquémico o cerca de este.

«Un paciente que lo necesite» se usa en la presente memoria para hacer referencia a un paciente diagnosticado con una enfermedad cardiovascular o que se sospecha que la tiene. En una realización, el paciente tiene una enfermedad arterial periférica o es probable que la desarrolle.

La «totipotencia» se usa en la presente para hacer referencia a la capacidad de una célula individual de dividirse y/o producir todas las células diferenciadas en un organismo, incluidos los tejidos extraembrionarios. Las células totipotentes incluyen esporas y cigotos. En algunos organismos, las células pueden desdiferenciarse y recobrar la totipotencia.

«Pluripotencia» se usa en la presente para hacer referencia a la capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (Músculo, hueso, sangre, aparato urogenital) o ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso).

Las «células madre pluripotentes» incluyen células madre pluripotentes naturales y células madre pluripotentes inducidas. Estas pueden dar origen a cualquier tipo de célula fetal o adulta. Sin embargo, en solitario por lo general no pueden desarrollarse y convertirse en un organismo fetal o adulto dado que carecen de la capacidad de contribuir con el tejido extraembrionario, tal como la placenta.

Las «células madre pluripotentes inducidas» (o «células iPS») son similares a las células madre pluripotentes naturales, tales como las células madre embrionarias (ES), en muchos aspectos, tales como la expresión de determinados genes de células madre y/orfeins, patrones de metilación de cromatina, el tiempo de duplicación, la formación de cuerpos embrioides, la formación de teratomas, la formación de quimeras viables y la potencia y capacidad de diferenciación. Las células pluripotentes inducidas pueden derivar, por ejemplo, de células adultas del

estómago, el hígado, la piel y la sangre. Las células iPS pueden obtenerse mediante la transfección de determinados genes asociados a células madre en células no pluripotentes, tales como los fibroblastos adultos. En determinadas realizaciones, se puede lograr la transfección a través de vectores virales, tales como los retrovirus, por ejemplo. Los genes transfectados pueden incluir, pero no se limitan a, los reguladores transcripcionales principales Oct-3/4 (Pou5f1) y Sox2 Oct-4, y los transgenes Nanog y Lin28 transgenes. Las subpoblaciones de células transfectadas pueden empezar a asemejarse morfológica y bioquímicamente a células madre pluripotentes y pueden aislarse a través de la selección morfológica, el tiempo de duplicación, o a través de un gen reportero y la selección de antibióticos.

«Multipotencia» se usa en la presente para hacer referencia a células progenitoras multipotentes que tienen la capacidad de dar origen a múltiples tipos de células, pero a una cantidad de linajes más limitada que una célula madre pluripotente. Por ejemplo, una célula madre multipotente es una célula hematopoyética que puede desarrollarse y convertirse en varios tipos de glóbulos, pero no puede desarrollarse y convertirse en células del cerebro u otros tipos de células.

«Células madre mesenquimales o células estromales multipotentes» (a ambas se las denomina «MSC») se entiende en la presente memoria que son células estromales multipotentes que pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células, que incluyen, pero no se limitan a: osteoblastos (células óseas), condrocitos (células de los cartílagos) y adipocitos (células de grasa).

En una realización, las células madre mesenquimales se obtienen a partir de la médula ósea. En otra realización, las células madre mesenquimales se obtienen a partir de brotes de dientes en desarrollo del tercer molar mandibular. En otra realización, las MSC se obtienen a partir del líquido amniótico. En otra realización, las MSC pueden obtenerse a partir del tejido del cordón umbilical, por ejemplo, de la gelatina de Wharton y la sangre del cordón umbilical. En una realización adicional, las MSC se aíslan del tejido adiposo. De manera alternativa, las MSC se aíslan de la gelatina de Wharton. En otra realización, las MSC derivan de células iPS, por ejemplo, como se describe en Giuliani et al. "Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells downregulate NK cell cytolytic machinery," Blood, 29 de julio de 2011.

Preferiblemente, las MSC tienen un cuerpo celular pequeño con unos pocos procesos celulares que son largos y finos. El cuerpo celular puede contener un núcleo grande y redondo con un nucléolo prominente, rodeado por partículas de cromatina finamente dispersadas, que otorgan al nucléolo una apariencia transparente. El resto del cuerpo celular contiene una pequeña cantidad de aparatos de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, mitocondria y polirribosomas. Las MSC que son largas y finas, se encuentran ampliamente dispersadas y la matriz extracelular adyacente se encuentra poblada por unas pocas fibrillas reticulares pero desprovista de otros tipos de fibrillas de colágeno.

La unión celular no es un proceso homogéneo, sino que se produce en zonas particulares, denominadas «zonas de adhesión focal». Una vez unidas, las células ejercen tensión por medio de proteínas motoras internas. De esta manera, el citoesqueleto puede organizarse y funciona en una variedad de procesos que incluyen el transporte, el andamiaje y la supervivencia celular. Al separar las células, estas pueden constreñirse rápidamente en función de la acumulación de tensión interna por parte de las proteínas motoras y las estructuras internas organizadas previamente (citoesqueléticas y otras) pueden verse alteradas. Si no se permite que vuelvan a unirse a las superficies, esas células pueden iniciar programas de muerte celular que se han descrito como apoptosis/anoikis dependiente de la unión.

Las «miosinas» incluyen una familia de proteínas motoras dependientes de ATP y por lo general se conocen por su función en la contracción muscular y por su participación en una amplia variedad de procesos de motilidad eucariótica. Por lo general, son responsables de la motilidad basada en actina. Por lo general, la miosina II (también conocida como miosina convencional) es el tipo de miosina responsable de la contracción muscular en células musculares.

La principal proteína motora citoesquelética responsable de generar la tensión celular es la miosina no muscular II (denominada «miosina II»). La «miosina no muscular II» o «NM II» es una proteína de unión a la actina que tiene reticulación de actina y propiedades de contracción y es regulada en parte a través de la fosforilación de sus cadenas ligeras y pesadas. Al igual que la miosina muscular II, las moléculas de NM II están compuestas por tres pares de péptidos: dos cadenas pesadas de 230 kDa, dos cadenas ligeras reguladoras (RLC, por sus siglas en inglés) de 20 kDa y dos cadenas ligeras esenciales (ELC, por sus siglas en inglés) de 17 kDa que estabilizan la estructura de la cadena pesada. Si bien en la presente se hace referencia a estas miosinas como miosinas «no musculares» II para distinguirlas de sus homólogos musculares, las primeras también se encuentran presentes en células musculares, en donde tienen funciones distintas durante el desarrollo y la diferenciación del músculo esquelético, así como en el mantenimiento de la tensión en el músculo liso.

Por lo general, tres isoformas de NM II mamíferas tienen propiedades comunes y particulares. Los dos dominios de cabeza globular de la NM II contienen un sitio de unión para ATP y actina y son sucedidos por regiones de cuello, cada una de las cuales se unen a las dos cadenas ligeras diferentes desde el punto de vista funcional. El dominio de cuello actúa como un brazo de palanca para amplificar la rotación de la cabeza mientras la energía química del ATP se convierte en el movimiento mecánico de la cabeza de la miosina. Este dominio de cuello es sucedido por una espiral α -helicoidal larga, que forma un dominio con forma de varilla que efectúa la dimerización entre las cadenas pesadas y termina en una cola no helicoidal relativamente corta. Los dominios de varilla de la NM II se autoasocian para formar filamentos bipolares (disposiciones antiparalelas de moléculas de miosina), que son más pequeños que aquellos que

se encuentran en el músculo cardíaco y esquelético.

La NM II actúa para integrar procesos que impulsan la migración y adhesión celular. También es un punto final importante en el que convergen muchas vías de señalización, en gran medida a través de GTPasas Rho. La NMII en sí misma está regulada estrechamente en diferentes niveles, incluso al nivel de pliegue, montaje y desmontaje de filamentos de miosina, unión a la actina y actividad motora y de ATPasa. La regulación del citoesqueleto de actina mediante la NM II controla múltiples procesos interrelacionados, tales como la migración, la adhesión célula-célula y célula-matriz, la diferenciación celular, la morfogénesis y el desarrollo de tejido. La regulación espacial-temporal de la NM II mediante la ubicación subcelular y la activación de sus cinasas reguladoras en diferentes células y tejidos tiene repercusiones importantes en el control de la función de la NM II.

10 La regulación de la hidrólisis de Mg^{2+} -ATP y la formación de filamentos de la NM II involucra la fosforilación reversible de aminoácidos específicos presentes en el par de RLC de 20 kDa y las cadenas pesadas. La función del par de ELC consiste en estabilizar la NMHC y no existe evidencia de que experimenten una fosforilación reversible. Véase también Vicente-Manzanares et al., Nat Rev Mol Cell Biol. noviembre de 2009; 10(11): 778-790.

15 «Antagonista de la miosina no muscular II» se refiere a un agente que de manera directa o indirecta inhibe, bloquea o revierte la actividad de la Miosina II tal como se produce de manera natural o en los tejidos enfermos o dañados de pacientes que sufren una enfermedad cardiovascular. Un agente de ese tipo puede ser una molécula pequeña (por ejemplo, la blebistatina), ácido nucleico, lo cual incluye ARNr, ARNm, ARNt, miARN, ARNip (véase, por ejemplo, Ma et al., Mol. Biol. Cell 15 de noviembre de 2010 vol. 21 n.º 22 3952-3962 o Kim et al., J Biol Chem. 10 ago 2012;287(33):27345-58), ARN antisentido, ADN, ARN/ADN híbrido, ribozima, APN, aptámero, (cualquiera o la totalidad de los cuales puede incluir bases de nucleótidos sintéticas o no naturales); péptidos; o proteínas, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas similares a anticuerpos o anticuerpos de cadena simple, así como fosfatasa y cinasas. Por ejemplo, el antagonista de la NM II puede ser un ARNip dirigido para inactivar la expresión del ARNm que codifica la NM II o el ARNm de un gen asociado a la regulación por aumento de la NM II; o un vector que codifica un ARNip de ese tipo.

25 Los antagonistas II incluyen los antagonistas del receptor de la angiotensina II tipo 1 (por ejemplo, el antagonista del receptor de AT1 no peptídico FK-739, véase Fuji et al., Hypertension, 1999;33:975- 980) así como los antagonistas del receptor de la angiotensina II, también conocidos como bloqueadores del receptor de la angiotensina (ARB, por sus siglas en inglés), los antagonistas del receptor de AT1 o sartanos son un grupo de agentes farmacéuticos que modulan el sistema de renina-angiotensina-aldosterona. Sus usos principales tienen que ver con el tratamiento de la hipertensión (presión sanguínea alta), la nefropatía diabética (daño renal provocado por la diabetes) y la insuficiencia cardíaca congestiva. El losartano, irbesartano, olmesartano, candesartano y valsartano incluyen el grupo tetrazol (un anillo con cuatro nitrógenos y un carbono). El losartano, irbesartano, olmesartano, candesartano y telmisartano incluyen uno o dos grupos imidazol.

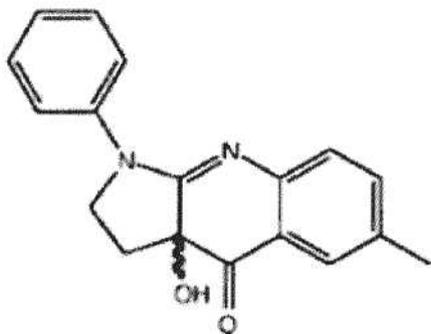
35 Los antagonistas de la miosina no muscular II también incluyen inhibidores de la ECA. Un inhibidor de la ECA (o inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) es una droga farmacéutica para medicación que se usa principalmente para el tratamiento de la presión sanguínea alta (hipertensión) y la debilidad del músculo cardíaco (insuficiencia cardíaca congestiva). Se ha demostrado que los ejemplos de inhibidores de la ECA que incluyen aptopril, zofenopril, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril, imidapril, zofenopril, trandolapril, fosinopril, casoquininas y lactoquininas, así como los lactotripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro producidos por el probiótico Lactobacillus helveticus o derivados de la caseína, tienen funciones de inhibición de la ECA y antihipertensiva.

Los antagonistas de la miosina no muscular II también incluyen 2,3-butanodiona-2-monoxima (BDM, por sus siglas en inglés) e inhibidores de la actividad de la adenosina trifosfatasa (ATPasa) de la miosina II.

45 Un antagonista de la NM II es la blebistatina (un derivado de 1-fenil-2-pirrolidinona) que es un inhibidor farmacológico específico del músculo esquelético y la actividad de la adenosina trifosfatasa (ATPasa) de la miosina no muscular II. La blebistatina es una molécula pequeña altamente activa que inhibe la formación de vesículas. Este compuesto tiene permeabilidad celular, es benigno y, cabe destacar, fácilmente reversible. Se ha descrito como un factor de supervivencia en cultivos de células madre. También se ha descrito como un promotor de la adhesión de las células a un sustrato con el cual las células habitualmente tienen una afinidad nula o solamente baja (WO2012062819), por ejemplo, para el recubrimiento de dispositivos médicos implantados tales como marcapasos, implantes de cadera o huesos o estents.

50

A continuación se muestra la blebistatina:



En algunas realizaciones, el término «blebistatina» incluye una mezcla racémica. En algunas realizaciones, el término «blebistatina» se refiere a la R-blebistatina. En algunas realizaciones, el término «blebistatina» se refiere a la S-blebistatina.

- 5 La presente descripción abarca variantes, análogos y derivados de la blebistatina. Las variantes, los análogos y los derivados adicionales de la blebistatina y los antagonistas de la miosina no muscular II adecuados y previstos para usarse en la presente memoria se describen en la pub. estadounidense n.º 20080021035. Véase, por ejemplo, también: Straight et al., *Science* 299 (5613): 1743-47; Kovács et al., (Aug 2004), *J Biol Chem.* 279 (34): 35557-63; Limouze et al., (2004) *J Muscle Res Cell Motil.* 25 (4-5): 337—41.
- 10 En determinadas realizaciones, las composiciones terapéuticas que se describen en la presente contienen o están asociadas al menos a un antagonista de la miosina no muscular II, mediante lo cual cada uno del o de los antagonistas de la miosina no muscular II se encuentra presente en una dosis individual en una concentración de aproximadamente, al menos o más de 0,1, 0, 2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 cada vez 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} molar por dosis. Preferiblemente, el antagonista de la miosina no muscular II se encuentra presente en una dosis individual con una concentración de entre aproximadamente 1-100, 2-60, 3-50, 4-40, 5-30, 6-20, 7-15, 8-10, 2-18, 3-16, 4-14, 5-12, 6-10 o 7-8 μM .
- 20 En determinadas realizaciones, las composiciones terapéuticas descritas en la presente se administran en una dosis de aproximadamente o al menos o más 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 veces por día, semana o mes en un período de aproximadamente o al menos o más 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 días, semanas o meses.
- 25 En determinadas realizaciones, el antagonista de la NM II se incubaba con las células de la composición al menos o más de 0,1, 0, 2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 minutos, horas o días antes de la administración al paciente.
- 30 Determinadas realizaciones involucran un kit que comprende células y un antagonista de la NM II. Determinadas realizaciones de kits comprenden (a) un envase que contiene al menos un antagonista de la NM II; y (b) un envase con células madre. La NM II puede encontrarse en una solución o en forma liofilizada. El kit puede incluir opcionalmente instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada; o (iii) el uso del contenido para tratar la enfermedad cardiovascular. El kit puede comprender además (iii) un amortiguador, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, (v) una jeringa y/o (vi) un dispositivo médico automático. En una realización, el
- 35 envase se selecciona del grupo que consiste en: una botella, un vial, una jeringa, un tubo de ensayo o un envase multiuso. En otra realización, la composición de péptidos objetivo se encuentra liofilizada.
- Una dosis individual de las composiciones terapéuticas descritas en la presente puede contener al menos o aproximadamente 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, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 cada vez 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o más células por kilogramo de peso corporal del paciente. En determinadas realizaciones, una dosis contiene aproximadamente, al menos o más de 1-20, 2-19, 3-18, 4-17, 5-16, 6-15, 7-14, 8-13, 9-12 o 10-11 cada vez 10^6 células madre.
- 40
- 45 En determinadas realizaciones, la incorporación del antagonista de la NM II en las composiciones de la invención permiten que el médico proporcione a un paciente una dosis menor de las células madre que la que de otro modo se

necesitaría para lograr el mismo efecto terapéutico alcanzado con una población de células madre que carece del antagonista de la NM II. En determinadas realizaciones, la incorporación del antagonista de la NM II en las composiciones de la invención permite que el médico proporcione a un paciente al menos o aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90 por ciento menos células madre por dosis que las que se necesitarían de otro modo para lograr el mismo efecto terapéutico durante un período de tiempo definido.

En la presente memoria se describen métodos y composiciones para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular; y métodos para reducir las complicaciones (por ejemplo, amputación) del tratamiento de la enfermedad cardiovascular al emplear MSC. Además, se describen kits que incluyen células, antagonistas de la NM II, portadores farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, instrucciones apropiadas.

La invención también se refiere a un método para reducir la tasa de amputación en un paciente con enfermedad arterial periférica que se trata con una composición que comprende MSC, que comprende poner en contacto las MSC con un antagonista de la miosina no muscular II antes del tratamiento. Lo ideal es que el antagonista de la miosina no muscular II sea la blebistatina.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento pueden involucrar por lo general una inyección intramuscular de una dosis de una composición de MSC tratadas con un antagonista de la NM II tal como la blebistatina en el sitio de las lesiones que surgen a partir de una ECV tal como una PAD o cerca de este. Esas inyecciones por lo general provocan un aumento de la función de las extremidades, el flujo sanguíneo y los síntomas isquémicos. Además, el uso de un antagonista de la NM II tal como la blebistatina en la composición acelera drásticamente la regeneración de los tejidos dañados desencadenada por las MSC. Asimismo, la aplicación de la blebistatina con MSC reduce drásticamente las complicaciones graves asociadas a la PAD y/o el trasplante de MSC a un paciente que sufre una PAD.

Los métodos y kits también pueden incluir fármacos o dispositivos médicos cardiovasculares tales como, por ejemplo, estents (que pueden o no ser de elución de fármacos). En otra realización, esos estents pueden estar cargados con MSC que se hayan puesto en contacto con antagonistas de la NM II durante o antes del implante.

Referencias adicionales:

Armstrong, L., Lako, M., Buckley, N., Lappin, T. R. J., Murphy, M. J., Nolte, J. a, Pittenger, M., et al. (2012). Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 30(1), 2-9. doi:10.1002/stem.1007

Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, Shi Y : Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med.* ene 2012;l(1):51-8. Review.

Masuzawa K, Jesmin S, Maeda S, Kaji Y, Oshika T, Zaedi S, Shimojo N, Yaji N, Miyauchi T, Goto K. A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by subconjunctival injection of endothelin-1. *Exp Biol Med* (Maywood). jun 2006;231(6): 1085-9.

Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ.

Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science.* 14 mar 2003;299(5613):1743-7.

Walker A, Su H, Conti MA, Harb N, Adelstein RS, Sato N. Non-muscle myosin II regulates survival threshold of pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 7 sep 2010;1:71.

Daigh, Christine; Fuhrken, Peter; Salvagiotto, Giorgia: Method and composition for the differentiation of stem cells. US20100216181A1, US Patent application 2010 Schenk, Judith; van den Bos, Christian; Rosenbaum, Claudia; Nie, Ying: Method for controlling binding of cells to a substrate. 2012 WO2012062819, Solicitud de patente Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cometta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL..Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose- derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells.* dic 2007;25(12):3234-43). Epub 27 de sep 2007

Goto T. , Fukuyama N., Aku A., Kanabuchi K. ,Kimura K., Taira H., Tanaka E., Wakana N., Mori H. e Inoue H.. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse. *Tokai J Exp Clin Med.*, Vol. 31, n.º 3, pp. 128-132, 2006

OECD principles of Good Laboratory Practice ENV/MC/CHEM (98)17.

Stabile E., Burnett M.S., Watkins C., Kinnaird T, Bachis A., la Sala A., Miller J.M., Shou M., Epstein S.E., Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4- knockout mice. *Circulation.* 2003;15;108(2):205-210

Ejemplos

Ejemplo 1 - Configuración experimental

5 En la presente se describe el análisis de BM MSC en un modelo de ratón para la isquemia periférica de las extremidades posteriores. La enfermedad arterial periférica (PAD) es una forma de enfermedad vascular periférica (PVD) en la que existe un bloqueo parcial o total del suministro de sangre a una extremidad, habitualmente la pierna, que lleva a un deterioro del flujo sanguíneo e hipoxia en el tejido. Cuando la PAD avanza, llega a la etapa de isquemia crítica de las extremidades (CLI, por sus siglas en inglés) con ulceraciones en la piel, gangrena y amputaciones inevitables. Uno de los tratamientos innovadores más auspiciosos para las complicaciones vasculares diabéticas son los productos basados en células madre que potencian la angiogénesis (TRefl-3) Se han usado modelos animales con isquemia en las extremidades posteriores para evaluar diversas estrategias terapéuticas dirigidas al trasplante de células madre.

15 La manipulación de los animales se realizó de conformidad con el Instituto Nacional de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) y la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC, por sus siglas en inglés). Los animales se mantuvieron en jaulas de polisulfona (PSU) (7-8/jaula) que medían 42,5 x 265,6 x 18,5 cm, con una rejilla superior de acero inoxidable con instalaciones para comida granulada y agua para beber en botellas de policarbonato transparentes; se usaron lechos de cáscara de arroz limpia esterilizada con vapor (Harlan, Sani-chip, Cat n.º 106S8216) y el material de los lechos se cambió junto con la jaula dos veces por semana. Los animales se alimentaron *ad libitum* siguiendo una dieta comercial para roedores (dieta de proteínas de 18 % de Teklad Certified Global cat n.º: 106S8216). Los animales tienen acceso libre a agua para beber acidificada (pH entre 2,5 y 3,5) obtenida de la red de abastecimiento municipal. Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio estándares, con aire acondicionado y filtración (HEPA F6/6) con un suministro de aire fresco adecuado (con un mínimo de 15 cambios de aire/hora). Los animales se mantuvieron en un entorno con clima controlado. El intervalo de temperaturas era de 20-24 °C y el intervalo de HR era de 30-70 % con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Especie/Cepa: Ratón/Lampión atómico; Género/Cantidad/Edad: Macho/152/9-10 semanas; Origen: Harlan Laboratories, Israel; Peso corporal: El peso corporal promedio al momento de iniciar el estudio fue de 28,4 g (día 1). Los pesos mínimos y máximos del grupo se encontraban dentro de un intervalo de ± 20 % de peso medio del grupo; Período de aclimatación: 5-10 días; Identificación: Tres muescas de posición en las orejas y tarjetas de las jaulas. Ningún animal se encontró en condición moribunda o demostró un dolor grave y signos duraderos de aflicción grave. El día de la cirugía se definió como el «DÍA 0» en este estudio. El día de la cirugía se indujo anestesia mediante isoflurano al 1,5 a 3,0 %, N2O al 1,5 % y O2 al 0,5 %.

30 Artículos de prueba: Células madre mesenquimales de la médula ósea humanas (Lonza Cologne GmbH). Vehículos: DMEM + FCS al 10 %, Opcional: 10 μ M de blebistatina (BB).

35 Bajo los efectos de la anestesia, el ratón se colocó con el lado ventral hacia arriba. Se realizó una incisión de 0,5-1,0 cm en la piel en el área inguinal. La arteria femoral se ligó dos veces con hilo de seda 6-0 y se seccionaron transversalmente entre las ligaduras. La herida se cerró con hilo de seda 4-0 y se permitió que el ratón se recuperara.

40 El DÍA 1, 24 horas después de la cirugía, cada animal tratado recibió una inyección intramuscular en dos sitios (el lado proximal y distal de la herida quirúrgica) o intravenosa en la vena de la cola. Para la inyección intramuscular, se inyectó a los animales 50 μ l en cada sitio, en total 100 μ l por animal. Para la inyección intravenosa, se inyectó a los animales 200 μ l por animal. Véase la Tabla 1 para consultar la distribución de los grupos.

Tabla 1 Distribución de los grupos

| Grupo | Cantidad de animales | Tratamiento (lote) | Día del tratamiento | Cantidad de células | Vía de administración: |
|-------|----------------------|---|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1 | 15 | DMEM | (24 horas después de la cirugía) | 0 | i.m. en 2 sitios |
| 2 | 17 | DMEM + BB 10 µM | | 0 | |
| 3 | 15 | BM.MSC en DMEM | | 0,25x10 ⁵ en 0,1 mL | |
| 4 | 15 | BM.MSC en DMEM + BB 10µM | | 0,25x10 ⁵ en 0,1 mL | |
| 5 | 15 | BM.MSC tratadas previamente con BB inyectadas en DMEM | | 0,25x10 ⁵ en 0,1 mL | |
| 6 | 15 | DMEM | | 0 | i.v en lavena de la cola |
| 7 | 15 | DMEM + BB 10 µM | | 0 | |
| 8 | 15 | BM.MSC en DMEM | | 0,25x10 ⁵ en 0,2 mL | |
| 9 | 15 | BM.MSC en DMEM + 10 µM de BB | | 0,25x10 ⁵ en 0,2 mL | |
| 10 | 15 | BM.MSC tratadas previamente con BB inyectadas en DMEM | | 0,25x10 ⁵ en 0,2 mL | |

El peso corporal se midió en el día de estudio -1 antes de la cirugía y después una vez por semana. Medición del flujo sanguíneo: Se midió el flujo sanguíneo en las piernas de ambos lados con un Doppler láser sin contacto, antes de la cirugía y los días: 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 35 después de la operación. Las mediciones del flujo sanguíneo se expresaron como la relación del flujo en la extremidad isquémica con respecto al flujo en la extremidad normal (Goto et al. Tokai J Exp Clin Med., Vol. 31, n.º 3, pp. 128-132, 2006). Sistemáticamente, la mejor regeneración se dio en los animales del Grupo 4 tratados con MSC + BB (Fig. 1). Evaluación macroscópica de la gravedad isquémica: La evaluación macroscópica de la extremidad isquémica se realizó una vez a la semana después de la operación mediante el uso de grados morfológicos para el área necrótica (Goto et al.): Véase la tabla 2.

Tabla 2 Grados morfológicos para el área necrótica

| Grado | Descripción |
|-------|--|
| 0 | ausencia de necrosis |
| 1 | necrosis limitada a los dedos (pérdida de dedos) |
| 2 | necrosis extendida al dorso de la pata (pérdida de la pata) |
| 3 | necrosis que se extiende hasta una pierna (pérdida de la rodilla) |
| 4 | necrosis que se extiende hasta un muslo (pérdida total de la extremidad posterior) |

Evaluación in vivo de la función de las extremidades y el daño isquémico. Se realizó una evaluación semicuantitativa del uso disminuido de la extremidad isquémica una vez a la semana después de la cirugía mediante el uso de la siguiente escala (Stabile et al., Circulation. 2003;15;108(2):205-210). Véase la tabla 3.

Tabla 3 Evaluaciones de la función de las extremidades

| Grado | Descripción |
|-------|---|
| 0 | flexión de los dedos para resistir el movimiento suave de la cola |
| 1 | flexión plantar |
| 2 | sin arrastre pero sin flexión plantar |
| 3 | arrastre de pata |

La función de las extremidades se califica como «no aplicable» en caso de amputación parcial o total de las extremidades. En ese caso, las mediciones del flujo sanguíneo no se incluyeron en el análisis estadístico.

- 5 Evaluación in vivo de la función de las extremidades. Se realizó una evaluación semicuantitativa del uso disminuido de la extremidad isquémica los días 7 a 35 mediante el uso de escalas funcionales en grados. Se encontró una mejora en la función de las extremidades a partir del día 14 en animales del grupo 4 tratados con células en comparación con los grupos de animales de control 1 y 2 (Fig. 2A). Esa mejora se encontró en los grupos de animales 3 y 5 el día 35 después de la isquemia. En los animales a los que se administró el artículo de prueba por vía intravenosa, se encontró una mejora en la función de las extremidades a partir del día 28 en el grupo 9 en comparación con los grupos de control 6 y 7 (Fig. 2B).

EJEMPLO 2 - Análisis estadístico

El objetivo de este estudio fue analizar la eficacia de las células madre examinadas como un posible tratamiento para aliviar los síntomas de la HLI en un modelo de ratón lampiño animal.

- 15 Los criterios de valoración del estudio fueron: Índice clínico; Mediciones del peso corporal; Mediciones del flujo sanguíneo

20 Análisis de clasificación: A cada grupo se le asignó una clasificación de 1 a 10 en cada uno de los 3 primeros criterios de valoración medidos (% de flujo sanguíneo, función de las extremidades e índice de gravedad isquémica). La clasificación = 1 es la más alta y la clasificación = 10 es la más baja. Cuando dos grupos están igualados, ambos reciben la misma clasificación «en el medio»; por ejemplo, si dos grupos estaban igualados en la Clasificación = 4, ambos recibían el índice 4,5 (que multiplicado por dos es igual a la suma de los índices 4 y 5). Para cada criterio de valoración, se calculó la mediana para cada grupo (la mediana se usó para asegurarse que el valor extremo no afectara los resultados). En cada criterio de valoración, los grupos se ordenaron por mediana y a cada uno se le asignó su clasificación respectiva. Se calculó la clasificación promedio para cada grupo con respecto a todos los criterios de valoración.

25 Se realizó un análisis estadístico mediante el uso del modelo mixto en SAS®. Las principales comparaciones presentadas son entre los dos tratamientos más eficaces y todos los demás. En la presente se proporcionan los resultados completos del análisis estadístico. Los valores P que se proporcionan en el informe y en los anexos no están ajustados por multiplicidad. Para determinar la significancia, úsease $P < 0,0056$. Existen muchas maneras de realizar ajustes aquí para un análisis múltiple en función de la interpretación de análisis que son significativos y aquellos que no lo son. Dado que esto es un ensayo exploratorio, se decidió que el ajuste se consideraría dentro de cada grupo por separado. De esta manera, por ejemplo, el Grupo 4 se comparó con otros 9 grupos de forma tal que se determinó que un resultado significativo es $P < 0,05/9 = 0,0056$.

35 Pendiente: La pendiente calculada corresponde a la tendencia lineal desde la cirugía hasta el Día 35. Este número individual para cada animal representa su cambio en un criterio de valoración a lo largo del tiempo. Se proporciona la distribución de pendientes para cada grupo en cada uno de los criterios de valoración (excluido el peso), mediante el uso de diagramas de caja. Estos diagramas proporcionan un método conveniente para presentar muchos grupos en un único gráfico. Esto se debería leer de la siguiente manera: el 25 % de los puntos de datos (en este caso, las pendientes) se encuentra entre la bisagra inferior y la parte de abajo de la caja—percentiles 0 a 25; 50 % de los puntos de datos se ubican entre la parte de abajo y la parte de arriba de la caja—percentiles 25 a 75. Esto también se denomina «rango intercuartílico» (IQR, por sus siglas en inglés). El 25 % de los puntos de datos se ubican entre la parte de arriba de la caja y la bisagra superior—percentiles 75 a 100. Sin embargo, las vallas superior e inferior están definidas por una distancia de $1,5 \times \text{IQR}$ desde la parte de abajo y de arriba de la caja. Si bien no se muestran efectivamente en el diagrama, los valores por fuera de estas vallas se consideran atípicos. Así que, si existen puntos de datos por encima de la valla superior, o por debajo de la valla inferior, estos se indican por separado en el diagrama de caja; en otras palabras, los puntos extremos no se incluyen entre las bisagras inferior y superior del diagrama de caja.

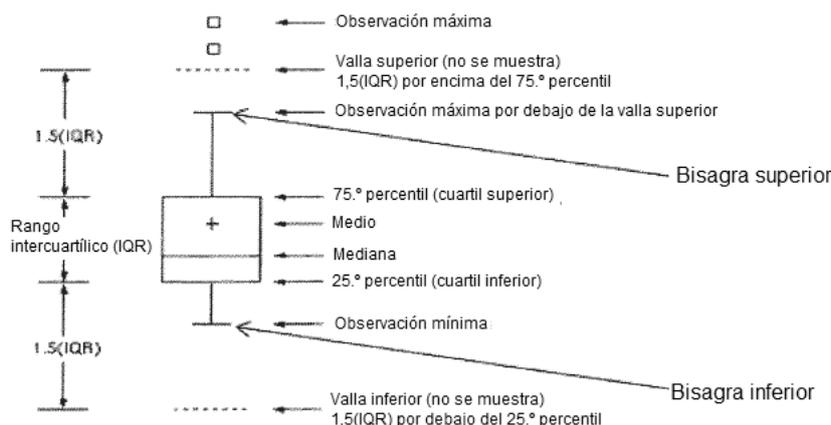


Tabla 4 Disposición de los animales

| Grupo de tratamiento | Disposición | | | | | | Total | |
|----------------------------------|------------------------|------|------------------------|------|--------------------------|------|-------|-------|
| | Excluidos ¹ | | Imputados ² | | Completados ³ | | | |
| | N | % | N | % | N | % | N | % |
| (1) DMEM(im) | 1 | 6,7 | 1 | 6,7 | 13 | 86,7 | 15 | 100,0 |
| (2) DMEM+BB (im) | 3 | 17,6 | 0 | 0 | 14 | 82,4 | 17 | 100,0 |
| (3) BM.MSC en DMEM (im) | 0 | 0 | 6 | 40,0 | 9 | 60,0 | 15 | 100,0 |
| (4) BM.MSC en DMEM+BB (im) | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| (5) BM.MSC en DMEM, pre-BB (im) | 0 | 0 | 1 | 6,7 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| (6) DMEM (iv) | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| (7) DMEM+BB (iv) | 1 | 6,7 | 0 | 0 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| (8) BM.MSC en DMEM (iv) | 0 | 0 | 5 | 33,3 | 10 | 66,7 | 15 | 100,0 |
| (9) BM.MSC en DMEM+BB (tv) | 0 | 0 | 1 | 6,7 | 14 | 93,3 | 15 | 100,0 |
| (10) BM.MSC en DMEM, pre-BB (iv) | 2 | 13,3 | 7 | 46,7 | 6 | 40,0 | 15 | 100,0 |
| Total | 9 | 5,9 | 21 | 13,8 | 12,2 | 80,3 | 152 | 100,0 |

1. Excluidos de todos los análisis adicionales debido a:

- 5 a) la amputación antes o durante el día 14 después de la cirugía - atribuida a la falla del modelo,
- b) muerte no relacionada con el tratamiento.

2. Imputados debido a la amputación después del día 14, es decir, a partir del día 21 - atribuida a la falla del tratamiento.

3. Completaron el seguimiento de 35 días.

- 10 En análisis adicionales, la imputación de los datos faltantes se realiza de la siguiente manera: Flujo sanguíneo (%): Valor de la primera medición después de la cirugía (se asume que el tratamiento falló por lo que no hay ninguna mejora más allá de lo que se observó inmediatamente después de la cirugía); Índice de gravedad isquémica: 1 = «Pérdida total de las extremidades posteriores» (el peor índice posible); Función de las extremidades: 3 = «Arrastre de la pata» (el peor índice posible); Peso (g): El peso más bajo del animal en cualquiera de las instancias en que se midió hasta el
- 15 día de la amputación inclusive.

Si bien se realizaron comparaciones por pares, los resultados centrales se muestran de manera tal que sean pertinentes desde el punto de vista estadístico y se puedan ilustrar claramente en los gráficos. Los datos son coherentes a través de los criterios de valoración y son coherentes a través de los diferentes análisis. Para obtener esta imagen, se eliminó el peso de la consideración. Los análisis y las estadísticas descriptivas indicaron que el peso

20 no fue una medida significativa de la eficacia en el modelo. Cada grupo se clasificó en cuanto a los 3 criterios de valoración restantes el día 35 y en la Clasificación promedio de los grupos evaluada - una medición que combina los

resultados de todos los criterios de valoración.

5 Evaluación de todos los parámetros de manera simultánea el día 35. Procedimiento: Para cada parámetro (flujo sanguíneo (%), función de las extremidades e índice de gravedad isquémica), se calculó la mediana en el grupo en todos los animales. Se clasificaron todos los grupos basados en su mediana de 1 a 10, donde 1 es el mejor valor, en cada uno de los siguientes parámetros: Flujo sanguíneo (%)—el valor más alto es 1, el valor más bajo es 10; Función de las extremidades—el valor más alto es 10, el valor más bajo es 1 (la peor categoría es 3, la mejor es 0); Índice de gravedad isquémica—el valor más alto es 10, el valor más bajo es 1 (la peor categoría es 4, la mejor es 0); Finalmente, para cada grupo se calculó la clasificación promedio de los tres parámetros.

Tabla 5 Clasificación de los grupos de tratamiento el día = 35, datos imputados

| Grupo | Flujo sanguíneo (%) | Función de las extremidades | Índice de gravedad isquémica | Clasificación promedio | Factor * | Factor 2 ** |
|--|---------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|----------|-------------|
| (4) Tratamiento: BM.MSC en DMEM+BB (im) | 1 | 1 | 1,5 | 1,2 | | |
| (5) Tratamiento: BM.MSC en DMEM, pre-BB (im) | 3 | 5 | 1,5 | 3,2 | 2,0 | 2,0 |
| (9) Tratamiento: BM.MSC en DMEM+BB (iv) | 2 | 5 | 6 | 4,3 | 3,2 | 1,2 |
| (3) Control positivo: BMMSC en DMEM | 4 | 5 | 6 | 5,0 | 3,8 | 0,7 |
| (2) Control negativo: DMEM+BB (im) | 6,5 | 5 | 6 | 5,8 | 4,7 | 0,8 |
| (7) Control negativo: DMEM+BB (iv) | 6,5 | 5 | 6 | 5,8 | 4,7 | 0,0 |
| (6) Control negativo: DMEM (iv) | 8 | 5 | 6 | 6,3 | 5,2 | 0,5 |
| (1) Control negativo: DMEM (im) | 9 | 5 | 6 | 6,7 | 5,5 | 0,3 |
| (8) Control positivo: BM.MSC en DMEM | 5 | 9,5 | 6 | 6,8 | 5,7 | 0,2 |
| (10) Tratamiento: BMMSC en DMEM, pre-BB (iv) | 10 | 9,5 | 10 | 9,8 | 8,7 | 3,0 |

10 Se usó la mediana por grupo de tratamiento

* Factor por el cual la clasificación promedio difiere del grupo con mejor clasificación (4)

** Factor 2 - Diferencia entre las clasificaciones de grupos con clasificaciones adyacentes

A partir de la tabla, se puede observar que existen cuatro magnitudes generales de clasificación:

15 El grupo 4 (BM.MSC en DMEM+BB (im)) tiene la clasificación más alta y se encuentra muy por delante del 2.º grupo con mayor eficacia (5): Clasificación promedio = 1,2, la diferencia con respecto al grupo siguiente es de 2.

El grupo 5 está muy por detrás del Grupo (tal como se indica en la viñeta anterior) pero por delante de los grupos que lo siguen. Específicamente, se encuentra 1,2 puntos por encima del 3.º grupo más eficaz (9).

Los siguientes siete grupos (9, 3, 2, 7, 6, 1 y 8) se encuentran en la 3.ª categoría con una diferencia entre la mejor y la peor - 2,5 (6,8-4,3), que es menor de manera equivalente a la distancia entre el 1.º y 3.º lugar (3,1).

20 Grupo 10 (BM.MSC en DMEM, pre-BB (iv)) se encuentra muy por detrás del «bloque de los siete grupos» en la viñeta anterior - 3 puntos. Cabe señalar que el Grupo 10 resultó ser especialmente ineficaz debido a una gran cantidad de amputaciones y, por lo tanto, se imputaron valores ineficaces para el Día 35.

En la Tabla 6, se ilustran los resultados del Análisis de significancia. Los dos mejores grupos se comparan con todos los demás en todos los criterios de valoración.

25

Tabla 6 Comparaciones por pares, Grupos 4 y 5 en comparación con todos los demás, datos imputados

| Grupo de tratamiento | Flujo sanguíneo (%) | | Función de las extremidades | | Índice de gravedad isquémica | |
|---|---------------------|----------|-----------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | (4) | (5) | (4) | (5) | (4) | (5) |
| (1) Control negativo: DMEM (im) | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,0014 | 0,9614 | 0,0208 | 0,2723 |
| (2) Control negativo: DMEM+BB (im) | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,2760 | 0,0509 | 0,4688 |
| (3) Control positivo: BM.MSC en DMEM (im) | < 0,0001 | 0,0034 | < 0,0001 | 0,4911 | < 0,0001 | 0,0008 |
| (4) Tratamiento: BM.MSC en DMEM+BB (im) | — | 0,0001 | — | 0,0010 | — | 0,2036 |
| (5) Tratamiento: BM.MSC en DMEM, pre-BB (im) | 0,0001 | — | 0,0010 | — | 0,2036 | — |
| (6) Control negativo: DMEM (iv) | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,0709 | 0,0025 | 0,0660 |
| (7) Control negativo: DMEM+BB (iv) | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | 0,0208 | < 0,0001 | 0,0050 |
| (8) Control positivo: BM.MSC en DMEM (iv) | 0,0002 | 0,9142 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |
| (9) Tratamiento: BM.MSC en DMEM+BB (iv) | 0,0002 | 0,9442 | < 0,0001 | 0,4314 | 0,0003 | 0,0137 |
| (10) Tratamiento: BM.MSC en DMEM, pre-BB (iv) | < 0,0001 | 0,7473 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Nota: Los valores P menores que 0,05 se encuentran subrayados.

- 5 La angiogénesis obstaculizada es una de las características de las enfermedades isquémicas. Sin embargo, los ensayos clínicos para aliviar la isquemia han sido decepcionantes, lo cual indica la necesidad de nuevas moléculas y objetivos terapéuticos para tratar las enfermedades isquémicas. La terapia de células madre es una estrategia auspiciosa en la medicina cardiovascular. Con el fin de evaluar la actividad terapéutica de las células madre en el tejido isquémico, se usa el modelo de isquemia de las extremidades posteriores en ratones.
- 10 En la presente memoria se describe que las MSC mostraron un potencial regenerativo en un modelo de ratón animal, mientras que la sustancia Blebistatina por sí sola no tuvo ningún efecto beneficioso. Esto validó el modelo.
- 15 En estos experimentos, una única administración IV o local en la extremidad isquémica de las células analizadas restauró de manera sorprendente e inesperada la perfusión sanguínea hasta el 65-84 % de sus valores normales. La restauración del flujo sanguíneo fue compatible con otros resultados que mostraron una mejora en la función de las extremidades y una disminución y demora de la gravedad isquémica en el modelo de isquemia de las extremidades posteriores en ratones. Este efecto se logró en los grupos tratados con células analizadas localmente (grupos 4 y 5) o por vía intravenosa (grupo 9).
- 20 La blebistatina aceleró drásticamente la regeneración de tejidos dañados desencadenada por las MSC. La aplicación de la blebistatina con MSC reduce drásticamente las complicaciones graves en la curación tal como lo demostró claramente el Grupo 4 (BM.MSC en DMEM + BB (im)) que tiene mayor eficacia que todos los grupos en el % de flujo sanguíneo y la función de las extremidades, incluido el grupo 5 BM.MSC en DMEM, pre-BB (im). Además, la blebistatina mejora drásticamente el potencial regenerativo de las MSC al reducir las complicaciones graves en la curación.
- 25 El Grupo 4 (BM.MSC en DMEM + BB (im)) tiene mayor eficacia que todos los grupos en el % de flujo sanguíneo y la función de las extremidades, incluido el grupo 5 BM.MSC en DMEM, pre-BB (im).
- 30 Los resultados que se presentan en la presente demuestran que la aplicación de BM.MSC en presencia de la blebistatina proporciona la mayor eficacia cuando se aplica de manera intramuscular. Esta aplicación combinada mostró la recuperación más rápida de la lesión, lo cual derivó en el tratamiento más eficaz. La variación relativamente pequeña en el mejor grupo indica el carácter sistemático de la eficacia en todos los animales. A menos que se defina lo contrario, todo término técnico y científico, y cualquier acrónimo que se use en la presente, tiene el mismo significado que le asigna normalmente el experto en la técnica en el campo de la presente invención. Si bien se puede usar cualquier composición, método, kit y medio para la comunicación de información similar o equivalente a los que se describen en la presente para poner en práctica esta invención, las composiciones, los métodos, los kits y los medios para la comunicación de información preferidos son los que se describen en la presente.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una población de células madre y blebistatina para uso en el tratamiento de una enfermedad susceptible de tratamiento con terapia de células madre.
- 5 2. Composición para uso según la reivindicación 1, donde la enfermedad se selecciona del grupo de una enfermedad que sea consecuencia de la diabetes, una enfermedad que sea consecuencia de la aterosclerosis, una enfermedad vascular, una enfermedad arterial periférica (PAD).
3. Composición para uso según la reivindicación 1 o 2, donde la enfermedad está asociada a un índice de presión tobillo-brazo de aproximadamente o menos de 0,9 o un índice de presión tobillo-brazo de aproximadamente o menos de 0,7.
- 10 4. Composición para uso según las reivindicaciones 1 a 3, donde la enfermedad ha derivado en una isquemia crítica de las extremidades y/o la enfermedad ha derivado en ulceraciones en la piel o gangrena.
5. Composición para uso según las reivindicaciones 1 a 4, donde una parte de la población de las células comprende células pluripotentes y/o donde las células pluripotentes se inducen células madre pluripotentes y/o donde una parte de la población de las células comprende células multipotentes y/o donde las células multipotentes son células estromales multipotentes o células madre mesenquimales y/o donde las células multipotentes derivan de células madre pluripotentes inducidas.
- 15 6. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las células madre son MSC.
7. Un kit para tratar una enfermedad susceptible de tratamiento con una terapia de células madre que comprende:
 - a. blebistatina;
 - 20 b. un portador farmacéuticamente aceptable;
 - c. una población de células madre; y
 - d. opcionalmente, instrucciones para administrar los artículos (a)-(c) a un paciente diagnosticado con una enfermedad cardiovascular.
8. El kit de la reivindicación 7, donde las células son células multipotentes.
- 25 9. El kit de la reivindicación 7, donde las células son MSC.

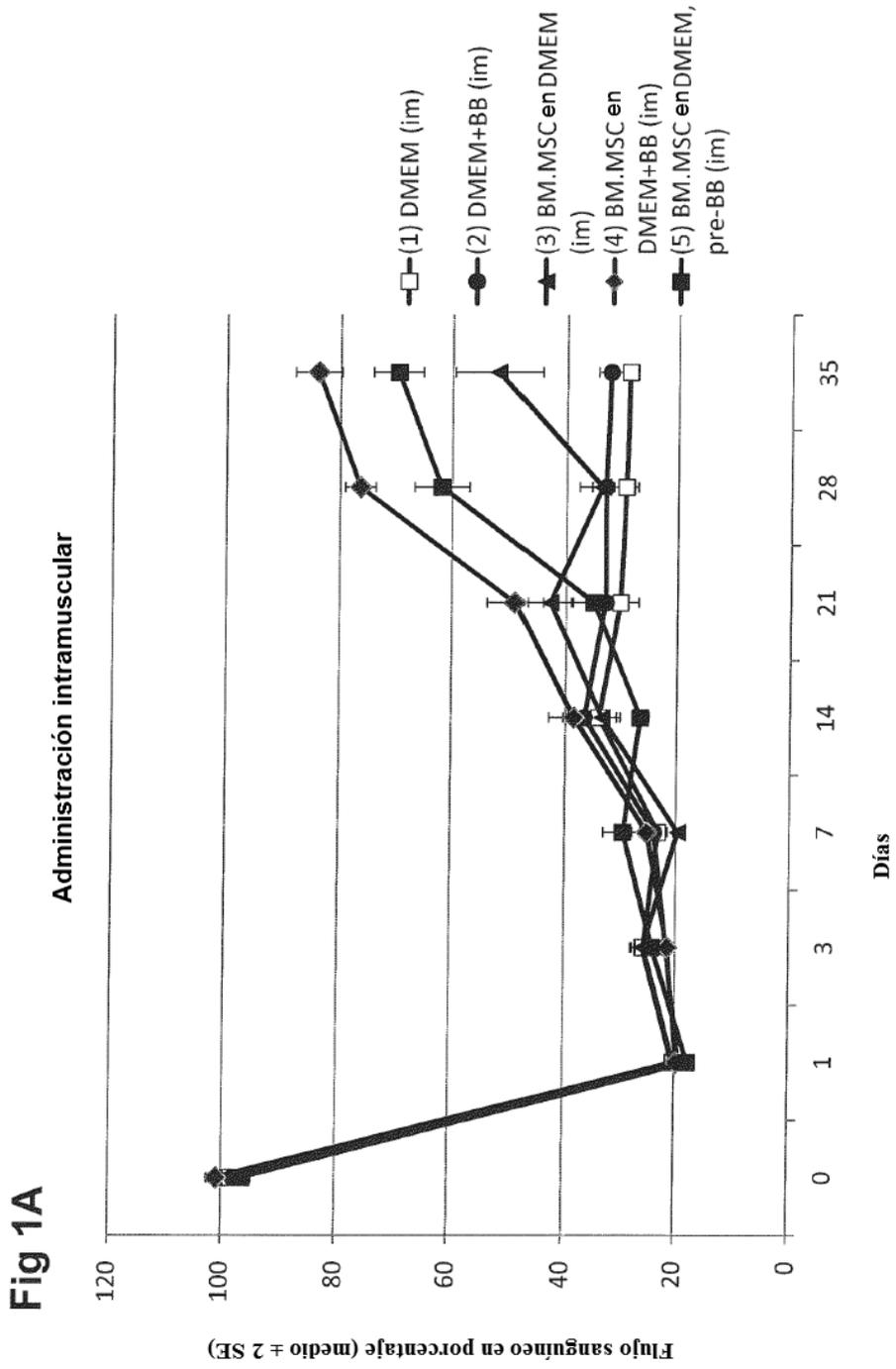
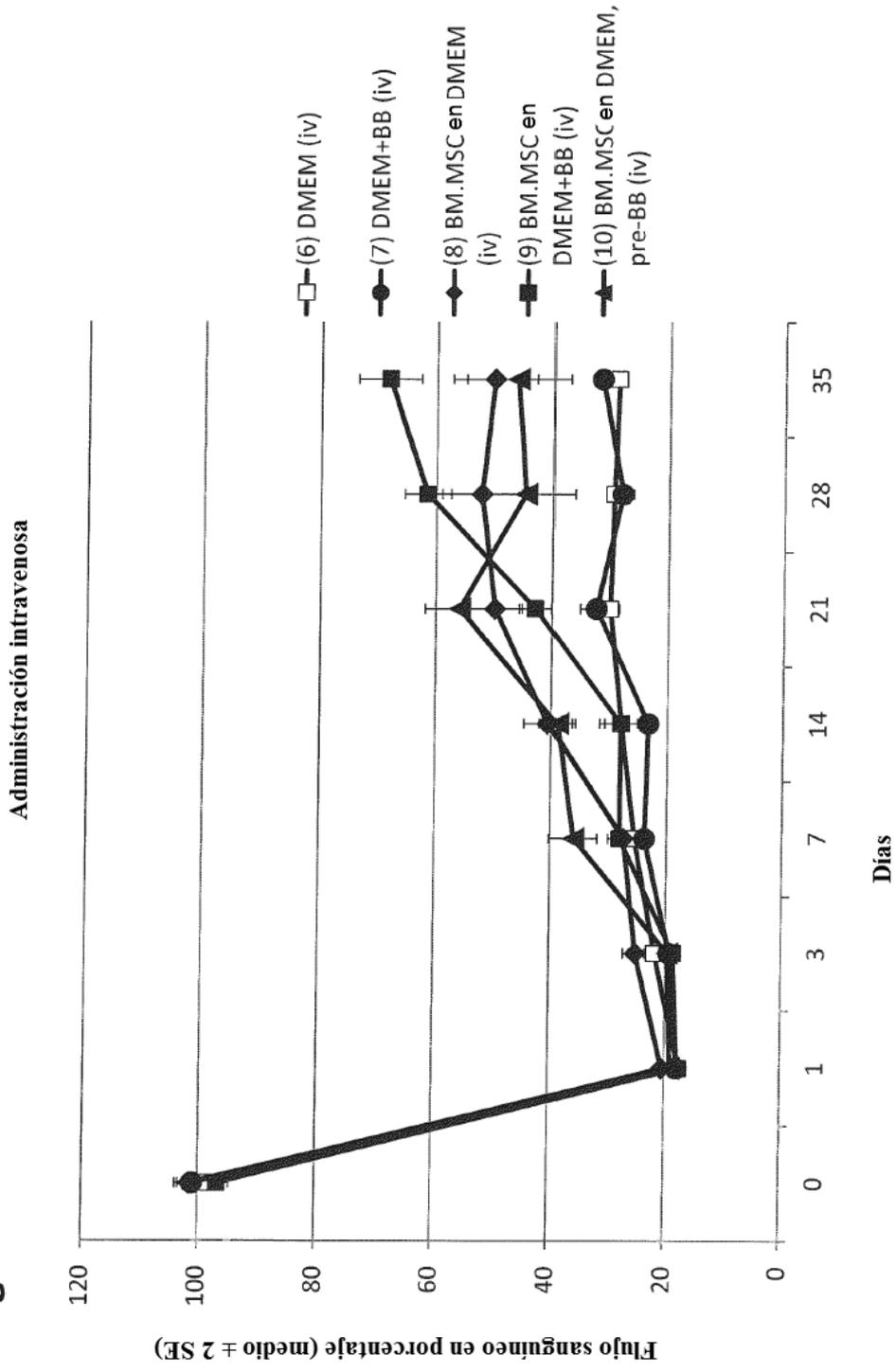


Fig 1B



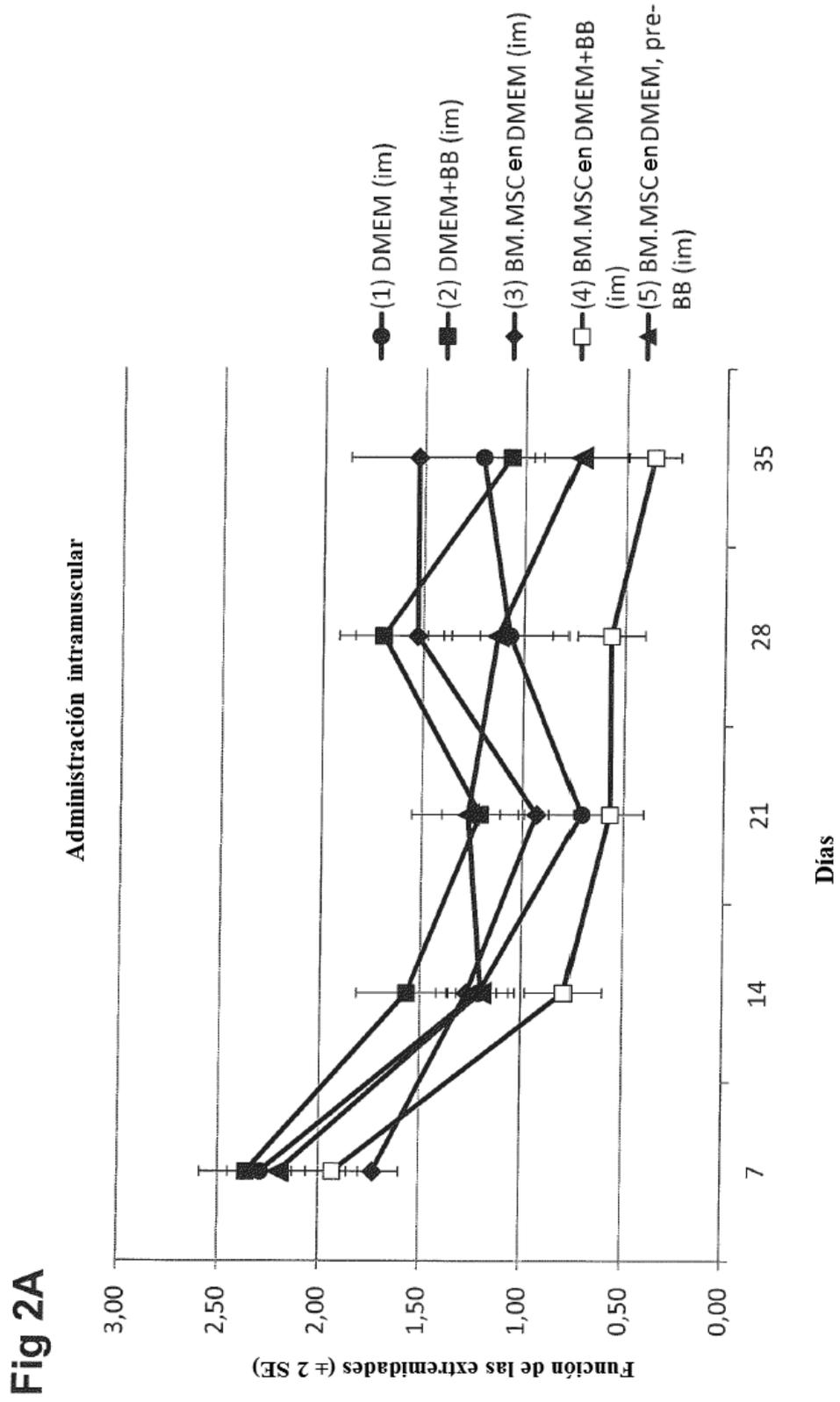


Fig 2B

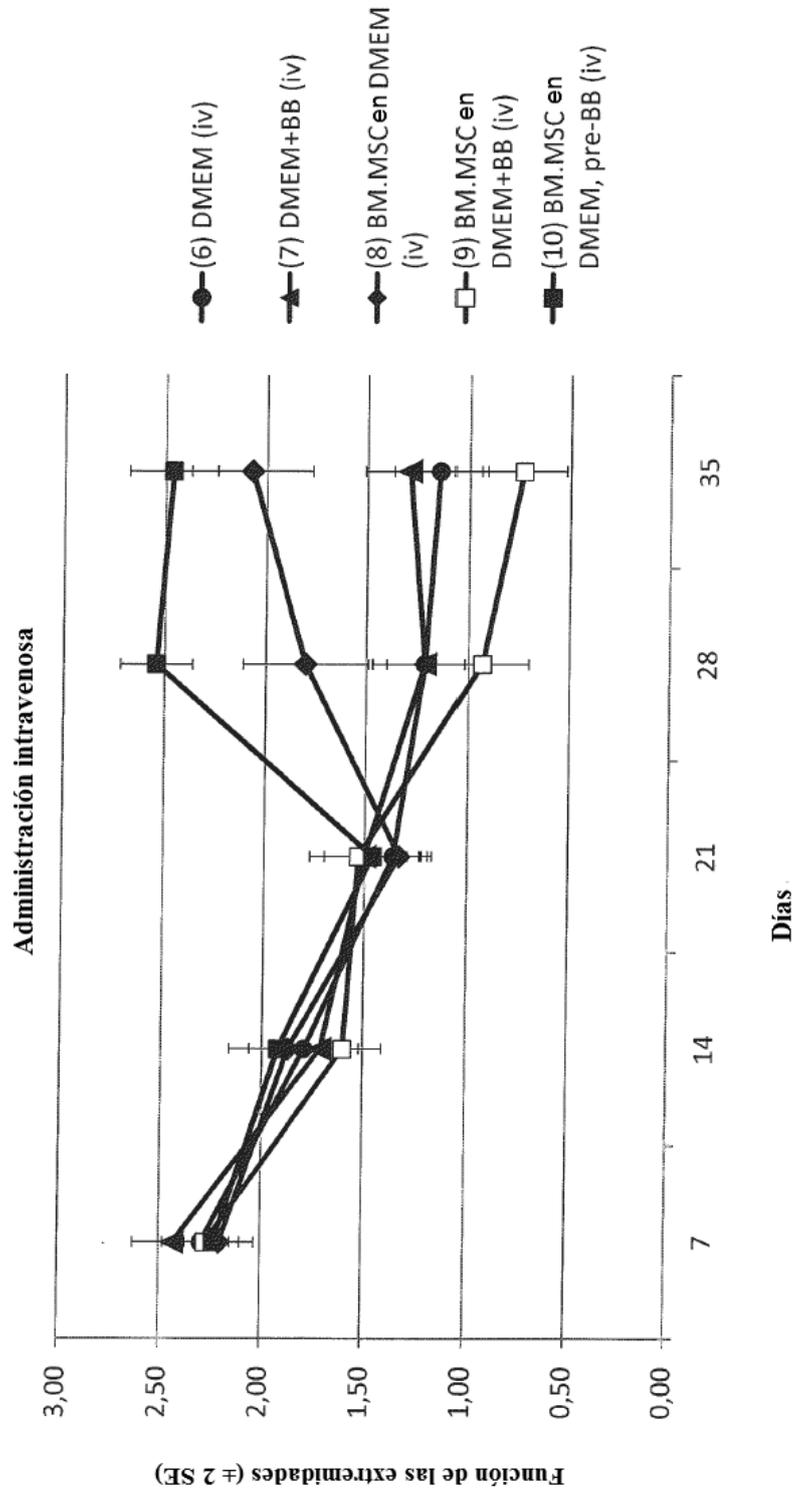
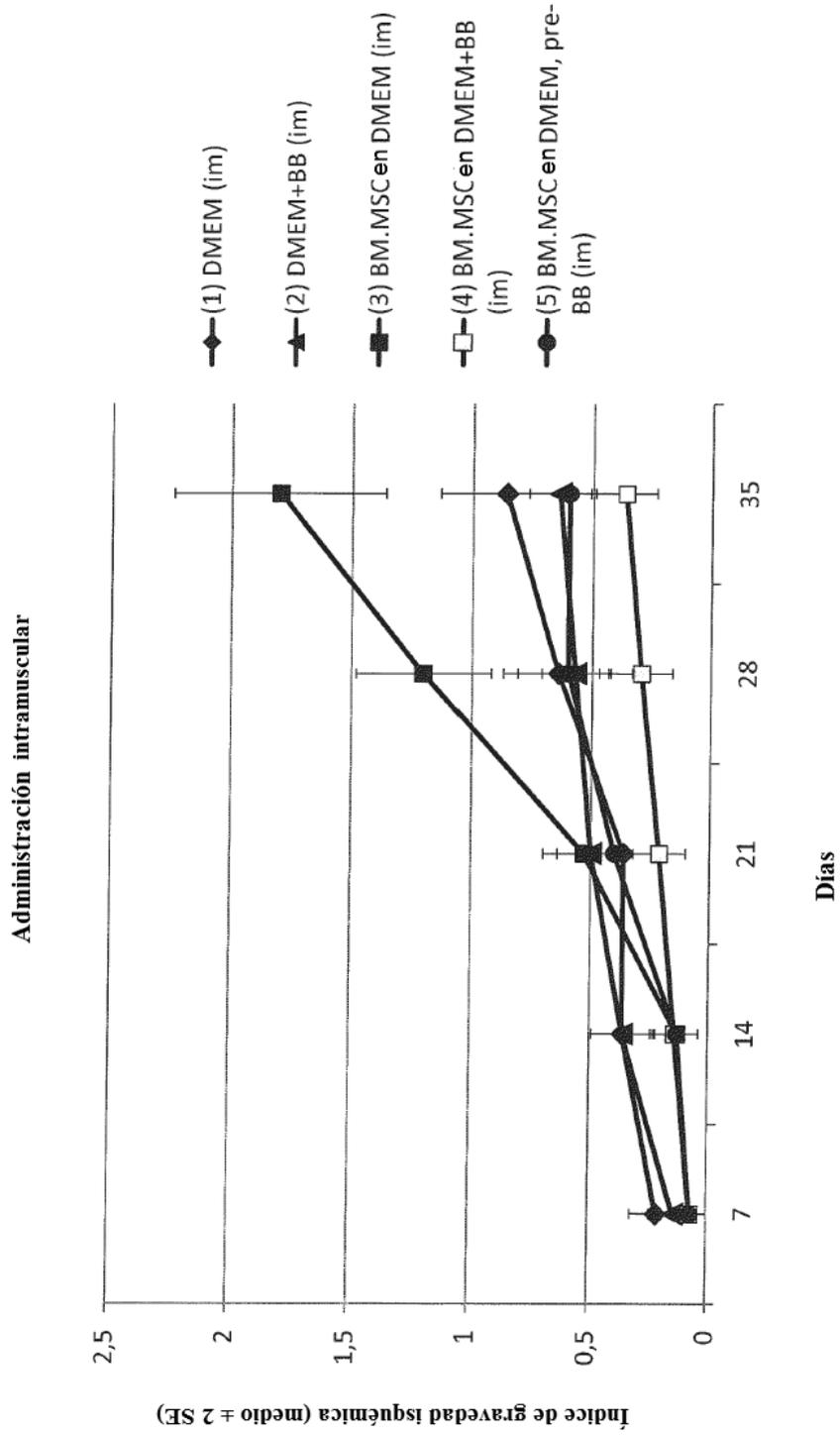
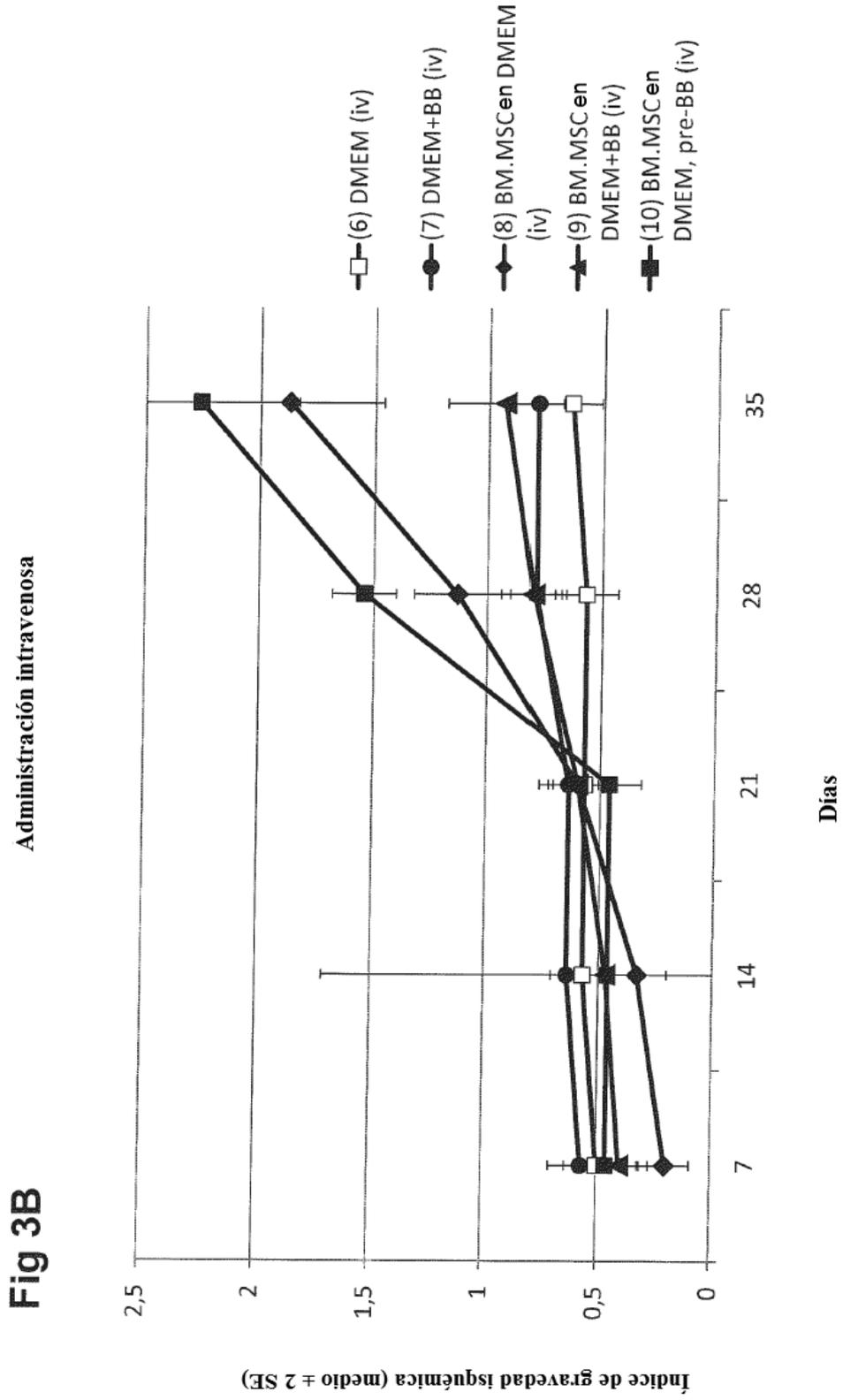


Fig 3A





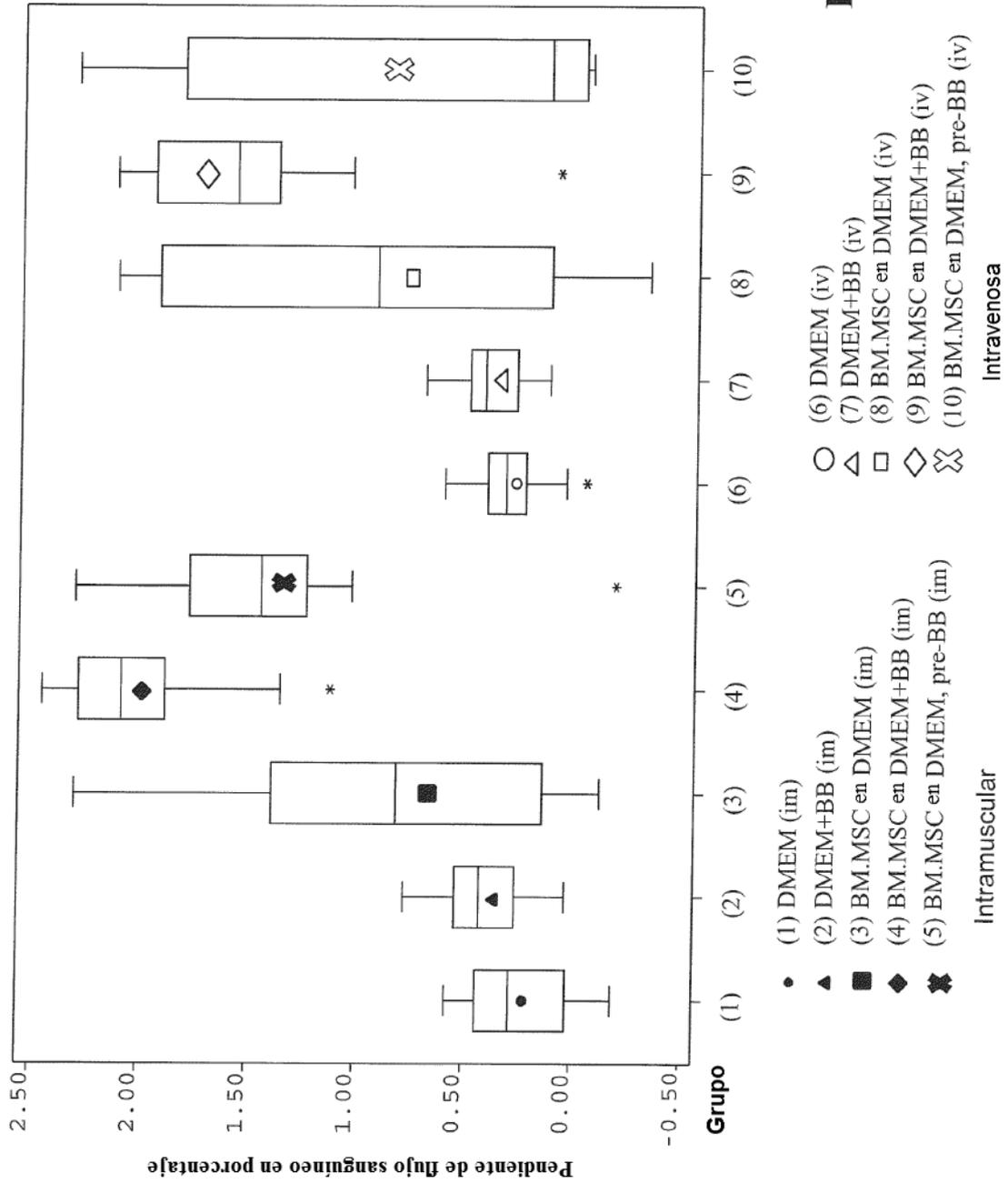
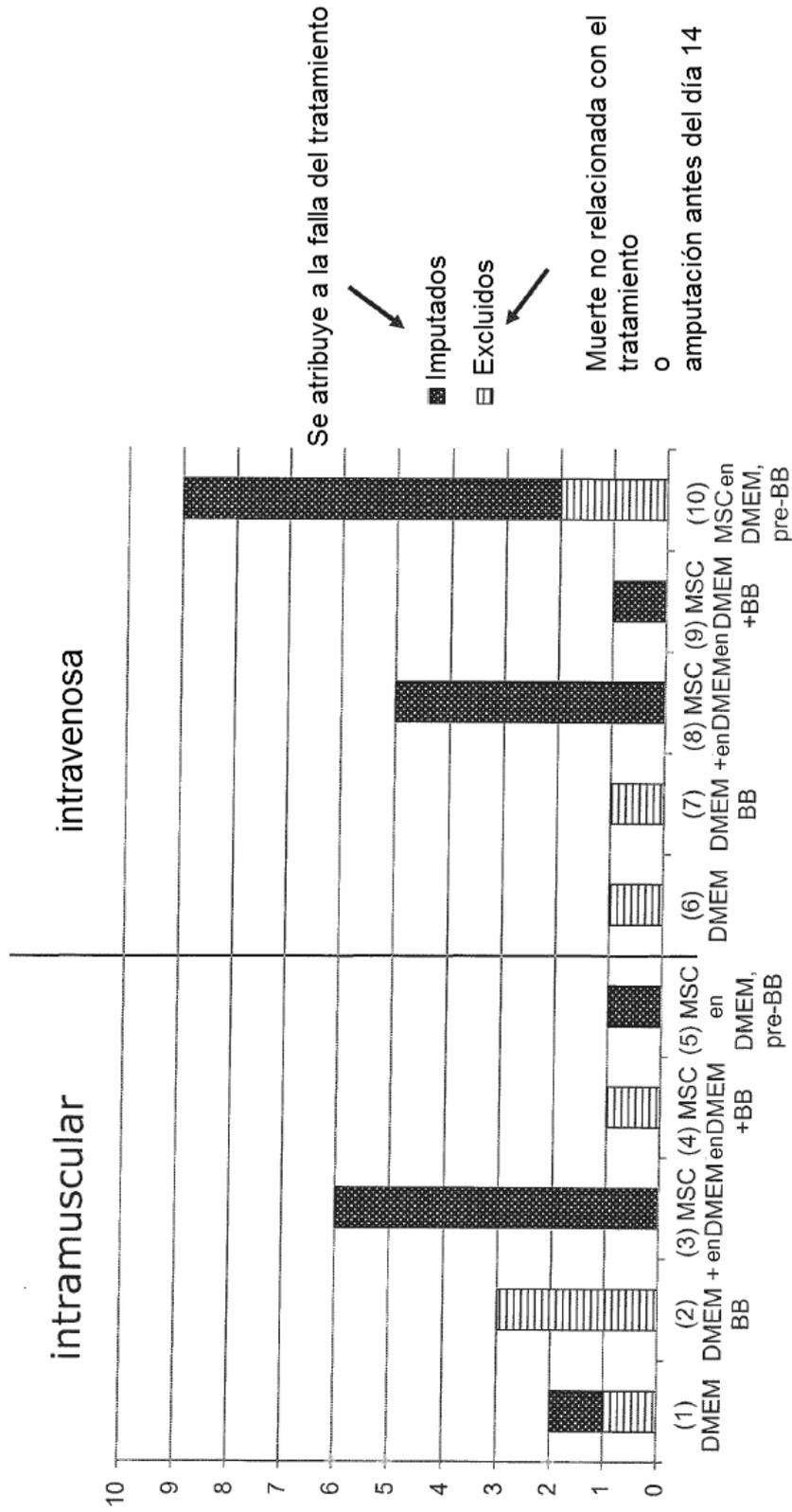


Fig 4

Fig 5 Proporción de deserción en el estudio



La blebistatina reduce la tasa de complicaciones graves (amputación) del tratamiento con MSC