

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 241**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/00** (2006.01)

**A61K 35/28** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12N 5/0789** (2010.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/US2010/053744**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO2011050266**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10825743 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2491114**

54 Título: **Composiciones y usos para el tratamiento de lesiones miocárdicas progresivas debidas a una insuficiencia vascular**

30 Prioridad:

**23.10.2009 US 254539 P**

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

**26.04.2017**

73 Titular/es:

**AMORCYTE, INC. (100.0%)  
21 Main Street Court Plaza South East Wing,  
Suite 304  
Hackensack, NJ 07601, US**

72 Inventor/es:

**PECORA, ANDREW L. y  
PRETI, ROBERT A.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 610 241 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 usos para el tratamiento de lesiones miocárdicas progresivas debidas a una insuficiencia vascular**

5

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud de Estados Unidos Núm. 11/552,396 (presentada el 24 de octubre de 2006), que se expidió como Patente de Estados Unidos Núm. 7.794.705, U.S. 12/401.291 (presentada el 10 de marzo de 2009), que es una solicitud divisional de la Solicitud 11/552.396, solicitudes provisionales de Estados Unidos Núm. 61/119.552 (presentada el 3 de diciembre de 2008) y U.S. 61/169.850 (presentada el 16 de abril de 2009).

10

**Campo de la invención**

15

La invención descrita se refiere a composiciones que comprenden un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas y métodos de uso de las mismas para el tratamiento de consecuencias adversas tempranas o tardías de la insuficiencia vascular.

20

**Antecedentes de la invención**

## El ciclo cardíaco

25

El término "ciclo cardíaco" se utiliza para referirse a la totalidad o cualquiera de los eventos mecánicos relacionados con el flujo sanguíneo coronario o la presión arterial que se produce desde el comienzo de un latido del corazón hasta el comienzo del siguiente. La presión arterial aumenta y disminuye a lo largo del ciclo cardíaco. La frecuencia del ciclo cardíaco es el ritmo cardíaco. Cada 'latido' individual del corazón implica cinco etapas principales: (1) "diástole tardía", que consiste en el cierre de las válvulas semilunares, la apertura de las válvulas auriculoventriculares (Av) y la relajación de todo el corazón; (2) "sístole auricular", que consiste en la contracción del miocardio de las aurículas izquierda y derecha, la apertura de las válvulas AV y el flujo de sangre desde la aurícula al ventrículo; (3) "contracción ventricular isovolumétrica", que consiste en el comienzo de la contracción de los ventrículos, las válvulas AV y semilunares se cierran, y no hay ningún cambio en el volumen; (4) "eyección ventricular", consiste en el vaciado de los ventrículos, pero todavía con contracción y las válvulas semilunares están abiertas; y (5) "relajación isovolumétrica del ventrículo", cuando la presión disminuye, la sangre no entra en los ventrículos, cesa la contracción de los ventrículos y comienzan a relajarse, y las válvulas semilunares están cerradas porque la sangre en la aorta está impeliendo su cierre. El ciclo cardíaco es coordinado por una serie de impulsos eléctricos que son producidos por las células del corazón especializadas que se encuentran dentro del nodo sinoauricular y el nodo atrioventricular.

30

35

## Flujo sanguíneo coronario

45

El flujo de sangre a través de las arterias coronarias es pulsátil, con componentes de flujo sistólico y diastólico fásico característicos. El flujo sistólico, que se refiere a la fase de contracción o bombeo del ciclo del corazón, tiene respuestas retrógradas rápidas, breves. El flujo diastólico, que se refiere a la relajación o fase de llenado del ciclo cardíaco, se produce durante la fase de relajación después de la contracción del miocardio, con un aumento brusco por encima de los niveles sistólicos y una disminución gradual en paralelo a la de las presiones diastólicas aórticas. Los cambios en el volumen de sangre coronaria intramural durante cada latido del corazón, acomodando el miocardio el cambio de volumen provocado por la contracción muscular. El flujo venoso coronario está fuera de fase con el flujo arterial coronario, que se produce predominantemente en sístole y es casi ausente durante la diástole.

50

Para cada latido del corazón, la presión arterial varía entre presión sistólica y diastólica. El término "presión sistólica" se refiere a la presión máxima en las arterias, que se produce cerca del final del ciclo cardíaco cuando los ventrículos se contraen. El término "presión diastólica" se refiere a la presión mínima en las arterias, que se produce cerca del comienzo del ciclo cardíaco cuando los ventrículos se llenan de sangre.

55

60

El flujo sanguíneo coronario no sólo es fásico sino también varía con el tipo de vaso y la ubicación en el miocardio. Las arteriolas coronarias parecen tener elementos reguladores especializados a lo largo de su longitud que operan "en serie" de una manera integrada. Un sistema de múltiples "válvulas" funcionales permite el control fino de la circulación coronaria. Las arteriolas más pequeñas se dilatan durante el estrés metabólico, lo que da como resultado la reducción de la resistencia microvascular y el aumento de la perfusión miocárdica. La estenosis o estrechamiento de un vaso sanguíneo produce resistencia al flujo sanguíneo relacionada directamente con las características morfológicas de la estenosis. A medida que la presión arteriolar aguas arriba disminuye debido a una caída de la presión de distensión a través de la estenosis, se produce dilatación miogénica de arteriolas ligeramente más grandes aguas arriba y causa una disminución adicional de la resistencia. El aumento del flujo en las arteriolas más

grandes aumenta la tensión de cizallamiento y desencadena la dilatación mediada por flujo, reduciendo adicionalmente la resistencia de esta red.

5 Las características de flujo arterial y venoso pulsátil del corazón dependen de la capacidad elástica intramiocárdica. El término "capacidad elástica" se refiere a una medida de la tendencia de un órgano hueco a resistir el retroceso hacia sus dimensiones originales después de la retirada de una fuerza de distensión o compresión. Cuanto mayor sea la capacidad elástica más elástico es el material. La capacidad elástica se calcula utilizando la siguiente ecuación, donde  $\Delta V$  es el cambio de volumen, e  $\Delta P$  es el cambio de presión:

$$10 \quad C = \Delta V / \Delta P$$

15 La capacidad del corazón como depósito es controlada por las arteriolas de resistencia al flujo de entrada vascular coronario. La resistencia de salida está relacionada con las venas cardíacas intramurales. La resistencia de los capilares intramiocárdicos influye en las respuestas tanto arteriales como venosas pero predominantemente actúa en concierto con la resistencia de salida.

20 Aproximadamente 75% de la resistencia coronaria total se produce en el sistema arterial, que comprende vasos capilares de conductancia (R1), prearteriolas (R2) y arteriolas e intramiocárdicos (R3). Las arterias coronarias epicárdicas normales en los seres humanos por lo general son de 0,3 a 5 mm de diámetro, y no ofrecen resistencia apreciable al flujo sanguíneo. Normalmente, la resistencia del gran vaso epicárdico (R1) es trivial hasta que las obstrucciones ateroscleróticas comprometen el lumen. Las arteriolas precapilares (R2), de 100 a 500  $\mu\text{m}$  de tamaño son vasos de resistencia que conectan el epicardio a los capilares del miocardio y son los principales reguladores del flujo sanguíneo coronario. Contribuyen con aproximadamente 25% a 35% a la resistencia coronaria total. Los vasos arteriolas precapilares distales (<100 micras de diámetro), el sitio principal de regulación metabólica del flujo sanguíneo coronario, son responsables de 40-50% de la resistencia a la circulación coronaria. La densa red de aproximadamente 4000 capilares por milímetro cuadrado asegura que cada uno de los miocitos sea adyacente a un capilar. Los capilares no son patentes uniformemente (es decir, abiertos; que proporcionan paso libre), debido a que los esfínteres precapilares regulan el flujo de acuerdo con las necesidades del miocardio.

30 Diversas afecciones, tales como la hipertrofia ventricular izquierda, la isquemia miocárdica, o la diabetes, pueden deteriorar la resistencia microcirculatoria (R3), amortiguando el aumento absoluto máximo del flujo coronario en los momentos de mayor demanda de oxígeno.

#### 35 Isquemia

El miocardio depende casi en su totalidad del metabolismo aeróbico, ya que las reservas de oxígeno en el corazón son escasas. El suministro de oxígeno del miocardio sube y baja en respuesta a las demandas de oxígeno (energía) del miocardio. El término "autorregulación" se refiere a la capacidad de mantener la perfusión miocárdica a niveles constantes de cara a cambiar las fuerzas propulsoras. La autorregulación mantiene la perfusión coronaria a niveles relativamente constantes a lo largo de un amplio intervalo de presión aórtica media. Cuando la presión aórtica supera sus límites superior o inferior, el flujo de sangre coronaria disminuye o aumenta proporcionalmente precipitadamente.

45 Al corazón se le tiene que suministrar una cantidad suficiente de oxígeno para evitar la hipoperfusión. Cuando no se compensa la reducción de presión de perfusión distal a la estenosis por la dilatación autorreguladora de los vasos de resistencia, se produce isquemia, es decir, una falta de suministro de sangre y oxígeno. Debido a que la zona menos suministrada generalmente es la más alejada, la isquemia aparece generalmente en las zonas más alejadas de la fuente de sangre.

50 Después de la oclusión total o casi total de una arteria coronaria, se produce la perfusión miocárdica a través de los canales colaterales, es decir, canales vasculares que interconectan las arterias epicárdicas. Los canales colaterales se pueden formar de forma aguda o pueden preexistir en un estado poco desarrollado antes de la aparición de la enfermedad de las arterias coronarias. Los canales colaterales preexistentes son estructuras de paredes finas de diámetro que varía de 20  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ , con una densidad variable entre las diferentes especies. Los canales colaterales preexistentes normalmente están cerrados y no son funcionales, ya que no existe gradiente de presión para conducir el flujo entre las arterias que conectan. Después de la oclusión coronaria, la presión distal cae precipitadamente y los canales colaterales preexistentes se abren prácticamente al instante.

60 El término "isquemia miocárdica" se refiere a una disminución en el suministro de sangre y oxígeno a las células del miocardio. El desarrollo de la isquemia miocárdica se ha atribuido a dos mecanismos: (1) aumento de la demanda de oxígeno del miocardio, y (2) disminución de la perfusión y el aporte de oxígeno miocárdico. (Willerson, J. T. et al., J. Am. Coll. Cardiol. 8(1): 245-50 (1986)). La isquemia miocárdica generalmente aparece primero y es más extensa en la región subendocárdica, ya que estas capas más profundas de miocardio están más alejadas de la fuente de la

sangre, con una mayor necesidad de oxígeno.

La isquemia transitoria, el miocardio hibernado, y el infarto de miocardio son clínicamente diferentes afecciones.

5 Isquemia transitoria. El término "isquemia transitoria", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un estrechamiento reversible (que significa que los miocitos sobreviven al insulto) de una arteria coronaria en reposo o con ejercicio donde no hay trombo o ruptura de la placa, pero donde el suministro de sangre no se puede cumplir. Cada vez que aumenta la demanda de oxígeno del corazón, se crea un desequilibrio entre la demanda y el suministro de oxígeno. La isquemia transitoria produce una cascada de eventos que comienzan con alteraciones metabólicas y bioquímicas que conducen a alteración de la relajación ventricular y disfunción diastólica, deterioro de la función sistólica, y anomalías electrocardiográficas con alteraciones del segmento ST, seguido de un aumento de presión diastólica final con asincronía ventricular izquierda, hipocinesia, acinesia, y discinesia, y en última instancia síntomas dolorosos de la angina de pecho. A pesar de que los miocitos isquémicos experimentan cambios fisiológicos y metabólicos en cuestión de segundos de la cesación del flujo coronario, lo que da como resultado la onda T y, a veces anomalías del segmento ST (pero sin elevación de las enzimas del suero), no hay resultados de muerte celular a partir de la isquemia. Kloner, R.A. y Jennings, RB, *Circulation* 104: 2981-89 (2001). Una vez que se restablece el flujo de sangre, tiene lugar una recuperación completa de la función contráctil de los miocitos.

20 Aunque la angina de pecho (dolor en el pecho) puede ser un síntoma de isquemia transitoria, por lo general la isquemia transitoria es silenciosa (que significa que está presente depresión del segmento ST de al menos 1 mm sin síntomas asociados, p.ej., dolor de pecho) en 79% de los sujetos. En la mayoría de los pacientes con angina estable, por ejemplo, el esfuerzo físico o la emoción, con el consiguiente aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial, o el estado contráctil, o cualquier combinación de los mismos, aumenta la demanda miocárdica de oxígeno sin un suministro adecuado en el suministro de oxígeno a través de arterias coronarias fuertemente estrechadas (estenosadas). Más de 40% de los pacientes con angina estable tratados con uno o más fármacos antianginosos tiene frecuentes episodios de isquemia silenciosa, que se ha demostrado que predicen un riesgo más alto de eventos coronarios y muerte cardíaca. Deedwania, PC, Carbajal, EV, *Arch. Intern. Med.* 150:2373-2382 (1991).

30 Isquemia miocárdica crónica. El término "isquemia miocárdica crónica (IMC)" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un estado prolongado de isquemia miocárdica subaguda o crónica debido al estrechamiento de un vaso sanguíneo coronario en el que el miocardio "hiberna", lo que significa que el miocardio regula a la baja o reduce su contractilidad, y por lo tanto su demanda de oxígeno miocárdico, para que coincida con la reducción de perfusión, preservando así la viabilidad celular y previniendo la necrosis miocárdica. Este miocardio hibernado es susceptible de volver a la función normal o casi normal en la restauración de un suministro adecuado de sangre. Una vez que el flujo sanguíneo coronario ha sido restaurado a su estado normal o casi normal y se resuelve la isquemia, sin embargo, el miocardio hibernado todavía no se contrae. Este desajuste de la función de flujo que da como resultado un lento retorno de la función cardíaca después de la resolución de la isquemia ha sido denominado aturdimiento. El período de tiempo para que vuelva la función es bastante variable, oscilando de días a meses, y depende de una serie de parámetros, incluyendo la duración de la lesión isquémica original, la gravedad de la isquemia durante el insulto original, y la adecuación del retorno del flujo arterial. Diversos estudios han proporcionado evidencia de inflamación en el miocardio hibernante. Heusch, G. et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:984-99 (2005). Un estudio realizado en un modelo porcino de hibernación del miocardio en el que el flujo medio en reposo de sangre coronaria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) se redujo a aproximadamente 60% del valor basal durante un período de 24 horas a cuatro semanas, detectó miocitos apoptóticos en todos los cerdos experimentales en las regiones de hibernación abastecidas por la LAD estenótica, lo que sugiere que la regulación a la baja funcional puede no ser adecuada para evitar la muerte de los miocitos gradual, en curso a través de la apoptosis en el miocardio hibernado. Chen, C, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 30:1407-1412 (1997).

50 Infarto agudo de miocardio (IAM). Otro tipo de insulto se produce en el IAM. El IAM es un cambio brusco en la luz de un vaso sanguíneo coronario que se traduce en infarto isquémico, lo que significa que continúa hasta que muere músculo cardíaco. En la inspección macroscópica, el infarto de miocardio se puede dividir en dos tipos principales: infartos transmurales, en los que la necrosis miocárdica implica el grosor completo o casi completo de la pared ventricular, e infartos subendocárdicos (no transmurales), en los que la necrosis miocárdica implica el subendocardio, el miocardio intramural, o ambos, sin que se extienda por toda la pared ventricular del epicardio. A menudo se produce la oclusión total del vaso con elevación del segmento ST debido a la formación de trombos dentro de la luz como resultado de la ruptura de la placa. El insulto isquémico prolongado da como resultado la muerte celular apoptótica y necrótica de los cardiomiocitos. Véase Kajstura, J., et al., *Lab Invest.* 74:86-107 (1996). La necrosis compromete la integridad de la membrana del sarcolema y se liberan macromoléculas intracelulares tales como marcadores cardíacos del suero, tales como troponinas y enzimas cardíacas específicas, tales como creatina quinasa sérica (CK). Además, el paciente puede experimentar cambios en el electrocardiograma (ECG) debido a daños en el espesor completo en el músculo. Un Infarto de Miocardio Con Elevación del Segmento ST (IAMCEST) es una lesión más amplia que un infarto de miocardio sin elevación del ST. La elevación del segmento

ST y las ondas Q en el ECG, dos características muy indicativas de infarto de miocardio, sólo se observan en aproximadamente la mitad de los casos de infarto de miocardio en presentación.

5 El IAM sigue siendo común con una incidencia anual notificada de 1,1 millones de casos en los Estados Unidos solamente (Antman, E. M., Braunwald, E., *Acute Myocardial Infarction*, en *Principles of Internal Medicine*, 15ª ed, Braunwald, E. et al., Eds., Nueva York: McGraw-Hill (2001)). Los datos preclínicos y clínicos demuestran que  
10 después de un infarto de miocardio, la pérdida aguda de células musculares del miocardio y la hipoperfusión de la zona limítrofe peri-infarto acompañante da como resultado una cascada de acontecimientos que causan una disminución inmediata de la función cardíaca, con el potencial para la persistencia a largo plazo. El grado de pérdida  
15 de células del miocardio depende de la duración de la oclusión de la arteria coronaria, la circulación coronaria colateral existente y el estado de la microvasculatura cardíaca. Paul et al., *Am. Heart J.* 131: 710-15 (1996); Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-1172 (1990); Sheilban, I. e. al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:464-71 (2001); Braunwald E., Bristow, M. R., *Circulation* 102: IV-14-23 (2000); Rich et al., *Am. J. Med.* 92: 7-13 (1992); Ren et al., *J. Histochem. Cytochem.* 49:71-79 (2002); Hirai, T. et al., *Circulation* 79: 791-96 (1989); Ejiri, M. et al., *J. Cardiology* 20: 31-37 (1990). Debido a que las células del miocardio no tienen prácticamente ninguna capacidad de regenerarse, el infarto de miocardio conduce a disfunción cardíaca permanente debido a la pérdida de células contráctiles del músculo y su sustitución por la cicatrización fibrótica no funcional. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53(1): 31-47 (2002). Por otra parte, la hipertrofia compensatoria del músculo cardíaco viable conduce a insuficiencia microvascular que da como resultado mayor desaparición de la función cardíaca, causando la hibernación del  
20 músculo del miocardio y la apoptosis de los miocitos hipertrofiados en la zona limítrofe peri-infarto.

Entre los supervivientes del infarto de miocardio, la función cardíaca residual se ve influenciada por el grado de remodelación ventricular (que significa cambios en el tamaño, la forma y la función, por lo general una disminución  
25 progresiva de la función, del corazón después de la lesión). Las alteraciones en la topografía ventricular (que significa la forma, la configuración, o la morfología de un ventrículo) se producen en el tejido cardíaco tanto infartado como sano después de un infarto de miocardio. Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-1172 (1990). La dilatación ventricular (es decir, un estiramiento, la ampliación o la difusión fuera del ventrículo) causa una disminución en la función cardíaca global y se ve afectado por las tensiones tamaño del infarto, curación del infarto y la pared ventricular. Los recientes esfuerzos para reducir al mínimo la remodelación han tenido éxito al limitar el  
30 tamaño del infarto mediante la rápida reperfusión (que significa la restauración del flujo sanguíneo) usando agentes trombolíticos, e intervenciones mecánicas, incluyendo, pero no limitadas a, la colocación de una endoprótesis vascular, junto con la reducción de las tensiones de la pared ventricular mediante el uso juicioso de terapias de precarga y gestión de poscarga apropiada. Independientemente de estas intervenciones, un porcentaje sustancial de los pacientes experimentan disfunción cardíaca clínicamente relevante y a largo plazo después de un infarto de  
35 miocardio. Sheiban, I. et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:464-71 (2001). A pesar de la revascularización de la circulación de la arteria relacionada con el infarto y el tratamiento médico adecuado para minimizar las tensiones de la pared ventricular, un porcentaje significativo de estos pacientes experimentan remodelación ventricular, disfunción cardíaca permanente, y por lo tanto permanecerá con un mayor riesgo de por vida de sufrir eventos cardíacos adversos, incluida la muerte. Paul et al., *Am. Heart J.* 131: 710-15 (1996); Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-1172 (1990).  
40

A nivel celular, inmediatamente después de un infarto de miocardio, se produce de manera uniforme disfunción  
45 cardíaca generalizada transitoria. En el contexto de una breve (que significa con una duración de tres minutos a cinco minutos) oclusión de la arteria coronaria, el metabolismo energético se deteriora, lo que lleva a la disfunción del músculo cardíaco demostrable que puede persistir durante un máximo de 48 horas a pesar de reperfusión inmediata. Este llamado "fenómeno de miocardio aturdido" se produce posteriormente a o después de la reperfusión y se cree que es resultado de especies reactivas del oxígeno. El proceso es transitorio y no está asociada con una respuesta inflamatoria. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53(1): 31-47 (2002). Tras la revascularización satisfactoria, la recuperación significativa del aturdimiento se produce en el plazo de tres a cuatro  
50 días, aunque la recuperación completa puede tardar mucho más. Boli, R., *Prog. Enfermedades Cardiovasculares* 40(6): 477-515 (1998); Sakata, K. et al., *Ann. Nucleic Med.* 8:153-57 (1994); Wollert, K. C. et al., *Lancet* 364: 141-48 (2004).

La oclusión de la arteria coronaria de duración más significativa, es decir, con una duración de más de cinco  
55 minutos, conduce a la isquemia miocárdica (es decir, un flujo sanguíneo insuficiente a la masa del músculo cardíaco) y se asocia con una respuesta inflamatoria significativa que comienza inmediatamente después de la reperfusión y puede durar hasta a varias semanas. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53(1): 31-47 (2002); Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 98: 687-798 (1998).

60 El proceso inflamatorio después de la reperfusión es complejo. Inicialmente contribuye al daño miocárdico, pero más tarde conduce a la curación y formación de cicatrices. Este complejo proceso parece ocurrir en dos fases. En la primera fase denominada "caliente" (en el plazo de los primeros cinco días), las especies reactivas de oxígeno (en el tejido miocárdico isquémico) y la activación del complemento generan una señal quimiotáctica para los leucocitos (quimiotaxis es el movimiento dirigido de una célula móvil, organismo o porción hacia las condiciones ambientales

que considere atractivas y/o fuera de un entorno que encuentra repelente) e inician una cascada de citoquinas. Lefler, D. J., Granger, D. N., *Am. J. Med.* 4: 315-23 (2000); Frangogiannis, N. G., et al., *Circulation* 7: 699-710 (1998). La desgranulación de los mastocitos, la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), y el aumento de la expresión de interleuquina-6 (IL-6), molécula de adhesión intercelular 1 ("ICAM-1" o CD-54, un receptor expresado normalmente en las células endoteliales y las células del sistema inmunitario), selectinas (L, E y P) e integrina (CD11a, CD11b y CD18) todos parecen contribuir a la acumulación de neutrófilos y la desgranulación en el miocardio isquémico. Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 7: 699-710 (1998), Kurrelmeyer, K. M, et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 10: 5456-61 (2000); Lasky, L. A., *Science* 258: 964-69 (1992); Ma, X. L., et al., *Circulation* 88 (2): 649-58 (1993); Simpson, P. J. et al., *J. Clin. Invest.* 2:624-29 (1998). Los neutrófilos contribuyen significativamente al daño de las células del miocardio y a su muerte a través de la obstrucción microvascular y la activación de las vías de estallido respiratorio de neutrófilos después de la adhesión específica del ligando a miocitos cardíacos. Entman, M. L., et al., *J. Clin. Invest.* 4:1335-1345 (1992). Durante la fase de "caliente", la angiogénesis se inhibe debido a la liberación de sustancias angiostáticas, incluyendo la proteína inducible por interferón gamma (IP 10). Frangogiannis, N. G., et al., *FASEB J.* 15: 1428-1430 (2001).

En la segunda fase, el proceso de reparación cardíaca comienza (aproximadamente el día 6 hasta aproximadamente el día 14), que finalmente conduce a la formación de cicatrices (aproximadamente el día 14 hasta aproximadamente el día 21) y el posterior remodelado ventricular (aproximadamente el día 21 hasta aproximadamente el día 90). Poco después de la reperfusión, los monocitos infiltran el miocardio infartado. Atraídos por el complemento (C5a), el factor de crecimiento transformante B1 ("TGF-B1") y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 ("MCP-1"), los monocitos se diferencian a macrófagos que inician el proceso de curación fagocitando el tejido muerto, regulando el metabolismo de la matriz extracelular, e induciendo la proliferación de fibroblastos. Birdshall, H. H., et al., *Circulation* 3: 684-92 (1997). La secreción de interleuquina 10 (IL-10) por los linfocitos infiltrantes también promueve la curación regulando a la baja citoquinas inflamatorias e influyendo en la remodelación del tejido. Frangogiannis, N. G. et al., *J. Immunol.* 5: 2798-2808 (2000). Los mastocitos también parecen estar implicados en las etapas posteriores de la reparación del miocardio mediante la participación en la formación de tejido de la cicatriz fibrótica. Factor de Células Madre (SCF) es un potente atractor de los mastocitos. Se ha demostrado que el ARNm del SCF está regulado al alza en segmentos de miocardio isquémicos en un modelo canino de infarto de miocardio y de este modo puede contribuir a la acumulación de células cebadas en los sitios de miocárdico isquémico. Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 98: 687-798 (1998). Los productos de mastocitos (incluyendo TGF-B, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y gelatinasas A y B) inducen la proliferación de fibroblastos, influyen en el metabolismo de la matriz extracelular, e inducen angiogénesis. Fang, K. C., et al., *J. Immunol.* 162:5528-35 (1999); Takeshi, S., et al., *Cardiología* 93: 168-74 (2000).

Después de un infarto de miocardio, la neoangiogénesis se produce después de que se atenúa la fase "caliente" del proceso inflamatorio (aproximadamente el día 5) coincidente con el aumento de los niveles de VEGF (VEGF tiene su máximo aproximadamente el día 7 y disminuye gradualmente a los valores basales de aproximadamente el día 14 a aproximadamente el día 21). Durante esta fase del proceso de curación, se movilizan las células precursoras endoteliales (CPE) y se reclutan al sitio del infarto. Shinitani, S., et al., *Circulation* 103: 2776-79 (2001). Sin estar limitados por la teoría, se ha sugerido que la quimioquina derivada del factor-1 de las células del estroma (SDF-1), que es el ligando para el receptor de quimioquinas CXCR-4 expresado por las células CD34+, también juega un papel en el anidamiento de las células en áreas de daño isquémico. Ceredini, D. J., et al., *Nature Medicine* 10: 858-63 (2004); Askari, A., et al., *Lancet* 362: 697-703 (2003); Yamaguchi, J. et al., *Circulation* 107: 1322-1334 (2003). Si bien se sabe que SDF-1 juega un papel en la hematopoyesis y está implicado en la migración, el anidamiento y la supervivencia de progenitores hematopoyéticos, y si bien el SDF-1 ha sido implicado en la neovascularización isquémica in vivo al aumentar el reclutamiento de CPE a los sitios isquémicos (Yamaguchi et al. *Circulation* 107: 1322-1328 (2003), el papel de SDF-1 en la neoangiogénesis no es seguro. Existe evidencia indicativa que implica al SDF-1. Por ejemplo, la expresión génica del SDF-1 está regulada positivamente durante la hipoxia, una deficiencia de oxígeno en los tejidos, mediante el factor-1 inducible de hipoxia. Además, las células CD34+ son capaces de anidar en las áreas de isquemia, rica en SDF-1, incluyendo miocardio infartado. Askari et al., *Lancet* 362: 697-703 (2003). Además, prácticamente todas las células CD34+ CXCR-4+ co-expresan VEGF-2 y, por tanto, migran en respuesta a VEGF, así como a SDF-1. Peichev M., et al., *Blood* 95: 952-58 (2000). Las células CD34+CXCR-4+VEGF-1, una vez reclutadas, son capaces de contribuir a la neoangiogénesis. Yamaguchi, J. et al., *Circulation* 107:1322-1334 (2003).

#### La zona limítrofe peri-infarto

La zona de miocardio disfuncional producido por oclusión de la arteria coronaria se extiende más allá de la región del infarto para incluir un límite variable del tejido de aspecto normal adyacente. (Hu, P., et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H648-657 (2006)). Esta zona de tejido perinfarto isquémica, pero viable, separa la zona central de la necrosis progresiva de los alrededores de miocardio normal. La zona peri-infarto no se correlaciona con los parámetros enzimáticos de tamaño del infarto y es sustancialmente mayor en pequeños infartos. Stork, A., et al., *European Radiol.* 16(10): 2350-57 (2006).

La isquemia debida al edema y la compresión de los vasos sanguíneos en la zona limítrofe pueden ser muy importantes para el resultado después de un IAM. Se sabe, por ejemplo, que después de un IAM, se produce isquemia transitoria en las zonas limítrofes, y que las intervenciones coronarias percutáneas, que abren la arteria relacionada con el infarto, pueden afectar negativamente a la salud de las zonas limítrofes peri-infarto. Se ha sugerido que los niveles intermedios de flujo arterial medio pueden existir como resultado de la mezcla de penínsulas de tejido isquémico entremezcladas con regiones de miocardio perfundido normalmente en la frontera de un infarto. (Hu, P., et al., Am. J. Physiol. heart Circ Physiol. 291: H648-657 (2006)). Sin embargo, el límite de los microvasos coronarios entremezclados, que en los perros es de no más de 3 mm de ancho, no puede explicar la relativamente amplia región del miocardio disfuncional que rodea a un infarto. Murdock, RH, Jr., et al., Cir. Res. 52:451-59 (1983); Buda, AJ, et al., J. Am. Coll. Cardiol. 8:150-58 (1986). La disfunción progresiva de este miocardio peri-infarto a lo largo del tiempo puede contribuir a la transición de remodelación compensada a insuficiencia cardíaca progresiva después de un IAM.

#### Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca es un síndrome clínico complejo que surge derivado de anomalías de la estructura y/o la función cardíaca que deterioran la capacidad del ventrículo izquierdo para llenar o expulsar la sangre. Véase Hunt, S. J. Am. Coll. Cardiol. 46: E1-E82 (2005). Es una enfermedad progresiva en la que el músculo cardíaco se debilita y no puede bombear sangre con eficacia. Los pacientes pueden ser clasificados por tener insuficiencia cardíaca con disminución de la fracción de eyección ("FE") (referida como "insuficiencia sistólica"), o por tener insuficiencia cardíaca con fracción de eyección normal o insuficiencia cardíaca con una FE conservada (referida como "insuficiencia diastólica"). Los pacientes pueden tener anomalías significativas de la contracción y relajación de ventrículo izquierdo (VI) y sin embargo no tener síntomas, en cuyo caso se puede decir que tienen "insuficiencia cardíaca asintomática". Cuando un paciente con insuficiencia cardíaca crónica se deteriora, se dice que el paciente tiene "insuficiencia cardíaca descompensada", o, si se presentan los síntomas de repente, que tiene "insuficiencia cardíaca aguda descompensada".

Los diversos criterios de diagnóstico utilizados para determinar la presencia de insuficiencia cardíaca se muestran en la siguiente Tabla (V. L. Roger, Intl. J. Environ. Res. Public Health 7(4): 1807-1830 (2010)):

Framingham <sup>1</sup>	Bostón <sup>2</sup>	Sociedad Europea de Cardiología <sup>3</sup> n	Criterios de Puntuación de Gotemburgo <sup>4</sup> /método de evaluación	
<b>CRITERIOS PRINCIPALES:</b>	<b>CATEGORÍA I:</b> Historia		<b>PUNTUACIÓN CARDIACA</b>	
Disnea paroxística nocturna o ortopnea	Disnea en reposo (4 pts)	1. Síntomas de insuficiencia cardíaca (en reposo o durante el ejercicio) y	Antecedentes de enfermedad cardíaca (1-2 pts)	Autoinforme
Distensión de la vena del cuello	Ortopnea (4 pts)	2. Evidencia objetiva de disfunción cardíaca (en reposo) y	Angina de pecho (1-2 pts)	Autoinforme
	Disnea paroxística nocturna (3 pts)		Edema (1 pt)	Autoinforme
Estertores		3. Respuesta al tratamiento dirigido a la insuficiencia cardíaca (en casos en los que el diagnóstico es dudoso).	Disnea nocturna (1 pt)	Autoinforme
Cardiomegalia	Disnea al caminar a nivel (2 pts)		Estertores (1 pt)	Examen físico
Edema pulmonar agudo con galope S3	Disnea en escalada (1 pt)		Fibrilación auricular (1 pt)	ECG
			<b>PUNTUACIÓN PULMONAR</b>	
Aumento de presión venosa $\geq$ 16 cm de agua	<b>CATEGORÍA II:</b> Examen Físico		Historia de bronquitis crónica/asma (1-2 pts)	Autoinforme
Tiempo de Circ. $\geq$ 25 seg		Se deben cumplir los criterios 1 y 2	Tos, flema, o sibilancias (1 pt)	Autoinforme
Reflujo hepatoyugular	Anomalía del ritmo cardíaco (1-2 pts)	en todos los casos	Roncus (2 pts)	Examen físico
<b>CRITERIOS SECUNDARIOS:</b>	Elevación de la presión venosa Yugular (1-2 pts)		La puntuación cardíaca y pulmonar se calcula y se utiliza para diferenciar la disnea cardíaca de la pulmonar	
Edema de tobillo	crepitaciones pulmonares (1-2 pts)			
Tos nocturna	Sibilancias (3 pts)			
Disnea de esfuerzo				
Hepatomegalia	Tercer ruido cardíaco (3 pts)			
Derrame pleural	<b>CATEGORÍA III:</b> Radiografía de tórax			
Disminución de la capacidad vital en 1/3				

Framingham <sup>1</sup>	Boston <sup>2</sup>	Sociedad Europea de Cardiología <sup>3</sup> n	Criterios de Puntuación de Gotemburgo <sup>4</sup> /método de evaluación	
Tasa de Taquicardia ≥ 120/min)				
desde el máximo	Edema pulmonar alveolar (4 pts)			
<b>CRITERIO PRINCIPAL O SECUNDARIO:</b>	Edema pulmonar intersticial (3 pts)			
Pérdida de peso ≥ 4,5 kg en 5 días en respuesta al tratamiento	Efusiones pleurales bilaterales (3 pts)			
<b>INSUFICIENCIA CARDÍACA:</b> presente con 2 criterios principales o 1 principal y 2 secundarios	Índice cardiotorácico ≥0,50 (3 pts)			
	Redistribución del flujo en la zona superior (2 pts)			
	<b>INSUFICIENCIA CARDÍACA:</b>			
	Definida 8-12 pts, posible 5-7pts, improbable 4 pts o menos			

<sup>1</sup> McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB. The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. N. Engl. J. Med. 285:1441-1446 (1971)

<sup>2</sup> Carlson K J, Lee DC Goroll AH, Lehy M, Johnson RA, an analysis of physicians' reasons for prescribing long-term digitalis therapy in outpatients. J. Chronic Dis. 38: 733-39 (1985)

<sup>3</sup> Guidelines for the diagnosis of heart failure The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. Eur. Heart J. 16:741-751 (1995)

<sup>4</sup> Eriksson H, Caidahl K, Larsson B, Ohlson LO, Welin L, Wilhelmsen L, Svardsudd K. Cardiac and pulmonary causes of dyspnoea-validation of a scoring test for clinical-epidemiological use: the Study of Men Born in 1913. Eur. Heart J. 8:1007-1014 (1987)[

El pronóstico de la insuficiencia cardiaca es malo, con estimaciones notificadas de supervivencia de 50% a los 5 años y 10% a los 10 años; disfunción ventricular izquierda asociada con un aumento en el riesgo de muerte súbita. Id.

Hasta la fecha, no existe un tratamiento ideal para la prevención de las consecuencias adversas a largo plazo de la insuficiencia vascular, en particular insuficiencia vascular después de un infarto de miocardio. La revascularización de vasos grandes (que significa la colocación con éxito de una endoprótesis vascular) es insuficiente para hacer frente a las crecientes demandas planteadas por la hipertrofia compensatoria del miocardio. Como resultado, la extensión del infarto y la sustitución fibrosa se producen comúnmente, independientemente de la revascularización de vasos grandes, el tratamiento médico apropiado de las tensiones de la pared ventricular, y la neoangiogénesis mediada por células CD34+ natural, aunque subóptima potencial (una de las teorías relativas a la causa subyacente de infarto de miocardio es que la capacidad de movilización de estas células puede ser limitada biológicamente).

Se ha generado un intenso interés en la evaluación de la capacidad de las células precursoras endoteliales y de miocardio para limitar el daño al miocardio después de un infarto y para limitar o prevenir la remodelación ventricular. Los datos preclínicos significativos y algunos datos clínicos demuestran la seguridad y el potencial de la terapia con células utilizando una variedad de precursores celulares (particularmente células hematopoyéticas) para contribuir a la neoangiogénesis, la miogénesis cardiaca limitada (principalmente por fusión), y la preservación del músculo en la zona de infarto de miocardio. Véase, por ejemplo, Jackson, et al., J. Clin. Invest. 107:1395-1402 (2001); Edelberg, J. M., et al., Cir. Res. 90: e89-e93 (2002); Schichinger, V. et al., New Engl. J. Med. 355 (12): 1210-21 (2006) (utilizando células progenitoras derivadas de la médula ósea); Assmus, B. et al., New Engl. J. Med. 355 (12): 1222-32 (2006) (utilizando células progenitoras derivadas de la médula ósea), véase también Lunde, K. et al., New Eng. J. Med. 355 (12): 1199-209 (2006) (utilizando células progenitoras derivadas de la médula ósea).

La médula ósea consiste en una variedad de tipos celulares precursores y maduros, incluyendo las células hematopoyéticas (los precursores de células sanguíneas maduras) y células del estroma (los precursores de un

amplio espectro de células de tejido conectivo), ambas las cuales parecen ser capaces de diferenciarse a otros tipos de células. Wang, J. S. et al., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 122: 699-705 (2001); Tomita, S. et al., *Circulation* 100 (Supl. II): 247-256 (1999); Saito, T. et al., *Tissue Eng.* 1:327-43 (1995). Las células derivadas de médula ósea o modificada (que significa no fraccionada) o de sangre se han utilizado en varios estudios clínicos, por ejemplo, Hamano, K. et al., *Japón Cir. J.* 65: 845-47 (2001); Strauer, B. E., et al., *Circulation* 106: 1913-1918 (2002); Assmus, et al., *Circulation* 106: 3009-3017 (2002); Dobert, N. et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 8: 1146-1151 (2004); Wollert, K. C. et al., *Lancet* 364: 141-48 (2004). Dado que la fracción mononuclear de la médula ósea contiene células estromales, precursores hematopoyéticos, y precursores endoteliales, la contribución relativa de cada una de estas poblaciones a los efectos observados, en su caso, sigue siendo desconocido.

CD34 es un antígeno de células madre hematopoyéticas expresado selectivamente en células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas de médula ósea humana, sangre e hígado fetal. Yin et al., *Blood* 90: 5002-5012 (1997); Miaglia, S. et al., *Blood* 90: 5013-21 (1997). Las células que expresan CD34 se denominan CD34+. Las células estromales no expresan CD34 y por lo tanto se denominan CD34-. Las células CD34+ aisladas de la sangre humana pueden ser capaces de diferenciarse a cardiomiocitos, células endoteliales, y células de músculo liso in vivo. Véase Yeh, et al., *Circulation* 108: 2070-73 (2003). Las células CD34+ representan aproximadamente 1% de las células nucleadas derivadas de la médula ósea; el antígeno CD34 también es expresado por los precursores de células endoteliales inmaduras (las células endoteliales maduras no expresan CD34). Peichev, M. et al., *Blood* 95: 952-58 (2000). In vitro, las células CD34+ derivadas de la médula ósea de adultos dan lugar a una mayoría de las células progenitoras de granulocitos/macrófagos (UFC-GM), algunas unidades formadoras de colonias mixtas (UFC-Mix) y una población menor de células progenitoras eritroides primitivas (unidades formadoras en estallido, eritrocitos o UFC-E). Yeh, et al., *Circulation* 108: 2070-73 (2003). Las células CD34+ también pueden tener el potencial de diferenciarse a, o contribuir al desarrollo de nuevo músculo del miocardio, aunque a baja frecuencia.

Se han desarrollado técnicas utilizando separación con esferas inmunomagnéticas para aislar una población altamente purificada y viable de células CD34+ a partir de células mononucleares de médula ósea. Véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.536.475, 5.035.994, 5.130.144, 4.965.205. Dos estudios clínicos respaldan la aplicación clínica de células CD34+ derivadas de médula ósea después de infarto de miocardio. Véanse C. Stamm, et al., *Lancet* 361: 45-46 (2003); Herenstein, B. et al., *Blood Supplement, Abs.* 2696 (2004).

#### Modelos animales

La enfermedad arterial periférica (PAD), también denominada enfermedad vascular periférica (PVD), se modela mediante el modelo de isquemia de las extremidades posteriores en los que la arteria femoral del ratón se liga para simular la enfermedad arterial periférica. La PAD, que comúnmente afecta a las arterias que abastecen la pierna e incluye todas las enfermedades causadas por la obstrucción de las grandes arterias en los brazos y las piernas, puede ser resultado de aterosclerosis, procesos inflamatorios que conducen a estenosis, embolia o formación de trombos. La restricción del flujo sanguíneo arterial debido a estenosis u oclusión a menudo lleva a los pacientes a quejarse de dolor muscular al caminar (claudicación intermitente). Cualquier otra reducción del flujo sanguíneo provoca dolor isquémico en reposo. Esta afección se denomina isquemia crónica de miembros, es decir, la demanda de oxígeno no se puede mantener en estado de reposo. A continuación pueden sobrevenir ulceración y gangrena en los dedos de los pies, que son los más alejados del suministro de sangre, y se puede producir la pérdida de la extremidad afectada si no se trata.

Las terapias para la isquemia de las extremidades tienen los objetivos de desarrollo colateral y reposición del suministro de sangre. Las células CD34+ mononucleares derivadas de médula ósea han sido probadas en estos modelos de isquemia de las extremidades posteriores, pero el modelo de isquemia de las extremidades posteriores no es un ejemplo de lo que tiene lugar en el corazón. Una terapia preferida después de un IAM detendría la muerte de las células durante la recuperación que lleva a revertir la remodelación y la insuficiencia, o a reemplazar las células que mueren por cardiomiocitos.

El modelo animal más cercano, el modelo porcino, no es un buen modelo de la enfermedad humana debido a que (i) todos los experimentos se realizan generalmente en animales no ateroscleróticos, (ii) los animales no son tratados con angioplastia, (iii) los cerdos normales no embolizan vasos sanguíneos; (iv) la circulación del cerdo no es exactamente la misma que la de los seres humanos; y (iv) la zona limítrofe peri-infarto puede no ser la misma.

Recientemente se informó sobre una mejora marginal de los síntomas de angina cuando se movilizaron células CD34+ con G-CSF, se sometieron a aféresis después de 5 días, y a continuación se inyectaron en una zona isquémica del corazón basado en mapeo por Noga. [Northwestern University (2009, 1 de abril). Adult Stem Cell Injections May Reduce Pain And Improve Walking In Severe Angina Patients. ScienceDaily. Consultado el 21 de octubre de 2010, en <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/03/090330091706.htm>]. Los datos de un ensayo de fase I realizado por los autores de la presente invención han proporcionado pruebas de que los sujetos tratados con al menos  $10 \times 10^6$  células madre hematopoyéticas CD34+ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada

por CXCR-4 (n = 9) experimentaron una mejora significativa las tasas de perfusión en reposo a los 6 meses en comparación con los sujetos que recibieron 5 millones de células (n = 6) y control (n = 15), según se midió por medio de la Puntuación Total de Severidad mediante SPECT (-256 frente a +13, p = 0,01). Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm. 61/169.850 y 61/119.552.

5 La invención descrita es una terapia para la prevención de las consecuencias adversos a largo plazo de la insuficiencia vascular, particularmente insuficiencia vascular que produce la expansión de la zona de infarto de miocardio después de un IAM que progresa a insuficiencia cardíaca. Se propone que la administración de una dosis potente de una población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecida en células CD34+,  
10 que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 administrada tempranamente o tardíamente después de la aparición de un IAM puede dar como resultado una reducción de eventos cardíacos adversos, incluyendo, pero sin limitarse a, muerte prematura, infarto de miocardio recurrente, desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias importantes, y síndrome coronario agudo, y empeoramiento de insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias importantes, y síndrome coronario agudo.  
15

### Compendio de la invención

20 La invención descrita proporciona composiciones progresivas para la prevención/tratamiento de las consecuencias adversas de una lesión miocárdica progresiva debida a una insuficiencia vascular. De acuerdo con algunas realizaciones, la insuficiencia vascular se produce poco después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente. Según algunas realizaciones, la insuficiencia vascular ocurre tarde después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente.

25 La invención se refiere a una composición que es una composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva debida a insuficiencia vascular que afecta al flujo sanguíneo coronario, caracterizándose la lesión miocárdica progresiva como un componente del progreso de enfermedad a insuficiencia cardíaca, preparándose la composición farmacéutica por medio de un procedimiento que comprende:

30 (a) purificar en condiciones estériles una población de células mononucleares que comprende células CD34+ obtenidas del sujeto en condiciones estériles con el fin de producir una población no expandida, aislada de células mononucleares enriquecidas en células CD34+, de modo que al menos 70% de las células comprende células CD34+;

35 (b) al menos 24 horas después de la adquisición de las células del sujeto, hacer pasar una primera porción de la población enriquecida producida en la etapa (a) a través de un catéter que tiene un diámetro interno de 0,36 mm y confirmar que

(i) al menos algunas de las células que pasan a través del catéter tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y se mueven en respuesta a SDF-1 *in vitro*;

40 (ii) al menos algunas de las células que pasan a través del catéter pueden formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y

(iii) al menos 70% de las células que pasan a través del catéter son viables;

45 (c) formular la composición farmacéutica estéril que comprende una segunda porción de la población de células mononucleares enriquecida en células CD34+ producida en la etapa (a) para el suministro al sujeto por vía parenteral a través de un catéter que tiene un diámetro interno de 0,36 mm en una pluralidad de fechas de infusión;

en donde la composición farmacéutica estéril comprende:

50 (A) una cantidad terapéutica de un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, en donde que el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende una población aislada no expandida de células mononucleares autólogas que comprende una subpoblación de células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4+ y que se mueven en respuesta a SDF-1;

55 en donde la cantidad terapéutica es eficaz para mejorar la perfusión del miocardio, para preservar los cardiomiocitos existentes y su función, y para reducir la progresión de la enfermedad a insuficiencia cardíaca durante la vida del sujeto, y

60 en donde la cantidad terapéutica del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ aisladas que comprenden  $0,5 \times 10^6$  o más células CD34+ potentes que expresan CXCR-4, que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y que se mueven en respuesta a SDF-1; y

(B) una cantidad estabilizante de suero de al menos 10%, expresada en volumen final en ml/100 cc de la composición farmacéutica estéril, en donde la cantidad estabilizante de suero es eficaz para retener la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y la actividad de formación de colonias hematopoyéticas de

la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

5 La composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva puede incluir adicionalmente al menos un agente activo que es compatible con los componentes (A) y (B) de la composición. El agente activo compatible puede seleccionarse del grupo que consiste de una citoquina tal como un agente de movilización de células madre hematopoyéticas, un diurético, un agente anti-arritmico, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipocolesterolemiante. El agente movilizador de células madre hematopoyéticas puede ser G-CSF, GM-CSF, o una combinación de los mismos. El agonista del receptor de tirosina quinasa puede ser la neuregulina 1 humana.

15 En la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas después de la adquisición puede dividirse en una pluralidad de alícuotas, al menos uno de los cuales se almacena en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido hasta que se necesite.

20 En la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva la insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria puede dar como resultado la oclusión de una arteria coronaria. La insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria que resulta de la oclusión de la arteria puede ser una isquemia, tal como una isquemia transitoria, una isquemia miocárdica crónica o una isquemia miocárdica, tales como una isquemia de zona limítrofe peri-infarto.

25 En la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva la insuficiencia vascular puede ser una insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria que se desarrolla después de un infarto agudo de miocardio. La lesión miocárdica progresiva puede ser un deterioro progresivo de la función del músculo cardíaco tras el infarto agudo de miocardio.

30 En la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, la progresión de la enfermedad a insuficiencia cardíaca puede incluir al menos uno de un infarto de miocardio recurrente, desarrollo de arritmias importantes y desarrollo de síndrome coronario agudo. En algunos de tales usos el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, el empeoramiento de las arritmias importantes, el empeoramiento del síndrome coronario agudo, o una de sus combinaciones podría conducir a muerte prematura en ausencia de tratamiento.

35 La composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva puede formularse para su administración por vía parenteral a través del catéter en el miocardio o por vía intravascular.

40 En la composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, la población aislada no expandida de células mononucleares autólogas que comprende una subpoblación de células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y que se mueven en respuesta a SDF-1 se puede obtener a partir de médula ósea autóloga, sangre del cordón umbilical, sangre periférica autóloga, sangre periférica movilizada, cordón umbilical o tejido adiposo.

45 La composición farmacéutica de la invención para uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva se puede utilizar en un sujeto que es un sujeto revascularizado.

50 También se describe en la presente memoria un método para tratar una lesión miocárdica progresiva debida a una insuficiencia vascular, comprendiendo el método las etapas: (a) adquirir una población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de un sujeto en condiciones estériles; (b) enriquecer en condiciones estériles las células CD34+ que contienen adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprenden células CD34+, en donde las células CD34+ enriquecidas que contienen adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 son un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; (c) administrar parenteralmente a través de un catéter en una pluralidad de fechas de infusión durante la vida de sujeto una composición farmacéutica estéril, comprendiendo la composición farmacéutica estéril: 55 (i) una cantidad terapéuticamente eficaz del producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ que contienen adicionalmente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; y (ii) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es mayor de 20% (v/v), en donde el producto 60

- quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro; (d) administrar opcionalmente el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas en una pluralidad de fechas de infusión durante la vida del sujeto; y (e) tratar al menos una consecuencia adversa de la insuficiencia vascular progresiva.
- De acuerdo con una realización de tal método, la etapa (a) comprende adicionalmente congelar al menos una alícuota de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que contiene células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 a -86°C y crioconservar la al menos una alícuota en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.
- De acuerdo con otra realización de tal método, la etapa (a) comprende adicionalmente (i) descongelar la al menos una alícuota de la población no expandida, aislada estéril congelada de células mononucleares autólogas que contiene células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) enriquecer la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, en donde la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, es un producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas; y (iii) administrar al sujeto en una segunda fecha la infusión de una cantidad terapéuticamente eficaz del producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas, que comprende (a) al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+, que contienen adicionalmente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; y (b) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es mayor de 20%(v/v), en donde el producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas después de descongelación de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro.
- De acuerdo con otra realización de tal método, el enriquecimiento de la etapa (ii) se produce a partir de al menos 1 día a al menos 40 años después de la adquisición de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ del sujeto.
- De acuerdo con otra realización de tal método, el producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas se administra por vía parenteral a través de un catéter al sujeto en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas de la etapa de descongelación (i).
- De acuerdo con otra realización de tal método, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere temprano después de un infarto agudo de miocardio.
- De acuerdo con otra realización de tal método, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere después de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias en una zona infartada.
- De acuerdo con otra realización de tal método, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere tarde después de un infarto agudo de miocardio.
- De acuerdo con otra realización de tal método, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere a partir de al menos 15 días a al menos 40 años después de la aparición de un infarto agudo de miocardio.

- 5 De acuerdo con otra realización de tal método, el producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 48 horas siguientes a la descongelación de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (i) es capaz de formar colonias hematopoyéticas; y (ii) conserva al menos 2% de la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.
- 10 De acuerdo con otra realización de tal método, el producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 72 horas siguientes a la descongelación de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (i) es capaz de formar colonias hematopoyéticas; y (ii) conserva al menos 2% de la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.
- 15 De acuerdo con otra realización de tal método, la insuficiencia vascular es una isquemia. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia transitoria. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica crónica. Según otra realización, la insuficiencia vascular es una insuficiencia vascular después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia de la zona límite peri-infarto.
- 20 De acuerdo con otra realización de tal método, una primera fecha de infusión comprende un intervalo de tiempo específico definido un primer período y un segundo período, en donde el primer período es después de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias en una zona infartada y el segundo período es antes de la formación de cicatrices miocárdicas en la zona infartada. De acuerdo con otra realización, el primer período de la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente 5 días post-infarto. De acuerdo con otra realización, el primer período de la primera fecha de infusión es aproximadamente 5 días post-infarto y el segundo período es aproximadamente 14 días post-infarto.
- 25 De acuerdo con otra realización, el método trata la muerte celular de cardiomiocitos en la zona límite peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el método trata la hipoperfusión en la zona límite peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el método trata la hibernación del miocardio en la zona límite peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el método disminuye el área de infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el método disminuye la masa del infarto, con respecto a los controles.
- 30 De acuerdo con otra realización de tal método, la lesión miocárdica progresiva consiste en un deterioro progresivo de la función del músculo cardíaco después del infarto agudo de miocardio.
- 35 De acuerdo con otra realización de tal método, la etapa (e) comprende el tratamiento de al menos una consecuencia adversa de un infarto agudo de miocardio seleccionado entre muerte prematura, infarto de miocardio recurrente, desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva, desarrollo de arritmias importantes, desarrollo de síndrome coronario agudo, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, empeoramiento de las arritmias importantes, y empeoramiento del síndrome coronario agudo.
- 40 De acuerdo con otra realización de tal método, la lesión miocárdica progresiva es la insuficiencia cardíaca.
- 45 De acuerdo con otra realización de tal método, el catéter es un catéter de control de flujo.
- 50 De acuerdo con otra realización de tal método, el catéter es un catéter de dilatación con balón.
- De acuerdo con otra realización de tal método, el catéter tiene un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm.
- 55 De acuerdo con otra realización de tal método, la administración de la etapa (c) es a través del catéter en el miocardio. De acuerdo con otra realización, la administración de la etapa (c) es a través del catéter por vía intravascular.
- 60 De acuerdo con otra realización de tal método, la composición farmacéutica incluye adicionalmente al menos un agente activo compatible. De acuerdo con otra realización, el agente activo se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un beta-bloqueador, un diurético, un agente anti-arrítmico, un agente movilizador de células madre hematopoyéticas, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipocolesterolemizante.

De acuerdo con otra realización de tal método, el agonista del receptor de tirosina quinasa es la neuregulina humana.

5 También se describe en la presente memoria un régimen para el tratamiento de una lesión miocárdica progresiva debida a insuficiencia vascular en un sujeto revascularizado, que comprende (a) administrar por vía parenteral a través de un catéter en una pluralidad de fechas de infusión durante la vida del sujeto una composición farmacéutica estéril que comprende un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, en donde el producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas comprende (i) una población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecida en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ que contienen adicionalmente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; y (ii) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es mayor de 20% (v/v), en donde el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas después de la adquisición del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro; y (b) tratar al menos una consecuencia adversa de la insuficiencia vascular progresiva.

De acuerdo con una realización de tal régimen, la insuficiencia vascular es una isquemia. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia transitoria. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica crónica. De acuerdo con otra realización, la insuficiencia vascular es una insuficiencia vascular después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere temprano después de la aparición de un infarto agudo de miocardio.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere después de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias en una zona infartada.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere tarde después de la aparición de un infarto agudo de miocardio.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se adquiere a partir de al menos 15 días a al menos 40 años después de la aparición de un infarto agudo de miocardio.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, una primera fecha de infusión comprende un intervalo de tiempo específico definido por un primer período y un segundo período, y en donde el primer período es después de la producción máxima inflamatoria de citoquinas en cascada en una zona infartada y el segundo período es antes formación de la cicatriz miocárdica en la zona infartada.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, el primer período de la primera fecha de infusión es de al menos aproximadamente 5 días post-infarto. De acuerdo con otra realización, el primer período de la primera fecha de infusión es de aproximadamente 5 días post-infarto y el segundo período es de aproximadamente 14 días post-infarto. De acuerdo con otra realización, la primera fecha de infusión es de al menos 5 días después de la aparición de un infarto agudo de miocardio. De acuerdo con otra realización, una segunda fecha de infusión es de al menos 30 días después de la aparición de un infarto agudo de miocardio.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la isquemia es una isquemia de la zona limítrofe peri-infarto. De acuerdo con otra realización, la etapa (b) comprende el tratamiento de la muerte celular de cardiomiocitos en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, la etapa (b) comprende el tratamiento de la hipoperfusión en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles.

De acuerdo con otra realización de tal régimen, la etapa (b) comprende el tratamiento de la hibernación del miocardio en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, la etapa (b) comprende la disminución de la zona de infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, la etapa (b) comprende la disminución de la masa del infarto, con respecto a los controles.

5 De acuerdo con otra realización de tal régimen, la etapa (b) comprende el tratamiento de al menos una consecuencia adversa del infarto agudo de miocardio seleccionada entre muerte prematura, infarto de miocardio recurrente, desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva, desarrollo de arritmias importantes, desarrollo de síndrome coronario agudo, empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, empeoramiento de las arritmias importantes, y el empeoramiento del síndrome coronario agudo.

10 De acuerdo con otra realización de tal régimen, la lesión miocárdica progresiva consiste en un deterioro progresivo de la función del músculo cardíaco después de infarto agudo de miocardio. De acuerdo con otra realización, la lesión miocárdica progresiva es la insuficiencia cardíaca.

15 De acuerdo con otra realización de tal régimen, el catéter es un catéter de control de flujo. De acuerdo con otra realización, el catéter es un catéter de dilatación con balón. De acuerdo con otra realización, el catéter tiene un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm.

20 De acuerdo con otra realización de tal régimen, la composición se administra a través del catéter al miocardio. De acuerdo con otra realización, la composición se administra a través del catéter intravascular.

25 De acuerdo con otra realización de tal régimen, la composición farmacéutica incluye adicionalmente al menos un agente activo compatible. De acuerdo con otra realización, el agente activo se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un beta-bloqueador, un diurético, un agente anti-arritmico, un agente movilizador de células madre hematopoyéticas, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipocolesterolemizante.

30 De acuerdo con otra realización de tal régimen, el agonista del receptor de tirosina quinasa es la neuregulina 1 humana.

### Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 muestra que la viabilidad funcional del producto quimiotáctico de células hematopoyéticas de la invención a las 72 horas es equivalente a la de las 48 horas.

La figura 2 muestra la eficiencia migratoria del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas formulado que comprende células CD34+ de la invención.

40 La Figura 3 muestra la estabilidad mejorada de las células CD34+ formuladas en suero humano.

### Descripción detallada

45 La presente invención describe composiciones para la prevención/tratamiento de consecuencias adversas tempranas o tardías de la insuficiencia vascular, incluyendo, pero sin limitarse a, insuficiencia vascular que se produce temprano o tarde después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente.

### Glosario

50 El término "administrar" y sus diversas formas gramaticales, según se utiliza en la presente memoria significa proporcionar o aplicar. El término "administración" según se utiliza en la presente memoria incluye la administración in vivo, así como la administración directamente al tejido ex vivo. En general, las composiciones se pueden administrar sistémicamente por vía parenteral o tópicamente en formulaciones unitarias de dosificación que contienen portadores, coadyuvantes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales como se desee, o se pueden administrar localmente por medios tales como, pero sin limitarse a, inyección, implante, injerto, aplicación tópica, o parenteral. Un medio para la administración de las células puede incluir, pero no se limita a, infusión.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "alícuota" se refiere a una porción de una cantidad total.

60 Según se utiliza en la presente memoria, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación y desarrollo de vasos sanguíneos.

Los términos "apoptosis" o "muerte celular programada" se refieren a un proceso altamente regulado y activo que contribuye a la homeostasis biológica compuesta de una serie de eventos bioquímicos que conducen a una variedad

de cambios morfológicos, incluyendo la formación de ampollas, cambios en la membrana celular, tales como pérdida de asimetría y anclaje de la membrana, encogimiento celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina, y fragmentación del ADN cromosómico, sin dañar el organismo.

5 El término "c-kit" se refiere a una proteína de superficie de algunas células que se une al factor de células madre (una sustancia que hace que ciertos tipos de células crezcan). Las formas alteradas de este receptor pueden estar asociadas con algunos tipos de cáncer.

10 El término "biomarcadores cardíacos" se refiere a enzimas, proteínas y hormonas asociadas con la función, el daño o la insuficiencia cardíaca que se utilizan con fines de diagnóstico y pronóstico. Diferentes biomarcadores tienen diferentes momentos en los que sus niveles aumentan, alcanzan el máximo, y caen en el organismo, lo que les permite ser utilizados no sólo para realizar un seguimiento del progreso de un ataque al corazón, sino para estimar cuándo comenzó y para vigilar la recurrencia. Algunos de los ensayos son específicos para el corazón, mientras que otros son también elevados por el daño al músculo esquelético. Los biomarcadores cardíacos actuales incluyen, pero no se limitan a CK (creatina fosfoquinasa o creatina quinasa) y CK-MB (niveles de creatina quinasa-mioglobina (para ayudar a distinguir entre músculo esquelético y cardíaco)), troponina (niveles en sangre de troponina I o T se siguen siendo elevados durante 1-2 semanas después de un ataque al corazón; la troponina en general no se ve afectada por el daño a otros músculos), mioglobina (para determinar si el músculo, particularmente el músculo del corazón, se ha lesionado) y BNP (péptido natriurético cerebral) o NT-proBNP (pro-hormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (para ayudar a diagnosticar la insuficiencia cardíaca y clasificar la gravedad de esa insuficiencia cardíaca).

25 El término "cateterismo cardíaco" se refiere a un procedimiento en el cual se hace pasar un catéter a través de una arteria al corazón, y a una arteria coronaria. Este procedimiento produce angiogramas (es decir, imágenes de rayos X) de las arterias coronarias y el ventrículo izquierdo, la cámara de bombeo principal del corazón, que se pueden utilizar para medir las presiones en la arteria pulmonar, y para controlar la función del corazón.

30 El término "células CD34+" según se utiliza en la presente memoria se refiere a células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea humana que "son positivas para", es decir, "expresan", un antígeno de células madre hematopoyéticas, al menos una subpoblación las cuales expresan CXCR-4, y que pueden migrar a las zonas de lesión. El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita que se enriquece en células CD34+ no co-expresa VEGF-2 (<1%).

35 El término "CD38" se refiere a un marcador de proteína presente en los macrófagos, células dendríticas, y células B y NK activadas, que puede mediar la adherencia entre linfocitos y células endoteliales.

Los términos "CD45" y "antígeno leucocitario común" se refieren a una proteína tirosina fosfatasa (PTP), localizada en las células hematopoyéticas excepto eritrocitos y plaquetas.

40 El término "CD59" se refiere a una glicoproteína de membrana ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que protege las células humanas de la lisis mediada por el complemento.

45 El término "CXCR-4" según se utiliza en la presente memoria se refiere a un receptor de quimioquinas ligado a la proteína G.

50 El término "citoquina" según se utiliza en la presente memoria se refiere a pequeñas sustancias proteicas solubles secretadas por las células que tienen una variedad de efectos sobre otras células. Las citoquinas median muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo el crecimiento, el desarrollo, la curación de heridas, y la respuesta inmunitaria. Actúan mediante la unión a sus receptores específicos de células localizados en la membrana celular, lo que permite que comience en la célula una clara cascada de transducción de señales, lo que finalmente dará lugar a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células diana. Generalmente, las citoquinas actúan localmente. Incluyen citoquinas de tipo I, que abarcan muchas de las interleuquinas, así como varios factores de crecimiento hematopoyéticos; citoquinas de tipo II, incluyendo los interferones y la interleuquina-10; moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral ("TNF"), incluyendo TNF $\alpha$  y linfotoxina; miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, incluyendo interleuquina 1 ("IL-1"); y quimioquinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel crítico en una amplia variedad de funciones inmunológicas e inflamatorias. La misma citoquina puede tener efectos diferentes en una célula en función del estado de la célula. Las citoquinas a menudo regulan la expresión de, y desencadenan cascadas de, otras citoquinas.

60 El término "factor estimulante de colonias" se refiere a una citoquina responsable de controlar la producción de glóbulos blancos. Los tipos de factores estimulantes de colonias incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF).

- 5 El término "célula madre hematopoyética" se refiere a una célula aislada de la sangre o de la médula ósea que pueden renovarse a sí misma, diferenciarse a una variedad de células especializadas, moverse fuera de la médula ósea a la sangre circulante, y puede experimentar muerte celular programada (apoptosis). En algunas realizaciones de la invención descrita, las células madre hematopoyéticas derivadas de sujetos humanos expresan al menos un tipo de marcador de superficie celular, incluyendo, pero no limitado a, CD34, CD38, HLA-DR, c-kit, CD59, Sca-1, Thy-1, y/o CXCR-4, o una combinación de los mismos.
- 10 "HLA-DR" se refiere a un antígeno de histocompatibilidad de clase II humano presentes en varios tipos de células, incluyendo células presentadoras de antígeno, células B, monocitos, macrófagos y células T activadas.
- 15 El término "interleuquina" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una citoquina secretada por los glóbulos blancos como un medio de comunicación con otros glóbulos blancos.
- Los términos "VEGF-1" o "factor de crecimiento endotelial vascular 1" se utilizan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a una citoquina que media numerosas funciones de las células endoteliales que incluyen proliferación, migración, invasión, supervivencia, y permeabilidad. Se cree que el VEGF es crítico para la angiogénesis.
- 20 El término "quimioquina" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una clase de citoquinas quimiotácticas que señalizan los leucocitos para que se muevan en una dirección específica. Los términos "quimiotaxis" o "quimiotáctico" se refieren al movimiento dirigido de una célula o parte móvil a lo largo de un gradiente de concentración química hacia las condiciones ambientales que considere atractivas y/o fuera de un entorno que encuentra repelente.
- 25 El término "recuento sanguíneo completo" (RSC) se refiere a un ensayo de laboratorio que proporciona información detallada acerca de la cantidad y la calidad de cada uno de los tipos de células sanguíneas. Por lo general, incluye una medición de cada una de las tres principales células de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) y una medida de la hemoglobina y el hematocrito. "Hemoglobina" (HGB) se refiere al número de gramos de hemoglobina en un decilitro de sangre (g/dL). Los niveles de hemoglobina normales en sujetos humanos adultos sanos son de aproximadamente 14 g/dl a aproximadamente 18 g/dl para los hombres y de aproximadamente 12 g/dl a aproximadamente 16 g/dl para las mujeres. Como guía aproximada, la hemoglobina debe ser generalmente aproximadamente un tercio del hematocrito. "Recuento de glóbulos rojos" (GR) se refiere al número total de glóbulos rojos en una cantidad de sangre. Los intervalos normales en sujetos humanos son de aproximadamente 4,5 millones de células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 6,0 millones de células/mm<sup>3</sup> para los hombres y de aproximadamente 4,0 millones de células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 5,5 millones de células/mm<sup>3</sup> para las mujeres. El "recuento de glóbulos blancos" (RGB) se refiere al número total de glóbulos blancos o leucocitos en una cantidad de sangre. Los intervalos normales en sujetos humanos son de aproximadamente 4,3 x 10<sup>3</sup> células/mm<sup>3</sup> a aproximadamente 10,8 x 10<sup>3</sup> células/mm<sup>3</sup>. "Hematocrito" (HCT) se refiere a la proporción de glóbulos rojos como un porcentaje del volumen de sangre total. Un hematocrito normal para sujetos humanos es de aproximadamente 40% a aproximadamente 55% para los hombres y de aproximadamente 35% a aproximadamente 45% para las mujeres.
- 30 El término "enfermedad" o "trastorno", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un deterioro de la salud o una afección de funcionamiento anormal. El término "síndrome", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de una enfermedad o afección. El término "afección", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una variedad de estados de salud y se entiende que incluye trastornos o enfermedades causados por cualquier mecanismo subyacente o trastorno, lesión, y la promoción de tejidos y órganos sanos.
- 35 Según se utiliza en la presente memoria, el término "temprano" se refiere al hecho de ser o aparecer en o cerca del comienzo de un período de tiempo o serie de eventos. Según se utiliza en la presente memoria, el término "tarde" se refiere al hecho de ser o aparecer en un período de tiempo o estadio avanzados de una serie de eventos.
- 40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "enriquecimiento" o "purificación" se refiere al aumento de la fracción de células de un tipo sobre la fracción de ese tipo en una preparación de partida. Las células pueden ser enriquecidas mediante cualquiera de los diversos marcadores expresados, o no expresados, en ciertas células en combinación con técnicas de separación adecuadas. Las técnicas de separación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la separación de esferas inmunomagnéticas, cromatografía de afinidad, centrifugación en gradiente de densidad, y citometría de flujo.
- 45 Según se utiliza en la presente memoria, el término "no expandidas" se refiere a no aumentar o ampliar el número de células por medio de cultivo in vitro.
- 50 Según se utiliza en la presente memoria, el término "inflamación" se refiere a una respuesta a la infección y lesión en la que las células que participan en la desintoxicación y reparación son movilizadas al sitio comprometido por

mediadores inflamatorios. La inflamación a menudo se caracteriza por una fuerte infiltración de leucocitos al sitio de inflamación, en particular de neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promueven el daño tisular mediante la liberación de sustancias tóxicas en la pared vascular o en el tejido no lesionado.

5 Independientemente del agente iniciador, los cambios fisiológicos que acompañan a la inflamación aguda abarcan cuatro características principales: (1) la vasodilatación, que da como resultado un incremento neto del flujo de sangre, es una de las primeras respuestas físicas a la lesión tisular aguda; (2) en respuesta a estímulos inflamatorios, las células endoteliales que recubren las vénulas se contraen, ampliando las uniones intracelulares para producir huecos, dando lugar a aumento de la permeabilidad vascular, lo que permite la filtración de proteínas plasmáticas y células de la sangre fuera de los vasos sanguíneos; (3) la inflamación a menudo se caracteriza por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de inflamación, en particular neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promueven el daño tisular mediante la liberación de sustancias tóxicas en la pared vascular o en el tejido no lesionado; y (4) la fiebre, producida por pirógenos liberados por los leucocitos en respuesta a estímulos específicos.

15 Durante el proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios solubles de la respuesta inflamatoria trabajan junto con los componentes celulares de una manera sistémica en el intento de contener y eliminar los agentes causantes de malestar físico. Los términos "inflamatorios" o inmuno-inflamatorios" según se utilizan en la presente memoria con respecto a los mediadores se refiere a los mediadores moleculares del proceso inflamatorio. Estas moléculas difusibles, solubles actúan a nivel local en el sitio del daño tisular e infección y en sitios más lejanos. Algunos mediadores inflamatorios son activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros son sintetizados y/o liberados a partir de fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o por otros mediadores inflamatorios solubles. Los ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria incluyen, pero no se limitan a, proteasas plasmáticas, complemento, quininas, proteínas de coagulación y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (FAP), péptidos y aminas, incluyendo, pero no limitados a, histamina, serotonina, y neuropéptidos, citoquinas proinflamatorias, incluyendo, pero no limitadas a, interleuquina-1, interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-S, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón-gamma, e interleuquina 12.

30 El término "dentro de fecha" se refiere al intervalo de tiempo entre la finalización de la adquisición de una preparación que comprende una población enriquecida en células CD34+ potentes de un sujeto bajo condiciones estériles y el inicio de la purificación en condiciones estériles de células CD34+ potentes de la preparación. El término "fuera de fecha" se refiere al intervalo de tiempo entre la finalización de la adquisición de una preparación que comprende una población enriquecida en células CD34+ potentes de un sujeto en condiciones estériles y la infusión de la composición farmacéutica formulada que comprende un producto de células hematopoyéticas quimiotácticas en el sujeto.

35 Los términos "infundir" o "infusión" según se utiliza en la presente memoria se refieren a la introducción de un fluido distinto de sangre en un vaso sanguíneo de un sujeto, incluyendo seres humanos, para fines terapéuticos.

40 La "solución de infusión" de la invención descrita sin suero autólogo contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con 25 unidades USP/ml de heparina y albúmina de suero humano (HSA) al 1%. En algunas realizaciones, la solución de infusión se complementa con suero. En algunas realizaciones, el suero es autólogo.

45 El término "lesión" se refiere a daños y perjuicios causados a la estructura o función del organismo de un sujeto provocados por un agente o fuerza, que pueden ser físicos o químicos. El término "lesión vascular" se refiere a la lesión de la vasculatura (es decir la red vascular, que significa la red de vasos sanguíneos o conductos que transportan fluidos, tales como, sin limitación, sangre o linfa). El término "lesión del miocardio" se refiere a una lesión en el miocardio del corazón.

50 El término "macrófago" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula mononuclear, activamente fagocítica derivada de células madre monocíticas en la médula ósea. Estas células están ampliamente distribuidas en el organismo y varían en la morfología y la motilidad. La actividad fagocítica está mediada típicamente por factores de reconocimiento de suero, incluyendo ciertas inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento, pero también puede ser no específica. Los macrófagos también están implicados tanto en la producción de anticuerpos como en las respuestas inmunológicas mediadas por células, en particular en la presentación de antígenos a los linfocitos. Secretan una variedad de moléculas inmunorreguladoras.

55 Los términos "microbio" o "microorganismo" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un organismo demasiado pequeño para ser observado claramente a simple vista, incluyendo, pero sin limitarse a, bacterias microscópicas, hongos (mohos), algas, protozoos y virus.

60 El término "modular", según se utiliza en la presente memoria significa regular, alterar, adaptar o ajustar en cierta medida o proporción.

El término "infarto de miocardio" se refiere a la muerte o daño permanente al músculo cardíaco. La mayoría de los ataques cardíacos son provocados por el bloqueo de las arterias coronarias que interrumpe el flujo de sangre y oxígeno al músculo cardíaco, lo que lleva a la muerte de las células del corazón en esa zona. El músculo cardíaco dañado pierde su capacidad de contraerse, dejando el músculo cardíaco que queda para compensar el área debilitada. Se describen aquí las etapas relacionadas con la evaluación de la idoneidad de los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la invención descrita mediante el uso de ensayos para examinar el tamaño, la forma y la función del corazón, a medida que está latiendo, para detectar cambios en el ritmo cardíaco, y para detectar y evaluar los tejidos dañados y las arterias bloqueadas. Los ejemplos de tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, electrocardiograma, ecocardiograma, angiografía coronaria y ventriculografía nuclear. También se utilizan biomarcadores cardíacos para evaluar la idoneidad de los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la invención descrita.

El término "necrosis" se refiere a la muerte prematura de las células y tejido vivo inducida por factores externos, tales como infección, toxinas o trauma. El tejido necrótico experimenta reacciones químicas diferentes a las del tejido apoptótica. La necrosis comienza típicamente con abultamiento celular, digestión de cromatina, alteración de la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos. El daño a la membrana del lisosoma puede desencadenar la liberación de enzimas lisosomales, destruyendo otras partes de la célula. La necrosis tardía se caracteriza por una amplia hidrólisis de ADN, vacuolización del retículo endoplásmico, rotura de orgánulos y lisis celular. La liberación del contenido intracelular después de la rotura de la membrana plasmática es la causa de la inflamación en la necrosis. Las enzimas lisosomales liberadas pueden desencadenar una reacción en cadena de muerte celular adicional. La necrosis de una cantidad suficiente de tejido contiguo puede dar como resultado la muerte del tejido o gangrena.

El término "perfusión" según se utiliza en la presente memoria se refiere al proceso de suministro nutritivo de sangre arterial a un lecho capilar en el tejido biológico. La perfusión ("F") se puede calcular con la fórmula  $F = ((PA-Pv)/R)$  en donde PA es la presión arterial media, Pv es la presión venosa media, y R es la resistencia vascular. La perfusión de tejido se puede medir in vivo, mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, técnicas de formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Tales técnicas incluyen el uso de un agente de contraste inyectado y marcaje arterial de spin (ASL) (en donde la sangre arterial es etiquetada magnéticamente antes de que entre en el tejido de interés y la cantidad de marcaje se mide y se compara con una grabación de control).

El término "persistente" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a lo que no cesa o es indefinidamente continuo.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "potente" o "potencia" se refiere a la actividad biológica necesaria del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita, es decir, las células potentes de la invención descritas permanecen viables, son susceptibles de movilidad mediada, y son susceptibles de crecer, es decir, de formar colonias hematopoyéticas en un análisis de UFC in vitro.

El término "célula progenitora", según se utiliza en la presente memoria se refiere a una célula inmadura en la médula ósea que puede ser aislada mediante suspensiones en crecimiento de células de médula en placas de cultivo con factores de crecimiento añadidos. Las células progenitoras maduran hasta convertirse en células precursoras que maduran a células sanguíneas. Las células progenitoras son referidas como unidades formadoras de colonias (UFC) o células formadoras de colonias (CFC). El linaje específico de una célula progenitora se indica mediante un sufijo, tal como, pero no limitado a, UFC-E (eritrocitos), UFC-GM (granulocitos/macrófagos), y UFC-GEMM (progenitoras hematopoyéticas pluripotentes).

El término "progresiva" según se utiliza en la presente memoria se refiere a aquella que avanza gradualmente en extensión.

El término "reparar" según se utiliza en la presente memoria como un sustantivo se refiere a cualquier corrección, refuerzo, reacondicionamiento, remedio, compensación, adopción acertada, renovación, reparación, remiendo, o similar, que restaure la función. Cuando se utiliza como verbo, significa corregir, reforzar, reacondicionar, para remediar, compensar, adoptar acertadamente, renovar, reparar, remendar o restaurar la función de otro modo. En algunas realizaciones "reparar" incluye reparación completa y reparación parcial.

El término "inverso" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un cambio en sentido contrario, o a un giro de naturaleza o efecto retrógrado.

El término "Sca-1" o "antígeno-1 de células madre" se refiere a un componente de proteína de la superficie en una vía de señalización que afecta a la capacidad de auto-renovación de las células madre mesenquimales.

El término "células madre" se refiere a células indiferenciadas que tienen un alto potencial proliferativo con la capacidad de auto-renovación que pueden generar células hijas que pueden experimentar diferenciación terminal a

más de un fenotipo celular distinto.

El término "endoprótesis vascular" se utiliza para referirse a un pequeño tubo usado para mantener abierta una arteria. La endoprótesis vascular se pliega a un diámetro pequeño, se coloca sobre un catéter con balón, se inserta a través de una arteria principal en la ingle (arteria femoral) o brazo (arteria braquial) y se ensarta en la sección estrecha/bloqueada de la arteria. Cuando se llega a la ubicación correcta, se infla el balón para empujar levemente cualquier placa fuera del camino y para ampliar la arteria (angioplastia con balón). Cuando se infla el balón, la endoprótesis vascular se expande, se fija en su sitio y forma un armazón para mantener la arteria abierta. La endoprótesis vascular permanece en la arteria de forma permanente. En ciertos sujetos, una endoprótesis vascular reduce el re-estrechamiento que se produce después de la angioplastia con balón u otros procedimientos que utilizan catéteres. Una endoprótesis vascular también puede ayudar a restaurar el flujo sanguíneo normal y mantener abierta una arteria si se ha roto o dañado por el catéter con balón. La reobstrucción (reestenosis) puede ser un problema con el procedimiento de endoprótesis vascular. Las endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos son las endoprótesis vasculares recubiertas de fármacos que se liberan lentamente. Estos fármacos pueden ayudar a mantener el vaso sanguíneo libre de reobstrucción.

Los términos "sujeto" y "pacientes" se utilizan indistintamente en la presente memoria e incluyen especies animales de origen mamífero, incluyendo seres humanos.

El término "Thy-1" se refiere a la glicoproteína Thy-1 de la superficie celular de la superfamilia de Ig expresada en las células inmunes y las neuronas de roedores y seres humanos, de la cual se plantea la hipótesis de que funciona en la adhesión celular y la transducción de señales en la diferenciación, la proliferación y la apoptosis de células T.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se utilizan indistintamente para incluir abrogar, inhibir sustancialmente, retardar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección, prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección, y proteger de estímulos perjudiciales o molestos. Tratamiento se refiere adicionalmente a la consecución de uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad del trastorno; (b) limitar el desarrollo de síntomas característicos del trastorno o los trastornos que estén siendo tratados; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno o los trastornos que estén siendo tratados; (d) limitar la recurrencia del trastorno o los trastornos en pacientes que previamente han tenido el trastorno o los trastornos; y (e) limitar la recurrencia de los síntomas en los pacientes que previamente eran asintomáticos para el trastorno o los trastornos.

El término "insuficiencia vascular" se refiere a flujo sanguíneo insuficiente.

La invención descrita proporciona composiciones farmacéuticas para prevenir la lesión miocárdica progresiva para tratar o prevenir una lesión miocárdica progresiva debida a insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente. Los términos "formulación" y "composición" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un producto de la invención descrita que comprende todos los ingredientes activos e inertes. El término "activo" se refiere al ingrediente, componente o constituyente de las composiciones de la invención descrita responsables del efecto terapéutico pretendido. Los términos "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a una formulación o composición que se emplea para prevenir, reducir en intensidad, curar o tratar de otro modo una afección o enfermedad diana.

Las células madre hematopoyéticas de la invención descrita pueden migrar, lo que significa que pueden moverse de un lugar, ubicación o zona a otras. La migración de células madre hematopoyéticas es impulsada por la quimiotaxis de CXCR-4.

## Composiciones

La composición farmacéutica para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita comprende un producto de quimiotáctica de células madre hematopoyéticas, comprendiendo el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas una población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecida en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica. En algunas realizaciones, esta actividad quimiotáctica está mediada por SDF-1 y CXCR-4. De acuerdo con algunas realizaciones, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se prepara mediante el aislamiento o la purificación de células madre hematopoyéticas CD34+ de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, sangre periférica movilizada, cordón umbilical o tejido adiposo recogidos del sujeto. De acuerdo con algunas realizaciones, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se prepara mediante el aislamiento o la purificación de células madre hematopoyéticas CD34+ de sangre periférica movilizada. Se ha demostrado que el tratamiento con factores de crecimiento hematopoyéticos causa un marcado aumento en el número de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica tal como se mide por la presencia de células CD34+ o como se mide en un análisis de formación de colonias como UFC. Tales células madre hematopoyéticas de sangre periférica movilizada (CMH) se han utilizado para el trasplante, la inmunoterapia,

y la medicina regenerativa cardiovascular. Los factores estimulantes de colonias, por ejemplo, son agentes utilizados para la movilización de células madre hematopoyéticas. Los ejemplos de los factores estimulantes de colonias incluyen, sin limitación, G-CSF, GM-CSF, y análogos y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. Por ejemplo, filgrastim, un análogo de G-CSF producido por medio de tecnología recombinante, se comercializa bajo las marcas Neupogen (Amgen); Religrast® (Reliance Life Sciences), Nugraf® (Zenotech Laboratories, Ltd., y Neukine® (Intas Biopharmaceuticals).

De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 puede ser adquirida a partir del sujeto en cualquier momento. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere temprano después de un IAM. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se adquiere tarde después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días, al menos 20 días, al menos 21 días, al menos 22 días, al menos 23 días, al menos 24 días, al menos 25 días, al menos 26 días, al menos 27 días, al menos 28 días, al menos 29 días, al menos 30 días, al menos 60 días, al menos 90 días, al menos 120 días, al menos 150 días, al menos 180 días o más desde el IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se adquiere al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 16 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses, al menos 42 meses, al menos 48 meses, al menos 54 meses, al menos 60 meses, al menos 66 meses, al menos 72 meses, al menos 78 meses, al menos 84 meses, al menos 90 meses, al menos 96 meses, al menos 102 meses, al menos 108 meses, al menos 114 meses, al menos 120 meses, al menos 126 meses, al menos 132 meses, al menos 138 meses, al menos 144 meses, al menos 150 meses, al menos 156 meses, al menos 162 meses, al menos 168 meses, al menos 174 meses, al menos 180 meses, al menos 186 meses, al menos 192 meses, al menos 198 meses, al menos 204 meses, al menos 210 meses, al menos 216 meses, al menos 222 meses, al menos 228 meses, al menos 234 meses, al menos 240 meses o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se adquiere al menos 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años, 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, una vez adquirida, se congela a -86°C y se crioconserva en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido en forma de una pluralidad de alícuotas para su posterior uso.

De acuerdo con la invención descrita, al menos 70% de las células potentes en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+. En algunas realizaciones, al menos 75% de las células en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+ que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+. En algunas realizaciones, al menos 80% de las células potentes en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+. En algunas realizaciones, al menos 85% de las células potentes en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+. En algunas realizaciones, al menos 90% de las células potentes en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+. En algunas realizaciones, al menos 95% de las células potentes en la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica son células CD34+.





expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva comprende adicionalmente al menos aproximadamente 80 millones de células CD34+ aisladas adquiridas del sujeto, que contienen adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva comprende adicionalmente al menos aproximadamente 90 millones de células CD34+ aisladas adquiridas del sujeto, que contienen adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva comprende adicionalmente al menos aproximadamente 100 millones de células CD34+ aisladas adquiridas del sujeto, que contienen adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

Para el uso en la presente invención, las células CD34+ pueden ser enriquecidas/seleccionadas por cualquiera de los mecanismos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ se enriquece en células que expresan el antígeno de células CD34 y el antígeno de células CXCR-4 mediante células activadas por fluorescencia (FACS). En algunas realizaciones, la población aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ se enriquece/selecciona mediante técnicas de inmunoseparación positiva o negativa. En algunas realizaciones, el aislamiento y/o la purificación de las células madre hematopoyéticas de la población aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ se basa en métodos de fraccionamiento de células en función del tamaño y la densidad celular, el flujo de salida de colorantes metabólicos, o la resistencia a agentes citotóxicos. En una realización, por ejemplo, la población aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ está enriquecida en células CD34+/seleccionadas utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 y una técnica de separación inmunomagnética.

Las células CD34+ aisladas se pueden identificar, cuantificar y caracterizar por medio de mecanismos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el porcentaje de células CD34+ en la población aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ y en el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas puede ser determinada mediante análisis FACS. De acuerdo con otra realización, la expresión de proteínas CD34 se cuantifica mediante transferencia Western. El término "transferencia Western" se refiere a un método para identificar proteínas en una mezcla compleja; las proteínas se separan mediante electroforesis en un medio de gel; se transfieren del gel a una lámina o membrana de unión a proteínas; y la lámina o membrana que contienen las proteínas separadas se exponen a anticuerpos específicos que se unen a, localizan y permiten la visualización de la proteína o proteínas de interés. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD34 se puede utilizar para detectar la proteína CD34 adherida a una membrana in situ.

De acuerdo con otra realización, la expresión de ARNm y ADN de CD34 en las células CD34+ aisladas pueden ser cuantificada. El término "transferencia Northern" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una técnica en la que el ARN de una muestra se separa en sus partes componentes en un gel mediante electroforesis y se transfiere a un soporte de papel modificado específicamente para que el ARNm se fije en sus posiciones electroforéticas. Las secuencias relacionadas con CD34 se identifican utilizando sondas que comprenden una molécula informadora, tal como, sin limitación, un marcador radiactivo. De acuerdo con otra realización, el nivel de expresión de CD34 y/o CXCR-4 es/son determinados mediante técnicas de PCR cuantitativa o semi-cuantitativa o PCR en tiempo real ("RT-PCR"). La abreviatura "PCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa, que es una técnica para amplificar la cantidad de ADN, haciendo por lo tanto el DNA más fácil de aislar, clonar y secuenciar. Véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.656.493, 5.333.675, 5.234.824 y 5.187.083. La PCR en tiempo real es un método de cuantificación y amplificación simultánea de ADN, por medio de la cual ADN se amplifica específicamente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y después de cada ronda de amplificación, se cuantifica el ADN.

El producto de células madre hematopoyéticas de la invención descrita comprende un número mínimo de células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas tal que está presente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, al menos aproximadamente 2% de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34+ aisladas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica se mantiene durante al menos 24 horas después de la adquisición del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. De acuerdo con otra realización, al menos aproximadamente 3% de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34+ aisladas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica se mantiene durante al menos 24 horas después de la adquisición del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. De acuerdo con otra realización, al menos aproximadamente 4% de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34+ aisladas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica se mantiene durante al menos 24 horas después de la adquisición del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. De acuerdo con otra realización, al menos aproximadamente 5% de la actividad



















aproximadamente 34%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 33%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 32%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 31%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 30%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 29%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 28%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 27%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 26%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 25%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 24%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 23%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 22%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 21%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 20%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición. De acuerdo con otra realización, la concentración máxima de suero presente en la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita es de aproximadamente 15%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición.

En algunas realizaciones, la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva se puede formular con un excipiente, portador o vehículo incluyendo, pero sin limitarse a, un disolvente. Los términos "excipiente", "portador", o "vehículo" según se utilizan en la presente memoria se refiere a materiales portadores adecuados para la formulación y administración del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas descrito en la presente memoria. Los portadores y vehículos útiles en la presente memoria incluyen cualquiera de dichos materiales conocidos en la técnica que no son tóxicos y no interactúan con otros componentes. Según se utiliza en la presente memoria la frase "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier portador sustancialmente no tóxico utilizable para la formulación y administración de la composición de la invención descrita en el que el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita se mantendrá estable y biodisponible.

El portador farmacéuticamente aceptable debe ser de pureza suficientemente alta y de toxicidad suficientemente baja para que sea adecuado para la administración al mamífero que esté siendo tratado. Además, debe mantener la estabilidad y la biodisponibilidad de un agente activo. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la manera planeada de administración en mente, para proporcionar la masa, la consistencia, etc. deseadas, cuando se combina con un agente activo y otros componentes de una composición dada. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitación, un agente aglutinante (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.), una carga (p. ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos, hidrogenofosfato de calcio, etc.), un lubricante (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.), un disgregante (p. ej., almidón, glicolato de almidón sódico, etc.), o un agente humectante (p. ej., laurilsulfato de sodio, etc.). Otros portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones de la invención descritas incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares. Dichas soluciones de portadores también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón" según se utiliza en la presente memoria se refiere a una solución o líquido cuya composición química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el

pH. Los ejemplos de tampones previstos por la invención descrita incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), solución de Ringer, dextrosa al 5% en agua (D5W), y solución salina normal/fisiológica (NaCl al 0,9%). En algunas realizaciones, la solución de infusión es isotónica con respecto a los tejidos de los sujetos. En algunas realizaciones, la solución de infusión es hipertónica con respecto a los tejidos de los sujetos. Las composiciones de la invención descrita que son para administración parenteral pueden incluir portadores farmacéuticamente aceptables, tales como soluciones acuosas estériles, soluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o soluciones en una base de aceite líquido.

En algunas realizaciones, el portador de la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita puede incluir un agente de liberación tal como un portador de liberación sostenida o de liberación retardada. En tales realizaciones, el portador puede ser cualquier material susceptible de liberación sostenida o retardada del ingrediente activo para proporcionar una administración más eficaz, p. ej., lo que da como resultado la dosificación menos frecuente y/o reducida de la composición, mejora de la facilidad de manipulación, y prolongación o retraso de los efectos sobre las enfermedades, trastornos, afecciones, síndromes, y similares, que estén siendo tratados, prevenidos o promovidos. Los ejemplos no limitantes de tales portadores incluyen liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas de polímeros naturales y sintéticos y similares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

La composiciones para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita se pueden administrar parenteralmente en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Los términos "parenteral" o "parenteralmente" según se utilizan en la presente memoria se refieren a la introducción en el organismo por medio de una inyección (es decir, administración mediante inyección), incluyendo, pero sin limitarse a, técnicas de infusión. En algunas realizaciones, la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita que comprende un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se suministra al sujeto por medio de un catéter con balón adaptado para el suministro de las composiciones fluidas (es decir, composiciones capaces de fluir) a una estructura anatómica seleccionada.

La composición estéril para prevenir la lesión miocárdica progresiva de la invención descrita puede ser una solución o suspensión estéril en un diluyente o disolvente no tóxicos parenteralmente aceptables. Una solución generalmente se considera una mezcla homogénea de dos o más sustancias; es con frecuencia, aunque no necesariamente, un líquido. En una solución, las moléculas de soluto (o sustancia disuelta) están distribuidas uniformemente entre las del disolvente. Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la que una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no sedimenta rápidamente. En la vida cotidiana, las suspensiones más comunes son las de sólidos en agua líquida. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, y la solución isotónica de cloruro de sodio (solución salina). En algunas realizaciones, se emplean soluciones hipertónicas. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles, fijados como medio disolvente o de suspensión. Para la aplicación parenteral, los vehículos adecuados consisten en soluciones, p. ej., soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano.

Las composiciones para prevenir la lesión miocárdica progresiva adicionales de la invención descrita se pueden preparar fácilmente utilizando tecnología, que es conocida en la técnica, tal como la descrita en Remington Pharmaceutical Sciences, ediciones 18 o 19, publicado por Mack Publishing Company de Easton, Pa.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos "terapéuticamente eficaz", "cantidad para prevenir la lesión miocárdica", "cantidad para reparar la insuficiencia vascular", "cantidad para prevenir las consecuencias adversas", "cantidad revertir las consecuencias adversas", o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de las composiciones de la invención que dan como resultado un efecto terapéutico o beneficioso después de su administración a un sujeto. La reparación de la insuficiencia vascular, la reparación de la lesión miocárdica, la reversión terapéutica de las consecuencias adversas o el efecto farmacéutico puede ser curando, minimizando, previniendo o mejorando una enfermedad o trastorno, o puede tener cualquier otro efecto de reparación de la insuficiencia vascular, reparación de la lesión miocárdica, reversión de consecuencias adversas, o farmacéutico beneficioso. La concentración de la sustancia se selecciona con el fin de ejercer su efecto de reparación de la insuficiencia vascular, reparación de la lesión miocárdica, reversión de las consecuencias adversas, terapéutico, o farmacéutico, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios significativos dentro del alcance y el buen criterio del médico. La cantidad eficaz de la composición puede variar con la edad y el estado físico del sujeto biológico que esté siendo tratado, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente, el momento de la infusión, el compuesto específico, la composición u otro ingrediente activo empleado, el portador concreto utilizado, y factores similares.

Un experto en la técnica puede determinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de las composiciones de la invención mediante la determinación de la dosis en una unidad de dosificación (que significa unidad de uso) que provoca una intensidad dada del efecto, en lo sucesivo referida como "dosis unitaria". El término "relación de

intensidad de dosis" se refiere a la manera en que la intensidad del efecto en un receptor individual se relaciona con la dosis. La intensidad del efecto designado en general es 50% de la intensidad máxima. La dosis correspondiente se llama dosis efectiva de 50% o DE50 individual. El uso del término "individual" distingue la DE50 basada en la intensidad del efecto según se utiliza en la presente memoria de la dosis efectiva media, también abreviada DE50, determinada a partir de la frecuencia de datos de respuesta en una población. "Eficacia" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la propiedad de las composiciones de la invención descrita para lograr la respuesta deseada, y de "efecto máximo" se refiere al efecto máximo alcanzable. La cantidad del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas en las composiciones farmacéuticas de la invención descrita que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o afección concretos dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. (Véase, por ejemplo, Goodman y Gilman THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel G. Harman, Lee E. Limbird, Eds.; McGraw Hill, New York, 2001; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, Medical Economics Company, Inc., Oradell, N. J., 1995; y DRUG FACTS AND COMPARISONS, FACTS AND COMPARISONS, INC., St. Louis, Mo., 1993). La dosis precisa que se va a emplear en las formulaciones de la invención descrita también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada sujeto.

De acuerdo con otra realización, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención descrita contienen un número mínimo de células madre hematopoyéticas CD34+ que tienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 por unidad de dosificación para la administración parenteral a discreción del médico. Se prevé que los sujetos puedan beneficiarse de múltiples administraciones de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención descrita que comprenden un número mínimo de células madre hematopoyéticas CD34+ que tienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ que expresan CXCR-4 y que poseen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

En otro aspecto de la invención descrita, las composiciones farmacéuticas para la prevención de la lesión miocárdica de la invención descrita pueden incluir adicionalmente uno o más ingredientes activos compatibles, que están destinados a proporcionar la composición para prevenir la lesión miocárdica progresiva con otro efecto farmacéutico además del proporcionado por el producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas de la invención descrita. "Compatible" según se utiliza en la presente memoria significa que los ingredientes activos de tal composición son susceptibles de ser combinados entre sí de manera que no haya interacción que reduzca sustancialmente la eficacia de cada ingrediente activo o la composición en condiciones ordinarias de uso. En algunas realizaciones, la terapia combinada comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica para prevenir la lesión miocárdica progresiva que comprende un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas de la invención descrita combinado con un agente seleccionado del grupo que consiste en una enzima convertidora de angiotensina (ECA), un beta-bloqueador, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente movilizador de células madre hematopoyéticas, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo o inotrópico, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipocolesterolemiante. De acuerdo con algunas realizaciones, el agonista del receptor de tirosina quinasa es la neuregulina 1. De acuerdo con algunas realizaciones, la neuregulina 1 es una proteína recombinante. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente de movilización de células madre hematopoyéticas es un factor estimulante de colonias. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, el agente movilizador de células madre hematopoyéticas comprende G-CSF, GM-CSF, o un análogo o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente movilizador de células madre hematopoyéticas es un análogo recombinante o derivado de un factor estimulante de colonias. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente de movilización de células madre hematopoyéticas es filgrastim.

En algunas realizaciones, la composición de la invención descrita adicionalmente comprende aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 5% de albúmina. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 0,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 0,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 1,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 1,25% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 1,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 1,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 2,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 2,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 2,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 3,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 3,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 4,0% expresada

como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 4,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es de aproximadamente 5,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición.

5 En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 5,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 4,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 4,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 4,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 4,25% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 4,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 3,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 3,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 3,25% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 3,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 2,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 2,0% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 1,75% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 1,5% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 1,25% expresada como volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la cantidad máxima de albúmina en las composiciones de la invención descrita es de aproximadamente 1%, expresada en volumen en ml/100 cc de la composición. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina humana. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina humana recombinante.

### Métodos de la descripción

40 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para preparar una composición farmacéutica para prevenir la lesión miocárdica progresiva que comprende un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas para tratar a un sujeto que lo necesite. El método comprende las etapas de

- 45 (1) adquirir una población estéril no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 del sujeto bajo condiciones estériles por medio de un procedimiento quimiotáctico de adquisición de células;
- 50 (2) congelar opcionalmente al menos una alícuota de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas de la etapa (1) a -86°C y crioconservar la al menos una alícuota en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido; y descongelar la al menos una alícuota de la etapa (2) cuando sea necesario;
- 55 (3) purificar en condiciones estériles las células CD34+ de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprenden células CD34+ de los apartados (1) o (2) con el fin de producir un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecida en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4;
- 60 (4) formular en condiciones estériles el producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas para formar una composición farmacéutica estéril;
- (5) confirmar la esterilidad de la composición farmacéutica;
- (6) liberar la composición farmacéutica estéril apta para infusión al sujeto;
- (7) cargar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica en un aparato de suministro de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; y
- (8) transportar opcionalmente el aparato de suministro que contiene la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica estéril que comprende el producto quimiotáctico estéril de células madre

hematopoyéticas a un centro de cateterismo cardíaco para la infusión al sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas puede ser adquirida del sujeto en cualquier momento. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere temprano después de un IAM. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere tarde después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días, al menos 20 días, al menos 21 días, al menos 22 días, al menos 23 días, al menos 24 días, al menos 25 días, al menos 26 días, al menos 27 días, al menos 28 días, al menos 29 días, al menos 30 días, al menos 60 días, al menos 90 días, al menos 120 días, al menos 150 días, al menos 180 días o más después de la aparición del IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 16 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses, al menos 42 meses, al menos 48 meses, al menos 54 meses, al menos 60 meses, al menos 66 meses, al menos 72 meses, al menos 78 meses, al menos 84 meses, al menos 90 meses, al menos 96 meses, al menos 102 meses, al menos 108 meses, al menos 114 meses, al menos 120 meses, al menos 126 meses, al menos 132 meses, al menos 138 meses, al menos 144 meses, al menos 150 meses, al menos 156 meses, al menos 162 meses, al menos 168 meses, al menos 174 meses, al menos 180 meses, al menos 186 meses, al menos 192 meses, al menos 198 meses, al menos 204 meses, al menos 210 meses, al menos 216 meses, al menos 222 meses, al menos 228 meses, al menos 234 meses, al menos 240 meses o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere al menos un mínimo de 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años, 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más después de la aparición de un IAM.

De acuerdo con una realización, la etapa (3) se inicia en el plazo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1). De acuerdo con algunas realizaciones, la etapa de liberación (6) prosigue sólo si el producto celular formulado en condiciones estériles se va a infundir en el sujeto en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1). De acuerdo con otra realización, la etapa (3) se inicia en el plazo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1), y la liberación de la etapa (6) prosigue sólo si el producto celular formulado en condiciones estéril se va a infundir en el sujeto en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1).

De acuerdo con algunas realizaciones, la etapa de liberación (6) prosigue sólo si el producto celular formulado en condiciones estériles se va a infundir en el sujeto en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas de la descongelación de la al menos una alícuota congelada de la etapa opcional (2). De acuerdo con otra realización, la etapa (3) se inicia en el plazo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas de la descongelación de la al menos una alícuota congelada de la etapa opcional (2), y la etapa de liberación (6) prosigue sólo si el producto celular formulado en condiciones estériles se va a infundir en el sujeto en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas de la descongelación de la al menos una alícuota congelada de la etapa opcional (2).

De acuerdo con algunas realizaciones, una alícuota congelada de la etapa (2) se descongela al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días, al menos 14 días, al menos 15 días, al menos 16 días, al menos 17 días, al menos 18 días, al menos 19 días, al menos 20 días, al menos 21 días, al menos 22 días, al menos 23 días, al menos 24 días, al menos 25 días, al menos 26 días, al menos 27 días, al menos 28 días, al menos 29 días, al menos 30 días, al menos 60 días, al menos 90 días, al menos 120 días, al menos 150 días, o al menos 180 días, desde la fecha en que la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere del sujeto en la etapa (1). De acuerdo con algunas realizaciones, la alícuota congelada de la etapa (4) se descongela al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 16 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses, al menos 42 meses, al menos 48 meses, al menos 54 meses, al menos 60 meses, al menos 66 meses, al menos 72 meses, al menos 78 meses, al menos 84 meses, al menos 90 meses, al menos 96 meses, al menos 102 meses, al menos 108 meses, al menos 114 meses, al menos 120 meses, al menos 126 meses, al menos 132 meses, al menos 138 meses, al menos 144 meses, al menos 150 meses, al menos 156 meses, al menos 162 meses, al menos 168 meses, al menos 174 meses, al menos 180 meses, al menos 186 meses, al menos 192 meses, al menos 198 meses, al menos 204 meses, al menos 210 meses, al menos 216 meses, al menos 222 meses, al menos 228

meses, al menos 234 meses o al menos 240 meses desde la fecha en que la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere del sujeto en la etapa (1). De acuerdo con algunas realizaciones, la alícuota congelada de la etapa (2) se descongela al menos 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más desde la fecha en que la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se adquiere del sujeto en la etapa (1).

De acuerdo con tales realizaciones, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas producido a partir de la alícuota congelada se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas siguientes a la descongelación cuando se somete a ensayo in vitro después de su paso a través de un catéter: (1) retiene al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70,%, al menos 80%, al menos 90%, o 100% de la mediada por la actividad de CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro.

De acuerdo con otra realización, la etapa (5), es decir, la etapa de evaluación de la esterilidad de la composición farmacéutica, comprende adicionalmente las etapas de (i) centrifugar el producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+/CXCR-4+ potentes para formar un sedimento celular y un sobrenadante, comprendiendo el sedimento celular las células CD34+/CXCR-4+ potentes; (ii) retirar en condiciones estériles el sobrenadante sin alterar el sedimento celular; y (iii) analizar si el sobrenadante está contaminado por un microbio determinando de esta manera la esterilidad del sedimento celular.

De acuerdo con una realización, en la etapa (1), el procedimiento quimiotáctico de adquisición celular es una técnica de mini-extracción de médula ósea utilizada para adquirir la población aislada no expandida de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+/CXCR-4+ potentes de la médula ósea del sujeto en condiciones estériles. Para la técnica de extracción de médula ósea, la etapa (1) del procedimiento comprende adicionalmente las etapas de: (i) precargar las jeringas de recolección con heparina antes de la extracción de médula ósea de un sujeto; (ii) aspirar la médula ósea de un cresta ilíaca posterior izquierda y una cresta ilíaca posterior derecha del sujeto utilizando las jeringas de recolección y una técnica de mini-extracción de médula ósea para formar la médula ósea extraída; y (iii) infundir la médula ósea extraída en una bolsa de recolección. En una realización, las jeringas de extracción de la etapa (i) y la bolsa de recolección de la etapa (iii) contienen una solución heparinizada libre de conservante que comprende 0,9% de solución salina normal. La concentración final de heparina en la solución salina heparinizada es de aproximadamente 20 unidades por ml a aproximadamente 25 unidades por ml.

Opcionalmente, de acuerdo con una realización del método, la médula ósea extraída se transporta a un centro de procesamiento diferente del centro del que se extrajo la médula ósea. De acuerdo con una realización, el método para el transporte de la médula ósea extraída al centro de procesamiento comprende las etapas de (a) colocar la médula ósea extraída en una bolsa de recolección; (b) colocar la bolsa de recolección en una bolsa secundaria; (c) colocar la bolsa secundaria que contiene la bolsa de recolección en un contenedor de transporte que comprende un compartimento interior que contiene hielo húmedo congelado y al menos una lámina de plástico con burbujas; (d) colocar un monitor de identificación de temperatura en el compartimento interior del contenedor de transporte; (e) sellar el contenedor de transporte; y (f) enviar el contenedor de transporte a la planta de procesamiento.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar o prevenir la lesión miocárdica progresiva debida a insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente. El método comprende las etapas de: (a) evaluar si el sujeto cumple los requisitos para la terapia con la composición farmacéutica de la descripción; (b) preparar la composición farmacéutica que comprende un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; (c) cargar la composición farmacéutica en un aparato de suministro de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; (d) suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica al sujeto; y (e) controlar la función cardíaca del sujeto. De acuerdo con una realización, en la etapa (d) la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravascular (que significa dentro de un vaso sanguíneo). De acuerdo con otra realización, la insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente es una isquemia. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la isquemia es una isquemia miocárdica. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la isquemia es una isquemia miocárdica transitoria. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la isquemia es una isquemia miocárdica crónica. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la isquemia es una isquemia de la zona limítrofe peri-infarto. De acuerdo con una realización, la insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente es una insuficiencia vascular después de un infarto agudo de miocardio resultante de enfermedad subyacente. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la lesión miocárdica progresiva es insuficiencia cardíaca.

De acuerdo con una realización, el sujeto que lo necesita es un paciente de infarto de miocardio revascularizado. El

término "revascularizado" según se utiliza en esta realización se refiere a la colocación satisfactoria de una endoprótesis vascular. Se pueden usar evaluaciones clínicas, por ejemplo, de insuficiencia coronaria utilizando pruebas que no son de laboratorio, cateterismo cardíaco, medición de citoquinas inflamatorias, y medición de los biomarcadores cardíacos para determinar el momento adecuado para administrar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con los métodos descritos. De acuerdo con algunas realizaciones, la detección de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias permite que la administración se adapte a la ventana terapéutica más crucial para el sujeto concreto. De acuerdo con algunas realizaciones, la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias se determina mediante la medición de los niveles de la citoquina o citoquinas apropiadas en plasma y orina. De acuerdo con otras realizaciones, el nivel o los niveles de la citoquina o citoquinas apropiadas se mide o miden inmunoquímicamente, por ejemplo, mediante un inmunoanálisis enzimático sándwich, mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) o mediante kits de esferas múltiplex.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición se administra a una primera fecha de infusión. De acuerdo con una realización, la primera fecha de infusión es un tiempo después de que se alcance un máximo en la producción de la cascada de citoquinas inflamatorias. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión en la que se administra la composición a un paciente de infarto de miocardio revascularizado es de aproximadamente 5 días a aproximadamente 14 días post-infarto. En algunas realizaciones, la primera fecha mínima de infusión en la que se administra la composición a un paciente de infarto de miocardio revascularizado es de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días post-infarto. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha máxima de infusión en la que se administra la composición a un paciente de infarto de miocardio revascularizado es de aproximadamente 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, o 5 días post-infarto.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición se administra en múltiples ocasiones, o cuando sea necesario a juicio del médico a cargo. De acuerdo con una de tales realizaciones, la composición se administra en la primera fecha de infusión, y opcionalmente en una segunda fecha de infusión, una tercera fecha de infusión, una cuarta fecha de infusión, una quinta fecha de infusión, una sexta fecha de infusión, una séptima fecha de infusión, una octava fecha de infusión, una novena fecha de infusión, una décima fecha de infusión, y así sucesivamente.

De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión en la que la composición se administra a un sujeto revascularizado que sufre una insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente después de un infarto de miocardio resultante de enfermedad subyacente comprende un intervalo de tiempo específico definido por un primer período y un segundo período, en donde el primer período es después de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias en la zona infartada y el segundo período es antes de la formación de la cicatriz miocárdica en la zona infartada.

De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente dos días, al menos aproximadamente tres días, al menos aproximadamente cuatro días, al menos aproximadamente cinco días, al menos aproximadamente seis días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 17 días, al menos aproximadamente 18 días, al menos aproximadamente 19 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 22 días, al menos aproximadamente 23 días, al menos aproximadamente 24 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 26 días, al menos aproximadamente 27 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 29 días, al menos aproximadamente 30 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la segunda fecha de infusión es al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 11 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 13 meses, al menos aproximadamente 14 meses, al menos aproximadamente 15 meses, al menos aproximadamente 16 meses, al menos aproximadamente 17 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 19 meses, al menos aproximadamente 20 meses, al menos aproximadamente 21 meses, al menos aproximadamente 22 meses, al menos aproximadamente 23 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 30 meses, al menos aproximadamente 36 meses, al menos aproximadamente 42 meses, al menos aproximadamente 48 meses, al menos aproximadamente 54 meses, al menos aproximadamente 60 meses, al menos aproximadamente 66 meses, al menos aproximadamente 72 meses, al menos aproximadamente 78 meses, al menos aproximadamente 84 meses, al menos aproximadamente 90 meses, al menos aproximadamente 96 meses, al menos aproximadamente 102 meses, al menos aproximadamente 108 meses, al menos aproximadamente 114 meses, al menos aproximadamente 120 meses, al menos aproximadamente 126 meses, al menos aproximadamente 132 meses, al menos aproximadamente 138 meses, al menos aproximadamente 144 meses, al menos aproximadamente 150 meses, al menos aproximadamente 156 meses, al menos aproximadamente 162 meses, al menos aproximadamente 168 meses, al menos aproximadamente 174 meses, al menos











después de la aparición de un IAM, y así sucesivamente.

De acuerdo con algunas realizaciones, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la composición administrada en la segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena y/o décima fecha de infusión se prepara a partir de una alícuota congelada y descongelada de una población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que contienen células CD34+.

De acuerdo con algunas realizaciones, el aparato de suministro del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas utilizado para suministrar la composición farmacéutica descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesite comprende una jeringa de infusión, una jeringa de lavado, una llave de paso de cuatro vías, y un catéter con balón. En una realización, el suministro intravascular comprende (a) un dispositivo de infusión conectado a una llave de paso de cuatro vías estéril que contiene la composición farmacéutica que comprende el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; (b) un dispositivo de lavado unido a la llave de paso de cuatro vías estéril, conteniendo el dispositivo de lavado una solución de lavado, y (c) un catéter unido al aparato de suministro por la llave de paso de cuatro vías estéril. De acuerdo con una realización, el dispositivo de infusión es una jeringa fabricada de cualquier material adecuado. El cuerpo y el mango de las llaves de paso de cuatro vías adecuadas se pueden fabricar del mismo material o de un material diferente. Los ejemplos de las llaves de paso de cuatro vías adecuadas incluyen, sin limitación, una llave de paso que tiene un mango de policarbonato/cuerpo de policarbonato, una llave de paso que tiene un mango de polietileno/cuerpo de polietileno, una llave de paso que tiene un cuerpo de policarbonato/mango de polietileno, o una llave de paso desechable. De acuerdo con algunas realizaciones, un dispositivo está conectado adicionalmente a la llave de paso para regular la presión ejercida sobre la solución suministrada. De acuerdo con algunas realizaciones, un dispositivo de lavado integral o jeringa está unido a la llave de paso. De acuerdo con una realización, el catéter es un catéter con balón. El término "catéter con balón" se refiere a un tipo de tubo de flexible delgado "liso" que tiene un "balón" inflable en su punta, que se utiliza durante un procedimiento de cateterismo para agrandar una abertura o paso estrechos dentro del cuerpo. El catéter con balón desinflado se coloca, inflado para realizar el procedimiento necesario, y se desinfla de nuevo para retirarlo.

La viabilidad y la eficacia potencial del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita que comprende células CD34+/CXCR-4+ potentes depende de las células que mantienen su potencia a medida que pasan a través de un catéter. El catéter utilizado en los métodos de la invención descrita tiene un diámetro interno de al menos 0,36 mm. Cualquier tipo de catéter que tiene un diámetro interno de al menos 0,36 mm puede ser eficaz en el suministro de las composiciones farmacéuticas de la invención descrita.

Por ejemplo, un catéter de control de flujo, que ralentiza el drenaje de sangre a través de la vasculatura arterial coronaria, facilita a las células el tiempo para pasar a través de la pared del vaso sanguíneo y al tejido.

En algunas realizaciones, el catéter es un catéter con balón. Por ejemplo, sin limitación, se han validado los siguientes catéteres de dilatación con balón disponibles de Cordis, Boston Scientific, Medtronic y Guidant que tienen un diámetro interno de aproximadamente 0,36 mm (véase la Tabla 1).

Tabla 1. El catéter con balón validado para la infusión de células CD34<sup>+</sup> seleccionadas a través de la ARI

Fabricante	Nombre y Núm. de modelo	Dimensiones del balón	Diámetro del lumen interno
Cordis	Raptor OTW 579-130	15 mm x 3,0 mm	0.36 mm (0,14 pulg.)
Boston Scientific	OTW Maverick 20620-1530	15 mm x 3,0 mm	0.36 mm (0,14 pulg.)
Medtronic	OTW Sprinter SPR 3015W	15 mm x 3,0 mm	0.36 mm (0,14 pulg.)
Guidant	Voyager OTW 1009443-15	15 mm x 3,0 mm	0.36 mm (0,14 pulg.)

Además, se han descrito catéteres que tienen un puerto de suministro de fluido adyacente al balón de tal manera que el balón puede ser inflado contra la pared de un vaso para aislar el sitio de suministro de la hemodinámica opuesto al balón desde el puerto, que puede estar situado distalmente del balón. Además, los se han descrito catéteres con balón que tienen lúmenes que terminan en puertos laterales dispuestos de forma proximal al catéter con balón; estos catéteres con balón generalmente se pueden denominar como catéteres de "balón/suministro", aunque las referencias específicas pueden utilizar descriptores diferentes. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.415.636 de Forman.

De acuerdo con algunas realizaciones, el método de tratamiento o prevención de una lesión miocárdica progresiva debida a insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente comprende administrar la composición farmacéutica para prevenir la lesión miocárdica progresiva a través del cateterismo con balón en una arteria a una primera fecha de infusión. En algunas realizaciones, después de la angioplastia, se inserta un catéter con balón de suministro a través de una arteria femoral en una arteria coronaria deseada, tal como la arteria coronaria descendente anterior. Algunas afecciones médicas pueden requerir tanto un catéter con balón como un catéter de

suministro de fluido para facilitar el tratamiento.

De acuerdo con algunas realizaciones, se utiliza un catéter para inyectar directamente células al miocardio.

## 5 Regímenes de tratamiento

De acuerdo con otro aspecto, se describe en la presente memoria un régimen para el tratamiento de una lesión miocárdica progresiva debido a la insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente, que comprende:

- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- (a) en primer lugar administrar al sujeto en una primera fecha de infusión una primera composición farmacéutica estéril parenteralmente a través de un catéter, comprendiendo la primera composición farmacéutica estéril de (a): (i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, en donde el primer producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende una población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas enriquecida en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del primer producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ que contienen al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es (v/v) mayor de 20%, en donde el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas después de la adquisición del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro;
- (b) en segundo lugar, administrar en una segunda fecha de infusión una segunda composición farmacéutica estéril que comprende una cantidad terapéutica de un segundo producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas; en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del segundo producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ que contienen adicionalmente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es (v/v) mayor de 20%, en donde el segundo producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas cuando se somete a ensayo in vitro después del paso a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro; y
- (c) en tercer lugar, opcionalmente administrar en una tercera fecha de infusión una composición farmacéutica estéril que comprende un tercer producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ aisladas, que contiene adicionalmente una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es (v/v) mayor de 20%, en donde el tercer producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se caracteriza adicionalmente por tener las siguientes propiedades durante al menos 24 horas cuando se somete a ensayo in vitro después de pasar a través de un catéter: (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) al menos 70% de las células son células CD34+; (3) es viable en al menos 70%; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas in vitro, de manera que el régimen de mejora al menos una medida de la función cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones, al menos una alícuota de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 adquirida del sujeto en condiciones estériles se congela a  $-86^\circ\text{C}$  y se crioconserva al menos una alícuota en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido hasta que se necesite. En ese momento, la al menos una alícuota de la población no expandida, aislada, congelada de células mononucleares autólogas que contienen células CD34+ que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se descongela y se enriquece en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. Esta población no expandida, aislada, congelada y descongelada de células mononucleares autólogas enriquecidas en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 constituye un producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre

hematopoyéticas.

De acuerdo con algunas realizaciones, el producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas se puede utilizar en la etapa (b), la etapa (c), o las etapas (b) y la etapa (c) del régimen.

5 El término "régimen", según se utiliza en la presente memoria se refiere a un curso o plan de tratamiento para preservar o restablecer la salud de un sujeto que padece una lesión miocárdica progresiva debida a una insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente.

10 De acuerdo con una realización del régimen, el producto quimiotáctico estéril descongelado de células madre hematopoyéticas, cuando pasa a través del catéter y se somete a ensayo in vitro, (i) es capaz de formar colonias hematopoyéticas; y (ii) conserva al menos 2% de la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos 48 horas después de la descongelación de la población no expandida, aislada, crioconservada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, el producto quimiotáctico descongelado de células madre hematopoyéticas, cuando pasa a través del catéter y se somete a ensayo in vitro, (i) es capaz de formar colonias hematopoyéticas; y (ii) conserva al menos 2% de la actividad mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 durante al menos 72 horas después de la descongelación de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

25 De acuerdo con otra realización, la primera fecha de infusión de (a) es al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente dos días, al menos aproximadamente tres días, al menos aproximadamente cuatro días, al menos aproximadamente cinco días, al menos alrededor seis días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 17 días, al menos aproximadamente 18 días, al menos aproximadamente 19 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 22 días, a menos aproximadamente 23 días, al menos aproximadamente 24 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 26 días, al menos aproximadamente 27 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 29 días, al menos aproximadamente 30 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión de (a) es al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 11 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 13 meses, al menos aproximadamente 14 meses, al menos aproximadamente 15 meses, al menos aproximadamente 16 meses, al menos aproximadamente 17 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 19 meses, al menos aproximadamente 20 meses, al menos aproximadamente 21 meses, al menos aproximadamente 22 meses, al menos aproximadamente 23 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 30 meses, al menos aproximadamente 36 meses, al menos aproximadamente 42 meses, al menos aproximadamente 48 meses, al menos aproximadamente 54 meses, al menos aproximadamente 60 meses, al menos aproximadamente 66 meses, al menos aproximadamente 72 meses, al menos aproximadamente 78 meses, al menos aproximadamente 84 meses, al menos aproximadamente 90 meses, al menos aproximadamente 96 meses, al menos aproximadamente 102 meses, al menos aproximadamente 108 meses, al menos aproximadamente 114 meses, al menos aproximadamente 120 meses, al menos aproximadamente 126 meses, al menos aproximadamente 132 meses, al menos aproximadamente 138 meses, al menos aproximadamente 144 meses, al menos aproximadamente 150 meses, al menos aproximadamente 156 meses, al menos aproximadamente 162 meses, al menos aproximadamente 168 meses, al menos aproximadamente 174 meses, al menos aproximadamente 180 meses, al menos aproximadamente 186 meses, al menos aproximadamente 192 meses, al menos aproximadamente 198 meses, al menos aproximadamente 204 meses, al menos aproximadamente 210 meses, al menos aproximadamente 216 meses, al menos aproximadamente 222 meses, al menos aproximadamente 228 meses, al menos aproximadamente 234 meses, al menos aproximadamente 240 meses o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión es al menos 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años, 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más después de la aparición de un IAM.

De acuerdo con otra realización, la segunda fecha de infusión de (b) es al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente dos días, al menos aproximadamente tres días, al menos aproximadamente cuatro días, al menos



meses, al menos aproximadamente 150 meses, al menos aproximadamente 156 meses, al menos aproximadamente 162 meses, al menos aproximadamente 168 meses, al menos aproximadamente 174 meses, al menos aproximadamente 180 meses, al menos aproximadamente 186 meses, al menos aproximadamente 192 meses, al menos aproximadamente 198 meses, al menos aproximadamente 204 meses, al menos aproximadamente 210 meses, al menos aproximadamente 216 meses, al menos aproximadamente 222 meses, al menos aproximadamente 228 meses, al menos aproximadamente 234 meses, al menos aproximadamente 240 meses o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión es al menos 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años, 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más después de la aparición de un IAM.

De acuerdo con otra realización, la insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente es una isquemia. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia transitoria. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia miocárdica crónica. De acuerdo con otra realización, la isquemia es una isquemia de la zona limítrofe peri-infarto. De acuerdo con otra realización, el catéter es un catéter de control de flujo. De acuerdo con otra realización, el catéter es un catéter de dilatación con balón. De acuerdo con otra realización, el catéter tiene un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm. De acuerdo con otra realización, la composición se administra a través del catéter al miocardio. De acuerdo con otra realización, la composición se administra a través del catéter intravascular. De acuerdo con otra realización, la composición farmacéutica incluye adicionalmente al menos un agente activo compatible. De acuerdo con otra realización, el agente activo se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un beta-bloqueador, un diurético, un agente anti-arrítmico, un agente movilizador de células madre hematopoyéticas, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipocolesterolémico. De acuerdo con otra realización, el agonista del receptor de tirosina quinasa es la neuregulina humana 1. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente de movilización de células madre hematopoyéticas es un factor estimulante de colonias. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, el agente movilizador de células madre hematopoyéticas comprende G-CSF, GM-CSF, o un análogo o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente movilizador de células madre hematopoyéticas es un análogo recombinante o derivado de un factor estimulante de colonias. De acuerdo con algunas realizaciones, el agente de movilización de células madre hematopoyéticas es filgrastim.

De acuerdo con otra realización, la insuficiencia vascular que se produce tempranamente o tardíamente es una insuficiencia vascular después de un infarto agudo de miocardio que resulta de enfermedad subyacente. De acuerdo con algunas de tales realizaciones, la primera fecha de infusión comprende un intervalo de tiempo específico definido por un primer período y un segundo período, en donde el primer período es después de la producción máxima de la cascada de citoquinas inflamatorias en la zona infartada y el segundo período es antes de la formación de cicatriz miocárdica en la zona infartada. De acuerdo con otra realización, en la etapa (a), el primer período de la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente 5 días post-infarto. De acuerdo con otra realización, en la etapa (a) el primer período de la primera fecha de infusión es de aproximadamente 5 días post-infarto y el segundo período es de aproximadamente 14 días post-infarto. De acuerdo con otra realización, el régimen trata la muerte celular de cardiomiocitos en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el régimen trata la hipoperfusión en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el régimen trata la hibernación del miocardio en la zona limítrofe peri-infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el régimen disminuye el área de infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, el régimen disminuye la masa del infarto, con respecto a los controles. De acuerdo con otra realización, la lesión miocárdica progresiva es un deterioro progresivo de la función del músculo cardíaco después de infarto agudo miocárdico. De acuerdo con otra realización, la lesión miocárdica progresiva es la insuficiencia cardíaca.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en el intervalo establecido está incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que se pueden incluir de forma independiente en los intervalos más pequeños también se incluyen en la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de estos dos límites incluidos están también incluidos en la invención.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también se pueden utilizar métodos y materiales cualesquiera similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención descrita, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado.

## 5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos normales en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y utilizar la invención descrita, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los autores de la presente invención consideran como su invención ni se pretende que representen que los experimentos siguientes son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (p ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deberían justificar algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio ponderal, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima.

Pruebas clínicas en Fase I

Ejemplo 1. Selección de los sujetos elegibles

Los sujetos/pacientes que presenten síntomas y hallazgos clínicos que sugieren un infarto de miocardio recibirán diagnóstico de emergencia y atención clínica de acuerdo con las directrices institucionales. Si se confirma un infarto de miocardio transmural (que significa a través de la pared), se registrarán el momento de los primeros síntomas y el momento de la colocación satisfactoria de la endoprótesis vascular. Los sujetos revascularizados recibirán tratamiento médico adecuado para reducir las tensiones de la pared ventricular de acuerdo con las directrices institucionales. El término "revascularizado" tal como se utiliza en esta realización, se refiere a la colocación satisfactoria de una endoprótesis vascular.

Todos los tipos de endoprótesis vasculares, incluyendo las endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos (por ejemplo, paclitaxel o sirolimus) son aceptables para su uso en la revascularización de la arteria relacionada con el infarto ("ARI"). Estudios previos empleando catéteres con balón para infundir productos celulares han informado que no hay ningún límite para el diámetro del vaso de referencia para la colocación de la endoprótesis vascular. Dado que este estudio está diseñado para distribuir el producto celular en la circulación de la ARI, y en un intento de limitar el potencial de daño a vasos muy pequeños, la invención descrita requiere que las endoprótesis vasculares sean colocadas antes de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita.

Los efectos de los fármacos relacionados con las endoprótesis vasculares se presentan predominantemente en el sitio de contacto de la endoprótesis vascular con la pared del vaso. Como consecuencia de la dilatación del balón, hay un flujo limitado de sangre a través de la endoprótesis vascular durante la infusión de las células, y por lo tanto no se espera ningún efecto adverso significativo mediado por fármaco sobre las células CD34+ en el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. Por otra parte, estudios clínicos previos han demostrado que 96 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular liberadora de fármaco, los niveles totales en sangre de paclitaxel o sirolimus están por debajo de los límites de detección. Por lo tanto, se espera los niveles de tejido en los sitios de miocardio a los que se pretende que migren las células CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 infundidas sean irrelevantes. Véase Sousa, J. et al., *Circulation* 107: 2274-79, 2383-89 (2003).

Durante la revascularización, la función y la perfusión cardiaca de un sujeto será evaluadas por medio de métodos convencionales. Las medidas relevantes de la función cardiaca incluyen la evaluación de la fracción de eyección global y regional, los volúmenes ventriculares, la perfusión en reposo y en esfuerzo, el movimiento de la pared segmentada, y, después de un infarto de miocardio, el tamaño del infarto.

El término "diástole" se refiere a la dilatación postsistólica normal de las cavidades del corazón durante la cuales se llenan de sangre. El término "sístole" se refiere a la contracción del corazón, especialmente de los ventrículos, por la cual la sangre se impulsa a través de la aorta y la arteria pulmonar para atravesar las circulaciones sistémica y pulmonar, respectivamente.

El término "fracción de eyección" ("FE") se refiere al porcentaje de la sangre desde el ventrículo vaciado durante la contracción. Más específicamente, es la fracción del volumen diastólico final que se expulsa con cada latido; es decir, que es el volumen sistólico (VE) dividido por el volumen diastólico final (VDF). El volumen de sangre dentro de un ventrículo inmediatamente antes de una contracción es conocido como volumen diastólico final, mientras que el volumen de sangre que queda en un ventrículo en el final de la contracción se conoce como volumen sistólico final. La diferencia entre los volúmenes diastólico final y sistólico final es el volumen de eyección, el volumen de sangre eyectada con cada latido. En un varón sano de 70 kg (154 libras), el VE es de aproximadamente 70 ml y el VDF

ventricular izquierdo es de 120 ml, proporcionando una fracción de eyección de 70/120, o 0,58 (58%). Una FE dentro del intervalo de 55 a 60% se considera normal. La fracción de eyección del ventrículo derecho ("FEVD") normalmente es igual a la del ventrículo izquierdo ("FEVI") dentro de límites estrechos.

5 Otras medidas de la función cardíaca incluyen la evaluación del índice de volumen de eyección y la velocidad de acortamiento circunferencial de la fibra. Strauer, et al., Circulation 106: 1913-1918 (2002). El volumen de eyección (VE) es la cantidad de sangre que el ventrículo izquierdo eyecta en un solo latido, medido en milímetros por latido (ml/latido). El VE puede ser indexado al tamaño del cuerpo de un paciente mediante la división de VE por Área de Superficie Corporal (ASC) para producir el Índice de Eyección (IE).

10 La evaluación de la reparación del miocardio infartado también ha incluido la evaluación de la perfusión de la región peri-infarto utilizando gammagrafía con talio. Id. El término "perfusión" se refiere al proceso de suministro nutritivo de sangre arterial a un lecho capilar en el tejido biológico. La perfusión ("F") se puede calcular mediante la fórmula  $F = (Pa - Pv) / R$ , donde Pa es la presión arterial media, Pv es la presión venosa media, y R es la resistencia vascular:

15 La resonancia magnética nuclear (RMN) es una herramienta útil para evaluar la función cardíaca y la viabilidad (tamaño del infarto) en este entorno. Véase Yin, A, et al., Blood 90: 5002 hasta 5012 (1997).

20 El día después de la colocación satisfactoria de endoprótesis vasculares, los sujetos serán evaluados para determinar su elegibilidad para los estudios y, en su caso, se les ofrecerá el consentimiento informado para participar en el estudio. Se evaluarán sujetos que presenten síntomas durante no más de tres (3) días antes de la colocación satisfactoria de la endoprótesis vascular, antes de la descarga, para determinar su elegibilidad para el estudio. A los sujetos que se encuentre que cumplen los criterios de elegibilidad (véase más adelante) se les ofrecerá el consentimiento informado para participar.

25 Los sujetos que dieron su consentimiento tendrán una entrada en el estudio SPECT no antes de 96 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular. Los sujetos son elegibles para continuar en el estudio si la FEVI es inferior o igual al 50% en la ecocardiografía y se observa una anomalía de la pared ventricular segmentaria en la ARI. Los sujetos elegibles pueden completar de inmediato la función cardíaca de referencia y la evaluación de la perfusión.

30 Específicamente, la función cardíaca de referencia incluye:

35 Perfusión Cardíaca. La perfusión se evaluar utilizando una exploración con radionúclido Sestamibi de tecnecio (Tc-99m) rutinaria reposo y después de adenosina intravenosa. Se utilizará el Emory Cardiac Toolbox para la cuantificación mediante imágenes. La evaluación utilizará un modelo de 17 segmentos. Un laboratorio de revisión central evaluará los estudios de perfusión con el intérprete ciego para la cohorte del estudio. La mejoría de la perfusión se expresa en términos semicuantitativos (sí/no). El porcentaje de pacientes que se observa que tienen mejoría de la perfusión se comparará entre las cohortes de dosis.

40 IRM. El movimiento regional y global de la pared, el tamaño del infarto, y los volúmenes del ventrículo izquierdo ("VI") se medirán utilizando IRM. Los sujetos recibirán contraste de Gadolinio durante la exploración. La IRM utilizará la técnica de bloqueo de la respiración. La obtención de imágenes de precesión en estado estacionario para obtener la función global y regional del VI se llevará a cabo en forma de obtención de imágenes con Gadolinio. Los volúmenes sistólico y diastólico finales del ventrículo izquierdo y, FEVI, VI final y la dimensión diastólica, el espesor de la pared durante la sístole y la diástole de la región infartada, y el tamaño del infarto serán referidos utilizando el modelo de 17 segmentos de la AHA/AVV con extensión transmural del infarto referida como <25%, 26%-50%, 51%-75% y >76%. Un laboratorio de revisión central evaluará la IRM con el intérprete ciego para la cohorte del estudio.

50 Para ser seleccionado para este estudio, los sujetos deben cumplir la totalidad de los siguientes criterios clínicos ("criterios de inclusión"):

- Edad: 18 - 75 años;
- Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST cumpliendo los criterios de la ACC/AHA, con síntomas de dolor de pecho en el plazo de 3 días desde la admisión. Los criterios incluyen (elevación del segmento ST > 1 mm en derivaciones de los miembros o de 2 mm en dos o más derivaciones precordiales y aumento de los niveles de troponina, creatina quinasa MB (CPK MB) o ambos, categoría de insuficiencia cardíaca de la New York Heart Association (NYHA) (se debe registrar) de I, II o III;
- Elegibles para la intervención coronaria percutánea (ICP);
- Elegibles para IRM;
- Elegibles para Tomografía Computarizada por Emisión de un Solo Protón (SPECT);
- El sujeto debe ser capaz de dar su consentimiento informado por escrito y debe estar dispuesto a participar en todas las evaluaciones de seguimiento del estudio requeridas;
- Los sujetos deben tener un contenido de hemoglobina (Hb) > 10 gramos/dL, un recuento de glóbulos

blancos (RGB) > 3500 células/mm<sup>3</sup>, un recuento de plaquetas > 100.000 células/mm<sup>3</sup> y una razón normalizada internacional (RNI, una prueba de coagulación de la sangre) < 2,0 el día antes de la extracción de la médula ósea;

- 5 • Los sujetos deben tener una creatinina sérica <2,5, bilirrubina total <2,0 en el plazo de 7 días desde la extracción de la médula ósea;
- La ARI y la lesión diana deben ser claramente identificables cuando la enfermedad esté presente en más de un vaso;
- La reperfusión y la colocación de la endoprótesis vascular intracoronaria satisfactorias, con flujo de Trombolisis en el Infarto de Miocardio (TIMI) 2 o 3 y ARI con < 20% de estenosis tras la revascularización;
- 10 • Los sujetos deben ser considerados elegibles para recibir sedación consciente, mini-extracción de médula ósea, y segundo cateterismo para infusión de Producto Quimiotáctico de Células Madre Hematopoyéticas;
- Se deben registrar el tipo de endoprótesis vascular utilizada y la hora y la fecha de inserción;
- Las endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos debe limitarse a los tipos de paclitaxel o sirolimus;
- 15 • Los sujetos incluidos deben tener una supervivencia esperada de al menos un año y no deben tener enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización, o se debe esperar que requieran intervención en el plazo de 6 meses desde el ingreso al estudio.

Los sujetos que cumplan cualquiera de los siguientes criterios no reúnen los requisitos, y se excluirán del estudio ("criterios de exclusión"):

- 20 • Sujetos que no son candidatos para intervención percutánea, sedación consciente, IRM, obtención de imágenes mediante SPECT o mini-extracción de médula ósea;
- Historial de dolor en el pecho sostenido no aliviado con nitratos, que se produce 4 o más días antes de la revascularización;
- 25 • Los sujetos que fracasan en la re-perfusión de la arteria coronaria relacionada con el infarto o en la colocación satisfactoria de una endoprótesis vascular;
- Sujetos que presentaban choque cardiogénico (presión sistólica <80 en vasopresores o contrapulsación intra-aórtica);
- Sujetos con una rama lateral de la lesión diana > 2 mm y con estenosis con un estrechamiento > 50% del diámetro ostial de después de la revascularización;
- 30 • Sujetos no susceptibles de recibir aspirina, clopidogrel o ticlopidina;
- Sujetos que recibieron warfarina deben tener un RNI menor de o igual a 2; el término RNI se refiere a RNI Razón Normalizada Internacional, que es un sistema establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia para informar de los resultados de pruebas de coagulación de la sangre (coagulación);
- 35 • Sujetos con estenosis aórtica severa;
- Sujetos con estados de inmunodeficiencia grave (p. ej., SIDA);
- Sujetos con cirrosis que requiere el tratamiento médico activo;
- Sujetos con enfermedad maligna activa que requiere tratamiento (excepto cáncer de piel de células basales);
- 40 • Sujetos con abuso de alcohol y/o de otras sustancias activo documentado;
- Mujeres con potencial para procrear a menos que una prueba de embarazo sea negativa en el plazo de 7 días desde la mini-extracción de médula ósea;
- Sujetos con fracciones de eyección mayores del 50% en el ingreso en el estudio mediante SPECT (96 a 144 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular);
- 45 • Sujetos con menos de tres meses de terapia antiplaquetaria planificada después del procedimiento basado en índices;
- Sujetos con enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización que requiere intervención planificada durante los siguientes 6 meses;
- Sujetos con participación en un ensayo de investigación en curso;
- 50 • Sujetos con infección bacteriana activa que requiere antibióticos sistémicos.

Las evaluaciones basales de la función cardíaca y de la perfusión cardíaca se obtendrán un día antes de la mini-extracción de médula ósea planificada e infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas (véase más abajo). Se llevará a cabo una mini-extracción de médula ósea ("MEM") al día siguiente de la evaluación inicial de la función cardíaca y de la perfusión cardíaca.

## Ejemplo 2. Cateterización cardíaca

### Preparación y cobertura en condiciones estériles

El sujeto será llevado al Laboratorio de Cateterización Cardíaca después de que el investigador haya obtenido un consentimiento informado. El sujeto recibirá una preparación y cobertura en condiciones estériles en el laboratorio de cateterismo cardíaco.

## Cateterización cardiaca

El acceso vascular se obtendrá mediante una técnica convencional utilizando la ingle derecha o izquierda. Se colocará una funda en la arteria femoral o la arteria braquial derecha o izquierda. El examen arteriográfico coronario se llevará a cabo mediante la obtención de vistas convencionales de ambas arterias coronarias derecha e izquierda. Se obtendrán múltiples vistas para identificar la arteria relacionada con el infarto con la endoprótesis vascular instalada. Todos los sujetos recibirán los medicamentos convencionales durante el procedimiento de cateterismo, de acuerdo con la práctica habitual.

10 Ejemplo 3: Procedimiento de adquisición para adquirir el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que a continuación se enriquece en células madre CD34+

15 Aunque se contempla que cualquier procedimiento de adquisición apropiado para adquirir el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende células CD34+ potentes está dentro del alcance de la invención descrita, el siguiente ejemplo ilustra uno de tales procedimientos referidos en la presente memoria como una técnica de mini-extracción de médula ósea.

## Preparación de jeringas de extracción

20 Antes de la extracción de la médula ósea, se prepararán cuarenta jeringas de 10cc cargadas con aproximadamente 2 ml de una solución salina heparinizada libre de conservante (aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 125 unidades/ml, Núm. de Cat. APP 42592B o equivalente) en condiciones estériles. Se inyectará heparina a través de un puerto estéril a cada una de dos bolsas de 100 ml de solución salina normal estéril al 0,9% ("Normal Saline", Núm. de Cat. Hospira 7983-09 o equivalente) después de la retirada de 10 cc a 12,5 cc de solución salina normal de cada bolsa, dando como resultado una concentración de heparina final de aproximadamente 100 unidades/ml (U/ml) a aproximadamente 125 unidades/ml (U/ml). Se cargarán 2 ml de la solución de heparina libre de conservante (aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 125 U/ml) en condiciones estériles en cada una de las cuarenta jeringas de 10 cc, que a continuación se tapan y se colocan en una bolsa estéril para su transporte a la zona de extracción.

30 Los sujetos serán preparados para la extracción de médula ósea después de obtener el consentimiento informado por escrito, como se detalla en el Ejemplo 1. Se proporcionará sedación consciente mediante procedimientos convencionales y directrices institucionales. La extracción de médula ósea se llevará a cabo en condiciones estériles. El término "condiciones estériles" según se utiliza en la presente memoria incluye lavado adecuado y el uso de batas con una máscara y guantes estériles utilizados por el médico y el auxiliar a cargo de la extracción. El procedimiento de extracción se puede realizar fuera de una sala de operaciones como sigue: después de la preparación y cobertura en condiciones estériles, cada cresta ilíaca debe ser anestesiada con una solución de lidocaína al 1% utilizando un mínimo de 10 ml para cada cresta. La zona de la anestesia debe ser una zona circular de no menos de 10 cm de diámetro. La aguja de extracción se inserta hasta que se pincha la cresta ilíaca. La tapa y el estilete se retiran y se recogen 2 ml de médula ósea en la jeringa de extracción de 10 ml que contiene 2 ml de la solución de heparina. La jeringa se retira a continuación y se coloca en el campo estéril. Después de volver a insertar el estilete, la aguja de extracción se hace avanzar un poco y después se hace girar 90°. El estilete se retira a continuación y se recogen 2 ml adicionales de médula ósea a la jeringa de extracción recuperada del campo estéril. Este procedimiento se repitió dos veces más hasta que la jeringa de recolección contiene 8 ml de médula ósea para un total de 10 ml de médula ósea heparinizada a una concentración de heparina final de aproximadamente 20 U/ml a aproximadamente 25 U/ml. Por último, la jeringa de extracción completa se entrega al auxiliar de extracción y se agita y se infunde en la bolsa de recolección estéril como se describe a continuación. El médico de extracción toma a continuación la otra aguja de extracción que había sido limpiada previamente con la solución de heparina y repite este procedimiento.

50 La jeringa de extracción llena se infunde en la bolsa de recolección estéril de la siguiente manera. Se entrega al asistente de extracción la jeringa de extracción llena y éste la vacía en la bolsa de recolección de 500 ml, a través del adaptador estéril adosado a la bolsa. A continuación, la aguja de extracción se lava con la solución de heparina en la jeringa de lavado y se devuelve al campo estéril.

55 El procedimiento de extracción se repite en una cresta ilíaca hasta que se han recogido y vaciado de la bolsa de recolección aproximadamente 19 jeringas. El mismo procedimiento se repite en la otra cresta ilíaca hasta que se han llenado aproximadamente otras 19 jeringas. Un total de treinta y ocho aspiraciones de 8 ml de ambas crestas ilíacas (idealmente 19 de cada cresta ilíaca) darán como resultado 302 ml de médula ósea extraída en un volumen final de 380 ml a una concentración de heparina de aproximadamente 20 U/ml a aproximadamente 25 U/ml.

60 La bolsa de recolección se sella ligando de tubo de conexión tres veces y a continuación se sujeta distal a las ligaduras. La bolsa se etiqueta debidamente "Extracción de Médula Ósea Humana" y los resultados del procedimiento de extracción, incluyendo el volumen final recogido y cualquier complicación relacionada con el

procedimiento, se registran en el formulario de informe de casos de la Puntuación de Riesgo de la Clínica Mayo (MCRS). La etiqueta completada se fija a la bolsa de la médula ósea. La bolsa se coloca a continuación en una bolsa de transporte estéril para ser transportada a la planta de procesamiento.

#### 5 Ejemplo 4. Preparación del producto de médula ósea para su transporte

En una realización, la médula ósea extraída se transporta al centro de procesamiento de la siguiente manera. Cuando el sitio clínico se prepara para enviar la preparación de la médula ósea, se proporcionará aviso de 24 horas al centro de procesamiento. El laboratorio de procesamiento realizará disposiciones para el envío en el menor tiempo posible para su recogida para la entrega el mismo día al laboratorio de procesamiento. Inmediatamente después de recoger la médula ósea, el producto de médula ósea se colocará en el contenedor de transporte suministrado. El contenedor de transporte contiene dos pequeños bloques de hielo húmedo congelado en la parte inferior y una envoltura de burbujas en la parte superior del hielo húmedo. El producto de médula ósea se coloca en una bolsa secundaria y la bolsa secundaria se coloca en la parte superior de la envoltura de burbujas. Se fija en el interior de la caja un monitor de la etiqueta de temperatura (un sensor utilizado para controlar la temperatura interna). A continuación se coloca en la parte superior del producto otra capa de envoltura de burbujas antes de que se selle el contenedor de transporte.

#### 20 Ejemplo 5: Selección de células CD34+ del producto médula ósea extraído

Las células CD34+ se aislaron a partir del producto de la médula ósea extraído. En una realización, las células CD34+ se aislaron utilizando el anticuerpo monoclonal (Mab) anti-CD34, anti-IgG de ratón de oveja M-450 Dynabeads®, y componentes del Agente de Liberación de Células Madre PR34+ (TM) del Sistema de Selección Magnética de Células Isolex 300i (Baxter Healthcare Corp. Gato. No. 4R9734) como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.536.475, 5.035.994, 5.130.144, 4.965.204, 5.968.753, 6.017.719, 6.251.295, 5.980.887, 6.676.937, Solicitud Publicada de los Estados Unidos Núm. 2003/0232050, el prospecto Isolex 300i. Este sistema operativo ha sido adaptado para el aislamiento de células CD34+ de la médula ósea de acuerdo con la invención descrita.

30 A su llegada al laboratorio de procesamiento, el producto médula ósea extraído (en la bolsa de recogida) se inspecciona inmediatamente y la bolsa se inspecciona en busca de fugas. La extracción debe ser de flujo libre y sin grumos aparentes y no debe ser hemolizada. La extracción no se utilizará si la integridad de la bolsa ha sido vulnerada de cualquier manera.

35 El producto de médula ósea debe ser procesado en el plazo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas de la inspección. Se obtiene un contenedor de paquete de transferencia de 300 ml o 400 ml, y se fija un equipo de transferencia de plasma al puerto de muestreo del contenedor. El producto de médula ósea se transfiere desde la bolsa de recolección al contenedor del paquete de transferencia. El producto de extracción de médula ósea reunido se mezcla a fondo invirtiendo el contenedor veinte (20) veces.

40 A continuación se toman muestras del producto de extracción de médula ósea agrupado para su análisis. En una realización, se retira un volumen total de 2,0 ml del producto y se divide en alícuotas de la siguiente manera: 0,3 ml se utilizan para una ronda por duplicado de Recuento Sanguíneo Completo (RSC) utilizando un analizador hematológico; 0,2 ml se dispensan a un tubo de vidrio de 75x100 mm para la detección de bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante Tinción de Gram (Gram Stain Kit, VWR, Núm. Cat. BB231401); como control de esterilidad, 0,6 ml se dispensan a una botella de Caldo de Soja Trypticaseína (TSB) (VWR, Núm. Cat. 29446-184) para el análisis de crecimiento de las bacterias aeróbicas, 0,6 ml se dispensan en una botella de Medio Fluido de Tioglicolato (FTM) (VWR Núm. Cat. 29446-138) para el análisis de crecimiento de las bacterias anaeróbicas, y se utilizan 0,3 ml en el análisis de flujo para el recuento de células CD34+ y la viabilidad celular.

50 La recolección se pesó en una balanza electrónica, y se registra la tara adecuada de la bolsa de recolección. La relación del volumen del producto de la médula ósea con respecto al peso del producto se puede expresar como

55 
$$\text{Volumen (ml)} = [\text{Peso (g) de producto} - \text{Tara de la bolsa (g)}] \div 1,06 \text{ (g/ml)} \text{ (Fórmula 1)}$$

El número total de células nucleadas (TCN) en el producto de la médula ósea se calcula utilizando el recuento de glóbulos blancos (RGB) obtenidos del RSC de acuerdo con la relación siguiente:

60 
$$\text{TCN} = \text{RGB}/\mu\text{l} \times 1000 \times \text{Volumen de producto (ml)} \text{ (Fórmula 2)}$$

El número de células CD34+ en el producto de médula ósea se calcula a partir de la siguiente relación:

Total de células CD34+ en el producto de médula ósea = Número de células CD34+/ $\mu\text{l}$  x 1.000 x Volumen de producto (ml) (Fórmula 3)

## ES 2 610 241 T3

El volumen de Glóbulos Rojos (GR) del producto extracción de médula ósea se calcula a partir de la siguiente relación:

Volumen de GR (ml) = Volumen de producto (ml) x Hematocrito (%)/100 (Fórmula 4)

Si la recolección contiene más de 20 ml de GR, se requiere la reducción de glóbulos rojos. Los glóbulos rojos se reducen mediante centrifugación. Se lleva a cabo la centrifugación a 1.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente para separar la capa leucocitaria de los glóbulos rojos. El término "capa leucocitaria" se refiere a una fina fracción de color blanco grisáceo de una muestra de sangre que contiene la mayoría de los glóbulos blancos (leucocitos). Inmediatamente después de la centrifugación, se conecta una jeringa de 60 ml a la parte inferior de la bolsa de centrifugación y los glóbulos rojos se retiran. Se puede necesitar más de una jeringa para recoger todos los GR concentrados. El producto de la médula ósea empobrecido en GR se lava a continuación para eliminar el contenido de grasa.

Se utiliza una jeringa de 1 ml para eliminar 0,3 ml del producto de células de médula ósea empobrecido en GR a través del equipo de transferencia conectado a la bolsa de producto y se realiza un RSC. El TCN del producto de médula ósea empobrecido en GR se determina a partir de la relación:

TCN total del producto empobrecido en GR = RGB/ $\mu$ l de producto empobrecido en GR x 1000 x 180 ml (Fórmula 5)

La recuperación de TCN del producto empobrecido en GR, que debe ser al menos 80% del recuento del producto original, se calcula a partir de la relación:

Recuperación de TCN = TCN del producto empobrecido en GR  $\div$  TCN del producto no procesado x 100% (Fórmula 6)

El volumen total de GR se calcula como se ha descrito anteriormente; el volumen de glóbulos rojos en el producto empobrecido en GR debe ser <20 ml.

En una realización de acuerdo con la invención descrita, se utiliza el sistema Isolex 300i para procesar el producto empobrecido en GR o el producto de la médula ósea, cuyo volumen de GR es <20 ml de acuerdo con las siguientes etapas de procesamiento:

(i) La médula ósea se lava automáticamente para eliminar las plaquetas;

(ii) las células CD34 positivas (CD34+) se marcan específicamente para la selección mediante incubación con el anticuerpo monoclonal (Mab) para CD34 Isolex 300i;

(iii) el reactivo no unido se elimina mediante lavado de la suspensión celular con la solución tampón;

(iv) las células sensibilizadas con CD34+ (que significan las células CD34+ marcadas con Mab CD34) son capturadas con anti-IgG de ratón de oveja Dynabeads M-450;

(v) Se utiliza una columna de selección para separar las Dynabeads marcadas magnéticamente que tienen las células CD34+ capturadas de las células no deseadas, que se lavan a través de la columna de selección y se recogen en la Bolsa de la Fracción Negativa; y

(vi) El Agente de Liberación de Células Madre PR34+ libera las células CD34+ de la columna, y las células CD34+ se recogen en la Bolsa de Producto Final. El sistema realiza varias etapas de lavado, eliminando la mayor parte del líquido a la Bolsa de Residuos de Tampón.

La fracción CD34+ Isolex (R) seleccionada se analizó como sigue para determinar los rendimientos de RGB y células CD34+. El volumen de la Fracción Positiva para CD34 se determina mezclando las células en la Bolsa de Producto Final; la bolsa se masajea suavemente con la mano para asegurar la distribución uniforme de las células. Se inserta un equipo de transferencia en el puerto de muestreo de la Bolsa de Producto Final y se acopla una jeringa de 60 ml. La suspensión de células se retira a la jeringa (máximo de 50 ml a la vez) con el fin de medir el volumen total.

Se utiliza una jeringa de 3 ml o 5 ml para extraer una muestra de 2,0 ml de la Bolsa de Producto Final a través del equipo de transferencia para las pruebas de control de calidad. Los volúmenes tomados en forma de alícuotas de las muestras y los análisis realizados sobre esas muestras se describen como anteriormente, es decir, RSC: 0,3 ml; Tinción de Gram: 0,3 ml; recuento de células CD34+ y viabilidad celular: 0,2 ml.

El TCN total de la Fracción Positiva para CD34 se calcula a partir de la relación:

TCN total de la Fracción Positiva = RGB/ $\mu$ l de la Fracción Positiva x 1000 x Volumen de la Fracción Positiva (Fórmula 7)

La recuperación de TCN de la Fracción Positiva, que debe ser inferior a 5% del recuento de producto original, se

calcula a partir de la siguiente relación:

Recuperación de TCN =  $\frac{\text{TCN total de la Fracción Positiva}}{\text{TCN total del producto no procesado}} \times 100\%$  (Fórmula 8)

5 El número total de células CD34+ viables en la Fracción Positiva se determina a partir de la siguiente relación:

Total de células CD34+ en la Fracción Positiva =  $\frac{\text{Número de células CD34+}/\mu\text{l de producto final} \times 1.000 \times \text{volumen de Producto final (ml)}}{\text{Fórmula 9}}$

10 La recuperación de células CD34+ de la Fracción Positiva se calcula a partir de la siguiente relación:

Recuperación de células CD34+ =  $\frac{\text{Total de células CD34+ de la Fracción Positiva}}{\text{Total de células CD34+ del producto no procesado}} \times 100\%$  (Fórmula 10)

15 Ejemplo 6. Preparación de células CD34+ seleccionadas para la transfusión

20 Las muestras del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se retirarán para su análisis para determinar el recuento de RGB, mediante citometría de flujo (para el recuento y la viabilidad de células CD34+), la tinción de Gram, y la esterilidad.

25 Las células CD34+ se caracterizan mediante análisis de citometría de flujo con fluorescencia CD34bright y CD45dim mediante doble marcaje con anticuerpos anti-CD34 y anti-CD45 (Beckman Coulter, PN IM3630). La viabilidad celular de las células CD34+ y CD45+ se determina mediante la exclusión de las células que se tiñen que absorben el colorante de ADN intercalante 7-aminoactinomicina D (7AAD). Véase Brocklebank AM, Sparrow RL. Citometry. 2001; 46: 254-261 (2001); Barnett D, et al. Br. J Haematol. 106: 1059-1062 (1999); Sutherland, et al., J Hematotherapy 5: 213-226 (1996), y las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.520.110; 4.859.582; 5.055.556; la Patente Europea Núm. 76.695; la Patente de Canadá Núm. 1.179.942 (PE, APC); la Patente de Estados Unidos Núm. 4.876.190 (PerCP); las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.268.486; 5.486.616; 5.569.587; 5.569.766; 30 5.627027 (Cy); las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.714.680; 4.965.204; 5.035.994 (CD34); la Patente de Estados Unidos Núm. 5.776.709 (método de Lisis/sin lavado); las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.723.218 y 5.187.288 (Tubos TruCOUNT).

35 Se pueden utilizar cualquier citómetro de flujo o un dispositivo equivalente para la realización de análisis de recuento y viabilidad de células CD34+. En una realización, el laboratorio de procesamiento emplea un citómetro de flujo BD FACSCalibur (TM) y se utiliza el soporte lógico BD FACSComp (TM) para la configuración y el seguimiento del aparato. Para la adquisición y el análisis se preinstalan un molde y un panel de etiquetas de leyenda. Antes de su uso, los reactivos, a saber CD45FITC/CD34PE, Fluoroesferas Stem-Count, Solución de Lisado de Cloruro de Amonio Concentrado, y Colorante de Viabilidad 7AAD, se llevó a la temperatura ambiente. Se ejecutan controles de 40 células CD34+ como un control positivo para afirmar que el instrumento está configurado para el análisis de células CD34+, y los resultados se comparan con un rango de porcentaje de CD34 predeterminado por el fabricante.

45 El producto de médula ósea no elaborado y los productos quimiotácticos de células madre hematopoyéticas procesados mediante Isolex se pueden analizar mediante muchos procedimientos diferentes. En una realización, o ejemplo, inmediatamente después de recibir la muestra, si el recuento de RGB de la muestra es mayor de  $2 \times 10^7$  células por ml, la muestra se diluye con el fluido envolvente para alcanzar un recuento celular de aproximadamente  $2 \times 10^7$  RGB por ml. Cien microlitros de producto diluido se dividen en alícuotas en dos tubos de 15 x 100 mm. Usando una micropipeta, se añaden 20  $\mu\text{l}$  de CD45FITC/CD34 PE y el reactivo colorante de viabilidad 7-AAD a cada tubo y las muestras se someten a vórtice suavemente. Los tubos se recubren con papel de aluminio y se dejan a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos. Los glóbulos rojos se lisan mediante la adición de 1,5 ml de 1x Solución de Lisado a cada tubo, sometiendo a vórtice suavemente. Los tubos se incuban durante diez minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Las muestras se almacenan a aproximadamente 2°C - 50 aproximadamente 8°C (es decir, en un baño de hielo), protegidas de la luz hasta que se realiza la adquisición de datos. La adquisición de datos se debe realizar en el plazo de una hora desde la adición del tampón de lisis. Antes de la adquisición de datos, las Fluoroesferas Stem-Count se vuelven a suspender mediante rotación por volteo (10 55 veces). Se añaden a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de fluoroesferas y se someten a vórtice suavemente teniendo cuidado de no generar burbujas de aire. El recuento absoluto de células CD34+ en el producto se calculó a partir de la relación:

60  $\text{Número de células CD34+ viables por } \mu\text{l de producto} = \text{LCD34} \times \text{FAC}$  (Fórmula 11)

donde LCD34 es el número promedio de eventos para CD34+ Vivas/Todas CD45+; "FAC" es la concentración de Fluoroesferas Analizada; y F es el número promedio de singletes de Fluoroesferas contados.

El volumen de la Fracción Positiva para CD34+ se calcula para obtener el número requerido de células CD34+ para

la dosificación requerida. El Volumen Requerido de la Fracción Positiva (ml) se define como:

La dosificación de células CD34+ Requeridas ÷ (Total de células CD34+ por µl en la Fracción Positiva x 1.000). (Fórmula 12)

5 Se dispensa un número apropiado de células a un tubo cónico de 50 ml y se centrifuga a 500 x g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante utilizando una pipeta serológica de 30 ml y se elimina en forma de residuo teniendo cuidado de no dispersar los sedimentos celulares de la parte inferior de los tubos durante este procedimiento. La solución de infusión (20 ml) se añade al tubo de la Fracción Positiva de Células CD34+ y las células se dispersan utilizando una pipeta serológica de 10 ml repitiendo el pipeteado. Las células resuspendidas se centrifugan durante 10 minutos a 500 g. Se utiliza una pipeta serológica de 30 ml (sin alterar el sedimento celular) para transferir la solución de sobrenadante/infusión a un tubo cónico de 50 ml con una etiqueta de "Sobrenadante de la Fracción Positiva" fijada. El tubo que contiene el sobrenadante se somete a vórtice para homogeneizar la solución. Se utiliza una pipeta serológica de 10 ml para transferir 10 ml del sobrenadante homogeneizado de nuevo al tubo de la Fracción Positiva de Células CD34+. Los restantes 10 ml de suspensión en el tubo de Sobrenadante se utilizan para pruebas de esterilidad (5 ml cada uno en una botella de TSB (Caldo de Soja Tripticaseína) y una botella de FTM (Tioglicolato Líquido)). Las células de la Fracción Positiva para Células CD34+ se vuelven a suspender retirando y aspirando lentamente a través de una aguja de extremo romo fijada a una jeringa de 10 ml (Jeringa de Infusión) varias veces. La suspensión celular se retira a la jeringa, se vuelve a aspirar cualquier burbuja de aire, y se retira la aguja de extremo romo. La jeringa de infusión se ancla al puerto de inyección de una llave de paso de 4 vías.

El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita se liberará para su infusión sólo si cumple los siguientes criterios:

- 25
- Pureza de células CD34<sup>+</sup> de al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%;
  - Se produce una tinción de Gram negativa para la fracción positiva seleccionada;
  - Niveles de endotoxina: menos de aproximadamente 0,5 unidades de endotoxina/ml;
  - El rendimiento de células CD34<sup>+</sup> viables del "Producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas" cumple la dosificación requerida según la cohorte de tratamiento;
  - Las células CD34+ son viables en al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% mediante 7-AAD;
  - Resultado de esterilidad USP para el "Sobrenadante fracción positiva": negativo (14 días después); y
  - La selección de células CD34<sup>+</sup> de médula ósea se inició en el plazo de aproximadamente 12 horas a
- 30
- 35 aproximadamente 24 horas desde la finalización de la extracción de médula ósea.

La evaluación de la esterilidad en el producto de células madre que incluye la tinción de Gram y la endotoxina se llevará a cabo antes de la liberación del producto para la infusión. Se llevará a cabo el cultivo de esterilidad USP (bacterias y hongos) y se informará al investigador principal de los resultados. En caso de un resultado de esterilidad USP positivo, el sujeto y el médico de guardia a cargo serán informados de inmediato, facilitando la identificación y la sensibilidad del organismo cuando esté disponible, y la documentación de los resultados del tratamiento y el tratamiento antimicrobiano apropiado serán registrados por el sitio de investigación y el patrocinador.

Después de conocer estos criterios de liberación, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas será liberado para la infusión y se empaquetará para su transporte al centro de cateterismo. También se enviará una muestra para las pruebas in vitro.

De acuerdo con algunas realizaciones, el producto será liberado sólo si la selección de células CD34+ se inicia en el plazo de 12 horas a aproximadamente 24 horas desde la finalización de la extracción de médula ósea, y sólo si se va a infundir en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la extracción de la médula ósea.

De acuerdo con algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que contiene células CD34+, que contienen adicionalmente células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se divide en alícuotas, que se congelan a -86°C y se crioconservan en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido para su administración posterior. Cada una de estas alícuotas se puede utilizar para preparar un producto quimiotáctico descongelado de células madre hematopoyéticas de la siguiente manera. La población congelada no expandida, aislada de células mononucleares autólogas se descongela un tiempo suficiente antes de la administración planeada de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 enriquecida en células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 con el fin de producir el producto quimiotáctico descongelado de células madre hematopoyéticas. Las muestras de este producto quimiotáctico descongelado de células madre hematopoyéticas se

retirarán para analizarlas para determinar el recuento de leucocitos, mediante citometría de flujo (para el recuento y la viabilidad de las células CD34+), la tinción de Gram, y la esterilidad. El producto quimiotáctico descongelado de células madre hematopoyéticas será liberado para su infusión en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas siguientes a la descongelación de la alícuota congelada de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+.

Ejemplo 7. Formulación del Producto Quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+

El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se formula en 10 ml de solución salina (Cloruro de Sodio al 0,9%, Inyección, USP, Hospira, Núm. Cat. 7983-09) con un suplemento de HSA (albúmina humana USP, Alpha, Núm. Cat. 521303) al 1% ("Solución de Infusión") y más de 20% de suero autólogo. Además, puede haber cierta cantidad traza de materiales (cantidades no determinadas) en el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que se utilizan y que quedan durante el procesamiento del producto. Estos materiales incluyen: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco libre de Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> (D-PBS) (Baxter, Núm. Cat. DER9865), citrato de sodio (Baxter/Fenwal, Núm. Cat. 4B7867), Hetastarch (Abbott Laboratories, Núm. Cat. 0074-7248-03), IgIV (Gammagard® Inmunoglobulina Intravenosa, Baxter, Núm. Cat. 060384) y los reactivos del Kit de reactivos de Células Madre Isolex® 300i (Baxter, Núm. Cat. 4R9734) incluyendo anticuerpo monoclonal anti-CD34, agente de liberación de células madre y esferas magnéticas anti-ratón de Oveja.

Ejemplo 8. Transporte de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas al centro de cateterismo

De acuerdo con el plan original, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que cumplió los criterios de suministro debía ser cargado en una jeringa de 10 cc estéril en una cabina de seguridad biológica de Clase 100 localizada dentro de un ambiente aséptico controlado, p. ej., como mínimo, un centro de procesamiento celular de Clase 100.000; es preferible, pero no se requiere la Clase 10.000. El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se suspendió en 10 ml de PBS con un suplemento de HSA y el contenedor se etiquetó de acuerdo con criterios de suministro. El plan original se designó para cuatro cohortes de dosificación que constaban de cinco sujetos cada uno en cada cohorte. El primero fue para recibir aproximadamente  $5 \times 10^6$  células CD34+, el segundo aproximadamente  $10 \times 10^6$  células CD34+, el tercero aproximadamente  $20 \times 10^6$  células CD34+ y el cuarto aproximadamente  $30 \times 10^6$  células CD34+. Los sujetos de las cohortes de dosificación más altas con cantidades inadecuadas de células CD34+ que cumplían con la dosis de la cohorte asignada se debían añadir a una cohorte previa a la mayor dosis de células CD34+ posible. La jeringa de infusión cargada se acopló a una llave de paso de cuatro vías, junto con una jeringa de lavado, tapada y que tenía protecciones de seguridad aplicadas para evitar fugas. El aparato de suministro se selló en una bolsa doble estéril y se colocó en una caja de transporte seguro para el transporte al centro de cateterismo cardíaco. Tras la liberación del producto de células madre hematopoyéticas y la asignación de la cohorte, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se envió al sitio de cateterismo para la infusión directa de la arteria relacionada con el infarto ("administración intravascular").

Ejemplo 9. Infusión intracoronaria de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas

Tras la notificación de la planta de procesamiento celular de que el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas había sido suministrado mediante infusión (véase más arriba), se programó la llegada simultánea del sujeto/paciente al centro de cateterismo para coincidir con la llegada del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas.

Se realizaron recuentos de enzimas cardíacas (péptido natriurético cerebral (BNP), troponina y CPK MB), hemograma completo, un panel químico completo (prueba de la función renal y hepática) y un electrocardiograma inmediatamente antes de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. Se registró la evaluación clínica del estado de insuficiencia cardíaca de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA).

Tras la recepción del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas y la liberación de la garantía de calidad final (por fax) para la infusión, el sujeto 1 se sometió a cateterismo cardíaco como se detalló anteriormente. La arteriografía coronaria se realizó para evaluar la permeabilidad (que significa la apertura, la libertad de obstrucción) de la arteria relacionada con el infarto y el flujo angiográfico de la Trombolisis en el Infarto de Miocardio (TIMI). Se colocó un catéter con balón sobre un alambre en el segmento de la endoprótesis vascular de la arteria relacionada con el infarto. Se puede utilizar cualquier catéter de dilatación con balón apropiado que tenga un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm compatible con la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. Después de la colocación, se retira el cable del balón. El aparato de suministro del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se retiró de la caja de transporte.

El aparato de suministro estaba en una bolsa estéril y tenía bloques de seguridad adosados a la jeringa de infusión (que contenía el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas) y la jeringa de lavado. El aparato

consistía en la jeringa de infusión (que contenía 10 ml del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas) y la jeringa de lavado (que contenía 6 ml de solución de lavado) en donde ambas estaban conectadas a una llave de paso de cuatro vías estéril. El aparato de suministro completo se agitó suavemente para resuspender las células CD34+ en la solución de infusión. La jeringa de lavado se utilizó para eliminar todas las burbujas de aire del aparato (para evitar la embolia de aire) y el aparato de suministro se conectó después al catéter de dilatación con balón a través de la llave de paso.

El suministro del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas al sujeto mediante infusión procedió de la siguiente manera. En primer lugar, con la llave de paso abierta entre la jeringa de lavado (6 ml de solución) y el lumen central del catéter con balón, se infundió 1 ml de solución de lavado (después de la eliminación de la protección) al lumen central del catéter a lo largo de 15 segundos. En segundo lugar, el balón se infló a dos atmósferas de presión en el interior de la endoprótesis vascular para evitar daños en el endotelio de la arteria coronaria y a continuación se ajustó la válvula de la llave de paso para permitir la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas distal al balón inflado (después de la eliminación de la protección). Con el balón inflado, se infundieron a mano de aproximadamente 3 cc a aproximadamente 4 cc de la jeringa de infusión durante un período de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 45 segundos (cronometrado y documentado). El balón se mantuvo inflado para permitir la adherencia de las células CD34+ y para evitar el flujo de retorno durante un total de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 3 minutos (incluyendo el tiempo de infusión). Entre las infusiones, el balón permanecerá desinflado durante 3 minutos para permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperusión). Se esperaba que fueran necesarias 3 infusiones para vaciar la jeringa de infusión. En tercer lugar, tras la finalización de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas y con el balón desinflado, la válvula de la llave de paso se ajustó para permitir el llenado de la jeringa de infusión desde la jeringa de lavado. Por último, con el balón inflado (aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 3 minutos), se infundieron los 4 ml de solución de lavado ahora en la jeringa de infusión durante un período de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 45 segundos para desalojar de la jeringa y el catéter cualquier célula CD34+ residual en la circulación de la ARI. A continuación se retiró el catéter.

Se llevó a cabo una evaluación de la isquemia relacionada con la infusión (flujo sanguíneo inadecuado) durante las primeras 24 horas después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. Se obtuvo un electrocardiograma en aproximadamente 12 horas y aproximadamente a las 24 horas y se obtuvo química analítica de las enzimas cardíacas (BNP, troponina y CPK MB) aproximadamente cada 8 horas durante aproximadamente 24 horas. La evaluación de la arritmia (monitor Holter durante 24 horas) se realizó inmediatamente después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas.

Todos los sujetos fueron dotados de termómetros digitales y de un libro de registro para registrar la temperatura dos veces al día durante 30 días después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas. Los sujetos fueron instruidos para notificar al centro investigador inmediatamente de las temperaturas registradas por encima de 38,056°C. Se realizó un rápido seguimiento con los cultivos y evaluaciones radiográficas apropiados de acuerdo a los patrones clínicos de rutina. Se informó sobre infecciones bacterianas documentados, si las hubiera, a la IRB y la FDA.

Las visitas adicionales de seguimiento para las evaluaciones de seguridad incluyen visitas en el plazo de 1 semana y 2 semanas después de la administración del producto. Las evaluaciones de visita incluyeron un historial médico integral y un examen físico, electrocardiograma, hemograma completo, perfil bioquímico completo (prueba de función renal y hepática), y medida de los marcadores cardíacos séricos (BNP, troponina y CPK MB). La evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA se registró la semana 1 y 2. A las 4 semanas de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas, se obtuvieron un EKG y las enzimas cardíacas (BNP, troponina y CPK MB). Se utilizó un monitor Holter 24 para evaluar las arritmias. Se registró la evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA. También se llevó a cabo la prueba de esfuerzo utilizando un protocolo de Bruce de síntoma limitante.

Aproximadamente 3 meses y aproximadamente 6 meses después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas en el primer período de infusión, se realizó un seguimiento Holter durante 24 horas. Se registró la evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA. Aproximadamente 6 meses después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas, se registró una prueba de esfuerzo de síntoma limitante utilizando el protocolo de Bruce.

Una evaluación de la seguridad aproximadamente 12 meses después de la infusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas incluirá un historial médico integral y un examen físico, EKG, hemograma completo, perfil bioquímico completo (pruebas de función renal y hepática), y la medición de los marcadores cardíacos séricos (BNP, troponina y CPK MB). Se realizará un seguimiento Holter de 24 horas. Se registrará la evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA.

Análisis estadístico

Se utilizó en algunas realizaciones un diseño pareado, donde cada sujeto sirve como su propio control. Las diferencias entre antes y después del tratamiento, por sujeto, se analizaron para cada una de las cuatro funciones cardíacas numéricas (es decir, contractilidad miocárdica, volumen sistólico final, volumen diastólico final; y perfusión). Se utilizó un análisis de regresión lineal para evaluar la importancia del aumento de los niveles de dosificación. La hipótesis nula es que la pendiente de la recta de regresión (nivel de dosificación que sirve como variable independiente y la diferencia del "después" menos el "antes" que sirve como la variable dependiente) es igual a cero. El poder de rechazo de una hipótesis nula falsa es 0,68 a nivel de significación alfa de 0,05 para una alta correlación de 0,5 entre la dosis y la mejora de la función cardíaca. Se utilizó el intervalo de confianza de 95% sobre la pendiente de la línea de regresión para evaluar la importancia médica del aumento del nivel de dosificación. Si la pendiente de la línea de regresión no fue significativamente diferente de cero, pero el origen de la recta de regresión es diferente de cero, todos los grupos de tratamiento se combinaron y se llevará a cabo una prueba t pareada para evaluar la eficacia global del tratamiento. La hipótesis nula es que la media de las diferencias es igual a cero. También se llevó a cabo una prueba de Wilcoxon de los rangos con signo como una prueba adicional para determinar la efectividad del tratamiento. Esta prueba es más potente (rechazando una hipótesis nula falsa) que una prueba t si las observaciones no se distribuyen normalmente. El poder de la prueba t es 0,79 para rechazar una hipótesis nula falsa al nivel alfa de 0,05 y el tratamiento tiene un efecto de tamaño medio (un efecto lo suficientemente grande como para ser discernible a simple vista). La importancia médica de la magnitud del efecto del tratamiento se determinó mediante el cálculo de un intervalo de confianza de 95% respecto a la media de las diferencias (la media real de las diferencias residirá en este intervalo en 95% de las muestras analizadas).

Para evaluar la mejora de la perfusión, se utilizó regresión logística con el nivel de dosificación como variable independiente y el cambio de perfusión (1 = sí, 0 = no) como variable dependiente. Las razones de probabilidades de los cuatro niveles de dosificación se calcularon por separado sirviendo  $5,0 \times 10^6$  células como el grupo índice.

Se utilizó una prueba binomial para evaluar la importancia de la dosificación de células CD34+ sobre la perfusión. Se esperaba que no hubiera ninguna mejora espontánea en un defecto de perfusión si estuviera presente en la exploración de perfusión inicial. Por lo tanto, cualquier mejora clínicamente significativa en un defecto de perfusión cuando se evaluó a los 6 meses y se comparó con el valor inicial se consideró un efecto del tratamiento.

Un grupo concurrente (controles no tratados) que cumplía la elegibilidad, pero que no recibió células CD34+ se evaluó de una manera similar a la del grupo tratado y evaluó para determinar la mejora significativa en la función/perfusión cardíaca. Cada sitio de estudio alternó acumulación de controles tratados y no tratados. Se utilizó una moneda al aire para determinar la secuencia sujeto inicial (tratado o no tratado) en cada sitio. Se realizó la comparación de resultados entre los grupos tratados y no tratados. El laboratorio central fue cegado con respecto al tratamiento o la ausencia de tratamiento.

Se realizó una evaluación para determinar si existía una correlación entre los resultados clínicos y el contenido celular (CD34+) y/o en el crecimiento de colonias in vitro (UFC-GM, UFC-GEMM, UFC-E), movilidad de CXCR-4 y expresión del antígeno de superficie para CXCR-4.

Tal como estaba previsto originalmente, un total de 20 sujetos iban a recibir el producto quimiotáctico de células hematopoyéticas de la invención descrita. Iba a haber cuatro cohortes de dosis (aproximadamente  $5 \times 10^6$ , aproximadamente  $10 \times 10^6$ , aproximadamente  $20 \times 10^6$ , y aproximadamente  $30 \times 10^6$  células CD34+). Si el contenido del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas en cualquier sujeto no era suficiente para la cohorte asignada, ese sujeto fue reasignado a una cohorte previa a la mayor dosis posible. Los sujetos que tenían menos de  $5 \times 10^6$  células CD34+ disponibles para la infusión fueron retirados del estudio, no se sometieron a la repetición del cateterismo y no se contaron como parte del grupo de estudio de 20 sujetos. Además, si el producto quimiotáctico de células hematopoyéticas de la invención descrita no cumplía los criterios de liberación, el sujeto no recibió el producto de células y no se contó como un candidato del estudio para ser sustituido por el siguiente sujeto. En cualquier grupo de dosificación de la cohorte, si un sujeto experimentaba una toxicidad aguda (que significa inmediata a aproximadamente 7 días después de la infusión) inesperada que se consideraba que (probablemente) era el resultado de la infusión del producto celular, el aumento de la dosis se detuvo y se enrolaron 3 sujetos adicionales a ese nivel de dosis. Si no se observó ninguna otra toxicidad inesperada, se reanudó el aumento de dosis, sin embargo, no se superó el total de 20 sujetos. Si se producía otra toxicidad a ese nivel de dosis, todos los sujetos posteriores se enrolaron al siguiente nivel de dosis más baja.

El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita no fue administrado a ningún sujeto en la cohorte de dosis más alta hasta que todos los sujetos de la cohorte de dosis anterior hubieron completado sus evaluaciones de seguimiento dos semanas después de la administración del producto.

Ejemplo 10. Resultados experimentales de estudios preliminares

Se realizó una serie de estudios preclínicos preliminares en un intento de lograr los siguientes objetivos:

- (1) Optimizar el procedimiento de fabricación para la Mini-Extracción de Médula Ósea (MMH);
- (2) Evaluar la estabilidad del producto de MMH entrante y el producto de células hematopoyéticas saliente.
- (3) Evaluar la tolerancia del diámetro interno y la seguridad de los catéteres;
- (4) Evaluar la compatibilidad del producto celular con catéteres destinados a ser utilizados en el estudio; y
- (5) Evaluar la idoneidad de utilizar el sobrenadante del producto de células hematopoyéticas final para representar el producto de células hematopoyéticas final para el ensayo de estabilidad.

Estudio 1: Optimización del procedimiento de fabricación para la mini-extracción de médula ósea (MMH)

Se evaluó el efecto de las variables de fabricación clave sobre el rendimiento de las células CD34 viables a partir de productos de médula ósea representativa. Un total de seis (6) donantes voluntarios mayores de 45 (basándose en un intervalo de 45-57) y tres menores de 30 años de edad (basándose en un intervalo de 21-28) acordó donar un promedio de 45 ml (basándose en intervalo de 31 ml-54 ml de médula ósea) y proporcionaron Consentimiento Informado por escrito para el procedimiento. La técnica de aspiración de médula empleado fue idéntica a la que se realiza para la MMH a clínica escala (véase el Ejemplo 3, más arriba). Como se muestra en la Tabla 2, los recuentos celulares de células nucleadas (CN) y las células CD34+ derivadas de células de Mini-Extracción de Médula Ósea ("MMH") recogidas de donantes voluntarios parecían estar relacionados con la edad.

Tabla 2: Efecto de la edad del donante sobre el rendimiento de células nucleadas de la MMH.

Donante	Grupo de edad de los donantes					
	Mayores de 45 (45-57)			Menores de 30 años (23-28)		
	Volumen de MMH (ml)	Viabilidad (%)	Células CD34 (10 <sup>5</sup> por ml)	Volumen de MMH (ml)	Viabilidad (%)	Células CD34 (10 <sup>5</sup> por ml)
1	31,30	83,85	1,27	48,00	96,90	7,98
2	43,50	97,42	3,89	50,60	96,28	11,60
3	51,50	85,74	1,37	39,90	87,17	5,99
4	47,50	80,95	1,76	-	-	-
5	53,70	98,21	5,58	-	-	-
6	44,90	96,36	4,48	-	-	-
Media	45,40	90,42	3,06	46,17	93,45	8,52

El recuento medio de células de los productos de médula ósea de donantes de más edad (N = 6) fue de 28,4 x 10<sup>6</sup> (basándose en un intervalo de 15,8 x 10<sup>6</sup> - 49,5 x 10<sup>6</sup>) células nucleadas por ml ["CN/ml"], con una viabilidad media, según se determina mediante exclusión con colorante 7-AAD y citometría de flujo, de 90,42% (basándose en un intervalo de 80,95% - 98,21%) y contenido de CD34+ de 3,06 x 10<sup>5</sup>/ml (basándose en un intervalo de 1,27 x 10<sup>5</sup>/ml - 5,58 x 10<sup>5</sup>/ml). En el grupo de sujetos jóvenes (N = 3), el recuento medio de células recogido de la aspiración de médula fue de 46,2 x 10<sup>6</sup> CN/ml (basándose en un intervalo de 39,9 x 10<sup>6</sup> CN/ml - 50,6 x 10<sup>6</sup> CN/ml), con una viabilidad media en 7-AAD de 93,5% (basándose en un intervalo de 87,17% - 96,90%) y un contenido total de CD34+ de 8,5 x 10<sup>5</sup>/ml (basándose en un intervalo de 5,99 x 10<sup>5</sup> células CD34+/ml - 11,60 x 10<sup>5</sup> células CD34+/ml).

Empobrecimiento de glóbulos rojos y Selección de CD34

Tabla 3: Recuperación de células CD34+ después del empobrecimiento en GR de la MMH del grupo (4557) de donantes de más edad.

	Donante					Media
	1	2	3	4	5	
Método de empobrecimiento en GR	Heta-almidón	Capa leucocitaria	Capa leucocitaria	Capa leucocitaria	Capa leucocitaria	-
% de Células CD34+ en MMH: Pre-empobrecimiento en GR	1,09	1,64	1,63	1,45	1,99	1,58
% de Células CD34+ en MMH: Post-empobrecimiento en GR	1,33	1,55	1,51	1,61	1,84	1,57
Recuperación de células CD34+ post-empobrecimiento en GR (%)	65,68	92,36	80,66	78,79	81,67	79,83

5 Como se muestra en la Tabla 3, tras el empobrecimiento en glóbulos rojos de los productos de médula ósea derivados de MMH recogida de los donantes de más edad, se recuperó un promedio de 79,83% (basándose en un intervalo de 65,68% - 92,36%) de las células CD34 de la MMH inicial. No hubo diferencia significativa entre la pureza de las células CD34 inicial (1,58%, basándose en un intervalo de 1,09% - 1,99%) y la de después del empobrecimiento en glóbulos rojos (1,57%, basándose en un intervalo de 1,33% - 1,84%). Los métodos de ensayo para cuantificar la quimiotaxis son bien conocidos en la técnica, y se utiliza una amplia variedad de técnicas para evaluar la capacidad quimiotáctica de una variedad de tipos celulares. Además, los ensayos de migración celular están disponibles comercialmente.

10 El ensayo utilizado para la determinación de la actividad migratoria in vitro de células CD34+ mediada por CXCR-4, que se adapta de un análisis descrito en Jo et al (J. Clin. Invest. 105:101-11 (2000)), se basa en la migración transmembrana de células CD34+. La migración transmembrana de las células CD34+ de la cámara superior a la cámara inferior de una placa de poliestireno Transwell (6,5 mm de diámetro, 5 µm de tamaño de poro, Costar) es inducida por SDF-1 colocado en la cámara inferior. El número de células CD34+ viables que migraba en la cámara inferior se determina a continuación mediante análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD34/CD45 y 7-AAD. El control de la migración espontánea de las células CD34+ se realiza sin SDF-1 en la cámara inferior.

15 La subpoblación de células potentes que (i) expresan CXCR-4 y (ii) tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, expresaba VEGFR-2 a niveles muy bajos (media 0,84%, intervalo de 0 a 2,39%). Debido a que la subpoblación de células CD34+ potentes co-expresa CXCR-4, {co-expresión de CXCR-4; media 60,63%, rango 31 a 98% de la mediana 52% de células CD34+, capaces de migrar en un gradiente de SDF-1} mientras que menos de 2,5% de las células CD34+ co-expresa VEGFR-2, funcionalmente, estas células son VEGFR-2-, es decir, VEGFR-2 no es el que conduce a las células a la zona peri-infarto.

25 Tabla 4: Recuperación de células CD34+, pureza, actividad migratoria de CXCR-4, viabilidad y crecimiento UFC hematopoyético inmediatamente después del tratamiento Isolex de MMH del grupo de donantes más edad (45 años de edad a 57 años de edad).

	Donante					Media
	1	2	3	4	5	
Tiempo de almacenamiento (horas) a 4°C y 8°C	0	0	0	12	10,50	-
Recuperación de células CD34 <sup>+</sup> (%)	32,36	29,09	15,31	43,60	40,20	32,11
Pureza de las células CD34 <sup>+</sup> (%)	76,76	73,64	71,66	72,52	72,01	73,32
Viabilidad de las células CD34 <sup>+</sup>	98,49	93,80	97,38	98,28	98,39	97,27
Actividad migratoria de CXCR-4 de las células CD34 <sup>+</sup> (%)	22,10	2,60	22,00	19,90	19,70	17,26
UFC Hematopoyéticas /100 células CD34 <sup>+</sup> cultivadas	27,5	25,0	18,9	17,0	21,00	21,9

30 Como se muestra en la Tabla 4, después de la selección de CD34 utilizando el sistema Isolex, que incluye Dynabeads(R) inmunomagnéticas y mAb anti-CD34, se recuperó un promedio de 32,11% (basándose en un intervalo de 15,31% - 43,60%) de las células CD34 con una pureza media de 73,32% (basándose en un intervalo de 71,66% - 73,64%) y una viabilidad media de 97,27% (basándose en un intervalo de 93,80% - 98,49%). Además, estas células CD34+ muestran un promedio de capacidad migratoria de CXCR-4 17,26% (basándose en un intervalo de 2,60% - 22,10%) inmediatamente después de la selección y fueron capaces de generar colonias hematopoyéticas (21,89 colonias/100 células CD34+ sembradas (basándose en un intervalo de 17,0 colonias/100 células CD34+ sembradas - 27,5 colonias/100 células CD34+ sembradas) en cultivo MethoCult.

40 Estudio 2: Evaluación de la estabilidad de la mini-extracción de médula ósea entrante y del producto quimiotáctico de células hematopoyéticas saliente

45 Se llevó a cabo una serie de experimentos, utilizando voluntarios sanos, con el fin de evaluar la estabilidad de la MMH entrante y del producto quimiotáctica de células madre hematopoyéticas de salida de la invención descrita. La determinación de la viabilidad funcional de los productos entrantes y salientes se evaluó mediante viabilidad celular (7-AAD), la migración de células CD34<sup>+</sup> mediada por SDF-1/CXCR-4, y la capacidad de formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (capacidad de formación de colonias UFC).

50 Para evaluar la estabilidad del producto entrante para fines de transporte y logísticos y para la coordinación con los programas clínicos, los productos de MMH se almacenaron a 4°C y 8°C como se indica. Para evaluar la estabilidad del producto saliente para fines de transporte y logísticos, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+ asiladas enriquecidas después de la MMH se almacenó a 4°C a

8°C como se indica.

5 En estudios preliminares, las células se procesaron inmediatamente o se mantuvieron a 4-8°C durante 12 horas antes de su procesamiento para evaluar el impacto de la duración del transporte y la logística en la fabricación de un producto celular adecuado para la infusión. A pesar de la duración del almacenamiento antes de su procesamiento (caducidad del producto de entrada), los resultados no variaron significativamente (datos no mostrados).

10 En otra serie de experimentos, las células se almacenaron de aproximadamente 4°C a aproximadamente 8°C durante 12 horas y aproximadamente 24 horas antes de la nueva evaluación para simular productos infundidos aproximadamente 36 horas y aproximadamente 48 horas, respectivamente, después de la MMH.

Tabla 5: Viabilidad, crecimiento y actividad migratoria mediada por CXCR-4 de las células CD34+ 13-13,5 horas después del procesamiento Isolex de la MMH.

	Donante		
	1	2	Media
Viabilidad de las células CD34+ (%)	97,59	96,90	97,24
Actividad migratoria mediada por CXCR-4 de las células CD34+ (%)	7,70	7,50	7,60
UFC Hematopoyéticas /100 células CD34+ cultivadas	18,00	25,00	21,5

15 Como se muestra en la Tabla 5, las células CD34+ aisladas del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas tenían una viabilidad media de 97,24% (basándose en un intervalo de 96,90% -97,59%) y capacidad migratoria media mediada por CXCR-4 de 7,60% (basándose en un intervalo de 7,50% -7,70%). Como se muestra en la Tabla 6, después de un almacenamiento durante un promedio de 26,3 horas (basándose en un intervalo de 26,0 h - 26,5 h), estas células tenían una viabilidad media de 96,81% (basándose en un intervalo de 96,39% - 97,22%) y una capacidad migratoria mediada por CXCR-4 de 4,75% (basándose en un intervalo de 4,0% - 5,00%). Además, las células todavía mantenían su capacidad de generar colonias hematopoyéticas in vitro.

Tabla 6: Viabilidad, crecimiento y actividad migratoria media mediada por CXCR-4 de las células CD34+ 26,0-26,5 horas después del procesamiento Isolex de MMH.

	Donante		
	1	2	Media
Viabilidad de las células CD34+ (%)	97,22	96,39	96,81
Actividad migratoria mediada por CXCR-4 <sup>+</sup> de las células CD34 <sup>+</sup> (%)	4,50	5,00	4,75
UFC Hematopoyéticas/100 células CD34+ cultivadas	28,00	14,00	21,00

25 Por lo tanto, un promedio de 13,3 horas (basándose en un intervalo de 13,0h - 13,5h) después de la selección de las células CD34+, lo que representa 26,0 a 26,5 horas después de la MMH, la población de células CD34+ tenía una viabilidad media de 97,24% (basándose en un intervalo de 96,90% - 97,59%), con una capacidad migratoria media mediada por CXCR-4 de 7,60% (basándose en un intervalo de 7,50% -7,70%). A un promedio de 26,3 horas (basándose en un intervalo de 26,0 h - 26,5h) después de la MMH, la viabilidad media de las células fue de 96,81% (basándose en un intervalo de 96,39% - 97,2%) y se mantuvo una capacidad migratoria media mediada por CXCR-4 de 4,75% (basándose en un intervalo de 4.50% - 5.00%).

35 La formulación de la composición de la invención descrita que comprende este producto apareció un promedio de 8 horas (8,63 ± 1,80 n = 4) después de la recogida de la MMH, y la infusión se produjo en el plazo de 24 horas de la MMH.

Tabla 7: Viabilidad de las células CD34+ en función del tiempo después de la MMH: (12 horas dentro de fecha y 48 horas fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH)

Tiempo (h) después de la MMH (DT)	Viabilidad de las células CD34 <sup>+</sup> (%)				
	A	B	C	D	Media (DT)
	98,22	97,13	97,60	99,00	97,99 (0,29)
24	95,32	97,76	-	-	96,54 (1,73)
33	91,92	96,32	95,90	80,00	91,04 (7,62)

40

En un experimento posterior, se recogieron cuatro (4) productos de MMH (A-D) y se almacenaron a 4°C durante una media de 12,8 horas (basándose en una serie de 12,5h-13,0h) antes de que las células CD34+ se aislaran mediante el procedimiento Isolex. Este grupo, que representa el grupo de "12 horas dentro de fecha" (que significa que el producto fue formulado dentro del tiempo dentro de fecha de aproximadamente 12 horas), se evaluó la viabilidad funcional fuera de fecha a las "24 horas" (22,9h 1,63, N = 4), "33 horas" (33,38 ± 1,11, N = 2), y "48 horas" (48,33 ± 0,82, N = 4) después de la extracción MMH. Los datos, que se resumen en las Tablas 7-9, demuestran que después de la MMH, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+ enriquecidas mantiene 1) alta viabilidad (> 90,0% de viabilidad media, Tabla 7), 2) 76,85% (± 21,66) de su capacidad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4 (Tabla 8), y 3) su capacidad para formar colonias hematopoyéticas in vitro (Tabla 9), respectivamente.

La Tabla 8 muestra la migración mediada por SDF-1/CXCR-4 de células CD34+ (% de células CD34+ que migran) en función del tiempo después de la MMH: 12 horas dentro de fecha y 48 horas fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH). Con el fin de determinar el impacto del tiempo post-MMH sobre la capacidad migratoria de las células CD34+, el punto horario "X" se consideró como el punto de referencia, ya que se determinó que representaba el punto horario más temprano después de la MMH en el que se podría esperar razonablemente que las células fueran devueltas al sujeto en una formulación acabada. La actividad migratoria restante en los siguientes puntos horarios (Y = 33 horas, Z = 48 horas) se calculó como el porcentaje de capacidad migratoria que quedaba después del punto horario de 24 horas (X).

Tabla 8: Migración de células CD34+CXCR-4+ mediada por SDF-1/CXCR4 (% de células CD34+ que migran) en función del tiempo después de la MMH: 12 horas dentro de fecha y 48 horas fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH).

Tiempo (h) después de la MMH	Células CD34 <sup>+</sup> CXCR-4 <sup>+</sup> que migran (%)				
	A	B	C	D	Media
24 (X)	20,00	18,50	21,50	36,00	24 (8,09)
% Restante	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00 (0)
33 (Y)	21,80	10,50	-	-	16,15 (7,99)
*% Restante	109,0	56,76	-	-	82,88 (36,94)
48 (Z)	8,80	17,00	17,50	31,00	18,58 (9,19)
@% Restante	44,00	91,89	81,40	86,00	75,85 (21,66)

\* = (Y ÷ X) x 100%

@ = (Z ÷ X) x 100%

La Tabla 9 muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 células CD34+ viables sembradas en función del tiempo después de la MMH: 12 horas dentro de fecha y 48 horas fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH).

Tabla 9: UFC por cada 100 células CD34+ viables sembradas en función del tiempo después de la MMH

Tiempo (h) después de la MMH	Núm. de UFC por 100 células CD34 <sup>+</sup> viables sembradas				
	A	B	C	D	Media (DT)
24	13,00	30,00	37,00	39,00	29,75 (11,81)
33	12,00	34,00	-	-	23,00 (15,56)
48	15,00	30,00	20,00	8,00	28,25 (14,57)

En un intento de prolongar los parámetros de estabilidad tanto dentro de fecha como fuera de fecha para el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita que comprende células CD34+ desde 12 horas (dentro de fecha) y 48 horas (fuera de fecha) (12/48), respectivamente, a 24 horas (dentro de fecha) y 72 horas (fuera de fecha) (24/72), respectivamente, se purificaron células CD34 aproximadamente 12 horas después de la extracción MMH (12 horas dentro de fecha) y aproximadamente 24 horas después de la extracción MMH (24 horas dentro de fecha) y se analizó la viabilidad funcional aproximadamente a las 48 horas y aproximadamente a las 72 horas de tiempo total de la MMH al momento de la prueba/infusión anticipada (48 horas fuera de fecha y 72 horas fuera de fecha, respectivamente). Específicamente, se evaluaron las características de viabilidad funcional de dos MMH/productos quimiotácticos de células madre hematopoyéticas de la invención descrita a las 48 horas y las 72 horas. Los datos resultantes se compararon adicionalmente con los mismos índices derivados en los puntos horarios

12/48 anteriores (Tablas 7-9).

Las Tablas 10-12 muestran que a las 33 horas (basándose en  $32,5 \pm 0,71$ , N = 2), 48 horas (basándose en el punto de datos a las 49 horas), y a las 72 horas (basándose en  $72,5h \pm 0,71$ , N = 2), las células CD34+ aisladas del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita mantuvieron 1) más de 90% de viabilidad (Tabla 10), 2)  $102,19 \pm 32,69\%$  de su capacidad migratoria mediada por SDF-1/VEGF/CXCR-4 (Tabla 11), y 3) su capacidad para generar colonias hematopoyéticas in vitro (Tabla 12).

Tabla 10: Viabilidad de las células CD34+ en función del tiempo después de la MMH: 24 h dentro de fecha y 72 h fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH)

Tiempo (h) después de la MMH	Viabilidad de las células CD34+ (%)		
	A	B	Media (DT)
33	98,00	99,00	98,50 (0,71)
48	-	97,00	97,00 (-)
72	91,00	97,00	94,00 (4,24)

Tabla 11: Migración de células CD34+ mediada por SDF-1/CXCR-4 (% de células CD33+ que migran en función del tiempo después de la MMH): 42 horas dentro de fecha y 72 horas fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH)

Tiempo (h) después de la MMH (DT)	(% de Células CD34+CXCR-4+ que migran)		
	A	B	Media (Rango)
33	8,20	14,05	11,13 (2,93)
% Restante	100,00	100,00	100,00 (0,00)
48	-	18,61	18,61 (-)
% Restante	-	132,46	132,46 (-)
72	5,70	18,95	12,33 (6,63)
% Restante	69,51	134,88	102,19 (32,69)

Las razones restantes en % de la Tabla 11 se determinaron como en la Tabla 8 anterior.

Tabla 12: Número de UFC por cada 100 células CD34+ viables sembradas en función del tiempo después de la MMH: 24 h dentro de fecha y 72 h fuera de fecha (todos los puntos horarios medidos desde la finalización de la MMH)

Tiempo (h) después de la MMH (DT)	Núm. de UFC por cada 100 células CD34+ viables sembradas		
	A	B	Media (rango)
33	26,00	28,50	22,25 (1,25)
48	-	16,80	16,80 (-)
72	14,50	27,50	21,00 (6,5)

La evaluación adicional de los parámetros de viabilidad funcionales del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+ aisladas de la invención descrita ("producto clínico") a las 8 horas ( $8,6h \pm 1,80$ , N = 4), 12 horas ( $12,87h \pm 1,92$ , N = 4), 32 horas (un punto horario a 33,5 h), 48 horas ( $47,50h \pm 2,5$ , N = 2), y 72 horas ( $71,5h \pm 0,50$ , N = 2) después de la MMH muestra que después de 72 horas, el producto conserva su 1) viabilidad (Tabla 13), 2) capacidad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4 (Tabla 14) y 3) capacidad de formar colonias hematopoyéticas in vitro (Tabla 15), equivalente punto horario de 24 horas.

Tabla 13: Experimentación del producto clínico: viabilidad de las células CD34+ en función del tiempo después de la MMH.

Tiempo (h) después de la MMH	Viabilidad de las células CD34 <sup>+</sup> (%)				
	A	B	C	D	Media (DT)
8	98,30	99,08	90,00	96,45	95,96 (4,12)
12	98,89	96,96	99,00	99,43	98,57 (1,10)
33	-	93,42	-	-	93,42
48	-	93,15	91,58	-	92,37 (1,11)
72	-	91,25	89,25	-	90,30 (1,48)

5 Tabla 14: Experimentación del Producto Clínico: migración de células CD34<sup>+</sup> mediada por SDF-1/CXCR-4 (% de células CD34<sup>+</sup> que migran en función del tiempo después de la MMH)

Tempo (h) después de la MMH	Células CD34 <sup>+</sup> CXCR-4 <sup>+</sup> que migran (%)				
	A	B	C	D	Media (DT)
12 (X)	14,31	13,08	9,74	31,73	17,97 (11,34)
% Restante	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00 (0)
33 (Y)	-	6,17	-	-	6,17
*% Restante	-	47,17	-	-	47,17
48 (Y)	-	4,88	8,21	-	6,55 (2,35)
*% Restante	-	37,30	84,29	-	69,79 (23,49)
72 (Y)	-	3,7	6,6	-	5,15 (2,05)
*% Restante	-	28,29	21,19	-	24,74 (3,55)

\* =  $(Y \div X) \times 100\%$

Todas las razones restantes se calcularon como en la Tabla 8 anterior.

10 Tabla 15: Experimentación de producto clínico: Núm. de UFC por cada 100 células CD34+ viables sembradas en función del tiempo después de la MMH

Tiempo (h) después de la MMH	Núm. de UFC por cada 100 células CD34 <sup>+</sup> viables sembradas				
	A	B	C	D	Media (DT)
12,	98,14	33,30	24,00	22,50	44,49 (36,09)
33	-	16,50	-	-	16,5
48	-	19,56	20,50	-	20,03 (0,66)
72	-	20,45	21,19	-	20,82 (1,10)

15 Basándose en estos datos, se justifica la prolongación del margen de entrada en fecha a 24 horas (desde 12 horas) y del margen de salida de fecha a 72 horas (desde 48 horas) para el producto clínico de células CD34+ de la invención descrita.

La Figura 1 indica la equivalencia de la viabilidad funcional del producto quimiotáctico de células hematopoyéticas de la invención descrita a las 72 horas para los mismos índices evaluados a las 48 horas.

20 Estudio 3: Seguridad del catéter.

La viabilidad y la eficacia potencial del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita que comprende células CD34+ potentes dependen de las células que mantienen su potencia a medida que pasan a través de un catéter. El catéter utilizado en los métodos de la invención descrita tiene un diámetro interno de

al menos 0,36 mm. Cualquier tipo de catéter que tenga un diámetro interno de al menos 0,36 mm puede ser eficaz para el suministro de las composiciones farmacéuticas de la invención descrita.

5 En una realización, el catéter es un catéter con balón. Se llevaron a cabo estudios de seguridad del catéter con balón para determinar si las altas concentraciones de células y repetidas perfusiones afectan negativamente a la viabilidad celular, la recuperación celular o la integridad del catéter. Los progenitores de sangre periférica no movilizadas se utilizaron con el fin de obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Los catéteres se evaluaron para determinar la infusión del producto de células de la invención descrita que comprende células CD34+ seleccionadas a través de la ARI. Ninguno de los catéteres de diámetro interno de 0,36 mm sometidos a ensayo afectó negativamente a la viabilidad celular, el crecimiento en cultivo, o la movilidad en los análisis con CXCR-4 seleccionados de CD34+.

Tabla 16: Viabilidad de células CD34+ antes y después de las infusiones a través de los catéteres.

Catéter	Condiciones	Viabilidad (%)				
		1	2	3	4	5
-	Pre-infusión	81,45				
Raptor	Después de la 1ª infusión	84,29	70,94	87,89	88,02	84,68
	Después de la 2ª infusión	83,00	87,44	86,39	79,91	83,18
Sprinter	Después de la 1ª infusión	93,39	91,09	84,13	88,28	81,68
	Después de la 2ª infusión	91,89	91,08	84,88	77,65	77,73
Voyager	Después de la 1ª infusión	94,21	86,21	83,08	77,53	69,68
	Después de la 2ª infusión	88,03	84,71	79,27	78,11	76,80
Maverick	Después de la 1ª infusión	90,00	89,76	90,79	85,49	81,31
	Después de la 2ª infusión	90,94	87,38	81,98	80,09	85,47

15 Como se muestra en la Tabla 16, en todos los catéteres sometidos a ensayo, la viabilidad media de la células CD34+ fue igual o superior a 70% después de pasar a través de los catéteres.

20 Para demostrar que la infusión del producto de células CD34+ no plantea ninguna infracción de seguridad del catéter utilizado y que un porcentaje significativo de producto celular no se adhiere a las paredes interiores del catéter, los catéteres fueron probados con infusiones repetidas de un producto de células CD34+ que tiene una concentración de células considerablemente más alta que la utilizada clínicamente. Se evaluaron cuatro marcas de catéteres (Sprinter, Voyager, Maverick y Raptor) utilizando 5 catéteres de cada tipo. Se utilizaron productos de aféresis no movilizadas con el fin de obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Se hizo pasar dos veces a través de cada catéter una concentración de células mayor de tres veces planificada como dosis de tratamiento para el ensayo, es decir, 160 x 10<sup>6</sup> células nucleadas que contenían células CD34+ en 10 ml de solución de infusión. La recuperación promedio de células CD34+ fue de 100,59% (basándose en un intervalo de 76,99% a 228,70%) después de paso a través de los catéteres.

30 Los veinte catéteres se sometieron a ensayo para determinar su integridad utilizando una prueba de fuga de colorante azul de metileno después de dos perfusiones con las células nucleadas. No hubo evidencia de fuga y los puntos de contacto y las puntas de los catéteres fueron normales después de su inspección.

35 Como se muestra en las Tablas 17a y 17b, el efecto sobre las células de su perfusión a través de un catéter parece ser independiente del modelo y marca de catéter entre los catéteres sometidos a ensayo y era independiente de la cantidad de tiempo que las células se almacenaron antes del procesamiento y/o después de la selección de las células de CD34+ y antes de su perfusión, lo que da como resultado una formulación final que contiene una recuperación media de 96,0% (rango 80,8% - 102,2%) de las células CD34+ (Tabla 17b) y 86,36% de las células CD45+ perfundidas a través del catéter. Adicionalmente, la viabilidad media de las células fue de 96,5% (rango 92,5% - 98,6%, N = 16); las células mantienen tanto la capacidad migratoria mediada por CXCR-4 (datos no mostrados) y su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (media 25,8 UFC/100 células sembradas (rango 21,0% -30,5%))

Tabla 17a: Recuperación y viabilidad de las células CD45 después de haber sido infundidas a través de los catéteres.

Catéter	Condiciones	1		2		3		4		5		Media	
		Recuperación	Viab. Rec.	Recuperación	Viab. Rec.								
Raptor	Después de la 1ª infusión	69,68%	- 1,35%	78,67%	2,08%	72,14%	-4,55%	80,54%	1,83%	73,21%	- 2,13%	74,85% (30,83%)	-0,82% (2,53%)
	Después de la 2ª infusión	97,91 %	- 8,55%	81,84%	-4,76%	142,98%	3,28%	107,82%	- 8,48%	94,08%	0,08%	104,93% (47,60%)	-3,69% (4,94%)
Sprinter	Después de la 1ª infusión	76,74%	- 0,60%	68,56%	4,01 %	72,63%	5,29%	73,61%	6,06%	66,83%	8,31%	71,67% (29,48%)	4,61% (3,51%)
	Después de la 2ª infusión	78,82%	2,86%	85,40%	0,98%	90,29%	-1,02%	82,22%	6,50%	91,61%	0,00%	85,67% (35,30%)	1,86% (2,76%)
Voyager	Después de la 1ª infusión	87,38%	1,58%	83,93%	-0,36%	103,58%	0,93%	95,82%	4,52%	131,55%	- 4,39%	100,45 (44,39%)	0,46% (2,91%)
	Después de la 2ª infusión	82,70%	7,01%	69,34%	15,90%	69,54%	10,40%	89,04%	0,27%	69,03%	7,50%	75,93% (32,11%)	8,22% (6,09%)
Maverick	Después de la 1ª infusión	73,97%	1,58%	87,01%	0,42%	78,31%	0,69%	75,53%	2,61%	77,22%	2,95%	78,41% (32,33%)	1,65% (1,21%)
	Después de la 2ª infusión	152,35%	- 5,06%	73,44%	2,78%	80,85%	-3,92%	97,10%	- 2,97%	91,11%	- 2,07%	98,97% (49,11%)	-2,25% (2,85%)
Media de todos los catéteres:													
<sup>a</sup> Recuperación de las células CD45+ = (Núm. de células CD45 después de la infusión Núm. de CD45 antes de la infusión) x 100% <sup>b</sup> Reducción de la viabilidad de las células CD45+ = [1 - (% de viabilidad de las células CD45+ después de la infusión ÷ % de viabilidad de las células CD45+ antes de la infusión%)] x 100%													

Tabla 17b: Recuperación y viabilidad de las células CD34 después de haber sido infundidas a través de los catéteres.

Cáteter	Condiciones	1		2		3		4		5		Media	
		Recuperación <sup>a</sup>	Viab. Rec. <sup>b</sup>	Recuperación	Viab. Rec.	Recuperación	Viab. Rec.						
Raptor	Después de la 1ª infusión	116,49%	-3,48%	121,62%	12,91%	110,89%	-7,91%	97,55%	-8,06%	96,14%	-3,97%	106,54% (45,46%)	-2,10% (7,79%)
	Después de la 2ª infusión	91,66%	1,53%	85,18%	-23,26%	122,47%	1,71%	111,33%	9,21%	98,96%	1,78%	101,92% (43,73%)	-1,81% (11,4%)
Sprinter	Después de la 1ª infusión	89,19%	-14,66%	83,34%	-11,63%	102,72%	-3,29%	84,57%	-8,39%	88,65%	-0,28%	89,69% (37,26%)	-7,69% (6,16%)
	Después de la 2ª infusión	103,52%	1,61%	99,82%	0,01%	82,11%	-0,89%	114,87%	12,05%	100,45%	4,84%	100,15% (42,22%)	3,52% (4,90%)
Voyager	Después de la 1ª infusión	81,02%	-15,67%	96,08%	-5,84%	90,16%	-2,00%	82,73%	4,82%	89,32%	14,46%	87,96% (36,28%)	-0,85% (10,13%)
	Después de la 2ª infusión	106,48%	6,56%	81,66%	1,74%	95,04%	4,58%	94,81%	-0,75%	91,01%	-10,23%	93,80% (39,12%)	0,38% (5,86%)
Maverick	Después de la 1ª infusión	76,99%	-10,50%	101,79%	-10,21%	98,62%	-11,46%	112,58%	-4,96%	96,05%	0,18%	97,21% (41,34%)	-7,39% (5,34%)
	Después de la 2ª infusión	228,70%	-1,05%	88,66%	2,65%	103,35%	9,70%	89,35%	6,31%	117,63%	-5,12%	125,54% (73,48%)	2,50% (5,33%)
Media de todos los catéteres:											100,59%	-1,68%	

<sup>a</sup> Recuperación de las células CD34+ = (Núm. de células CD34 después de la infusión + Núm. de CD34 antes de la infusión) x 100%

<sup>b</sup> Reducción de la viabilidad de las células CD34+ = [1 - (% de viabilidad de las células CD34+ después de la infusión ÷ % de viabilidad de las células CD34+ antes de la infusión)] x 100%

En conjunto, estos experimentos demuestran que el paso en serie de un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+ a través de un catéter cardiaco con un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm no afecta negativamente a la integridad del catéter o la potencia células CD34+, es decir, la viabilidad de las células CD34+, el crecimiento de colonias UFC, o capacidad/movilidad migratoria mediada por CXCR+ de CD34+.

Estudio 4: Compatibilidad del producto celular con los catéteres

Con el fin de someter a ensayo la compatibilidad del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprende células CD34+ con cada uno de los catéteres que pueden ser utilizados para el suministro del producto celular en el estudio, los productos celulares se sometieron a ensayo después de múltiples tránsitos a través de cada tipo de catéter para evaluar los efectos de condiciones extremas de estrés que serían mayores que las esperadas durante el protocolo de tratamiento.

A las 48 horas de la extracción MMH, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que comprendía un intervalo de aproximadamente  $5,73 \times 10^6$  células CD34+ a aproximadamente  $21,10 \times 10^6$  células CD34+ (es decir, las dosis correspondientes de la cohorte de tratamiento) obtenido a partir de donantes individuales se infundió de forma secuencial a través de tres catéteres de la misma marca, un tipo de catéter para cada donante (Sprinter, Voyager o Maverick), y el producto celular se evaluó para determinar recuperación, la formación de colonias y la viabilidad de las células CD34+.

Tabla 18: Recuperación de células CD34+ y esterilidad después de las infusiones secuenciales a través de los catéteres.

Condiciones	Parámetro	Catéter utilizado		
		Sprinter	Voyager	Maverick
Pre-infusión	rendimiento de células CD34 <sup>+</sup>	$9,72 \times 10^6$	$2,11 \times 10^7$	$50,73 \times 10^6$
Después del 1 <sup>er</sup> catéter	recuperación de células CD34 <sup>+</sup>	111%	103%	99%
Después del 2 <sup>o</sup> catéter	recuperación de células CD34 <sup>+</sup>	94%	104%	97%
Después del 3 <sup>er</sup> catéter	recuperación de células CD34 <sup>+</sup>	99%	99%	106%
	Esterilidad (microbios aerobios y anaerobios)	Negativo	Negativo	Negativo

Como se muestra en la Tabla 18, se recuperaron células viables, formadoras de colonias en todos los experimentos para los tres catéteres sometidos a ensayo (recuperación de células de 99%, 99% y 106%).

Como se muestra en la Tabla 19, la viabilidad media de las células CD34+ después de pasar a través del tercer catéter fue de 94,00% (basándose en un intervalo de 93,55% - 94,40%) frente a 96,01% (basándose en el intervalos de 94,18% - 97,93%) del producto celular pre-infusión.

Tabla 19. Viabilidad de las células CD34+ después de infusiones secuenciales a través de los catéteres.

Condición	Viabilidad de las células CD34 <sup>+</sup>			
	Sprinter	Voyager	Maverick	Media
Pre-infusión	94,18%	95,91%	97,93%	96,01%
Después del 1 <sup>er</sup> catéter	94,73%	96,31%	95,45%	95,50%
después del 2 <sup>o</sup> catéter	95,34%	95,72%	95,01%	95,36%
Después del 3 <sup>er</sup> catéter	93,55%	94,40%	94,04%	94,00%

Como se muestra en la Tabla 20, el crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) derivadas de las células CD34+ después de pasar a través del tercer catéter fue de 95,27% (basándose en un intervalo de 43,47% - 163,64%) del producto de infusión (es decir, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas infundido que comprende células CD34+).

Tabla 20. Crecimiento de UFC de células CD34+ después de las infusiones secuenciales a través de los catéteres.

Condiciones	UFC por 100 células CD34+ cultivadas		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Pre-infusión	30,5	11,5	11,0
Después del 1 <sup>er</sup> de catéter	22,0	14,0	22,0
Después del 2 <sup>o</sup> catéter	20,5	4,0	19,0
Después del 3 <sup>er</sup> catéter	24,0	5,0	18,0
Recuperación del producto de pre-infusión después del 3 <sup>er</sup> catéter	78,69%	43,47%	163,64%
Recuperación media	95,27%		

5 Para determinar el efecto de la perfusión del catéter en la movilidad de las células CD34+ y la capacidad de crecimiento en cultivo, se realizó una serie de experimentos en los que se almacenaban las células MMH obtenidas de donantes sanos a 4°C durante 12 o 24 horas antes de iniciar el procesamiento Isolex. El producto de células CD34+ aisladas que se habían almacenado durante aproximadamente 12 horas de antes del procesamiento Isolex se almacenaron a continuación a 4°C hasta que habían transcurrido aproximadamente 36 horas desde el final del procesamiento, durante un total de aproximadamente 48 horas después de la MMH. En ese momento se evaluó la movilidad mediada por SDF-1/4-CXCR y el crecimiento de UFC pre- y post-perfusión a través de un catéter cardiaco con balón de 0,36 mm de diámetro interno (d.i.). Del mismo modo, las células que se almacenaron antes del procesamiento Isolex durante 24 horas a continuación se almacenaron a 4°C hasta que habían transcurrido 48 horas desde el final del procesamiento Isolex, durante un total de 72 horas, y a continuación se evaluaron.

15 Tabla 21: 12 de entrada/48 de salida y 48 horas de entrada/72 horas de salida de la MMH: movilidad SDF-1/CXCR-4 (% población de células CD34+ que migraban) y UFC (por cada 100 células CD34+ viables sembradas) pre-perfusión a través del catéter ("PRE") y post-perfusión a través del catéter ("POST")

Tiempo (h) después de la MMH entrantes/salientes	Movilidad SDF-1/CXCR-4 (%) // Núm. de UFC por cada 100 células CD34 <sup>+</sup> viables sembradas				
	A	B	C	D	E
12/48 PRE	2,7 // 14	8,8 // 15	15,8 // 16	-	-
12/48 POST	3,4 // 15	18,9 // 13	17,6 // 8	-	-
24/72 PRE	-	-	-	34 // 37	18,9 // 27,5
24/72 POST				34 // 43	23,5 // 24

20 Los resultados de la Tabla 21 demuestran que ni la movilidad celular mediada por CXCR-4 de CD34+ ni la capacidad de la célula para crecer en cultivo en cualquiera de los puntos horarios sometidos a ensayo se vio afectada negativamente por la perfusión a través de un catéter que tiene un diámetro interno de al menos 0,36 mm.

Efecto estabilizador del suero

25 Los siguientes datos confirman la importancia del efecto estabilizador de suero de la capacidad migratoria de las células CD34+ seleccionadas.

30 Como se muestra en la Tabla 22, no se observó actividad migratoria mediada por CXCR-4 para todas las muestras sometidas a ensayo, incluyendo las muestras de pre-infusión a través del catéter cuando la composición que comprendía un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas se formuló sin suero.

Tabla 22: Quimiotaxis de células CD34+ después de infusiones secuenciales a través de los catéteres en ausencia de suero.

Condiciones	Migración (%)		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Pre-infusión	0,0	0,0	0,1
Después del 1 de catéter	0,0	0,0	0,0
Después de segundo catéter	0,0	0,0	0,1

Condiciones	Migración (%)		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Después de 3ª catéter	0,0	0,0	0,0

5 Las figuras 2 y 3 ilustran adicionalmente que las células CD34+ seleccionadas mediante Isolex conservan su capacidad migratoria durante más tiempo cuando se formulan en presencia de suero humano. Tras el procesamiento Isolex, el producto de células madre hematopoyéticas derivado de médula ósea que comprende células CD34+ seleccionadas se formuló en solución salina (1) tamponada con fosfato (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, Libre de Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> (Baxter Núm. Cat. DER9865) ("PBS") que contiene albúmina de suero humano al 1%, 25 U/ml de heparina sódica y diversas concentraciones (aproximadamente 0%, aproximadamente 10%, aproximadamente 20%, o aproximadamente 70%) de suero autólogo; o (2) solución salina normal (0,9%) que contiene albúmina de suero humano al 1%, 25 U/ml de heparina sódica y (aproximadamente 0% o aproximadamente 10%) de suero autólogo. La capacidad migratoria de células CD34+ mediada por SDF-1/CXCR-4 se evaluó en diferentes momentos durante el almacenamiento del producto final (entre 2°C y 8°C) y después de pasar las células a través del catéter a la misma velocidad y duración según lo anticipado por el protocolo clínico. Ninguna de estas formulaciones afectó la viabilidad de las células CD34+ o la recuperación de células CD34+ después de haber transitado a través del catéter.

15 Independientemente de si los productos quimiotácticos de células hematopoyéticas que comprenden células CD34+ seleccionadas fueron (i) formulados en PBS-suero o en solución salina-suero y (ii) pasados a través del catéter inmediatamente o pasados a través del catéter después de un intervalo de almacenamiento de prueba de almacenamiento prolongado de aproximadamente 4°C a aproximadamente 8°C, se mantuvo una media de 96,6% de viabilidad (rango 92,5% - 98,6%) y una capacidad migratoria media mediada por CXCR-4 de 11,4% (rango 2,4% - 30,6%), lo que representa un tiempo total desde la extracción hasta el análisis de movilidad de hasta 48 horas.

20 Como se muestra en el panel (a) de la Fig. 2, las células formuladas en PBS solo en aproximadamente 25 horas conservaron aproximadamente 10% de su capacidad migratoria CXCR-4, que cayó a cerca de 0 a aproximadamente 48 horas. Como se muestra en el panel (b), las células formuladas en solución salina normal sola conservan algo, si la hubiera, de su capacidad migratoria. Como se muestra en los paneles (c) y (d), las células formuladas con PBS que contienen al menos aproximadamente 10% de suero conservan aproximadamente 10-15% de su capacidad migratoria durante hasta aproximadamente 55 horas (c), mientras que las células formuladas con solución salina y al menos 10% de suero conservan aproximadamente 20% de su capacidad migratoria durante hasta aproximadamente 30 50 horas. Como se muestra en los paneles (e) y (f), las células conservan una capacidad migratoria superior durante un tiempo mayor en PBS con un suplemento de concentraciones incluso más altas de suero.

35 Como se muestra en la Fig. 3, el producto de la invención descrita que comprende células CD34+ seleccionadas cuando se formulan en 10% de suero, conservan 14,25%, <1%, 6%, y 5,8% de su capacidad migratoria mediada por CD34+CXCR4 aproximadamente 24, aproximadamente 32, aproximadamente 48 y aproximadamente 56 horas después de la extracción, respectivamente. La Fig. 3 muestra adicionalmente que el producto de la invención descrita que comprende células CD34+ seleccionadas cuando se formula en suero al 20% de conservan 18,25%, 10,25%, 17% y 11% de su capacidad migratoria mediada por CD34+-CXCR-4 aproximadamente 24, aproximadamente 32, aproximadamente 48 y aproximadamente 56 horas después de la extracción, respectivamente. El término "cantidad estabilizante" según se utiliza en la presente memoria, por tanto, se refiere a la cantidad de suero que, cuando se incluye en la formulación del producto de la invención descrita que comprende células CD34+ seleccionadas, permite que estas células conserven su actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y capacidad formadora de colonias hematopoyéticas.

45 Como se muestra en la Tabla 23, las células CD34+CXCR-4+ obtenidas de voluntarios sanos y de pacientes a los que se añadió suero autólogo mantenían su motilidad a las 72 horas. Las células CD34+ fueron aisladas de la médula ósea de voluntarios sanos y de pacientes por medio del procedimiento de mini-extracción de médula ósea como se describe en el Ejemplo 3 en condiciones idénticas; y el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas fue creado como se describe en los Ejemplos 4 y 5. Los productos se formularon a continuación con o sin > 20% de suero autólogo, y se sometieron a ensayo a las 24, 48 y 72 horas. Como se muestra en la columna 2, la movilidad celular mediada por CXCR-4 de las células CD34+CXCR-+ obtenidas a partir de voluntarios sanos, cuando se formula sin suero, disminuyó 72% después de 48 horas. Como se muestra en la columna 3, la movilidad celular mediada por CXCR-4 de las células CD34+CXCR-4+ obtenidas a partir de voluntarios sanos, cuando se formularon con suero no mostró ningún cambio en la motilidad celular media de CD34+CXCR-4+, lo que significa que el suero estabiliza la motilidad mediada por SDF-1/CXCR-4. La columna 4 muestra que las células CXCR-4+CD34+ obtenidas a partir de pacientes mostraron una menor motilidad celular que la de los voluntarios sanos, pero que la motilidad de las células CD34+CXCR-4 + se mantuvo a las 72 horas.

Tabla 23. Movilidad media de las células CD34+ y % de cambio a lo largo del tiempo.

Horas	Movilidad Media de la células CD34+ %		
	Voluntarios <sup>†</sup> (N) <sup>††</sup>	Voluntarios con suero <sup>§</sup>	Pacientes con suero
24	14,6 (4)	18,1 (6)	12,8 (6)
48	3,2 (4)	19,7 (8)	4,7 (3)
72	ND <sup>#</sup>	22,1 (7)	4,6 (5)
Media del % de cambio (rango)**			
48	↓72 (↓53-↓84)	↓06 (↓16-↑28)	↓57 (↓13-↓93)
72	ND	↑9.6 (↓30-↑85)	↓68 (↓48-↓86)
<sup>*</sup> Horas de aspiración de médula ósea <sup>†</sup> Células CD34+ en suspensión en PBS solamente <sup>††</sup> Número de personas sometidas a ensayo <sup>§</sup> Células CD34+ en suspensión en PGS y suero autólogo <sup>‡</sup> % de CD34+ que migran a la cámara inferior <sup>#</sup> No realizado <sup>**</sup> Suma del % de cambio de cada experimento/número de experimentos			

Estudio 5: Ensayo de esterilidad del producto final

5 Debido al rendimiento limitado de células CD34+ obtenido a partir de un MMH de 300 ml, la esterilidad del producto celular final se evaluó utilizando el sobrenadante retirado de la formulación del producto final con el fin de preservar el producto celular para su infusión. Las muestras de sobrenadante se cargan en las jeringas de una manera idéntica a la utilizada para cargar el producto celular en las jeringas usadas para la infusión (véase más arriba).

10 Para demostrar que una muestra de este tipo es representativa de la formulación del producto celular final, se inocularon células CD34+ seleccionadas en solución de infusión antes de la centrifugación del producto final con *C. sporogenes* (13 UFC/ml), *P. aeruginosa* (2 UFC/ml), *S. aureus* (18 UFC/ml), *A. niger* (17 UFC/ml), *C. albicans* (3 UFC/ml) y *B. subtilis* (17 UFC/ml) (Véase la tabla 24). Después de la centrifugación, se evaluó la esterilidad del sedimento celular y de las fracciones de sobrenadante sin células mediante la prueba USP aeróbica y anaeróbica.

Tabla 24: Bacterias y hongos utilizados para el estudio de la esterilidad. Cada vial de microorganismo fuente preparado por Microbiological Environments contenía 400 microbios por ml, pero variaba el número de UFC derivadas de cada especie.

Microbio	Núm. total de microbios/ml	UFC Totales/ml	UFC Esperadas/ml de muestra inoculada (21 ml)
<i>C. sporogenes</i>	400	279	13
<i>P. aeruginosa</i>	400	36	2
<i>S. aureus</i>	400	371	18
<i>A. niger</i>	400	356	17
<i>DO. albicans</i>	400	62	3
<i>B. subtilis</i>	400	349	17

20 Como se muestra en la Tabla 25, tanto la fracción de sedimento celular como las fracciones de suspensión de todas las muestras sometidas a ensayo mostraron crecimiento en exceso de los microorganismos inoculados, mientras que los controles sin inoculación no mostraron crecimiento. Adicionalmente, no se observó tasa de crecimiento diferencial aparente entre el ensayo de las fracciones de sedimento celular y las fracciones de suspensión para todos los microorganismos sometidos a ensayo. Las muestras tomadas antes de cada etapa del procedimiento de procesamiento y después de la perfusión final a través de los catéteres dieron todas negativo para la contaminación microbiana.

Tabla 25: Ensayo de esterilidad a los 14 días de muestras de células nucleadas (CN) inoculadas con diferentes especies de microorganismos (400 microbios en muestras de CN de 21 ml).

Muestra con microbios inoculados	Tipo de medio	Fracción de muestreo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<i>C. sporogenes</i>	FTM <sup>a</sup>	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
<i>S. aureus</i>	FTM	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
<i>P. aeruginosa</i>	FTM	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
<i>A. niger</i>	TSB <sup>b</sup>	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
<i>C. albicans</i>	TSB	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
<i>B. subtilis</i>	TSB	Sedimento celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspensión	Positivo	Positivo	Positivo
Control positivo: <i>C. sporogenes</i>	FTM	Suspensión celular	Positivo		
Control positivo: <i>S. aureus</i>	FTM		Positivo		
Control positivo: <i>P. aeruginosa</i>	FTM		Positivo		
Control positivo: <i>A. niger</i>	TSB		Positivo		
Control positivo: <i>C. albicans</i>	TSB		Positivo		
Control positivo: <i>B. subtilis</i>	TSB		Positivo		
Control negativo: No hay microbios	FTM		Negativo		
Control negativo: No hay microbios	TSB	Suspensión celular	Negativo		
<sup>a</sup> Medio de tioglicolato fluido					
<sup>b</sup> Caldo de soja tripticaseína					

Resumen del Estudio Preclínico

5 Colectivamente, estos datos preclínicos indican que los procedimientos de fabricación y ensayo descritos son capaces de generar un número adecuado de células viables con una estabilidad adecuada para soportar el transporte y la perfusión a través del catéter de una manera que no debería plantear problemas de seguridad adicionales para el sujeto distinto de los asociados con el uso rutinario de la infusión de fluido a través del catéter con balón.

Ejemplo 11. Datos de eficacia de la fase 1 preliminar, con una fecha de infusión individual

15 Lo siguientes datos de eficacia de la fase 1 preliminar muestran que en aproximadamente  $10 \times 10^6$  células CD34+ aisladas, hay suficientes células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 para efectuar un efecto paracrino, que afecta a la muerte celular inmediata y más tarde cambios compatibles con el remodelado ventricular.

20 De acuerdo con la descripción en el Ejemplo 1, un total de 31 sujetos dieron su consentimiento, fueron elegibles y se enrolaron en el estudio. Los 31 pacientes enrolados en el estudio de fase I fueron asignados al azar a un grupo de tratamiento de la extracción de células madre autólogas o a un grupo de control cinco días después de un infarto con elevación del ST (STEMI) que se caracteriza por un período prolongado de hipoperfusión (que significa bloqueo del suministro de sangre). De los 31 sujetos enrolados, 16 estaban en el grupo de tratamiento y 15 en el grupo control. El primer sujeto en cada Centro se asignó al azar para recibir tratamiento o control, y cada paciente subsiguiente se enroló alternando grupos de tratamiento o de control. Si el sujeto se asignaba al tratamiento, él/ella continuó en la Fase de Tratamiento, siempre y cuando se continuaran cumpliendo todos los criterios de inclusión/exclusión. Los sujetos asignados al grupo de control progresaron a la fase de seguimiento. No hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las características demográficas o clínicas de partida. Los pacientes enrolados tenían de

34 a 71 años de edad, 87% hombres, 77% blancos, 61% de clase II o III de la NYHA y 49% de clase I de la NYHA, 74% experimentó una vista arteria coronaria descendente anterior izquierda infartada, y el 55% recibió una endoprótesis vascular liberadora de fármaco.

5 Las células CD34+ se aislaron de la médula ósea por medio del procedimiento de mini-extracción de médula ósea como se describe en el Ejemplo 3 en el plazo de 5-8 días desde la sustitución de la endoprótesis vascular. La médula ósea extraída se envió a continuación al centro de procesamiento de células cGMP como se describe en el Ejemplo 4 y se aisló como se describe en el Ejemplo 5.

10 Tal como estaba previsto originalmente, y como se describe en el Ejemplo 8, debía haber cuatro cohortes de dosificación (5 millones, 10 millones, 15 millones y 20 millones de células CD34+) en el estudio. Sin embargo, no se podían obtener de forma fiable más de 15 millones de células después de la selección de CD34+. Por lo tanto el reclutamiento terminó al final de la cohorte 3 siendo  $15 \times 10^6$  la dosis más alta de células evaluadas.

15 Tras la liberación del producto celular y la asignación de la cohorte, el producto de células CD34+ se envió al sitio de cateterismo para su infusión directa en la arteria relacionada con el infarto. El tratamiento de infusión se produjo 6-9 días después de la sustitución de la endoprótesis vascular en (y en el plazo de 48 horas desde la mini-extracción de médula ósea). Los sujetos fueron llevados a la sala de hemodinámica sólo después de que el producto de células CD34+ hubiera llegado al centro y de que se hubiera recibido la versión final para su infusión.

20 Las cohortes de dosificación consistieron en 5 sujetos en cohortes 1 y 2, 6 sujetos en la cohorte 3, y 15 sujetos de control. Para la cohorte 1, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención comprendía  $5 \times 10^6$  células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas con una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que poseen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representado como "5 M"]. Para la cohorte 2, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención comprendía  $10 \times 10^6$  células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas con una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que poseen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representado como "10 M"]. Para la cohorte 3, el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención comprendía  $15 \times 10^6$  células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas con una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que poseen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representado como "15 M"]. No se espera que los sujetos de control (que significa aquellos que no recibieron la infusión de células CD34+) tengan mejoras significativas en la función cardíaca (volúmenes de la fracción de eyección, sistólica y diastólica finales), o perfusión de la región del infarto a los 6 meses de seguimiento.

35 Se suministró a cada sujeto una composición farmacéutica estéril de la invención descrita en las cohortes 1, 2, 3 y parenteralmente mediante infusión a través de la arteria relacionada con el infarto a través de un catéter de siete a once días después de la STEMI. La composición farmacéutica estéril comprendía: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, comprendiendo el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas una población enriquecida de células CD34+ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que tienen actividad quimiotáctica; que, cuando se hacen pasar a través del catéter se mantienen potentes, y (b) una cantidad estabilizante de suero.

45 La función de seguimiento cardíaco se realizó a los 3 y 6 meses de la infusión. La perfusión cardíaca de la región del infarto se evaluó a los 6 meses de la infusión. Tanto la perfusión como la pruebas de seguimiento funcional fueron evaluadas por un centro de laboratorio central ciego para el estado de tratamiento del estudio de cada sujeto. Se llevó a cabo la comparación de estos resultados con los índices de referencia. Se realizan visitas de seguimiento a largo plazo a los 12 meses y se realizan entrevistas telefónicas a los sujetos anualmente a los años 2 a 5. Para aquellos sujetos que completaron la llamada telefónica de seguimiento a los 2 años, no se informó sobre eventos adversos graves, y por lo tanto, no se detectaron eventos de seguridad a largo plazo en este momento.

50 Las medidas de rendimiento cardíaco Puntuación de Severidad Total en Reposo (PSTR), el porcentaje de infarto ("% del infarto"), Volumen Sistólico Final (VSF) y la fracción de eyección ("FE") se evaluaron a los 3 meses del tratamiento y a los 6 meses del tratamiento y se compararon con controles para evaluar la eficacia de las composiciones en comparación con los controles. Los resultados preliminares se muestran en la Tabla 26. SPECT SCAN. Según se utiliza en la presente memoria, una exploración mediante tomografía computarizada por emisión de un único fotón (SPECT) es un tipo de examen de obtención de imágenes de medicina nuclear, que utiliza una sustancia radiactiva y una cámara especial para crear imágenes tridimensionales del corazón para mostrar los flujos de sangre hacia el corazón. En general, la "Puntuación de Severidad Total en Reposo (PSTR) es una puntuación basada en la cantidad de colorante que no se recoge en un SPECT SCAN. Los datos de Puntuación de Severidad Total en Reposo representan la perfusión cardíaca, es decir, el flujo de sangre a nivel microvascular, y la función muscular. En pocas palabras, el colorante de tecnecio utilizado en un SPECT SCAN es absorbido por el músculo cardíaco. Si el músculo cardíaco está sano y absorbe el colorante, aparece de color blanco. Si el músculo cardíaco no está sano, la absorción de colorante se reduce o no se produce en absoluto, y el músculo aparece de color gris a negro.

5 Porcentaje de infarto (MRI). El tamaño de un ataque al corazón tiene importancia para determinar lo bien que un  
paciente va a recuperarse del trauma. Un paciente que haya sufrido daños en más de 30 por ciento del ventrículo  
izquierdo del corazón tiene dos veces más probabilidades de morir en el plazo de un año a partir de la lesión que un  
paciente que haya sufrido menos daños, e infartos más grandes a menudo requieren una terapia más agresiva. Un  
método de ordenador calcula la cantidad de tejido dañado mediante la comparación de intensidad de la señal MRI  
entre el tejido dañado y el tejido no dañado. El tejido cardíaco dañado es más denso que el tejido no dañado debido  
a la estructura muscular se ha destruido, y la MRI puede distinguir entre tejidos de diferente densidad. El término  
"porcentaje (%) de infarto" según se utiliza en la presente memoria se refiere a la zona infartada en comparación con  
10 el resto del corazón. Para los propósitos de este estudio, un % de infarto mayor de 20% se considera significativo.

Los resultados preliminares se muestran en las Tablas 26 y 27. Con el fin de evaluar la significación estadística, se  
agruparon los datos para el grupo de control y el grupo 5 M y se agruparon los datos para el grupo 10 M y el grupo  
15 M (N = 7 para cada grupo de grupos). Los resultados preliminares de estos grupos unidos se muestran en la  
Tabla 27. Téngase en cuenta que sólo los datos de SPECT alcanzaron significación estadística; las otras medidas  
no alcanzaron significación estadística debido al pequeño número de pacientes afectados.

Tabla 26. Datos de eficacia en fase I 5M, 10M, 15M y de Control

Mediciones cuantitativas de la Función Ventricular Izquierda

Ensayo de la Función Cardíaca	Control	Tratados (5 millones) (N = 5)	Tratados (10 millones) (N = 5)	Tratados (15 millones) (N = 6)	Todos tratados (N = 15)	Valor P Todos Tratados vs. Control	Valor P Control vs. 10+15 millones	Control Combinado Control + 5 millones	Combinado Tratado 10 millones + 15 millones	Valor P Control + 5 millones vs. 10+15 millones
MRI	n = 10	n = 5	n = 4	n = 2	n = 11	n = 10	n = 6	n = 15	n = 10	
FEVD (%)	53+/-11	47+/-13	47+/-11	50+/-7	48+/-10			51+/-11	48+/-9	
6 Meses Diferencia	54+/-11	47+/-13	54+/-11	50+/-6	50+/-11	0,706	0,336	52+/-12	53+/-9	0,352
	1,1+/-7,8	-0,02+/-1,3	7+/-4	0,2+/-0,8	2,5+/-9			1+/-9	1+/-9	
VDF (mL)	154,7+/-55	153,3+/-30	176,6+/-51	175,7+/-12	165,8+/-36,1			154+/-47	176,4+/-39,9	
6 Meses Diferencia	154,1+/-55	176,3+/-53	182,4+/-58	180,1+/-41	179,2+/-48	0,244	0,617	161,5+/-53,3	181,7+/-48,7	0,884
	-0,56+/-20	23,1+/-37	5,83+/-29	4,39+/-29	13,4+/-31			7,3+/-28,1	5,35+/-25,9	
VSF (mL)	76+/-45	81+/-23	97+/-46	88+/-18	88+/-30			78+/-38	94+/-37	
6 Meses Diferencia	74+/-44	95+/-46	87+/-46	91+/-32	91+/-40	0,053	0,666	81+/-44	88+/-38	0,341
	-1,84+/-17	14+/-25	-9,9+/-18	2,7+/-13	3,4+/-22			3,6+/-21	-5,7+/-17	
Tamaño del infarto <sup>1</sup> (% de Masa del VI)	17+/-8	18,8+/-8,6	33,2+/-14	12+/-1	22,8+/-13			17,3+/-8,2	26+/-16	
	10+/-9	16,2+/-10,9	22+/-12	11+/-2	17,5+/-11	0,570	0,794	12+/-9,8	19+/-11	0,450
	-7+/-5	-2,6+/-5,9	-10,9+/-3	-0,6+/-1	-5,2+/-6	n = 13	n = 9	-5,3+/-5,8	-7,5+/-5,7	
SPECT	n = 13	n = 5	n = 5	n = 4	n = 14	n = 13	n = 9	n = 18	n = 9	
PSTR (perusión)	259+/-283	714+/-658	999+/-753	584+/-440	779+/-620			385+/-450	814+/-636	
	273+/-395	722+/-521	636+/-532	462+/-290	617+/-449	0,087	0,021	398+/-465	559+/-426	0,011
	14+/-210	7,8+/-216	-363+/-307	-122+/-260	-162+/-293			13+/-205	-256+/-298	

<sup>1</sup> Tamaño de infarto expresado en % de masa total (gramos)

## ES 2 610 241 T3

Tabla 27. Cambios simples en SPECT Puntuación de Severidad por Reperusión en Reposo por Grupo de Tratamiento - Pacientes que finalizaron el estudio de 6 meses

		Inicio	Cambio desde el Inicio hasta los 6 Meses Después de la Infusión	Valor P de Cambio a los 6 Meses
Grupo de tratamiento 1	N	5	5	
	Media	714,200	7,8000	0,940
	Desviación Típica	657,850	216,054	
	Mínimo, Máximo	(0,000, 1787,000)	(-322,000, 222,000)	
Grupo de Tratamiento 2-3	N	9	9	
	Media	814,333	-255,7778	0,033
	Desviación Típica	635,641	297,644	
	Mínimo, máximo	(97,000, 1868,000)	(-859,000, 263,000)	
Grupo de control	N	13	13	
	Media	259,000	14,462	0,808
	Desviación Típica	282,698	210,078	
	Mínimo, máximo	(0,000, 858,000)	(-250,000, 528,000)	
Control + Grupo de Tratamiento 1	N	18	18	
	Media	385,444	12,611	0,798
	Desviación Típica	449,728	205,293	
	Mínimo, máximo	(0,000, 1787,000)	(-322,000, 528,000)	

Nota 1: Valores p estimados a partir de las pruebas t de diferencias pareadas. Intervalo de confianza de 95% a partir de la distribución t.

- 5 Como para la Puntuación de Severidad Total en Reposo, la Tabla 27 muestra que para el grupo 5M y de control agrupados, el cambio en la Puntuación de Severidad Total en Reposo después de 6 meses fue de +12,6, lo que indica que el área de infarto creció en estos pacientes. Los datos de la Puntuación de Severidad Total en Reposo muestran adicionalmente que los pacientes en los grupos 10M y 15M tenían áreas de infarto más grandes en riesgo.
- 10 Los grupos 10 M y 15 M mostraron una caída de 31,4% en el tamaño del infarto con un  $p < 0,01$ . Basándose en estos datos, la infusión de al menos  $10 \times 10^6$  células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas que contienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 da como resultado una mejora estadísticamente significativa de la perfusión en la zona de infarto.
- 15 Los datos de PSTR para los sujetos de control no tratados no muestran ni neoangiogénesis ni prevención de la muerte celular. Cuando los sujetos fueron tratados con una dosis subterapéutica de células (es decir,  $5 \times 10^6$  células CD34+ que contienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4), los datos de PSTR no mostraron ni neoangiogénesis ni la
- 20 prevención de la muerte celular. La mejora en la PSTR sólo se observó en los sujetos tratados con  $10 \times 10^6$  o más células CD34+ que contienen una subpoblación de al menos  $0,5 \times 10^6$  células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. Por tanto, esta dosis es la dosis

terapéuticamente eficaz mínima.

Ejemplo 12. Múltiples Administraciones de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas a los sujetos

- 5 El suministro de sangre en las zonas limítrofes isquémicas peri-infarto es marginal, poniendo en peligro a los cardiomiocitos de la zona limítrofe. Infusiones múltiples de producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas, mediante células de apoyo en la zona limítrofe, pueden preservar/restablecer la viabilidad del miocardio peri-infarto.
- 10 De acuerdo con este aspecto de la invención descrita, se administra una primera alícuota de la composición en una primera fecha de infusión, una segunda alícuota de la composición se administra en una segunda fecha de infusión, una tercera alícuota de la composición se administra en una tercera fecha de infusión, etcétera. La programación de las fechas de infusión es determinada para un paciente dado por el médico de tratamiento de acuerdo con su criterio médico.
- 15 De acuerdo con una realización, la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente dos días, al menos aproximadamente tres días, al menos aproximadamente cuatro días, al menos aproximadamente cinco días, al menos aproximadamente seis días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 17 días, al menos aproximadamente 18 días, al menos aproximadamente 19 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 22 días, al menos aproximadamente 23 días, al menos aproximadamente 24 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 26 días, al menos aproximadamente 27 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 29 días, al menos aproximadamente 30 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con otra realización, la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente 1 mes, al menos aproximadamente 2 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 7 meses, al menos aproximadamente 8 meses, al menos aproximadamente 9 meses, al menos aproximadamente 10 meses, al menos aproximadamente 11 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 13 meses, al menos aproximadamente 14 meses, al menos aproximadamente 15 meses, al menos aproximadamente 16 meses, al menos aproximadamente 17 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 19 meses, al menos aproximadamente 20 meses, al menos aproximadamente 21 meses, al menos aproximadamente 22 meses, al menos aproximadamente 23 meses, al menos aproximadamente 24 meses, al menos aproximadamente 30 meses, al menos aproximadamente 36 meses, al menos aproximadamente 42 meses, al menos aproximadamente 48 meses, al menos aproximadamente 54 meses, al menos aproximadamente 60 meses, al menos aproximadamente 66 meses, al menos aproximadamente 72 meses, al menos aproximadamente 78 meses, al menos aproximadamente 84 meses, al menos aproximadamente 90 meses, al menos aproximadamente 96 meses, al menos aproximadamente 102 meses, al menos aproximadamente 108 meses, al menos aproximadamente 114 meses, al menos aproximadamente 120 meses, al menos aproximadamente 126 meses, al menos aproximadamente 132 meses, al menos aproximadamente 138 meses, al menos aproximadamente 144 meses, al menos aproximadamente 150 meses, al menos aproximadamente 156 meses, al menos aproximadamente 162 meses, al menos aproximadamente 168 meses, al menos aproximadamente 174 meses, al menos aproximadamente 180 meses, al menos aproximadamente 186 meses, al menos aproximadamente 192 meses, al menos aproximadamente 198 meses, al menos aproximadamente 204 meses, al menos aproximadamente 210 meses, al menos aproximadamente 216 meses, al menos aproximadamente 222 meses, al menos aproximadamente 228 meses, al menos aproximadamente 234 meses, al menos aproximadamente 240 meses o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con algunas realizaciones, la primera fecha de infusión es de al menos 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años, 20 años, 21 años, 22 años, 23 años, 24 años, 25 años, 26 años, 27 años, 28 años, 29 años, 30 años, 31 años, 32 años, 33 años, 34 años, 35 años, 36 años, 37 años, 38 años, 39 años, 40 años o más después de la aparición de un IAM.
- 55 De acuerdo con otra realización, la segunda fecha de infusión es al menos aproximadamente un día, al menos aproximadamente dos días, al menos aproximadamente tres días, al menos aproximadamente cuatro días, al menos aproximadamente cinco días, al menos aproximadamente seis días, al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 8 días, al menos aproximadamente 9 días, al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 11 días, al menos aproximadamente 12 días, al menos aproximadamente 13 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 15 días, al menos aproximadamente 16 días, al menos aproximadamente 17 días, al menos aproximadamente 18 días, al menos aproximadamente 19 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 22 días, al menos aproximadamente 23 días, al menos aproximadamente 24 días, al menos aproximadamente 25 días, al menos aproximadamente 26 días, al menos aproximadamente 27 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 29 días, al menos aproximadamente 30 días o más después de la aparición de un IAM. De acuerdo con otra realización, la segunda fecha de infusión es al menos aproximadamente 1 mes, al menos



## ES 2 610 241 T3

Los sujetos/pacientes elegibles que presenten síntomas y hallazgos clínicos indicativos de un infarto de miocardio y elegibles para su inclusión en el estudio serán seleccionados como se describe en el Ejemplo 1 y cateterizados como se describe en el Ejemplo 2. En algunas realizaciones, la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ potentes se adquirirá del sujeto/paciente como se describe en el Ejemplo 3 y, en algunas realizaciones, la médula ósea extraída será transportado al centro de procesamiento como se describe en Ejemplo 4. Las células CD34+ serán seleccionadas a partir del producto de médula ósea extraída como se describe en el Ejemplo 5.

El sistema Isolex 300i se utiliza para procesar el producto empobrecido en GR o el producto de médula ósea, cuyo volumen de GR es <20 ml de acuerdo con las siguientes etapas de procesamiento:

- (i) La médula ósea se lava automáticamente para eliminar las plaquetas;
- (ii) Las células CD34 positivas (CD34+) se marcan específicamente para su selección mediante incubación con el anticuerpo monoclonal (Mab) para CD34 Isolex 300i;
- (iii) El reactivo no unido se elimina mediante lavado de la suspensión celular con la solución tampón;
- (iv) Las células CD34+ sensibilizadas (que significan las células CD34+ marcadas con Mab para CD34) son capturadas mediante Dynabeads M-450 con anti-IgG de ratón de oveja;
- (v) Se utiliza una columna de selección para separar las Dynabeads marcadas magnéticamente que tienen células CD34+ capturadas de células no deseadas, que se lavan a través de la columna de la selección y se recogen en la Bolsa de la Fracción Negativa; y
- (vi) El Agente de Liberación Células Madre PR34+ libera las células CD34+ de la columna, y las células CD34+ se recogen en la Bolsa de Producto Final. El sistema realiza varias etapas de lavado, eliminando la mayor parte del líquido a la Bolsa de Residuos de Tampón.

La fracción CD34+ Isolex (R) seleccionada se analizará a continuación para determinar los rendimientos de RGB y células CD34+. Una primera alícuota del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas que contiene al menos  $10 \times 10^6$  las células CD34+ se formulará como se describe en el Ejemplo 7, se transportará al centro de cateterismo como se describe en el Ejemplo 8, y se infundirá al paciente como se describe en el Ejemplo 9 en la primera fecha de infusión. Una pluralidad de alícuotas de la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas que contiene células + CD34, que contienen, adicionalmente, una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se congelarán a  $-86^{\circ}\text{C}$  y se crioconservarán en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido para su administración. (Véase el "Estudio de Crioconservación" a continuación).

Estudio de CrioConservación.

Este estudio se realizó para evaluar la capacidad de la porción basada en Isolex del procedimiento de fabricación de productos quimiotácticos de células madre hematopoyéticas para enriquecer eficazmente las células CD34+ de la MMH crioconservada. El protocolo se ha diseñado para evaluar el rendimiento, la viabilidad, la funcionalidad y la estabilidad de las células CD34+ derivadas de enriquecimiento de MMH crioconservada. El estudio se ha diseñado para evaluar y describir el efecto sobre el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la crioconservación de la MMH reducida en GR antes de la selección de CD34 basada en Isolex.

Se han aplicado las siguientes condiciones experimentales:

- (1) Dos (2) MMH para cada uno de las tres (3) réplicas con el fin de proporcionar el rendimiento celular adecuadas para satisfacer los requisitos del diseño experimental; con un intervalo de veinticuatro (24) horas entre la MMH y el inicio del procedimiento de empobrecimiento en GR.
- (2) Control del estudio: Producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas recién preparado, con la caracterización completa del producto después de la perfusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas través de un catéter a las 48 y 72 horas después de la MMH.
- (3) Experimentación: el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas derivado de MMH crioconservada, con la caracterización completa del producto después de la perfusión del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas derivado de MMH crioconservada a través de un catéter a las 48 y 72 horas después de la MMH, menos el tiempo que la MMH crioconservada permanece en almacenamiento (definido como >24 horas)

Diseño del estudio

Con el fin de producir suficientes células CD34+ para realizar el experimento previsto, se requerirán dos (2) donantes. Se recogerán de cada donante más de o igual a 80 ml de MMH y  $\geq 30$  ml de sangre periférica.

Almacenamiento de entrada: Las muestras se almacenaron a  $2$  a  $8^{\circ}\text{C}$  durante veinticuatro (24) horas antes de comenzar el procedimiento de reducción de GR.

Después de la reducción de GR, la MMH de ambos donantes se agruparon y a continuación se dividieron en dos

## ES 2 610 241 T3

fracciones iguales. Una fracción se utilizará como control producto fresco (sin congelar) y la otra fracción se utilizará para la prueba de crioconservación.

5 Para la prueba de crioconservación, la MMH con reducción de GR se congelará en un congelador a -86°C y a continuación se almacenará en estado de criogenización en la fase de vapor ( $\leq -150^\circ\text{C}$ ) de un congelador de nitrógeno líquido (LNF) utilizando el crioprotector que contiene la fuente de líquido Hetastarch (Heta-almidón al 6% en cloruro de sodio al 0,9% fabricado por Hospira).

10 Las muestras tanto de control (no congelada) como crioconservada (después de la descongelación) se procesarán mediante Isolex esencialmente como se describe en el Ejemplo 5 anterior. Las muestras en dos jeringas de 10 ml se prepararán a partir de las células CD34+ seleccionadas. La caracterización completa del producto se llevará a cabo en los puntos horarios siguientes: (i) Después de la perfusión del producto a través de un catéter a las 48 horas de la MMH; y (ii) después de la perfusión del producto a través de un catéter a las 72 horas de la MMH. Para las muestras crioconservadas, el término "72 horas de la extracción", por ejemplo, significa el tiempo desde la extracción hasta el momento del ensayo, excluyendo el tiempo transcurrido de la congelación y del almacenamiento en estado criogenizado de la médula ósea empobrecida en GR.

15 Los determinantes clave para la calidad de células CD34+ del producto de células madre hematopoyéticas incluyen: (i) recuento de células CD34+ y viabilidad 7-AAD; (ii) actividad migratoria de células CD34+ mediada por SDF-1/CXCR-4; (iii) expresión del antígeno de la superficie celular CXCR-4 en las células CD34+, y (iv) crecimiento de colonias de células progenitoras hematopoyéticas (UFC). Este experimento se repitió tres veces.

### Resumen de los Resultados

25 El estudio se realizó de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Todas las desviaciones de la metodología y los materiales utilizados se detallan en las secciones de resultados relacionadas que se presentan a continuación.

La Tabla 28 resume la información pertinente sobre los donantes de médula ósea utilizada en este estudio.

30 **Tabla 28: La edad y el sexo de los donantes de médula ósea para el estudio de crioconservación.**

	Exp1		Exp 2		Exp 3	
Donante	1	2	3	4	5	6
Años	26	26	22	62	32	24
Género	F	F	F	F	F	F

La Tabla 29 resume el volumen de la muestra, el contenido de GR y el rendimiento, la viabilidad y la pureza de las células en la MMH pre-procesada después de almacenamiento de 24 h en un refrigerador a 2-8°C.

35 **Tabla 29: Post-almacenamiento de 24 horas a 2-8°C - Volumen, rendimiento celular y calidad de la MMH.**

	Exp 1		Exp 2		Exp 3	
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6
Volumen (ml)	117	64	106	105	103	113
RGB por microlitro <sup>#</sup>	1,39E+04	1,26E+04	1,39E+04	1,44E+04	1,94E+04	2,45E+04
TCN <sup>#</sup>	1,62E+09	8,03E+08	1,47E+09	1,51E+09	1,99E+09	2,76E+09
HCT <sup>#</sup>	33,85%	33,40%	29,10%	27,85%	31,60%	32,60%
Vol. de GR (ml) <sup>#</sup>	39,44	21,38	30,85	29,24	32,55	36,84
Viabilidad de las células CD45+*	91,13%	91,72%	90,58%	93,17%	94,11%	95,8%
Células CD34+ viables por $\mu\text{l}$ *	149,18	148,38	140,89	114,45	150,80	203,76
Viabilidad de las células CD34+*	94,14%	98,90%	98,35%	97,24%	98,89%	98,78%
Pureza de las células CD34+*	1,44%	1,32%	1,23%	0,97%	1,21%	0,88%
Células CD34+ que expresan CXCR-4 <sup>-</sup>	77,68%	77,03%	71,88%	64,57%	75,75%	68,36%
Núm. Total de células CD34+*	1,74E+07	9,50E+06	1,49E+07	1,20E+07	1,55E+07	2,30E+07

<sup>#</sup> Determinado mediante el analizador de hematología

\* Determinada mediante análisis de citometría de flujo de anticuerpos CD45-FITC/CD34-PE y tinción 7-AAD de la

## ES 2 610 241 T3

	Exp 1		Exp 2		Exp 3	
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6
muestra ~ Determinadas mediante análisis de citometría de flujo de anticuerpos CD34-FITC y CXCR-4-PE y tinción de la muestra						

En cada uno de los experimentos, las MMH de cada par de los donantes se agruparon después de la reducción de GR.

- 5 La Tabla 30 presenta el contenido, la viabilidad celular y la recuperación de GR de MMH agrupadas después de la reducción de glóbulos rojos:

Tabla 30: Post-reducción de GR - contenido de GR y calidad de las células

	Exp 1	Exp 2	Exp 3
	Donantes 1 y 2	Donantes 3 y 4	Donantes 5 y 6
Volumen de GR	15,35 ml	13,80 ml	20,85 ml
Recuperación de TCN <sup>#</sup>	76,95%	85,93%	89,37%
Viabilidad de las células CD45 +	84,97%	93,35%	95,60%
Recuperación de CD34 <sup>#</sup>	72,89%	84,00%	88,36%
Viabilidad de las células CD34+	93,99%	97,92%	98,95%
Células CD34+ que expresan CXCR-4	71,33%	64,89%	74,64%
<sup>#</sup> En comparación con las muestras pre-procesadas			

- 10 Después de la reducción de GR, cada una de las muestras de MMH agrupadas se dividió en dos fracciones iguales. Una se empleó como control fresco (sin congelar) y la otra se empleó para la prueba de crioconservación.

Para la crioconservación, la MMH mezclada con un volumen igual de crioprotector congelado se cargó uniformemente en dos contenedores Cryocyte de 250 ml, se congeló en un congelador mecánico (-86°C) y se almacenó crioconservada en la fase de vapor de un LNF de acuerdo con el Protocolo. La Tabla 31 presenta los datos obtenidos de la MMH post-descongelada y lavada:

- 15

Tabla 31: MMH post-descongelada y lavada - Calidad de la célula y recuperación de las células

Muestra crioconservada descongelada y lavada			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3
Periodo de almacenamiento antes de descongelar	10 días	8 días	8 días
Medios de lavado	Solución de trabajo de PBS*	Dextrano al 2% <sup>~</sup>	Dextrano al 80,3% <sup>@</sup>
Volumen de GR	0,39 ml	1,11 ml	0,38 ml
Recuperación de TCN <sup>#</sup>	36,11%	50,73%	28,61%
Viabilidad de las células CD45+	61,85%	32,18%	43,97%
Recuperación de las células CD34+ <sup>#</sup>	52,43%	46,29%	15,72%
Viabilidad de las células CD34+	94,36%	86,11%	81,76%
Pureza de células CD34+	2,40%	1,29%	1,88%
Células CD34+ que expresan CXCR-4	51,42%	50,74%	37,85%
<b>Clave:</b> <sup>#</sup> En comparación con la MMH con reducción de GR antes de la crioconservación. * La Solución de Trabajo de PBS contenía HSA al 1% y citrato de sodio al 0,41% (p/v) en PBS (sin Ca <sup>++</sup> ni Mg <sup>++</sup> ). El lavado de las células con esta solución se realizó de acuerdo con el indicado en el Protocolo. <sup>~</sup> Esta solución de lavado contenía Dextrano 40 al 2%, HSA al 1% y citrato de Na al 0,4% en PBS (sin Ca <sup>++</sup> ni Mg <sup>++</sup> ). La muestra descongelada se expandió con 200 ml de esta solución y a continuación se lavó dos veces cada vez con 200 ml de esta solución. La centrifugación se ajustó a 600 g, 10 minutos a 20°C. Las células lavadas se resuspendieron con 150 ml Solución de Trabajo de PBS para el procesamiento Isolex.			



## ES 2 610 241 T3

	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada
48 h post MMH	66,52%	53,31%	57,64%	41,35%	60,14%	54,16%
72 h post MMH	73,87%	53,89%	56,73%	44,07%	64,60%	50,67%

Tabla 35: Post-infusión a través del catéter - Células CD34+ migratorias (% del total de células CD34+ viables).

Catéter de perfusión	MMH fuente de muestras AMR-001					
	Exp 1		Exp 2		Exp 3	
	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada
48 h post MMH	18,81±1,83 %*	5,87±1,98 %	19,67±10,43 %	15,67±2,24 %	24,89±1,93 %	26,66±1,53 %
72 h post MMH	(1,07%)#	(1,51%)	(1,06%)	(2,19%)	(1,44%)	(1,56%)

\* Migración inducida por SDF-1. % De células CD34+ migratorias del total de células CD34+ viables con desviación típica de tres repeticiones.

# Migración natural (sin SDF-1 añadido)

Tabla 36: Post-infusión a través del catéter - Número de UFC por cada 100 células CD34+ viables cultivadas.

Perfusión	Fuente de MMH de muestras AMR-001					
	Exp 1		Exp 2		Exp 3	
	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada	Sin congelar	Congelada
48 h post MMH	24	15,5	31,5	14	38	15,5
72 h post MMH	20,5	0,05	62,5	12	30,5	7

5

Tabla 37: Catéteres de dilatación con balón utilizados

Exp.	Fuente de MMH de la muestra AMR-001	Tiempo de perfusión (Horas de MMH)	Producto de manufactura	Longitud del balón/día.	Núm. de catálogo	Núm. de lote	Comentario
1	Sin congelar	48 h	Sprinter	12/3,5 mm	SPR3512W	258795	Fuera de fecha
		72 h	Sprinter	12/4,0 mm	SPR4012W	254243	Fuera de fecha
	Congelada	48 h	Sprinter	15/3,0 mm	SPR3015W	412090	Fuera de fecha
		72 h	Voyager	15/3,0 mm	1009443-15	8111462	-
2	Sin congelar	48 h	Sprinter	15/3,5 mm	SPR3515W	443152	Fuera de fecha
		72 h	Sprinter	15/3,5 mm	SPR3515W	443152	Fuera de fecha
	Congelada	48 h	Voyager	15/3,0 mm	1009443-15	8111462	-
		72 h	Voyager	15/3,0 mm	1009443-15	8092561	-
3	Sin congelar	48 h	Voyager	15/3,0 mm	1009443-15	8111462	Reutilizado *
		72 h	Sprinter	15/3,0 mm	SPR3015W	476734	Fuera de fecha
	Congelada	48 h	Sprinter	15/3,0 mm	SPR3015W	476734	Fuera de fecha
		72 h	Sprinter	15/3,0 mm	SPR3015W	476734	Fuera de fecha

\* Antes de ser utilizado para la 2ª vez, el catéter y el lumen central fueron 1º lavados y purgados con alcohol isopropílico del 70% y después con PBS estéril. A continuación, al lumen central se le inyectó aire con el fin de eliminar el líquido residual en su interior. El procedimiento de lavado se llevó a cabo dentro de una cabina de bioseguridad.

## Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad de la AMR-001 fabricado a partir de MMH crioconservadas.

5 La recuperación de células CD34+ post-Isolex de la AMR-001 elaborada a partir de MMH no congelada (Muestras de control) fue de media  $34,6 \pm 4,35\%$  (rango de 30,3% a 39%), que se encuentra dentro del intervalo de aceptación para la fabricación de AMR-001 para uso clínico. Cabe señalar que los datos presentados anteriormente se estiman sin tener en cuenta las células retiradas para las pruebas en proceso, por lo tanto, la recuperación de células CD34+ real será ligeramente más alta que la presentada.

10 La recuperación de células CD34+ post-catéter fue de  $100,52 \pm 4,39\%$  (95,65% a 104,17%) a las 48 horas de la MMH y  $94,50 \pm 6,67\%$  (89,20% a 101,99%) a las 72 horas de la MMH. No hubo una reducción sustancial de la viabilidad (Tabla 33), expresión de CXCR-4 (Tabla 34), actividad migratoria (Tabla 35) y crecimiento de UFC (Tabla 36) de células CD34+ a las 72 horas de la MMH en comparación con los verificados a las 48 horas post-MMH.

15 Para la prueba de la crioconservación, las muestras de MMH con reducción de GR se crioconservaron, según el protocolo PCT para la crioconservación de la médula ósea para el trasplante donde las muestras de MMH mezcladas con un volumen igual de crioprotector con concentración final de DMSO al 5%, HSA al 2,5% y Heta-almidón al 2,1% (Heta-almidón al 6% de fuente líquida, Hospira) se congelaron a  $-86^{\circ}\text{C}$  y a continuación se almacenaron en estado criogenizado en la fase de vapor de un LNF.

20 Después de la crioconservación y la descongelación, la estabilidad, la viabilidad, la movilidad y el crecimiento en cultivo de las células CD34+ seleccionadas con Isolex se mantienen. Por lo tanto las células descongeladas cumplen los criterios para el uso clínico.

25 En algunas realizaciones, se utilizará para su infusión un producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas preparado a partir de alícuotas congeladas y descongeladas de una población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. Las muestras de este producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas serán retiradas para someterlas a ensayo para determinar el recuento RGB, mediante citometría de flujo (para determinar el recuento y la viabilidad de las células CD34+), tinción de Gram, y esterilidad. El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas será liberado para su infusión en el plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas después de la descongelación de la población no expandida, aislada, estéril de células mononucleares autólogas, sólo si cumple los siguientes requisitos:

- Pureza de las células CD34+ de al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%;
- Un resultado de tinción de Gram negativo para la fracción positiva seleccionada;
- Niveles de endotoxina: menos de aproximadamente 0,5 unidades de endotoxina/ml;
- 30 • El rendimiento células de CD34+ viables del "Producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas" cumple la dosificación requerida según la cohorte de tratamiento;
- Las células CD34+ son viables en al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% mediante 7-AAD;
- Resultado de esterilidad USP para la "Fracción Positiva de Sobrenadante": negativo (14 días después).

45 La evaluación de la esterilidad en el producto de células madre que incluye la tinción de Gram y la endotoxina se llevará a cabo antes de la liberación del producto para su infusión. Se llevará a cabo el cultivo para la esterilidad USP (bacterias y hongos) y los resultados serán comunicados al investigador principal. En el caso de un resultado positivo de esterilidad USP, el sujeto y el médico de guardia a cargo serán notificados de inmediato, provistos de identificación y sensibilidad del organismo cuando esté disponible, y la documentación de tratamiento y el resultado del tratamiento antimicrobiano apropiado serán registrados por el sitio de investigación y el patrocinador.

50 El producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas preparado a partir de las células mononucleares autólogas congeladas y descongeladas se formulará como se describe en el Ejemplo 7, se transportarán al centro de cateterismo como se describe en el Ejemplo 8, y se infundirá al paciente como se describe en el Ejemplo 9.

55 Se propone que la administración de una dosis potente de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, tempranamente o tardíamente después de la aparición de un infarto agudo de miocardio de acuerdo con la invención descrita puede dar como resultado una reducción de eventos cardíacos adversos persistentes/crónicos y progresivos, incluyendo, pero sin limitarse a, muerte prematura, infarto de miocardio recurrente, desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias importantes, y síndrome coronario agudo, y empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias importantes, y síndrome coronario agudo.

60 Ejemplo 13. Administración conjunta del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas y neuregulina 1.

65

La neuregulina 1 (NRG1) es un agonista para los receptores de tirosina quinasa de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, que consiste en ErbB1, 2, 3, y 4. (Fuller, SJ, et al., J. Mol. Cell Biol. 44:831-54 (2008)). La unión de NRG1 a ErbB4 aumenta su actividad quinasa y conduce a la heterodimerización con ErbB2 o la homodimerización con ErbB4 y la estimulación de las vías de transducción de señales intracelulares. Id. Las subunidades del receptor NRG1 ErbB2 y ErbB4 se expresan también en cardiomiocitos diferenciados. Id. Recientemente se ha demostrado en ratones que NRG1 induce la proliferación de cardiomiocitos mononucleados diferenciados in vivo haciendo que los cardiomiocitos diferenciados dejen la quiescencia proliferativa. Bersell, et al (Bersell, K. et al., Cell 138: 257-70 (2009)). Las células madre y progenitoras no diferenciadas no contribuyen a esta proliferación. (Id.). Utilizando un modelo de ratón en donde la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI) de ratones de dos meses de edad se ligó de forma permanente y se administró NRG1 diariamente una semana más tarde durante 12 semanas, se demostró que la administración de NRG1 durante 12 semanas daba como resultado una mejora sostenida de la función miocárdica, determinada por la fracción de eyección, una reducción del tamaño de la cicatriz de infarto, y la atenuación de la hipertrofia de los cardiomiocitos. (Id.).

Después de un infarto agudo de miocardio, además de la muerte celular necrótica, como consecuencia de la isquemia, la muerte celular apoptótica y la hibernación de cardiomiocitos en marcha conducen colectivamente a una disminución de la función cardíaca que puede empeorar con el tiempo y, finalmente, causar en última instancia grandes eventos cardíacos adversos. Una vez perdidos, los cardiomiocitos son incapaces de regenerarse de manera significativa para restaurar la función cardíaca. La datación con carbono 14 de los cardiomiocitos muestra que la capacidad de regeneración del músculo cardíaco es inferior a 1% anual (Bergman O. Science. 2009; 324: 98-101). La invención descrita demuestra la prevención de la pérdida de cardiomiocitos después de un IAM mediante la mejora de la perfusión y la prevención de la apoptosis. La restauración adicional de la función cardíaca requiere aumentar significativamente la capacidad de regeneración de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos en regeneración requerirán una adecuada perfusión o sufrirán las consecuencias de la isquemia, incluyendo la hibernación y la apoptosis.

Se propone que la combinación de la invención descrita con el aumento significativo de la capacidad de regeneración natural de los cardiomiocitos sería sinérgica en la restauración de la función cardíaca después de un IAM y la prevención de eventos cardíacos adversos. Por tanto, se propone la administración conjunta del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita con neuregulina 1 como un agente terapéutico capaz de restaurar la función cardíaca después de IAM mediante el aumento de la perfusión, que previene la muerte celular apoptótica de los cardiomiocitos y rescata los cardiomiocitos de la hibernación, y proporcionando la infraestructura necesaria para la generación de nuevos cardiomiocitos para reemplazar los cardiomiocitos perdidos.

La neuregulina 1 humana recombinante se obtiene a partir de fuentes comerciales. (Cell Sciences, Novus Biologicals, R & D Systems, RayBiotech, Inc., Shenandoah Biotecnología, Spring Bioscience).

El aumento de dosis de neuregulina 1 se mezclará con el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas de la invención descrita y se someterá a ensayo in vitro después del tránsito a través de un catéter para determinar la viabilidad del producto, la esterilidad, la pureza y la potencia, lo que significa la viabilidad, la capacidad migratoria y el crecimiento de UFC, después del almacenamiento durante hasta 72 horas. Si se mantienen la potencia, la pureza y la viabilidad, se propone un experimento preclínico en el que las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se infunden a través de la vena de la cola en ratones Nod SCID después de la ligadura y descarga de la arteria coronaria (modelo de IAM inducido). El efecto de este tratamiento sobre la perfusión cardíaca, la función del músculo cardíaco, la histopatología, la apoptosis, y la cicatrización se evaluará después de la infusión y se comparará con los controles (es decir, los ratones Nod SCID que no reciben células). Estudios anteriores han demostrado una mejoría en la perfusión, neoangiogénesis humana, prevención de la apoptosis, y preservación de la función cardíaca en comparación con los animales de control tratados. A continuación, se añadirán dosis crecientes de neuregulina 1 a las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita y los resultados se compararán con los animales de control y los animales tratados con las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita sola.

Si los modelos preclínicos muestran un potencial efecto beneficioso sinérgico con las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita combinadas con neuregulina 1, se propone una prueba de seguridad y eficacia de aumento de la dosis en el mantenimiento y en pacientes con IAM. Para este estudio, los pacientes recibirán las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención con o sin neuregulina 1. La neuregulina 1 se administrará a dosis crecientes para determinar (i) la dosis terapéutica media (DTM) y (ii) si la perfusión y la función cardíaca son mejoradas por la combinación de neuregulina 1 y las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una

## ES 2 610 241 T3

subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita en comparación con las células CD34+ derivadas de ser humano estériles, purificadas que contienen una subpoblación de células CD34+ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita sola.

5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva debida a la insuficiencia vascular que afecta el flujo sanguíneo coronario, estando caracterizada la lesión miocárdica progresiva como un componente de progresión de la enfermedad a insuficiencia cardíaca, preparándose la composición farmacéutica mediante un procedimiento que comprende:
- 10 (a) purificar en condiciones estériles una población de células mononucleares que comprende células CD34+ obtenidas del sujeto en condiciones estériles con el fin de producir una población no expandida, aislada de células mononucleares enriquecida en células CD34+, de modo que al menos 70% de las células comprendan células CD34+;
- 15 (b) al menos 24 horas después de la adquisición de las células del sujeto, hacer pasar una primera porción de la población enriquecida producida en la etapa (a) a través de un catéter que tiene un diámetro interno de 0,36 mm y confirmar que
- 20 (i) al menos algunas de las células que pasan a través del catéter tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y se mueven en respuesta a SDF-1 in vitro;
- (ii) al menos algunas de las células que pasan a través del catéter pueden formar colonias hematopoyéticas in vitro; y
- (iii) al menos 70% de las células que pasan a través del catéter son viables;
- 25 (c) formular la composición farmacéutica estéril que comprende una segunda porción de la población de células mononucleares enriquecida en células CD34+ producida en la etapa (a) para el suministro al sujeto por vía parenteral a través de un catéter que tiene un diámetro interno de 0,36 mm en una pluralidad de fechas de infusión;
- en donde la composición farmacéutica estéril comprende:
- 30 (A) una cantidad terapéutica de un producto quimiotáctico estéril de células madre hematopoyéticas, en donde el producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende una población aislada no expandida de células mononucleares autólogas que comprende una subpoblación de células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potente que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y que se mueven en respuesta a SDF-1;
- 35 en donde la cantidad terapéutica es eficaz para mejorar la perfusión del miocardio, para preservar los cardiomiocitos existentes y su función, y para reducir la progresión de la enfermedad a insuficiencia cardíaca durante la vida del sujeto, y
- en donde la cantidad terapéutica del producto quimiotáctico de células madre hematopoyéticas comprende al menos  $10 \times 10^6$  células CD34+ aisladas que comprenden  $0,5 \times 10^6$  o más células CD34+ potentes que expresan CXCR-4, que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y que se mueven en respuesta a SDF-1; y
- 40 (B) una cantidad estabilizante de suero de al menos 10%, expresada como ml/100 cc de volumen final de la composición farmacéutica estéril, en donde la cantidad estabilizante de suero es eficaz para retener la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y la actividad de formación de colonias hematopoyéticas de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.
- 45 2. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica incluye adicionalmente al menos un agente activo que es compatible con los componentes (A) y (B) de la composición.
- 50 3. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el agente activo compatible se selecciona del grupo que consiste en una citoquina, un diurético, un agente anti-arritmico, un agonista del receptor de tirosina quinasa, un agente antianginoso, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipocolesterolemante.
- 55 4. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el agente movilizador de células madre hematopoyéticas es G-CSF, GM-CSF, o una combinación de los mismos.
- 60 5. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el agonista del receptor de tirosina quinasa es la neuregulina 1 humana.
- 65 6. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población no expandida, aislada de células mononucleares autólogas después de la adquisición se divide en una pluralidad de alícuotas, al menos una de las cuales se almacena en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido hasta que se necesite.
7. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la

## ES 2 610 241 T3

- reivindicación 1, en donde la insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria resulta de la oclusión de una arteria coronaria.
- 5 8. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria que resulta de la oclusión de la arteria es una isquemia.
- 10 9. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la isquemia que resulta de la oclusión de la arteria es una isquemia miocárdica.
- 10 10. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la isquemia que resulta de la oclusión de la arteria es una isquemia transitoria o una isquemia miocárdica crónica.
- 15 11. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la insuficiencia vascular es una insuficiencia vascular de la vasculatura coronaria que se desarrolla después de un infarto agudo de miocardio.
- 20 12. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la lesión miocárdica progresiva es un deterioro progresivo de la función del músculo cardíaco después de infarto agudo de miocardio.
- 25 13. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la progresión de la enfermedad a insuficiencia cardíaca incluye al menos uno de un infarto de miocardio recurrente, desarrollo de arritmias importantes y desarrollo de síndrome coronario agudo.
- 30 14. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se formula para su administración parenteral a través del catéter en el miocardio o por vía intravascular.
- 30 15. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población aislada no expandida de células mononucleares autólogas que comprende una subpoblación de células CD34+, que contiene adicionalmente una subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ potentes que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y que se mueven en respuesta a SDF-1 se obtiene a partir de médula ósea autóloga, sangre del cordón umbilical, sangre periférica autóloga, sangre periférica movilizada, cordón umbilical o tejido adiposo.
- 35 a partir de médula ósea autóloga, sangre del cordón umbilical, sangre periférica autóloga, sangre periférica movilizada, cordón umbilical o tejido adiposo.
- 40 16. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un sujeto revascularizado.
- 40 17. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la isquemia miocárdica es una isquemia de la zona limítrofe peri-infarto.
- 45 18. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva, de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la citoquina es un agente de movilización de células madre hematopoyéticas.
- 45 19. La composición para su uso en un método de tratamiento de una lesión miocárdica progresiva de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el empeoramiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, el empeoramiento de las arritmias importantes, empeoramiento de síndrome coronario agudo, o una combinación de los mismos llevaría a la muerte prematura en ausencia de tratamiento.
- 50