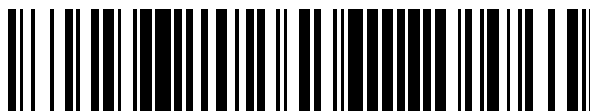


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 587**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| A61K 35/14 | (2015.01) | A61K 31/5375 | (2006.01) |
| A61K 35/16 | (2015.01) | A61P 9/10 | (2006.01) |
| A61K 35/28 | (2015.01) | | |
| C12N 5/0789 | (2010.01) | | |
| A61K 38/08 | (2006.01) | | |
| A61K 38/10 | (2006.01) | | |
| A61K 38/17 | (2006.01) | | |
| A61K 31/155 | (2006.01) | | |
| A61K 31/22 | (2006.01) | | |
| A61K 31/4439 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/US2009/066354**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065601**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09831024 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2367432**

54 Título: **Composición mejorada de la perfusión en una zona de infarto**

30 Prioridad:

16.04.2009 US 169850 P
03.12.2008 US 119552 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

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 y
PRETI, ROBERT

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 640 587 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

Composición mejoradora de la perfusión en una zona de infarto

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de Estados Unidos n.º 11/552.396 (presentada el 24 de octubre de 2006), de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/119.552, presentada el 3 de diciembre de 2008 y de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/169.850, presentada el 16 de abril de 2009.

10 **Campo de la invención**

La invención descrita se refiere a composiciones mejoradoras de la perfusión de una zona de infarto que comprenden un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas y a métodos de uso de las mismas para reparar una lesión en la zona de un infarto después de un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural en un sujeto revascularizado.

Antecedentes de la invención

El ciclo cardíaco

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

25 La expresión "ciclo cardíaco" se utiliza para hacer referencia a todos o a cualquiera de los acontecimientos mecánicos relacionados con el flujo sanguíneo coronario o la presión sanguínea que se produce desde el comienzo de un latido hasta el comienzo del siguiente. La presión sanguínea aumenta y disminuye a lo largo del ciclo cardíaco. La frecuencia del ciclo cardíaco es la frecuencia cardíaca. Cada uno de los "latidos" del corazón implica cinco fases principales: (1) "Diástole tardía", que es cuando las válvulas semilunares se cierran, las válvulas atrioventriculares (Av) se abren y todo el corazón se relaja; (2) "Sístole auricular", que es cuando el miocardio de las aurículas izquierda y derecha se están contrayendo, las válvulas AV se abren y la sangre fluye desde la aurícula al ventrículo; (3) "Contracción ventricular isovolúmica", que es cuando los ventrículos comienzan a contraerse, las válvulas AV y semilunares se cierran y no hay cambios de volumen; 4) "Expulsión ventricular", que es cuando los ventrículos están vacíos pero todavía se están contrayendo y las válvulas semilunares se abren; y (5) "Relajación ventricular isovolúmica", cuando la presión disminuye, no entra sangre en los ventrículos, los ventrículos dejan de contraerse y empiezan a relajarse, y las válvulas semilunares se cierran porque la sangre en la aorta las está cerrando. El ciclo cardíaco está coordinado por una serie de impulsos eléctricos que son producidos por células cardíacas especializadas que se encuentran dentro del nódulo sinoauricular y el nódulo auriculoventricular.

Flujo sanguíneo coronario

45 El flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias es pulsátil, con componentes característicos de flujo fásico sistólico y diastólico. El flujo sistólico, que se refiere a la fase de contracción o bombeo del ciclo cardíaco, tiene respuestas rápidas, breves y retrógradas. El flujo diastólico, que se refiere a la fase de relajación o llenado del ciclo cardíaco, se produce durante la fase de relajación después de la contracción del miocardio, con un aumento abrupto por encima de los niveles sistólicos y una disminución gradual paralela a la de las presiones diastólicas aórticas. El volumen sanguíneo coronario intramural cambia durante cada latido cardíaco, acomodando el miocardio acomodando el cambio de volumen provocado por la contracción muscular. El flujo venoso coronario no está sincronizado con el flujo arterial coronario, que se produce predominantemente en la sístole y está casi ausente durante la diástole.

55 Para cada latido del corazón, la presión sanguínea varía entre las presiones sistólica y diastólica. La expresión "presión sistólica" se refiere a la presión máxima en las arterias, que se produce cerca del final del ciclo cardíaco cuando los ventrículos se están contrayendo. La expresión "presión diastólica" se refiere a la presión mínima en las arterias, que se produce cerca del comienzo del ciclo cardíaco cuando los ventrículos están llenos de sangre.

60 El flujo sanguíneo coronario no solo es fásico, sino que 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 funcionan "en serie" de 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 lugar a una resistencia microvascular reducida y un 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 un descenso de la presión de distensión a través de la estenosis, se produce la dilatación miogénica de las 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 fuerza de cizallamiento y desencadena la dilatación mediada por flujo, reduciendo aún más la resistencia de esta red.

Las características arteriales y venosas de flujo pulsátil del corazón dependen de la distensibilidad intramiocárdico. El término "distensibilidad" se refiere a una medida de la tendencia de un órgano hueco a resistir el retroceso hacia sus dimensiones originales al retirar una fuerza de distensión o de compresión. Cuanto mayor sea la distensibilidad, más elástico será el material. La distensibilidad se calcula usando la siguiente ecuación, donde ΔV es el cambio de volumen y ΔP es el cambio en la presión:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

La capacidad del corazón como reservorio está controlada por arteriolas de resistencia a la entrada de flujo vascular coronario. La resistencia de salida está relacionada con las venas cardíacas intramurales. La resistencia capilar intramiocárdica influye tanto en las respuestas arteriales como venosas, pero actúa predominantemente en consonancia con la resistencia de salida.

Aproximadamente el 75 % de la resistencia coronaria total se produce en el sistema arterial, que comprende los vasos capilares de conductancia (R1), prearteriolas (R2) y arteriolas e intramiocárdicos (R3). Las arterias coronarias epicárdicas normales de los seres humanos tienen de 0,3 a 5 mm de diámetro y no ofrecen una resistencia apreciable al flujo sanguíneo. Normalmente, la gran resistencia de los vasos epicárdicos (R1) es trivial hasta que las obstrucciones ateroscleróticas afectan a la luz. Las arteriolas precapilares (R2), de 100 a 500 μm de tamaño) son vasos de resistencia que conectan el epicardio con los capilares del miocardio y son los principales controladores del flujo sanguíneo coronario. Contribuyen aproximadamente del 25 % al 35 % de la resistencia coronaria total. Los vasos arteriolas precapilares distales (<100 μm de diámetro), el principal sitio de regulación metabólica del flujo sanguíneo coronario, son responsables del 40-50 % de la resistencia al flujo coronario. La densa red de aproximadamente 4000 capilares por milímetro cuadrado asegura que cada miocito está adyacente a un capilar. Los capilares no son uniformemente permeables (es decir, abiertos, que permiten el paso libre), porque los esfínteres precapilares regulan el flujo según las necesidades del miocardio.

Varias afecciones, como la hipertrofia ventricular izquierda, la isquemia miocárdica o la diabetes, pueden perjudicar a la resistencia microcirculatoria (R3), atenuando el aumento absoluto máximo del flujo coronario en momentos de aumento de la demanda de oxígeno.

Isquemia

El miocardio depende casi enteramente del metabolismo aeróbico, ya que las reservas de oxígeno en el corazón son escasas. El suministro de oxígeno miocárdico aumenta y disminuye en respuesta a las demandas de oxígeno (energía) del miocardio. El término "autorregulación" se refiere a la capacidad para mantener la perfusión miocárdica a niveles constantes frente a las fuerzas impulsoras cambiantes. La autorregulación mantiene la perfusión coronaria a niveles relativamente constantes en una amplia gama de presión aórtica media. Cuando la presión aórtica supera sus límites superiores o inferiores, el flujo sanguíneo coronario disminuye o aumenta de forma proporcional.

El corazón necesita el suministro de una cantidad suficiente de oxígeno para prevenir la subperfusión. Cuando la reducción de la presión de perfusión distal a estenosis no se compensa con la dilatación autorreguladora de los vasos de resistencia, se produce isquemia, lo que significa una falta de suministro de sangre y oxígeno. Debido a que la zona con menor suministro suele ser la más alejada, la isquemia generalmente aparece en zonas más alejadas de la irrigación sanguínea.

Después de una oclusión total o casi total de una arteria coronaria, la perfusión miocárdica se produce por medio de colaterales, es decir canales vasculares que interconectan las arterias epicárdicas. Los canales colaterales pueden formarse de forma inmediata o pueden preexistir en un estado subdesarrollado antes de la aparición de la enfermedad coronaria. Los colaterales preexistentes son estructuras de paredes delgadas con un diámetro variable de 20 μm a 200 μm , con una densidad variable entre las diferentes especies. Los colaterales preexistentes normalmente están cerrados y no funcionan, porque no existe gradiente de presión que impulse el flujo entre las arterias que conectan. Después de la oclusión coronaria, la presión distal desciende precipitadamente y los colaterales preexistentes se abren prácticamente al instante.

La expresión "isquemia miocárdica" se refiere a una disminución del 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 miocárdico y (2) disminución de la perfusión miocárdica y el suministro de oxígeno. (Willerson, J.T. et al, JACC 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 del miocardio están más alejadas del suministro de sangre, con mayor necesidad de oxígeno.

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

Isquemia transitoria. El término "isquemia transitoria", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un estrechamiento de una arteria coronaria en reposo o con ejercicio donde no hay trombo o ruptura de placa pero donde el suministro de sangre no puede ser satisfecho. Cada vez que aumenta la demanda de oxígeno del corazón, se crea un desequilibrio entre la demanda y la oferta 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, alteración de la función sistólica y anomalías electrocardiográficas con alteraciones del segmento ST, seguido de aumento de la presión diastólica final con disincronía ventricular izquierda, hipocinesia, y discinesia, y por último los síntomas dolorosos de la angina. A pesar de que los miocitos isquémicos experimentan cambios fisiológicos y metabólicos a los pocos segundos del cese del flujo coronario, resultando en una onda T y en algunas anomalías del segmento ST (pero sin elevación de la enzima sérica), la muerte celular no resulta de la isquemia. Kloner, R.A. y Jennings, RB, *Circulation* 104: 2981-89 (2001). Una vez que se restablece el flujo sanguíneo, se produce una recuperación completa de la función contráctil de los miocitos.

Aunque la angina de pecho (dolor en el pecho) puede ser un síntoma de isquemia transitoria, en general la isquemia transitoria es silenciosa (lo que significa que hay una depresión del segmento ST de al menos 1 mm sin síntomas asociados, por ejemplo, dolor en el pecho) en el 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 sanguínea o el estado contráctil o cualquier combinación de los mismos aumenta la demanda de oxígeno miocárdico sin que haya un suministro adecuado de oxígeno a través de las arterias coronarias considerablemente estrechadas (estenosadas). Más del 40 % de los pacientes con angina estable tratados con uno o más fármacos antianginosos tienen episodios frecuentes de isquemia silenciosa, que se ha demostrado que predice un mayor riesgo de acontecimientos coronarios y muerte cardíaca. Deedwania, PC, Carbajal, EV, *Arch. Intern. Med.* 150: 2373-2382 (1991).

Isquemia miocárdica crónica. La expresión "isquemia miocárdica crónica (IMC)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un estado subagudo o crónico prolongado de isquemia miocárdica debido al estrechamiento de un vaso sanguíneo coronario donde el miocardio "hiberna", lo que significa que el miocardio disminuye o reduce su contractilidad y, por lo tanto, su demanda miocárdica de oxígeno, para adaptarse a la perfusión reducida, preservando así la viabilidad celular y eludiendo la apoptosis. El mecanismo subyacente por el cual el miocardio funciona de este modo no se conoce bien. Este miocardio en hibernación es capaz de regresar a una función normal o casi normal cuando se restaura un suministro sanguíneo adecuado. Una vez que el flujo sanguíneo coronario se ha restablecido a la situación normal o casi normal y la isquemia se resuelve, sin embargo, el miocardio en hibernación todavía no se contrae. Este desajuste de la función de flujo que da lugar a un retorno lento de la función cardíaca después de la resolución de la isquemia se ha denominado aturdimiento. La duración del retorno de la función es bastante variable, y varía desde días a meses y depende de diversos parámetros, incluyendo la duración de la agresión isquémica original, la gravedad de la isquemia durante la agresión original y la idoneidad del retorno del flujo arterial. En una serie de estudios se han proporcionado pruebas de inflamación en el miocardio en hibernación. Heusch, G. et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: 984-99 (2005). En un estudio realizado en un modelo porcino de hibernación miocárdica donde el flujo sanguíneo coronario medio en LAD en reposo se redujo a aproximadamente 60 % del valor basal durante un período de 24 horas a cuatro semanas, se detectaron miocitos apoptóticos en todos los cerdos experimentales en las regiones en hibernación irrigadas por la LAD estenótica, lo que sugiere que la regulación por disminución funcional puede no ser adecuada para prevenir la muerte gradual y constante de miocitos por apoptosis en el miocardio en hibernación. Chen, C, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 30: 1407-12 (1997). Un estudio de biopsia de pacientes humanos sometidos a cirugía de revascularización coronaria también reconoció la apoptosis de miocitos, lo que influye de forma negativa sobre la recuperación funcional del ventrículo izquierdo, como un fenómeno importante en el hibernación del miocardio. Angelini, A., et al., *Eur. J. Heart Failure* 9(4): 377-83 (2006).

Infarto agudo de miocardio (IAM) Durante el IAM se produce otro tipo de agresión. El IAM es un cambio brusco en la luz de un vaso sanguíneo coronario que da lugar a infarto isquémico, lo que significa que continúa hasta que el músculo cardíaco muere. En la inspección general, el infarto de miocardio puede dividirse en dos tipos principales: los infartos transmurales, en los que la necrosis miocárdica implica a todo o casi todo el grosor de la pared ventricular, y los infartos subendocárdicos (no transmurales), en los que la necrosis miocárdica afecta al subendocardio, al miocardio intramural, o a ambos, sin extenderse por toda la pared ventricular hasta el epicardio. A menudo hay una oclusión total del vaso con elevación del segmento ST debido a la formación de trombos dentro de la luz como resultado de la rotura de la placa. La agresión isquémica prolongada da como resultado una 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 las macromoléculas intracelulares de tal manera que se liberan marcadores cardíacos en el suero, tales como troponinas y enzimas específicas cardíacas, tales como creatina quinasa sérica (CK). Además, el paciente puede presentar cambios en el electrocardiograma (ECG) debido a un daño de la totalidad del grosor en el músculo. Un infarto de miocardio con elevación del ST (STEMI) es una lesión más grande que un infarto de miocardio sin elevación del ST. La elevación del segmento ST y ondas Q en el ECG, dos características altamente indicativas de infarto de miocardio, solo se observan en aproximadamente la mitad de los casos de infarto de miocardio inicialmente.

El infarto agudo de miocardio sigue siendo frecuente, con una incidencia anual de 1,1 millones de casos solo en Estados Unidos (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 después de un infarto de miocardio, la pérdida aguda de células del músculo miocárdico y la hipoperfusión que acompaña a la zona periinfarto dan lugar a una cascada de acontecimientos que causan una disminución inmediata de la función cardíaca, con el potencial de persistencia a largo plazo. El grado de pérdida de células miocárdicas depende de la duración de la oclusión de la arteria coronaria, de la circulación coronaria colateral existente y del estado de la microvasculatura cardíaca. Paul et al., *Am. Heart J.* 131: 710-15 (1996); Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-72 (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 miocárdicas prácticamente no tienen la capacidad de regenerarse, el infarto de miocardio conduce a una disfunción cardíaca permanente debido a la pérdida de células del músculo contráctil y el reemplazo con cicatrices fibróticas no funcionantes. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53 (1): 31-47 (2002). Además, la hipertrofia compensatoria del músculo cardíaco viable conduce a insuficiencia microvascular que da lugar a una desaparición adicional de la función cardíaca causando la hibernación del músculo miocárdico y la apoptosis de los miocitos hipertrofiados en la zona periinfarto.

Entre los supervivientes de un infarto de miocardio, la función cardíaca residual está influenciada por la extensión del remodelado ventricular (es decir, los cambios en el tamaño, la forma y la función, típicamente una disminución progresiva de la función, del corazón después de la lesión). Las alteraciones en la topografía ventricular (es decir, la forma, la configuración o a morfología de un ventrículo) se producen tanto en el tejido cardíaco infartado como en el sano después del infarto de miocardio. Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-72 (1990). La dilatación ventricular (es decir, un estiramiento, aumento de tamaño o expansión del ventrículo) causa una disminución de la función cardíaca global y se ve afectada por el tamaño del infarto, la cicatrización del infarto y las tensiones de la pared ventricular. Los esfuerzos recientes para minimizar el remodelado han tenido éxito al limitar el tamaño del infarto mediante una rápida reperfusión (es decir, restauración del flujo sanguíneo) usando agentes trombolíticos e intervenciones mecánicas, incluyendo, pero sin limitaciones, la colocación de una endoprótesis vascular, junto con la reducción de las tensiones en la pared ventricular mediante el uso juicioso de terapias de precarga y la gestión adecuada después de la carga. Independientemente de estas intervenciones, un porcentaje sustancial de pacientes experimentan disfunción cardíaca clínicamente relevante y prolongada después del infarto de 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 remodelado ventricular, disfunción cardíaca permanente y deterioro progresivo de la función cardíaca y, en consecuencia, presentan un riesgo mayor durante toda la vida de experimentar acontecimientos cardíacos, incluyendo la muerte. Paul et al., *Am. Heart J.* 131: 710-15 (1996); Pfeffer, M. A., Braunwald, E., *Circulation* 81: 1161-72 (1990).

A nivel celular, inmediatamente después de un infarto de miocardio, se produce disfunción cardíaca generalizada transitoria de forma uniforme. Cuando se produce una oclusión breve (es decir, de una duración de tres minutos a cinco minutos) de la arteria coronaria, el metabolismo energético se ve afectado, lo que conduce a una disfunción demostrable del músculo cardíaco que puede persistir hasta 48 horas a pesar de la reperfusión inmediata. Este fenómeno llamado "fenómeno del miocardio aturdido" se produce posteriormente o después de la reperfusión y se piensa que es un resultado de especies reactivas de oxígeno. El proceso es transitorio y no está asociado con una respuesta inflamatoria. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53 (1): 31-47 (2002). Después de una revascularización con éxito, se produce una recuperación significativa del aturdimiento en un plazo de tres a cuatro días, aunque la recuperación completa puede requerir mucho más tiempo. Boli, R., *Prog., Cardiovascular Disease* 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, que dura más de cinco minutos, conduce a isquemia del miocardio y se asocia con una respuesta inflamatoria significativa que comienza inmediatamente después de la reperfusión y puede durar hasta varias semanas. Frangogiannis, N. G., et al., *Cardiovascular Res.* 53 (1): 31-47 (2002); Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 98: 687-798 (1998).

El proceso inflamatorio después de la reperfusión es complejo. Inicialmente contribuye al daño miocárdico, pero más tarde conduce a la cicatrización y formación de cicatrices. Este proceso complejo parece producirse en dos fases. En la primera fase denominada "caliente" (en los primeros cinco días), las especies de oxígeno reactivo (en el tejido de miocardio isquémico) y la activación del complemento generan una señal quimiotáctica para los leucocitos (la quimiotaxis es el movimiento dirigido de una célula móvil, organismo o parte hacia las condiciones ambientales que considera atractivas y/o alejadas del entorno que encuentra repelente) e inicia una cascada de citocinas. Lefer, 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 α) y la expresión aumentada de la interleucina-6 (IL-6), la molécula de adhesión intercelular 1 ("ICAM-1" o CD-54) y un receptor que normalmente se expresa en las células endoteliales y células del sistema inmunológico, la selectina (L, E y P) y la integrina (CD 11 a, CD11b y CD18) parecen contribuir a la acumulación de neutrófilos y a la desgranulación en el miocardio

- isquémico. Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 7: 699-710 (1998), Kurrelmeyer, K. M, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 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 y muerte de las células del miocardio través de la obstrucción microvascular y la activación de las vías respiratorias de los neutrófilos después de la adhesión específica de ligando a los miocitos cardíacos. Entman, M. L., et al., *J. Clin. Invest.* 4: 1335-45 (1992). Durante la fase "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: 1428-30 (2001).
- 10 En la segunda fase, comienza el proceso de reparación cardíaca (de aproximadamente el día 6 hasta aproximadamente el día 14), que en última instancia conduce a la formación de cicatrices (de aproximadamente el día 14 hasta aproximadamente el día 21) y el posterior remodelado ventricular (de aproximadamente el día 21 a aproximadamente el día 90). Poco después de la reperfusión, los monocitos se infiltran en el miocardio infartado. Atraídos por el complemento (C5a), el factor de crecimiento transformante B1 ("TGF-B1") y la proteína quimiotáctica monocítica 1 ("MCP-1"), los monocitos se diferencian en macrófagos que inician el proceso de cicatrización mediante la eliminación de 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 interleucina 10 (IL-10) por infiltración de linfocitos también estimula la cicatrización mediante la regulación por disminución de las citocinas inflamatorias e influyendo en el remodelado 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 al participar en la formación de tejido cicatricial fibrótico. El factor de células madre (SCF) es un potente atrayente de mastocitos. Se ha demostrado que el ARNm del SCF está regulado por aumento en segmentos isquémicos de miocardio en un modelo canino de infarto de miocardio y, por lo tanto, puede contribuir a la acumulación de mastocitos en sitios isquémicos del miocardio. Frangogiannis, N. G. et al., *Circulation* 98: 687-798 (1998). Los productos de los mastocitos (incluyendo el TGF-B, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las gelatinasas A y B) inducen la proliferación de fibroblastos, influyen sobre el metabolismo de la matriz extracelular e inducen la angiogénesis. Fang, K. C., et al., *J. Immunol.* 162: 5528-35 (1999); Takeshi, S., et al., *Cardiology* 93: 168-74 (2000).
- 30 Después de un infarto de miocardio, se produce neoangiogénesis después de que la fase "caliente" del proceso inflamatorio remita (aproximadamente el día 5) coincidiendo con niveles crecientes de VEGF (el VEGF alcanza el máximo aproximadamente el día 7 y disminuye gradualmente al valor basal entre el día 14 y el día 21). Durante esta fase del proceso de cicatrización, las células precursoras endoteliales (EPC) se movilizan y se reclutan hacia el sitio del infarto. Shinitani, S., et al., *Circulation* 103: 2776-79 (2001). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se ha sugerido que el factor 1 derivado de células estromales de quimiocina (SDF-1), que es el ligando para el receptor de quimiocina CXCR-4 expresado por células CD34⁺, también desempeña un papel en el retorno de las células a las zonas del daño isquémico. Ceredini, D. J., et al., *Nature Medicine* 10: 858-63 (2004); Askari, A., et al., *Lancet* 362: 697-703 (2003); Yamaguchi, J. y col., *Circulation* 107: 1322-34 (2003). Aunque se sabe que el SDF-1 desempeña un papel en la hematopoyesis y está implicado en la migración, retorno y supervivencia de los progenitores hematopoyéticos y aunque se ha implicado al SDF-1 en la neovascularización isquémica *in vivo* aumentando el reclutamiento de EPC a los sitios isquémicos (Yamaguchi et al. *Circulation* 107:1322-1328 (2003), el papel del SDF-1 en la neoangiogénesis no está claro. Hay pruebas que sugieren la implicación del SDF-1. Por ejemplo, la expresión del gen del SDF-1 está regulado por aumento durante la hipoxia, una deficiencia de oxígeno en los tejidos, por el factor-1 inducible de hipoxia (HIF-1). Además, las células CD34⁺ son capaces de dirigirse a zonas de isquemia, ricas en SDF-1, incluyendo el miocardio infartado. Askari et al., *Lancet* 362: 697-703 (2003). Además, prácticamente todas las células que expresan VEGF-2 coexpresan CD34 y CXCR-4, pero solo aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 2 % de las células CD34⁺ CXCR-4⁺ coexpresan VEGF-2.

La zona del límite periinfarto

- 50 La zona de miocardio disfuncional producida por la oclusión de la arteria coronaria se extiende más allá de la región del infarto para incluir un límite variable del tejido adyacente de aspecto normal. (Hu, Q., et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291: H648-657 (2006)). Esta zona de tejido periinfarto isquémica pero viable separa la zona central de necrosis progresiva del miocardio normal que la rodea. La zona periinfarto no se correlaciona con parámetros enzimáticos del tamaño del infarto y es sustancialmente más grande en los infartos pequeños. 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 límite pueden ser muy importantes para el desenlace. Se sabe, por ejemplo, que después de un IAM se produce isquemia transitoria en las zonas límite y que las intervenciones coronarias percutáneas, que abren la arteria relacionada con el infarto, pueden afectar negativamente a la salud de las zonas límite periinfarto. Se ha sugerido que pueden existir niveles intermedios de flujo sanguíneo medio como resultado de la mezcla de penínsulas de tejido isquémico entremezcladas con regiones de miocardio perfundido normal en el límite de un infarto. (Hu, Q., et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 291: H648-657 (2006)). Sin embargo, el límite de los microvasos coronarios entremezclados, que en perros no supera los 3 mm de anchura, no puede explicar la región relativamente amplia 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 periinfarto a lo largo del tiempo puede contribuir a la transición del remodelado compensado a la insuficiencia cardíaca progresiva después de un IAM.

- 5 Hasta la fecha, no existe un tratamiento ideal para prevenir las consecuencias adversas a largo plazo de la insuficiencia vascular, en particular la importante insuficiencia vascular después de un infarto de miocardio. Aunque la revascularización de grandes vasos (es decir, la colocación con éxito de una endoprótesis vascular) parece prometedora, los estudios hasta la fecha han demostrado que tales aplicaciones son insuficientes para hacer frente a las crecientes demandas planteadas por la hipertrofia miocárdica compensatoria. Como resultado, habitualmente se producen extensión del infarto y reemplazo fibroso, independientemente de la revascularización de los vasos grandes, un tratamiento médico apropiado de las tensiones de la pared ventricular y la potencial neoangiogénesis mediada por células CD34⁺ natural, aunque subóptima (una de las teorías relacionadas con la causa subyacente del infarto de miocardio es que la capacidad para movilizar estas células puede estar limitada biológicamente).
- 10
- 15 Se ha desarrollado un interés intenso en la evaluación de la capacidad de las células precursoras endoteliales y miocárdicas para limitar el daño al miocardio después del infarto y para limitar o prevenir el remodelado ventricular. Datos preclínicos significativos y algunos datos clínicos demuestran la seguridad y el potencial de la terapia celular usando diversos precursores celulares (particularmente células hematopoyéticas) para contribuir a la neoangiogénesis, limitación de la miogénesis cardíaca (principalmente por fusión) y preservación muscular en la zona del 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) (usando células progenitoras derivadas de médula ósea), Assmus, B. et al., New Engl. J. Med. 355 (12) 1222-32 (2006) (usando células progenitoras derivadas de médula ósea), pero, véase Lunde, K. et al., New Eng. J. Med. 355 (12): 1199-209 (2006) (usando células progenitoras derivadas de médula ósea). No se sabe en qué circunstancias o en qué medida el remodelado del ventrículo izquierdo es reversible.
- 20
- 25

La médula ósea está constituida por diversos tipos de células precursoras y maduras, incluyendo células hematopoyéticas (los precursores de las células sanguíneas maduras) y células estromales (los precursores de un amplio espectro de células del tejido conjuntivo), las cuales parecen ser capaces de diferenciarse en otros tipos de células. Wang, J. S. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 122: 699-705 (2001); Tomita, S. y col., Circulation 100 (Suppl. II): 247-256 (1999); Saito, T. et al., Tissue Eng. 1: 327-43 (1995). En varios estudios clínicos se han utilizado células medulares o hemáticas no modificadas (es decir, no fraccionadas), por ejemplo, Hamano, K. et al., Japan Cir. J. 65: 845-47 (2001); Strauer, B. E., et al., Circulation 106: 1913-18 (2002); Assmus, et al., Circulation 106: 3009-3017 (2002); Dobert, N. et al., Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 8: 1146-51 (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, si es que hay, sigue siendo desconocida.

30

35

El CD34 es un antígeno de células progenitoras hematopoyéticas que se expresa de forma selectiva en las células madre y progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea humana, la sangre y el hígado fetal. Yin et al., Blood 90: 5002-5012 (1997); Miaglia, S. y col., 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 sangre humana pueden ser capaces de diferenciarse en cardiomiocitos, células endoteliales y células de músculo liso *in vivo*. Véase Yeh, et al., Circulation 108: 2070-73 (2003). Las células CD34⁺ representan aproximadamente el 1 % de las células nucleadas derivadas de la médula ósea; El antígeno CD34 también se expresa en los precursores de células endoteliales inmaduras, mientras que 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 adulta dan lugar a una mayoría de las células progenitoras de granulocitos/macrófagos (UFC-GM), algunas unidades formadoras de colonias mixtas (UFC-Mezcla) y una población menor de células progenitoras eritroides primitivas (unidades formadoras de colonias en ramillete, eritrocitos o BFU-E). Yeh, et al., Circulation 108: 2070-73 (2003). Las células CD34⁺ también pueden tener el potencial de diferenciarse en nuevo músculo miocárdico o contribuir a su desarrollo, aunque a baja frecuencia.

40

45

50

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

55

60 Modelos animales

Una terapia preferente después del IAM impediría que las células murieran durante la recuperación que conduce a un remodelado inverso y al fracaso, o reemplazaría las células moribundas por cardiomiocitos.

- 65 En ratones se ha descrito un sistema transgénico condicional que permite el control de la sincronización de la expresión de VEG-F. May, D et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 105(1): 282-87 (2008). El sistema se utilizó para crear un

estado ajustable e de hipoperfusión ventricular e isquemia del miocardio. En condiciones en las que una gran fracción de cardiomiocitos es dirigida para entrar en el modo de hibernación aunque sin muerte celular detectable, se descubrió que la disfunción de los cardiomiocitos (hibernación) estaba relacionada linealmente con el grado de reducción de la densidad microvascular. Esto no imita el remodelado ventricular inducido por IAM, que se complica con procesos de expansión del infarto, inflamación, formación de cicatrices e hipertrofia de miocitos.

La enfermedad de las arterias periféricas (PAD), también llamada enfermedad vascular periférica (PVD), se simula mediante el modelo de las extremidades posteriores de la isquemia en la cual se anuda la arteria femoral del ratón para simular la enfermedad de la arteria periférica. La PAD, que habitualmente afecta las arterias que irrigan la pierna e incluye todas las enfermedades causadas por la obstrucción de grandes arterias en los brazos y las piernas, puede deberse a aterosclerosis, procesos inflamatorios que conducen a estenosis, una embolia o formación de trombos. La restricción del flujo sanguíneo debido a la estenosis o la oclusión arterial a menudo lleva a los pacientes a quejarse de dolor muscular al caminar (claudicación intermitente). Cualquier reducción adicional del flujo sanguíneo causa dolor isquémico en reposo. Esta afección se llama isquemia crónica de la extremidad, lo que significa que la demanda de oxígeno no puede mantenerse en reposo. Posteriormente puede sobrevenir ulceración y gangrena en los dedos de los pies, que son los más alejados del suministro de sangre y puede dar lugar a la pérdida de la extremidad afectadas si no se trata.

Los tratamientos para la isquemia de la extremidad tienen los objetivos del desarrollo de colaterales y del reabastecimiento del suministro de sangre. Las células mononucleares CD34⁺ derivadas de médula ósea se han probado en dichos modelos de isquemia de extremidades posteriores, pero el modelo de isquemia de extremidades posteriores no simula lo que ocurre en el corazón.

El modelo animal más cercano, el modelo porcino, no es un buen modelo de enfermedad humana porque (i) todos los experimentos generalmente se hacen en animales no ateroscleróticos, (ii) los animales no son tratados con angioplastia, (iii) los cerdos normales no embolizan los vasos sanguíneos; (iv) la circulación del cerdo no es exactamente la misma que la humana; y (iv) la zona límite de periinfarto puede no ser la misma.

Recientemente se informó de una mejoría marginal en los síntomas de la angina cuando las células CD34⁺ se movilizaron con GCSF, se realizó aféresis después de 5 días y a continuación se inyectaron en una zona isquémica del corazón según el mapeo de Noga.

La invención descrita proporciona un tratamiento para mejorar la perfusión de la zona del infarto después del infarto de miocardio. Los datos de un ensayo de fase I han proporcionado pruebas de que los sujetos tratados con al menos 10×10^6 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 experimentaron una mejora significativa en las tasas de perfusión en reposo a los 6 meses en comparación con los sujetos que recibieron 5 millones de células y con el control, medido mediante la puntuación de gravedad total SPECT T(-256 frente a +13, $p = 0,01$).

En el documento US 2007/0105217 A1 se describen composiciones que comprenden productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas para su uso en el tratamiento de la insuficiencia vascular. En el documento US 2007/190127 A1 se describe una composición de liberación prolongada que comprende neuregulina (NRG) para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero. En el documento WO 2006/060779 A2 se describe una composición basada en un medio acondicionado de un cultivo celular para su uso en el tratamiento de la isquemia miocárdica y la enfermedad vascular periférica.

Sumario de la invención

La invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o reparación de una lesión en la zona de infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio (IAM), donde la lesión de la zona de infarto comprende remodelado ventricular adverso, comprendiendo la composición:

(a) una cantidad de mejora de la perfusión de la zona del infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas, comprendiendo el producto una población enriquecida de al menos 10×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de al menos $0,5 \times 10^6$ células CD34⁺/CXCR-4⁺ potentes que tienen actividad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4;

(b) una cantidad estabilizante de suero a una concentración de al menos 10 % (v/v); y

(c) opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos;

donde la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas, cuando se pasa a través de un catéter y se analiza *in vitro*, comprende al menos 70 % de células CD34⁺; y donde la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas,

cuando se pasa a través de un catéter y se analiza *in vitro*:

(1) retiene la actividad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4;

5 (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y

(3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*

10 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺; y donde la composición se administra al sujeto por vía parenteral a través de un catéter.

15 La composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, un agente hipercolesterolémico, neuregulina 1, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), una catecolamina, por ejemplo norepinefrina, endotelina -1, una prostaglandina F2 α , angiotensina II, un éster de forbol, neuropéptido Y, factor de crecimiento transformante activo β 1 (TGF-1 β), proteína Gq, diacilglicerol (DAG), salusina- α , salusina- β , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), miostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), una tiazolidindiona, por ejemplo, rosiglitazona, y el inductor débil de apoptosis débil similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK).

25 La población enriquecida de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas puede purificarse de los componentes celulares de un aspirado de médula ósea adquirido del sujeto. La población enriquecida de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas puede purificarse a partir de sangre periférica.

30 La composición puede administrarse a través del catéter por vía intravascular a una arteria relacionada con el infarto. La composición puede administrarse a través del catéter dentro del miocardio.

35 La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas para tratar una lesión de la zona del infarto y métodos de tratar o reparar la lesión de la zona del infarto en un sujeto revascularizado en el período posterior a un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural administrando al sujeto por vía parenteral a través de un catéter una composición farmacéutica estéril que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas como primer agente terapéutico y, opcionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico compatible. La cantidad de mejora de la zona del infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles comprende una población enriquecida de células CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, de tal manera que la población enriquecida de células madre hepatopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporciona al menos $0,5 \times 10^6$ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

45 De acuerdo con un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o reparar una lesión de la zona del infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural, comprendiendo el método las etapas: (a) administrar al sujeto por vía parenteral a través de un una composición farmacéutica estéril que comprende: (i) una cantidad de mejora de la perfusión de la zona del infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas como primer agente terapéutico, donde la cantidad de mejora de la perfusión de la zona de infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende una población enriquecida de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de tal manera que la población enriquecida de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporciona 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, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), y (iii) opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico compatible; y (b) mejorar la perfusión en al menos una zona de infarto, en relación con los controles, donde al menos el 70 % de las células en la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad migratoria mediada por CXCR-4, cuando se pasan a través del catéter y cuando se prueban *in vitro*, son células CD34⁺, y donde la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 cuando se pasa a través el catéter y ensayado *in vitro*, (1) retiene la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4; y donde la etapa de administración (a) tiene lugar en una o más fechas de infusión y donde una primera fecha de infusión comprende un intervalo de tiempo específico definido por una

primera vez y una segunda vez, donde la primera vez es después del pico de producción de la cascada de citocinas inflamatorias en la zona infartada y la segunda vez es antes de la formación de cicatrices miocárdicas en la zona infartada. De acuerdo con una realización del método, la cantidad que mejora la perfusión de la zona de infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende una población enriquecida de al menos 10×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de $0,5 \times 10^6$ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la pérdida de cardiomiocitos apoptóticos en la zona del infarto. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende el remodelado ventricular adverso después de un infarto agudo de miocardio, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende una disminución progresiva de la función del músculo cardíaco después del infarto agudo de miocardio. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la hipoperfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la hibernación del miocardio en la zona límite del periinfarto. De acuerdo con otra realización, el método comprende además la etapa: administrar a una segunda fecha de infusión una segunda alícuota congelada y descongelada de la segunda composición farmacéutica estéril, la segunda alícuota congelada y descongelada que comprende (i) una población enriquecida congelada y descongelada de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de $0,5 \times 10^6$ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; y (ii) una cantidad estabilizante de suero, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), donde la población enriquecida congelada y descongelada de células CD34⁺ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la segunda alícuota, cuando se pasa a través del catéter y se analiza *in vitro*, (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4; (2) contiene al menos 70 % de células CD34⁺; (3) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la descongelación de la segunda alícuota. De acuerdo con otra realización, el método comprende además la etapa: administrar opcionalmente en una tercera fecha de infusión una tercera alícuota congelada y descongelada de la composición farmacéutica estéril, comprendiendo la tercera alícuota una población enriquecida congelada y descongelada de células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de $0,5 \times 10^6$ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) una cantidad estabilizante de suero, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), donde la población enriquecida congelada y descongelada de células CD34⁺ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la tercera alícuota, cuando se pasa a través del catéter y se analiza *in vitro*, (1) retiene la actividad mediada por CXCR-4; (2) contiene al menos 70 % de células CD34⁺; (3) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (4) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la descongelación de la tercera alícuota. De acuerdo con otra realización, la segunda fecha de infusión es aproximadamente 30 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con otra realización, la tercera fecha de infusión es aproximadamente 60 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro* y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos 72 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, el método comprende además la etapa de administrar la composición por vía intravascular a una arteria relacionada con el infarto. De acuerdo con otra realización, el método comprende además la etapa de administrar la composición a través del catéter en el miocardio. 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 primera vez del intervalo de tiempo específico de la primera fecha de infusión es al menos aproximadamente 5 días después del infarto. De acuerdo con otra realización, la segunda vez del intervalo de tiempo específico de la primera fecha de infusión es menos de aproximadamente 14 días después del infarto. De acuerdo con otra realización, la primera vez del intervalo de tiempo específico de la primera fecha de infusión es de al menos aproximadamente 5 días después del infarto y la segunda vez del intervalo de tiempo específico de la primera fecha de infusión es de menos de aproximadamente 14 días después del infarto. De acuerdo con otra realización, el segundo agente terapéutico opcional es al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos. De acuerdo con otra realización, el segundo agente terapéutico opcional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico. De acuerdo con otra realización, el al menos

un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el agonista del receptor de tirosina quinasa neuregulina 1. De acuerdo con otra realización, el método reduce la lesión de la zona del infarto más que los componentes (i) más (ii) o el componente (iii) solo. De acuerdo con otra realización, el método mejora el flujo sanguíneo microvascular en la zona del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el método disminuye la zona de la lesión del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el método disminuye la masa del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el método aumenta la perfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el método aumenta la perfusión en el miocardio en hibernación en al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende un factor de crecimiento endotelial vascular seleccionado del grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de crecimiento placentario. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una catecolamina. De acuerdo con otra realización, la catecolamina es norepinefrina. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende endotelina-1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una prostaglandina $F_{2\alpha}$. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos es la angiotensina II. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende un éster de forbol. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el neuropéptido Y. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de crecimiento transformante activo $\beta 1$. El al menos un agente compatible que estimular el crecimiento de cardiomiocitos comprende la proteína Gq. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende diacilglicerol. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende salusina- α . De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende salusina- β . De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de crecimiento similar a insulina-1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende miostatina. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de estimulación de colonias de granulocitos. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de estimulación de colonias de macrófagos. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK). De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una tiazolidindiona. De acuerdo con otra realización, la tiazolidindiona es rosiglitazona.

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una lesión de la zona del infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural, que comprende: (a) una cantidad de mejora de una lesión de infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles, donde la cantidad de mejora de la zona del infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles comprende una población enriquecida de células $CD34^+$ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, de tal manera que la población enriquecida de células madre hematopoyéticas $CD34^+$ autólogas aisladas proporciona al menos $0,5 \times 10^6$ células $CD34^+$ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (b) una cantidad estabilizante de suero, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), y (c) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos, donde la composición se administra al sujeto por vía parenteral a través de un catéter; donde al menos el 70 % de las células en la población enriquecida de células $CD34^+$ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad migratoria mediada por CXCR-4, cuando se pasan a través del catéter y cuando se prueban *in vitro*, son células $CD34^+$, y donde la población enriquecida de células $CD34^+$ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 cuando se pasa a través el catéter y ensayado *in vitro*, (1) retiene la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células $CD34^+$ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4. De acuerdo con una realización, la cantidad que mejora la perfusión de la zona de infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende una población enriquecida de al menos 10×10^6 células madre hematopoyéticas $CD34^+$ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de $0,5 \times 10^6$ células $CD34^+$ potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición reduce la lesión de la zona del infarto más que los componentes (i) más (ii) o el componente (iii) solo. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la pérdida de cardiomiocitos apoptóticos en la zona del infarto. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende el remodelado ventricular adverso después de un infarto agudo de miocardio, cuando se compara con los controles. De acuerdo

con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende una disminución progresiva de la función del músculo cardíaco después del infarto agudo de miocardio. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la hipoperfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico. De acuerdo con otra realización, la lesión de la zona del infarto comprende la hibernación del miocardio en la zona límite del periinfarto.

5 De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se purifica de los componentes celulares de un aspirado de médula ósea adquirido del sujeto. De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se purifica a partir de sangre periférica.

10 De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos aproximadamente 48 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra

15 realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos aproximadamente 72 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra

20 realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, la composición se administra a través del catéter por vía intravascular a una arteria

25 relacionada con el infarto. De acuerdo con otra realización, la composición se administra a través del catéter dentro del miocardio. De acuerdo con otra realización, la composición mejora el flujo sanguíneo microvascular en la zona del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, la composición aumenta la perfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, la composición aumenta la perfusión en el miocardio en hibernación en al menos

30 una zona periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, la composición disminuye la zona de la lesión del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, la composición disminuye la masa del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente

35 antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el agonista del receptor de tirosina quinasa neuregulina 1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende un factor de crecimiento endotelial vascular seleccionado del grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de crecimiento placentario. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una catecolamina. De acuerdo con otra realización, la catecolamina es norepinefrina. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende

45 endotelina-1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una prostaglandina F_{2α}. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende angiotensina II. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende un éster de forbol. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el neuropéptido Y. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor transformante de crecimiento β1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende proteína Gq. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende diacilglicerol (DAG). De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende salusina-α. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende salusina-β. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de crecimiento similar a insulina-1. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende miostatina. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de estimulación de colonias de granulocitos. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el factor de estimulación de colonias de macrófagos. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK). De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende una tiazolidindiona. De acuerdo con otra realización, la tiazolidindiona es rosiglitazona.

Breve descripción de los dibujos

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

5 La Figura 2 muestra la eficacia migratoria del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas formulado que comprende células CD34⁺ de la invención.

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

10 La Figura 4(A) muestra el cambio en el tamaño del infarto como un porcentaje de la masa del LV en comparación con el producto (% de veces de la dosis de CD34⁺ de las células CD34⁺ móviles en un gradiente SDF). La Figura 4(B) muestra el cambio en el defecto de la perfusión (RTSS) frente al producto (% de veces de la dosis de CD34⁺ de las células CD34⁺ móviles en un gradiente SDF).

Descripción detallada

15 Tal como se define específicamente en las reivindicaciones adjuntas, la invención proporciona composiciones mejoradoras de la perfusión de una zona de infarto que comprenden un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas para su uso en el tratamiento de una lesión en la zona de un infarto que comprende el remodelado ventricular adverso después de un infarto agudo de miocardio (IAM) resultante de un proceso de enfermedad natural en un sujeto revascularizado.

20

GLOSARIO

25 El término "factor transformante de crecimiento β 1" (TGF- β 1) se refiere a una proteína multifuncional que controla la proliferación, la diferenciación y otras funciones en muchos tipos de células. Muchas células sintetizan TGF- β 1 y tienen receptores específicos para él. Regula positiva y negativamente muchos otros factores de crecimiento y como potente estimulador de la formación de hueso osteoblástica, causando quimiotaxis, proliferación y diferenciación en los osteoblastos comprometidos, tiene un papel importante en el remodelado óseo (Schluter, K.D. y Piper, H.M. FASEB J. 13:S17-S-22 (1999)).

30 El término "administrar", tal como se utiliza en el presente documento, en sus diversas formas gramaticales, significa dar o aplicar. El término "administrar", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la administración *in vivo*, así como la administración directa al tejido *ex vivo*. En general, las composiciones se pueden administrar sistémicamente de forma parenteral o tópica en formulaciones de unidad de dosificación que contienen transportadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales, según se desee, o pueden administrarse localmente mediante medios tales como, pero sin limitaciones, inyección, implantación, injerto, aplicación tópica o parenteral. Un medio de administración de células puede incluir, pero sin limitaciones, infusión.

40 El término "resultado" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una consecuencia o desenlace que resulta o sigue a un acontecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación y desarrollo de vasos sanguíneos.

45 El término "angiotensina II" se refiere a una hormona polipeptídica que se forma a partir de angiotensina I mediante la acción de la enzima convertidora de angiotensina (o ECA).

50 Las expresiones "apoptosis" o "muerte celular programada" se refieren a un proceso altamente regulado y activo que contribuye a la homeostasis biológica que comprende una serie de acontecimientos bioquímicos que conducen a diversos cambios morfológicos, incluyendo formación de burbujas, cambios en la membrana celular, tal como pérdida de asimetría y fijación de la membrana, retracción celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN cromosómico, sin dañar al organismo.

55 La muerte celular apoptótica es inducida por muchos factores diferentes e implica numerosas vías de señalización, algunas dependientes de las proteasas caspasas (una clase de cisteína proteasas) y otras que son caspasas independientes. Puede estar desencadenada por muchos estímulos celulares diferentes, incluyendo receptores de superficie celular, respuesta mitocondrial al estrés y células T citotóxicas, que dan como resultado la activación de las vías de señalización apoptóticas.

60 Las caspasas implicadas en la apoptosis transportan la señal apoptótica en una cascada proteolítica, con caspasas que escinden y activan otras caspasas que, a continuación, degradan otros objetivos celulares que conducen a la muerte celular. Las caspasas en el extremo superior de la cascada incluyen la caspasa-8 y la caspasa-9. La caspasa-8 es la caspasa inicial implicada en la respuesta a receptores con un dominio de muerte (DD) como Fas.

65 Los receptores en la familia de receptores del TNF están asociados a la inducción de la apoptosis, así como a la señalización inflamatoria. El receptor Fas (CD95) media la señalización apoptótica mediante el ligando de Fas que

se expresa en la superficie de otras células. La interacción Fas-FasL desempeña un papel importante en el sistema inmunológico y la falta de este sistema conduce a la autoinmunidad, lo que indica que la apoptosis mediada por Fas elimina los linfocitos autorreactivos. La señalización de Fas también está implicada en la vigilancia inmunológica para eliminar las células transformadas y las células infectadas con virus. La unión de Fas al FasL oligomerizado en otra célula activa la señalización apoptótica a través de un dominio citoplásmico denominado dominio de muerte (DD) que interacciona con los adaptadores de señalización, incluyendo FAF, FADD y DAX, para activar la cascada proteolítica de la caspasa. La caspasa-8 y la caspasa-10 primero se activan para, después, escindir y activar las caspasas aguas abajo y diversos sustratos celulares que conducen a la muerte celular.

Las mitocondrias participan en las vías de señalización apoptóticas a través de la liberación de proteínas mitocondriales en el citoplasma. El citocromo c, una proteína clave en el transporte de electrones, se libera de las mitocondrias en respuesta a las señales apoptóticas y activa la Apaf-1, una proteasa liberada por las mitocondrias. La Apaf-1 activada activa la caspasa-9 y el resto de la vía de la caspasa. Smac/DIABLO se libera de las mitocondrias e inhibe las proteínas IAP que normalmente interaccionan con la caspasa-9 para inhibir la apoptosis. La regulación de la apoptosis por las proteínas de la familia Bcl-2 se produce cuando los miembros de la familia forman complejos que entran en la membrana mitocondrial, regulando la liberación del citocromo c y otras proteínas. Los receptores de la familia TNF que producen apoptosis activan directamente la cascada de las caspasas, pero también pueden activar la Bid, un miembro de la familia Bcl-2, que activa la apoptosis mediada por mitocondrias. Bax, otro miembro de la familia Bcl-2, es activado por esta vía para localizar la membrana mitocondrial y aumentar su permeabilidad, liberando el citocromo c y otras proteínas mitocondriales. Bcl-2 y Bcl-xL previenen la formación de poros, bloqueando la apoptosis. Al igual que el citocromo c, el AIF (factor inductor de la apoptosis) es una proteína que se encuentra en las mitocondrias que liberan las mitocondrias mediante estímulos apoptóticos. Mientras que el citocromo C está ligado a la señalización apoptótica dependiente de caspasa, la liberación de AIF estimula la apoptosis independiente de la caspasa, moviéndose hacia el núcleo donde se une al ADN. La unión del ADN por el AIF estimula la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, quizás mediante el reclutamiento de nucleasas.

La vía del estrés mitocondrial comienza con la liberación del citocromo c desde las mitocondrias, que, después, interacciona con la Apaf-1, causando la autoescisión y la activación de la caspasa-9. Las caspasas 3, 6 y 7 son caspasas aguas abajo que son activadas por las proteasas aguas arriba y actúan ellas mismas para escindir las dianas celulares.

La granzima B y las proteínas perforinas liberadas por células T citotóxicas inducen apoptosis en las células diana, formando poros transmembrana y desencadenando apoptosis, quizás a través de la escisión de las caspasas, aunque se han sugerido mecanismos independientes de caspasa de la apoptosis mediada por la granzima B.

La fragmentación del genoma nuclear por múltiples nucleasas activadas por vías de señalización apoptóticas para crear una escalera nucleosómica es una respuesta celular característica de la apoptosis. Una nucleasa implicada en la apoptosis es el factor de fragmentación del ADN (DFF), una ADNasa activada por caspasa (CAD). El DFF/CAD se activa a través de la escisión de su inhibidor asociado ICAD por caspasas proteasas durante la apoptosis. DFF/CAD interacciona con componentes de la cromatina, tales como la topoisomerasa II y la histona H1, para condensar la estructura de la cromatina y tal vez reclutar CAD para la cromatina. Otra proteasa activada por apoptosis es la endonucleasa G (EndoG). La EndoG está codificada en el genoma nuclear pero se localiza en las mitocondrias de las células normales. La EndoG puede desempeñar un papel en la replicación del genoma mitocondrial, así como en la apoptosis. La señalización apoptótica provoca la liberación de EndoG desde las mitocondrias. Las vías de EndoG y DFF/CAD son independientes, ya que la vía de la EndoG todavía se produce en células que carecen de DFF.

La hipoxia, así como la hipoxia seguida de la reoxigenación pueden desencadenar la liberación del citocromo c y la apoptosis. La glucógeno sintasa quinasa (GSK-3), una serina-treonina quinasa que expresa de forma ubicua en la mayoría de los tipos de células, parece mediar o potenciar la apoptosis debido a muchos estímulos que activan la vía de la muerte celular mitocondrial. Loberg, RD, et al., J. Biol. Chem. 277 (44): 41667-673 (2002). Se ha demostrado que induce la activación de la caspasa 3 y activa el gen supresor tumoral proapoptótico p53. También se ha sugerido que la GSK-3 estimula la activación y translocación del miembro de la familia Bap-2 proapoptótico, Bax, que, tras la agregación y la localización mitocondrial, induce la liberación del citocromo c. Akt es un regulador crítico de la GSK-3 y la fosforilación y la inactivación de la GSK-3 puede mediar algunos de los efectos antiapoptóticos de Akt.

El término "biomarcador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un indicador medido de forma objetiva del riesgo de enfermedad, los procesos patobiológicos subyacentes, el diagnóstico y la etapa de la enfermedad, el pronóstico, la respuesta al tratamiento, la recurrencia y los resultados clínicos. Un biomarcador puede tomar la forma de un gen, variaciones genéticas, proteínas de ARN y metabolitos. Los biomarcadores que reflejan de manera fiable o predicen la progresión o mejoría de una enfermedad pueden ayudar en el diagnóstico de la enfermedad y la evaluación de la gravedad de la enfermedad, el riesgo de aparición y la progresión.

El término "c-kit" se refiere a una proteína en la 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.

La expresión "biomarcadores cardíacos" se refiere a enzimas, proteínas y hormonas asociadas con la función, el daño o fallo cardíacos que se utilizan con fines de diagnóstico y pronóstico. Diferentes biomarcadores cardíacos tienen diferentes momentos en que sus niveles se elevan, alcanzan el máximo y disminuyen dentro del cuerpo, lo que permite su utilización, no solo para seguir el progreso de un ataque al corazón, sino para estimar cuándo comenzó y para controlar la recurrencia. Algunas de las pruebas son específicas para el corazón, mientras que otras también se elevan con el daño del 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 el músculo esquelético y el cardíaco), troponina (los niveles sanguíneos de troponina I o T permanecerán altos 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, en particular el músculo cardíaco, ha sufrido daños) y BNP (péptido natriurético cerebral) o NT-proBNP (prohormona N-terminal del péptido natriurético cerebral (para ayudar a diagnosticar la insuficiencia cardíaca y el grado de gravedad de dicha insuficiencia cardíaca).

La expresión "cateterismo cardíaco" se refiere a un procedimiento donde un catéter se pasa 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 del ventrículo izquierdo, la cámara de bombeo principal del corazón, que puede usarse para medir presiones en la arteria pulmonar y para controlar la función cardíaca.

El término "catecolamina" se refiere a cualquiera de una clase de aminas que poseen un anillo de catecol ($C_6H_4(OH)_2$). Ejemplos no limitantes de catecolaminas incluyen dopamina, adrenalina y norepinefrina (noradrenalina).

El grupo de diferenciación (grupo de designación) (a menudo abreviado como CD) es un protocolo utilizado para la identificación e investigación de las moléculas de superficie celular presentes en los glóbulos blancos. Las moléculas de CD pueden actuar de numerosas maneras, actuando a menudo como receptores o ligandos (es decir, la molécula que activa un receptor) importantes para la célula. Normalmente se inicia una cascada de señales, alterando el comportamiento de la célula. Algunas proteínas CD no desempeñan un papel en la señalización celular, pero tienen otras funciones, tal como la adhesión celular.

La expresión "marcador de superficie celular", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico o epítipo que se encuentra en la superficie de un tipo específico de célula. Los marcadores de superficie celular pueden facilitar la caracterización de un tipo celular, su identificación y, en última instancia, su aislamiento.

La expresión "células CD34⁺", como se usa en el presente documento, se refiere a células progenitoras madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea humana que "son positivas para", es decir, "expresan", un antígeno de células madre hematopoyéticas, al menos una subpoblación de las que expresan CXCR4 y que pueden migrar a zonas de lesión.

El término "CD38" se refiere a un marcador de proteína presente en macrófagos, células dendríticas y células B y NK activadas, que pueden mediar en la adhesión 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.

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

El término "CXCR - 4", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un receptor de quimiocinas unido a proteína G.

El término "citocina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias proteínicas solubles pequeñas secretadas por células, que tienen diversos efectos sobre otras células. Las citocinas participan en muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo el crecimiento, el desarrollo, la cicatrización de heridas y la respuesta inmunitaria. Actúan uniéndose a sus receptores específicos de células situados en la membrana celular, lo que permite iniciar una cascada de transducción de señal distinta en la célula, que, en última instancia, conducirá a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células diana. En general, las citocinas actúan localmente. Incluyen citocinas de tipo I, que abarcan muchas de las interleucinas, así como varios factores de crecimiento hematopoyéticos; citocinas de tipo II, incluyendo los interferones y la interleucina-10; moléculas relacionadas con el factor de necrosis tumoral (TNF), incluyendo el TNF α y linfoxina; miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, incluyendo interleucina 1 ("IL-1"); y las quimiocinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel crítico en una amplia variedad de funciones inmunitarias e inflamatorias. La misma citocina puede tener diferentes efectos sobre una célula dependiendo del estado de la célula. Las citocinas a menudo regulan la expresión de, y desencadenan cascadas de, otras citocinas.

La expresión "factor estimulante de colonias" se refiere a una citocina responsable de controlar la producción de glóbulos blancos. Los tipos incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF).

5 El término "diacilglicerol" (DAG) se refiere a un glicérido que consiste en dos cadenas de ácidos grasos unidas covalentemente a una molécula de glicerol a través de enlaces éster. Los diacilgliceroles también pueden tener muchas combinaciones diferentes de ácidos grasos unidos a ambas posiciones C1 y C2.

10 El término "endotelina" se refiere a un péptido vasoconstrictor que es sintetizado y liberado por el endotelio vascular y que es un marcador de la función endotelial.

15 Los términos "formulación" y "composición" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un producto de la invención y la divulgación descritas que comprende todos los ingredientes activos e inertes. El término activo se refiere al ingrediente, componente o componente de las composiciones de la invención y la divulgación descritas responsable del efecto terapéutico pretendido. Las expresiones "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica", tal como se usan en el presente documento, 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.

20 El término proteína "Gq" se refiere a una subunidad de proteína G heterotrimérica que activa la fosfolipasa C y participa en una diversidad de vías de señalización celular.

25 La expresión "célula madre hematopoyética" se refiere a una célula aislada de sangre o de médula ósea que puede renovarse a sí misma, diferenciarse en diversas células especializadas, moverse fuera de la médula ósea hacia la sangre circulante y sufrir muerte celular programada (apoptosis). En algunas realizaciones de la invención y la divulgación descritas, las células madre hematopoyéticas derivadas de sujetos humanos expresan al menos un tipo de marcador de superficie celular, incluyendo, pero sin limitaciones, CD34, CD38, HLA-DR, c-kit, CD59, Sca-1, Thy-1 y/o CXCR-4, o una combinación de los mismos.

30 "HLA-DR" se refiere a un antígeno de histocompatibilidad de clase II humano presente en varios tipos de células, incluyendo las células presentadoras de antígenos, células B, monocitos, macrófagos y células T activadas.

35 La expresión "factor de crecimiento similar a la insulina 1" (IGF-1) se refiere a una proteína similar a la insulina en función y estructura que es un miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación del crecimiento y el desarrollo.

40 El término "aislar" y sus diversas formas gramaticales tal como se usan en el presente documento se refiere a la colocación, separación u obtención de una proteína, molécula, sustancia, ácido nucleico, péptido, célula o partícula, en una forma esencialmente libre de contaminantes u otros materiales con los cuales está habitualmente asociado.

El término "interleucina" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una citocina secretada por glóbulos blancos como medio de comunicación con otros glóbulos blancos.

45 Los términos "VEGF", "VEGF-1" o "factor de crecimiento endotelial vascular-1" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una citocina que media numerosas funciones de células endoteliales incluyendo proliferación, migración, invasión, supervivencia y permeabilidad. El término "VEGF-2" se refiere a un regulador para el crecimiento de células endoteliales vasculares y de músculo liso. El VEGF-2 estimula el crecimiento de células endoteliales vasculares humanas, pero inhibe el crecimiento de células de músculo liso aórtico humano inducido por el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

50 El término "quimocina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una clase de citocinas quimiotácticas que señalan a los leucocitos para moverse en una dirección específica.

55 Los términos "quimiotaxis" o "quimiotáctico/a" se refieren al movimiento dirigido de una célula o parte móvil a lo largo de un gradiente de concentración química hacia condiciones ambientales que considera atractivas y/o alejadas del entorno que encuentra repelente. Las células CD34⁺ CXCR-4⁺ potentes de la invención descrita pueden migrar, lo que significa que pueden moverse de un lugar, ubicación o zona a otro. Su migración está impulsada por la actividad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4.

60 La expresión "hemograma completo" (CBC) se refiere a una prueba de laboratorio que proporciona información detallada sobre la cantidad y la calidad de cada uno de los tipos de células sanguíneas. Por lo general, incluye una determinación de cada una de las tres principales células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) y una determinación 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 normales de hemoglobina en sujetos humanos adultos sanos son de aproximadamente 14 g/dl a aproximadamente 18 g/dl para varones y de aproximadamente 12 g/dl a aproximadamente 16 g/dl para las mujeres. Como norma general, la hemoglobina generalmente debe ser

aproximadamente un tercio del hematocrito. "Hematocrito" (HCT) se refiere a la proporción de glóbulos rojos como un porcentaje de la volemia total. Un hematocrito normal para sujetos humanos es del 40 % al 55 % para varones y del 35 % a aproximadamente el 45 % para mujeres. "Recuento de glóbulos rojos" (RBC) se refiere al número total de glóbulos rojos en una cantidad de sangre. Los intervalos normales en sujetos humanos son aproximadamente 4,5 millones de células/mm³ a aproximadamente 6,0 millones de células/mm³ para varones y de aproximadamente 4,0 millones de células/mm³ a aproximadamente 5,5 millones de células/mm³ para mujeres. "Recuento de glóbulos blancos" (WBC) se refiere al número total de glóbulos blancos o leucocitos en una cantidad de sangre. Los intervalos normales en sujetos humanos son de aproximadamente $4,3 \times 10^3$ células/mm³ a aproximadamente $10,8 \times 10^3$ células/mm³.

El término "enfermedad" o "trastorno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un deterioro de la salud o una afección de funcionamiento anormal. El término "síndrome", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de alguna enfermedad o afección. El término "afección", tal como se usa en el presente documento, se refiere a diversos estados de salud y se pretende que incluya trastornos o enfermedades causadas por cualquier mecanismo o trastorno subyacente, lesión y la estimulación de tejidos y órganos sanos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inflamación" se refiere a una respuesta a la infección y a la lesión donde las células implicadas en la destoxificación y la reparación se movilizan al sitio comprometido por mediadores inflamatorios.

Independientemente del agente iniciador, los cambios fisiológicos que acompañan a la inflamación aguda abarcan cuatro características principales: (1) vasodilatación, que da como resultado un aumento neto del flujo sanguíneo, 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, ensanchando las uniones intracelulares para producir huecos, lo que conduce a una mayor permeabilidad vascular, lo que permite la fuga de proteínas plasmáticas y células sanguíneas fuera de los vasos sanguíneos; (3) la inflamación se caracteriza a menudo por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, particularmente neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células estimulan el daño tisular liberando sustancias tóxicas en la pared vascular o en tejidos no dañados; y (4) fiebre, producida por pirógenos liberados de leucocitos en respuesta a estímulos específicos.

Durante el proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios solubles de la respuesta inflamatoria trabajan junto con componentes celulares de una manera sistémica en un intento de contener y eliminar los agentes que causan el sufrimiento físico. Los términos "inflamatorio" o "inmunoinflamatorio" tal como se usan en el presente documento con respecto a mediadores, se refiere a los mediadores moleculares del proceso inflamatorio. Estas moléculas solubles y difundibles actúan tanto localmente en el sitio del daño tisular e infección como en sitios más distantes. Algunos mediadores inflamatorios son activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros son sintetizados y/o liberados por fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o por otros mediadores inflamatorios solubles. Ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria incluyen, aunque no de forma limitativa, proteasas plasmáticas, complemento, cininas, proteínas coagulantes y fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor de activación de las plaquetas (PAF), péptidos y aminas, incluyendo, pero sin limitaciones, histamina, serotonina y neuropéptidos, y citocinas proinflamatorias, incluyendo, pero sin limitaciones, interleucina -1, interleucina -4, interleucina -6, interleucina-S, Factor de necrosis tumoral (TNF), interferón-gamma e interleucina12.

El término "en fecha" se refiere al intervalo de tiempo entre la finalización de la adquisición por parte del sujeto de una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34⁺ potentes en condiciones estériles y el inicio e la purificación en esterilidad de las células CD34⁺ potentes de la preparación. El término "fecha de salida" se refiere al intervalo de tiempo entre la finalización de la adquisición por parte del sujeto de una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34⁺ potentes en condiciones estériles y la infusión de la composición farmacéutica formulada que comprende un producto de células hematopoyéticas quimiotácticas en el sujeto.

Los términos "infundir" o "infusión" tal como se utilizan en el presente documento se refieren a la introducción de un fluido distinto de la sangre en un vaso sanguíneo de un sujeto, incluyendo seres humanos, con fines terapéuticos.

La "solución de infusión" de la divulgación sin suero contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 25 unidades/ml de heparina USP y 1 % de seroalbúmina humana (HSA). En algunas realizaciones, la solución de infusión se suplementa con suero. En algunas realizaciones, el suero es autólogo.

El término "lesión" se refiere al daño causado a la estructura o la función del cuerpo de un sujeto causado por un agente o fuerza, que puede ser físico o químico. El término "lesión vascular" se refiere a la lesión de la vasculatura (es decir, la red vascular, es decir, la red de vasos sanguíneos o conductos que transportan fluidos, tal como, sin limitaciones, sangre o linfa).

El término "límite" tal como se usa en el presente documento se refiere a restringir o limitar una extensión, grado o cantidad.

- El término "macrófago" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula mononuclear, activamente fagocítica, que se origina a partir de células madre monocíticas en la médula ósea. Estas células están ampliamente distribuidas en el cuerpo y varían en morfología y motilidad. La actividad fagocítica típicamente está mediada por factores de reconocimiento del suero, incluyendo ciertas inmunoglobulinas y componentes del sistema del complemento, pero también puede ser inespecífica. Los macrófagos también están implicados tanto en la producción de anticuerpos como en las respuestas inmunitarias mediadas por células, particularmente en la presentación de antígenos a los linfocitos. Secretan diversas moléculas inmunorreguladoras.
- Los términos "microbio" o "microorganismo" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un organismo demasiado pequeño como para que se pueda ver claramente a simple vista, incluyendo, pero sin limitaciones, bacterias microscópicas, hongos (mohos), algas, protozoos y virus.
- El término "modular" y sus diversas formas gramaticales tal como se usan en el presente documento significa regular, alterar, adaptar, manipular o ajustar una determinada medida o proporción. Tal modulación puede ser cualquier cambio, incluyendo un cambio indetectable.
- El término "infarto de miocardio" se refiere a la muerte o daño permanente al músculo cardíaco. La mayoría de los ataques al corazón son causados 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 cardíacas en esa zona. El músculo cardíaco dañado pierde su capacidad para contraerse, dejando al músculo cardíaco restante para compensar la zona debilitada. La divulgación incluye etapas relacionadas con la evaluación de la idoneidad de los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la invención descrita usando pruebas para observar el tamaño, la forma y la función del corazón mientras late, detectar cambios en el ritmo del corazón y detectar y evaluar los tejidos dañados y las arterias bloqueadas. Ejemplos de tales pruebas incluyen, aunque no de forma limitativa, electrocardiografía, ecocardiografía, angiografía coronaria y ventriculografía nuclear. También se usan biomarcadores cardíacos para evaluar la idoneidad de los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la invención descrita.
- El término "miostatina" (MSTN) se refiere a una proteína que es un miembro de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP) y la superfamilia de TNF-0. Este grupo de proteínas se caracteriza por un sitio de procesamiento proteolítico polibásico, que se escinde para producir una proteína madura que contiene siete residuos de cisteína conservados. Los miembros de esta familia son reguladores del crecimiento y la diferenciación celular tanto en tejidos embrionarios como en tejidos adultos.
- El término "neuropéptido Y" se refiere a un neuropéptido ampliamente expresado en el sistema nervioso central y que influye en muchos procesos fisiológicos, incluyendo la excitabilidad cortical, la respuesta al estrés, la ingesta de alimentos, los ritmos circadianos y la función cardiovascular. Funciona a través de receptores acoplados a proteínas G para inhibir la adenilil ciclasa, inhibir la proteína quinasa activada por mitógeno activada (MAPK), regular los niveles de calcio intracelular y activar los canales de potasio.
- El término "perfusión" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al proceso de suministro nutritivo de la sangre arterial a un lecho capilar en tejido biológico. La perfusión ("F") se puede calcular con la fórmula $F = ((P_A - P_V) / R)$, donde P_A es la presión arterial media, P_V es la presión venosa media y R es la resistencia vascular. La perfusión tisular puede medirse *in vivo*, mediante, por ejemplo, pero sin limitaciones, técnicas de formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Tales técnicas incluyen el uso de un agente de contraste inyectado y un marcaje de espín arterial (ASL) (donde la sangre arterial se marca magnéticamente antes de que entre en el tejido de interés y se mide la cantidad de marcaje y se compara con un registro de control).
- La expresión "factor de crecimiento placentario" (PIGF) se refiere a una citocina que es un miembro de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular.
- La expresión "éster de forbol" se refiere a un compuesto orgánico natural derivado de plantas que es un miembro de la familia de los diterpenos tigliana.
- Tal como se usa en el presente documento, el término "potente" o "potencia" se refiere a la actividad biológica necesaria del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita, es decir, las células CD34⁺ CXCR-4⁺ potentes de la invención descrita permanecen viables, son capaces de la movilidad quimiotáctica mediada por CXCR-4, y son capaces de crecer, es decir, de formar colonias hematopoyéticas en un ensayo de UFC *in vitro*.
- El término "prostaglandina" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de un grupo de sustancias fisiológicamente activas que son derivados del ácido prostanoico, una estructura de 20 carbonos, que es un ácido graso que contiene un anillo ciclopentano de 5 miembros.
- La expresión "célula progenitora" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una célula inmadura en la médula ósea que puede aislarse mediante el cultivo de suspensiones de células de médula en placas de cultivo con factores de crecimiento añadidos. Las células progenitoras maduran en células precursoras que maduran en células

sanguíneas. Las células progenitoras se denominan unidades formadoras de colonias (UFC) o células formadoras de colonias (CFC). El linaje específico de una célula progenitora está indicado por un sufijo, tal como, pero sin limitaciones, UFC-E (eritrocítico), UFC-GM (granulocítico/macrófago) y UFC-GEMM (progenitor hematopoyético pluripotente).

5 El término "reduce/n" o "reducir" cuando se usa en sus diversas formas gramaticales se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la disminución, estrechamiento o reducción a una extensión, tamaño, cantidad, grado o intensidad menor.

10 El término "reparación", tal como se usa en el presente documento como sustantivo se refiere a cualquier corrección, refuerzo, reacondicionamiento, remedio, compensación, convertir en robusto, renovación, arreglo, parcheo o similares que restaura la función. Cuando se usa como verbo, significa corregir, reforzar, reacondicionar, remediar, compensar, convertir en robusto, renovar, arreglar, reparar o restaurar de otro modo la función. En algunas realizaciones, la "reparación" incluye reparación completa y reparación parcial.

15 El término "salusina" se refiere a un péptido bioactivo de 28 aminoácidos (salusina- α) o 20 aminoácidos (salusina- β) que se traduce a partir de un ARNm de TOR2A, un gen que codifica una proteína de la familia de la distonía de torsión. Las salusinas aumentan el Ca^{2+} intracelular, regulan por aumento diversos genes e inducen la mitogénesis celular.

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

25 La expresión "células madre" se refiere a células indiferenciadas que tienen un alto potencial proliferativo con la capacidad de autorrenovación que puede generar células hijas que pueden experimentar diferenciación terminal en más de un fenotipo celular distinto.

30 La expresión "endoprótesis vascular" se usa para referirse a un pequeño tubo utilizado para abrir una arteria. La endoprótesis vascular se pliega hasta alcanzar un diámetro pequeño, se coloca sobre un catéter de balón, se inserta a través de una arteria principal en la ingle (arteria femoral) o el brazo (arteria braquial) y se hace avanzar hasta la sección estrechada/bloqueada de la arteria. Cuando alcanza la ubicación correcta, el balón se infla ligeramente para empujar cualquier placa y para expandir la arteria (angioplastia con balón). Cuando el balón se infla, la endoprótesis vascular se expande, se coloca en su lugar y forma un andamio para mantener la arteria abierta. La endoprótesis vascular permanece en la arteria de forma permanente. En ciertos sujetos, una endoprótesis vascular reduce el reestrechamiento que se produce después de la angioplastia con balón o de otros procedimientos que utilizan catéteres. Una endoprótesis vascular también puede ayudar a restablecer el flujo sanguíneo normal y mantener una arteria abierta si se ha roto o dañado debido al catéter con balón. La reoclusión (reestenosis) puede ser un problema con el procedimiento de la endoprótesis vascular. Las endoprótesis vasculares que liberan fármacos están revestidas con fármacos que se liberan lentamente. Estos fármacos pueden ayudar a evitar la reoclusión del vaso sanguíneo.

40 Los términos "sujeto" y "pacientes" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen especies animales de origen de mamífero, incluyendo seres humanos.

45 El término "sujeto susceptible" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un miembro de una población en riesgo.

50 El término "tiazolidindionas" (TZD) se refiere a una clase de compuestos que se unen a receptores activados por proliferador del peroxisoma (PPAR), un grupo de moléculas receptoras dentro del núcleo celular. Los miembros de esta clase de compuestos son derivados del compuesto parental tiazolidindiona e incluyen rosiglitazona, pioglitazona y troglitazona.

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

60 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "que trata" se usan indistintamente para incluir anular (suprimir, eliminar), 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, proteger frente a estímulos nocivos, así como para lograr uno o más de los siguientes: (a) reducir la gravedad de un trastorno, enfermedad o afección; (b) limitar el desarrollo de síntomas característicos del trastorno, enfermedad o afección que se esté tratando; (c) limitar el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno, enfermedad o afección que se esté tratando; (d) limitar la recurrencia del trastorno, enfermedad o afección en pacientes que han sufrido previamente el trastorno, enfermedad o afección; y

65 (e) limitar la recurrencia de los síntomas en pacientes que eran previamente asintomáticos para el trastorno, enfermedad o afección.

La expresión "inductor débil de la apoptosis similar al factor de necrosis tumoral" (TWEAK) se refiere a un miembro de la familia del factor de crecimiento TNF- α que se produce como una proteína transmembrana de tipo II y se procesa en la citocina soluble de 156 aminoácidos. (Chicheportiche, Y. et al., J Biol. Chem. 272: 32401-410 (1997)). TWEAK tiene múltiples actividades biológicas, incluyendo la estimulación del crecimiento celular y la angiogénesis, la inducción de citocinas inflamatorias y en algunas condiciones experimentales, la estimulación de la apoptosis, (Wiley, S.R., et al. Cytokine Growth Factor Rev. 14(3-4):241-9, 2003) y es un regulador positivo de la proliferación de cardiomiocitos (Novoyatieva, T., et al. Cardiovas. Res. 2009 Nov. 26, PMID:19887380). TWEAK media en estos procesos a través del receptor de la molécula 14 inducible por el factor de crecimiento de fibroblastos (FN14) (véase Harada, N. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 299: 488-93 (2002); Nakayama, M et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 306: 819-825 (2003), un receptor estrechamente regulado e inducible que se ha sugerido que señala a través de diversas cascadas de señalización aguas abajo. (Ando, T., et al., Arthritis Res. Ther. 8: R146 (2006); Brown, S.A., et al., Biochem. J. 371: 395-403 (2003); Saitoh, T. et al., J. Biol. Chem. 278: 36005-36012 (2003); Dogra, C. et al., FASEB J. 21: 1857-69 (2007)).

15 La expresión "insuficiencia vascular" se refiere a un flujo sanguíneo insuficiente.

Tal como se detalla específicamente en las reivindicaciones adjuntas, la invención descrita proporciona composiciones farmacéuticas de mejora de la perfusión de una zona de infarto para su uso en el tratamiento y reparación de una lesión en la zona de un infarto que comprende el remodelado ventricular adverso posteriormente a un infarto agudo de miocardio (IAM) resultante de un proceso de enfermedad natural en un sujeto revascularizado. La divulgación del presente documento proporciona aspectos y realizaciones relacionados.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una lesión de la zona del infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural, que comprende: (a) una cantidad de mejora de la zona del infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles, donde la cantidad que mejora de la zona de infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles comprende una población enriquecida de al menos 10×10^6 células CD34⁺ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (b) una cantidad estabilizante de suero, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), y (c) una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos, donde la composición se administra al sujeto por vía parenteral a través de un catéter; y donde al menos el 70 % de las células en la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad migratoria mediada por CXCR-4, cuando se pasan a través del catéter y cuando se prueban *in vitro*, son células CD34⁺, y donde la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 cuando se pasa a través el catéter y ensayado *in vitro*, (1) retiene la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, el agente que estimula el crecimiento de cardiomiocitos se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico. De acuerdo con otra realización, el al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos es el agonista del receptor de tirosina quinasa neuregulina 1. Los agentes activos compatibles adicionales que estimulan el crecimiento de cardiomiocitos incluyen, pero sin limitaciones, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PlGF), catecolaminas, tal como, pero sin limitaciones, norepinefrina, endotelina -1, una prostaglandina F_{2 α} , angiotensina II, ésteres de forbol, neuropéptido Y, factor de crecimiento transformante activo β 1 (TGF- β), proteína Gq, diacilglicerol (DAG), salusina- α , salusina- β , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), miostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), inductor débil de apoptosis débil similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK), tiazolidindionas, tal como, pero sin limitaciones, rosiglitazona y variantes o derivados recombinantes de los mismos.

De acuerdo con una realización, la composición reduce la lesión de la zona del infarto más que los componentes de la composición (a) más (b) o el componente (c) solo. En algunas realizaciones, la composición mejora el flujo sanguíneo microvascular en la zona del infarto, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende la pérdida de cardiomiocitos apoptóticos en la zona del infarto, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende remodelado ventricular medido por un descenso de la FEVI o un aumento del VTSVI. En algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende una disminución progresiva de la función del músculo cardíaco después de un IAM. En algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende hipoperfusión del miocardio en la zona límite del periinfarto, en relación con los controles. En algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende hibernación del miocardio en la zona límite del periinfarto, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la composición aumenta la perfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la composición aumenta la perfusión en el

miocardio en hibernación en al menos una zona periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la composición disminuye el área de infarto, cuando se compara con los controles. En algunas realizaciones, la composición disminuye la masa del infarto, cuando se compara con los controles.

5 De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se purifica de los componentes celulares de un aspirado de médula ósea adquirido del sujeto. De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se purifica a partir de sangre periférica. De acuerdo con una realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro* y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos aproximadamente 48 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con una realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos aproximadamente 72 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con una realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a).

25 De acuerdo con una realización, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se prepara aislando o purificando la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la médula ósea cosechada del sujeto. De acuerdo con otra realización, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se prepara aislando o purificando la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de sangre periférica.

35 De acuerdo con la invención y la divulgación descritas, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 70 % de células CD34⁺ puras. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 75 % de células CD34⁺ puras. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 80 % de células CD34⁺ puras. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 85 % de células CD34⁺ puras. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 90 % de células CD34⁺ puras. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas enriquecido para células CD34⁺ contiene al menos aproximadamente 95 % de células CD34⁺ puras.

45 En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 75 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 80 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 85 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 95 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺.

60 En otra realización, al menos aproximadamente el 70 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos aproximadamente 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 75 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos aproximadamente 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 80 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 85 % de las células CD34⁺ son viables durante al menos 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90 % de las

potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto comprende además al menos aproximadamente 40 millones de células CD34⁺ adquiridas del sujeto y que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra

5 realización, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto comprende además al menos aproximadamente 45 millones de células CD34⁺ adquiridas del sujeto y que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto comprende además al menos

10 aproximadamente 50 millones de células CD34⁺ adquiridas del sujeto y que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto comprende además al menos

15 aproximadamente 55 millones de células CD34⁺ adquiridas del sujeto y que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. De acuerdo con otra realización, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto comprende además al menos

aproximadamente 60 millones de células CD34⁺ adquiridas del sujeto y que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

Las células CD34⁺ pueden enriquecerse/seleccionarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población de células de médula ósea que comprenden células CD34⁺ se enriquece para células que expresan el antígeno celular CD34 y el antígeno celular CXCR4 mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En algunas realizaciones, las células CD34⁺ en la médula ósea se enriquecen/seleccionan mediante técnicas de inmunoseparación positiva o negativa. En algunas realizaciones, el aislamiento y/o purificación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se basan en métodos de fraccionamiento celular basados en el tamaño y la densidad celular, la salida de colorantes metabólicos

20 o la resistencia a agentes citotóxicos. En una realización, por ejemplo, las células CD34⁺ en la médula ósea se enriquecen/seleccionan usando anticuerpo monoclonal anti-CD34 y una técnica de separación inmunomagnética.

Las células CD34⁺ seleccionadas se pueden identificar, cuantificar y caracterizar mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el porcentaje de células CD34⁺ en la médula ósea y en el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas puede determinarse mediante análisis FACS. En otra realización, la expresión de la proteína CD34 se cuantifica mediante transferencia Western. La expresión "transferencia Western" se refiere a un método para identificar proteínas en una mezcla compleja; las proteínas se separan electroforéticamente en un medio de gel; se transfieren desde el gel a una lámina o membrana de unión a proteínas; y la lámina o membrana que contiene las proteínas separadas expuestas a anticuerpos específicos que se unen, localizan y permiten la visualización de la(s) proteína(s) de interés. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo monoclonal anti-CD34 para detectar la proteína CD34 adherida a una membrana *in situ*.

30

35

En otra realización, se puede cuantificar la expresión de ARNm y ADN de CD34 en las células CD34⁺ aisladas. La expresión "transferencia Northern" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una técnica donde el ARN de una muestra se separa en sus partes componentes en un gel mediante electroforesis y se transfiere a un soporte de papel específicamente modificado para que el ARNm se fije en sus posiciones electroforéticas. Las secuencias relacionadas con CD34 se identifican usando sondas que comprenden una molécula indicadora, tal como, sin limitaciones, un marcador radioactivo. En otra realización, el nivel de expresión de CD34 y/o CXCR4 se determina mediante técnicas de PCR cuantitativa o semicuantitativa 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 de este modo que el ADN sea más fácil de aislar, clonar y secuenciar. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 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 simultáneas del ADN, de modo que el ADN se amplifica específicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y después de cada ronda de amplificación, se cuantifica el

40

45

50

Las células madre hematopoyéticas CD34⁺ seleccionadas del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita contienen una subpoblación de células CD34⁺ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4. El producto de células madre hematopoyéticas de la invención descrita comprende un número mínimo de células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas, de forma 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.

55

En otra realización, al menos aproximadamente el 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34⁺CXCR-4⁺ se retiene durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 3 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34⁺CXCR-4⁺ se retiene durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 4 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34⁺CXCR-4⁺ se retiene durante al menos 24 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺. En otra realización, al menos aproximadamente el 5 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de las células CD34⁺CXCR-4⁺ se retiene durante al menos 24

60

65

En algunas realizaciones, la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto puede formularse con un excipiente, transportador o vehículo, incluyendo, pero sin limitaciones, un disolvente. Los términos "excipiente", "transportador" o "vehículo" tal como se usan en el presente documento se refiere a materiales transportadores adecuados para la formulación y administración del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descrito en el presente documento. Los transportadores y vehículos útiles en el presente documento incluyen cualquiera de estos materiales conocidos en la materia que sea no tóxico y que no interaccione con otros componentes. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier transportador sustancialmente no tóxico utilizable para la formulación y administración de la composición de la invención descrita donde el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita permanecerá estable y biodisponible.

El transportador farmacéuticamente aceptable debe tener una pureza suficientemente alta y una toxicidad suficientemente baja para que sea adecuado para la administración al mamífero que se está tratando. Además, debe mantener la estabilidad y biodisponibilidad de un agente activo. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la forma de administración planificada, para proporcionar el volumen, la consistencia etc. deseados, cuando se combina con un agente activo y otros componentes de una composición dada. Por ejemplo, el transportador farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitaciones, un agente aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.), una carga (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato cálcico, etilcelulosa, poliacrilatos, hidrógenofosfato cálcico, etc.), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.), un disgregante (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.) o un agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato sódico, etc.). Otros transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones de la invención descrita incluyen, pero sin limitaciones, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares. Tales soluciones transportadoras también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una solución o líquido cuya composición química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Ejemplos de tampones previstos por la invención descrita incluyen, pero sin limitaciones, solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, 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 los tejidos sujeto. En algunas realizaciones, la solución de infusión es hipertónica con los tejidos sujeto. Las composiciones de la invención descrita que son para administración parenteral pueden incluir transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como soluciones acuosas estériles, soluciones no acuosas en disolventes habituales tales como alcoholes, o soluciones en una base de aceite líquido.

En algunas realizaciones, el transportador de la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto de la invención descrita puede incluir un agente de liberación, tal como un transportador de liberación sostenida o de liberación retardada. En dichas realizaciones, el transportador puede ser cualquier material capaz de liberación sostenida o retardada del principio activo para proporcionar una administración más eficiente, por ejemplo, dando como resultado una dosificación menos frecuente y/o disminuida de la composición, mejorar la facilidad de manipulación y extender o retrasar los efectos sobre enfermedades, trastornos, afecciones, síndromes y similares que se estén tratando, previniendo o estimulando. Ejemplos no limitantes de tales transportadores incluyen liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas de polímeros naturales y sintéticos, y similares. Los liposomas pueden formarse a partir de diversos fosfolípidos tales como colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

Las composiciones mejoradoras de la perfusión de la zona del infarto de la invención descrita pueden administrarse por vía parenteral en forma de una suspensión estéril inyectable acuosa u oleaginosas. El término "parenteral" o "por vía parenteral" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la introducción en el cuerpo por medio de una inyección (es decir, administración mediante inyección), incluyendo, pero sin limitaciones, técnicas de infusión. La composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto de la invención descrita que comprende un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se administra al sujeto por medio de un catéter de balón adaptado para la administración de las composiciones fluidas (es decir, composiciones capaces de fluir) en una estructura anatómica seleccionada.

La composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto estéril de la invención descrita puede ser una solución o suspensión estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable. Una solución se considera generalmente como una mezcla homogénea de dos o más sustancias; es, con frecuencia, aunque no necesariamente, un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) se distribuyen uniformemente entre las del disolvente. Una suspensión es una dispersión (mezcla) donde 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 frecuentes son las de los sólidos en agua líquida. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se incluyen agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico (salina). En algunas realizaciones, se usan soluciones hipertónicas. Además, normalmente se usan aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en soluciones, preferentemente soluciones oleaginosas 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 adicionales mejoradoras de la perfusión de la zona del infarto de la invención descrita pueden prepararse fácilmente usando tecnología, que es conocida en la materia, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª o 19ª ediciones, publicado por Mack Publishing Company of Easton, Pa.

Como se usa en el presente documento, los términos "terapéuticamente eficaz", "cantidad mejoradora de la zona del infarto", "cantidad mejoradora de la zona del infarto", "cantidad mejoradora de la perfusión" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de las composiciones de la invención que dan como resultado un efecto terapéutico o beneficioso tras su administración a un sujeto. El efector mejorador de la zona del infarto, mejorador de la zona del infarto, mejorador de la perfusión o terapéutico o farmacéutico puede curar, minimizar, prevenir o mejorar una enfermedad o trastorno, o pueden tener cualquier otro efecto mejorador de la zona del infarto, mejorador de la zona del infarto, mejorador de la perfusión, terapéutico o farmacéutico beneficioso. La concentración de la sustancia se selecciona de manera que ejerza su efecto mejorador de la zona del infarto, mejorador de la zona del infarto, mejorador de la perfusión, terapéutico o farmacéutico, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios significativos dentro del alcance y buen juicio del médico. La cantidad eficaz de la composición puede variar con la edad y el estado físico del sujeto biológico que se está tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza del tratamiento concurrente, el momento de la infusión, el compuesto específico, la composición u otro principio activo empleado, el transportador concreto utilizado, y factores similares.

Un experto en la materia puede determinar una cantidad farmacéuticamente eficaz de las composiciones de la invención determinando la dosis en una unidad de dosificación (es decir, la unidad de uso) que provoca una intensidad de efecto dada, denominada en lo sucesivo "dosis unitaria". La expresión "relación dosis-intensidad" se refiere a la manera en que la intensidad del efecto en un receptor individual se relaciona con la dosis. La intensidad de efecto generalmente designada es el 50 % de intensidad máxima. La dosis correspondiente se denomina dosis eficaz del 50 % o DE₅₀ individual. El uso del término "individual" distingue la DE₅₀ basada en la intensidad de efecto tal como se utiliza en el presente documento a partir de la mediana de la dosis eficaz, también abreviada DE₅₀, determinada a partir de la frecuencia de los datos de respuesta en una población. "Eficacia" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la propiedad de las composiciones de la invención descrita para conseguir la respuesta deseada, y "eficacia máxima" se refiere al efecto máximo alcanzable. La cantidad de producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas en las composiciones farmacéuticas de la invención descrita que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. (Véase, por ejemplo, Goodman y Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel G. Harman, Lee E. Limbird, Eds.; McGraw Hill, Nueva 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 se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada sujeto. Se prevé que los sujetos puedan beneficiarse de múltiples administraciones de la composición farmacéutica de la invención descrita.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención descrita contienen al menos 10×10^6 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 administración parenteral a discreción del médico.

En otro aspecto de la invención descrita, las composiciones farmacéuticas mejoradoras de la perfusión de la zona del infarto de la invención descrita pueden incluir adicionalmente uno o más principios activos compatibles, que están destinados a proporcionar la composición mejoradora de la perfusión de la zona del infarto con otro efecto farmacéutico además del proporcionado por el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas de la invención descrita. "Compatible", tal como se usa en el presente documento, significa que los principios activos de dicha composición son capaces de combinarse entre sí de tal manera que no haya interacción que reduzca sustancialmente la eficacia de cada principio activo o composición en condiciones normales de uso. En algunas realizaciones, el tratamiento de combinación comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica mejoradora de la perfusión de la zona de infarto que comprende un producto de célula madre hematopoyética quimiotáctica de la invención descrita combinado con un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, Un agente vasoactivo o inotrópico, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico.

En algunas realizaciones, el agonista del receptor tirosina quinasa es neuregulina 1. La neuregulina 1 (NRG1) es un agonista de las tirosina quinasa receptores 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 Erb4 aumenta su actividad quinasa y conduce a heterodimerización con erbB2 u homodimerización con ErbB4 y a la estimulación de vías de transducción de señales intracelulares. Id. Las subunidades del receptor de NFRG1 ErbB2 y

ErbB4 también se expresan en los cardiomiocitos diferenciados. Id. Recientemente se ha demostrado en ratones que la NRG1 induce la proliferación de cardiomiocitos mononucleados diferenciados *in vivo* a través de la inducción de cardiomiocitos diferenciados para dejar quiescencia proliferativa. Bersell, et al (Bersell, K. et al., Cell 138: 257-70 (2009). Las células madre y progenitoras no diferenciadas no contribuyeron a esta proliferación. (Id). Usando un modelo de ratón donde se ligó de forma permanente la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) de ratones de dos meses de edad y, una semana más tarde, se administró NAG1 a diario durante 12 semanas, se demostró que la administración de NRG1 durante 12 semanas daba lugar a una mejora sostenida de la función miocárdica, determinada por la fracción de expulsión, una reducción del tamaño de la cicatriz del infarto y atenuación de la hipertrofia cardiomiocítica. (Id).

Después de un infarto agudo de miocardio, además de la muerte celular necrótica como consecuencia de la isquemia, la muerte celular apoptótica en curso y la hibernación de los cardiomiocitos llevan colectivamente a una disminución de la función cardíaca que puede empeorar con el tiempo y, en última instancia, causar acontecimientos cardíacos adversos importantes. Una vez perdidos, los cardiomiocitos no pueden regenerarse significativamente para restaurar la función cardíaca. La datación con carbono 14 de los cardiomiocitos muestra que la capacidad regenerativa del músculo cardíaco es inferior al 1 % anual (Bergman O. Science. 2009; 324:98-101).

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

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

de la invención descrita es de aproximadamente el 1 % expresada como ml/100 cc de volumen de la composición. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina humana. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina humana recombinante.

5 Métodos de la divulgación

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar una composición farmacéutica mejoradora de la perfusión de la zona del infarto que comprende un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas para tratar a un sujeto que lo necesite. El método comprende las etapas de

- 10 (1) adquirir una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34⁺ potentes del sujeto en condiciones estériles mediante un proceso de adquisición de células quimiotácticas;
- (2) purificar en esterilidad las células CD34⁺ potentes que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 a partir de la preparación;
- 15 (3) formular en esterilidad las células CD34⁺ potentes para formar el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas;
- (4) formular en esterilidad el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que contiene una subpoblación de células CD34⁺CXCR-4⁺ potentes que tienen actividad quimiotáctica para formar una composición farmacéutica;
- 20 (5) evaluar la esterilidad de la composición farmacéutica;
- (6) liberar la composición farmacéutica estéril como elegible para la infusión en el sujeto;
- (7) cargar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica en un aparato de administración;
- y
- 25 (8) transportar opcionalmente el aparato de administración que contiene la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica estéril que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas a una instalación de cateterismo cardíaco para infusión en el sujeto.

En una realización, la etapa (2) se inicia en un plazo de aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 24 horas de la finalización de la etapa de adquisición (1). En otra realización, la etapa de liberación (7) solo progresa si el producto celular formulado estéril ha de infundirse en el sujeto en un plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1). En otra realización, la etapa (2) se inicia en un plazo de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 24 horas de la finalización de la etapa de adquisición (1) y la etapa de liberación (6) solo progresa si el producto celular formulado estéril ha de infundirse en el sujeto en un plazo de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la etapa de adquisición (1).

En una realización, la etapa 5, es decir, la etapa de evaluar la esterilidad de la composición farmacéutica, comprende además las etapas de (i) centrifugar el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas 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) eliminar en esterilidad el sobrenadante sin perturbar el sedimento celular; y (iii) analizar si el sobrenadante está contaminado por un microbio determinando con ello la esterilidad del sedimento celular sin agotar su contenido celular.

En una realización, en la etapa (a), el proceso de adquisición de células quimiotácticas es una técnica de recogida de médula ósea mini usada para adquirir una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34⁺ potentes de la médula ósea del sujeto en condiciones estériles. Para la técnica de cosecha de médula ósea, la etapa (a) del método comprende además las etapas: (i) precargar jeringas de recolección con heparina antes de recoger médula ósea de un sujeto; (ii) aspirar la médula ósea de una cresta ilíaca posterior izquierda y una cresta ilíaca posterior derecha del sujeto usando las jeringas de recolección y una técnica de recogida de médula ósea mini para formar la médula ósea cosechada; e (iii) infundir la médula ósea cosechada en una bolsa colectora. En una realización, las jeringas de recolección en la etapa (i) y la bolsa colectora en 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, en una realización del método, la médula ósea cosechada se transporta a una planta de procesamiento diferente de la instalación desde la cual se cosechó la médula ósea. En una realización, el método para transportar la médula ósea cosechada a la planta de procesamiento comprende las etapas (a) colocar la médula ósea cosechada en una bolsa colectora; (b) colocar la bolsa colectora en una bolsa secundaria; (c) colocar la bolsa secundaria que contiene la bolsa colectora en un recipiente para envío que comprende un compartimento interior que contiene hielo húmedo congelado y al menos una hoja de papel de embalaje de burbujas; (d) fijar un monitor marcador de la temperatura al compartimento interior del recipiente para envío; (e) sellar el recipiente para envío; y (f) envío del recipiente para envío a la planta de procesamiento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o reparar una lesión de la zona de infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural,

comprendiendo el método las etapas: (a) administrar al sujeto por vía parenteral a través de un una composición farmacéutica estéril que comprende: (i) una cantidad de mejora de la perfusión de la zona del infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas como primer agente terapéutico, donde la cantidad que mejora la perfusión de la zona de infarto del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende una población enriquecida de al menos 10×10^6 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 tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (ii) una cantidad estabilizante de suero, donde la cantidad estabilizante de suero es mayor que 20 % (v/v), y (iii) opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un segundo agente terapéutico compatible; donde al menos el 70 % de las células en la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad migratoria mediada por CXCR-4, cuando se pasan a través del catéter y cuando se prueban *in vitro*, son células CD34⁺, y donde la población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 cuando se pasa a través del catéter y ensayado *in vitro*, (1) retiene la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y (3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*, durante al menos aproximadamente 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4; y (b) mejorar la perfusión en una zona de infarto, en relación con los controles, donde la etapa de administración (a) tiene lugar en una o más fechas de infusión y en la primera fecha de infusión comprende un intervalo de tiempo específico definido por una primera vez y una segunda vez, donde la primera vez es después del pico de producción de la cascada de citocinas inflamatorias en la zona infartada y la segunda vez es antes de la formación de cicatrices miocárdicas en la zona infartada.

De acuerdo con una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende una población enriquecida de al menos 15×10^6 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; De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos 48 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 (a) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y (b) retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, durante al menos 72 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a). De acuerdo con otra realización, la subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tiene actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 retiene al menos 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células CD34⁺ que contiene una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 en (a).

De acuerdo con algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico opcional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico. De acuerdo con algunas realizaciones, el agonista del receptor tirosina quinasa es neuregulina 1. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto es una disminución progresiva de la función del músculo cardíaco después del infarto agudo de miocardio.

De acuerdo con otra realización, el método reduce al menos una lesión de la zona del infarto más que los componentes de la composición (i) más (ii) o el componente (iii) solo. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende la pérdida de cardiomiocitos apoptóticos en la zona del infarto. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende el remodelado ventricular adverso después de un infarto agudo de miocardio. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende una disminución progresiva de la función del músculo cardíaco después del infarto agudo de miocardio. De acuerdo con algunas realizaciones, el método aumenta la perfusión de al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, el método aumenta la perfusión en el miocardio en hibernación en al menos una zona isquémica periinfarto del tejido miocárdico, cuando se compara con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende hipoperfusión del miocardio en la zona límite del periinfarto, en relación con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, la lesión de la zona del infarto comprende hibernación del miocardio en la zona límite del periinfarto, en relación con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, el método mejora el flujo sanguíneo microvascular de la zona del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, el método disminuye la zona del infarto, cuando se compara con los controles. De acuerdo con algunas realizaciones, el método disminuye la masa del infarto, cuando se compara con los controles.

De acuerdo con una realización de la invención descrita, el sujeto que lo necesita es un paciente de infarto de

miocardio revascularizado. El término "revascularizado" tal como se utiliza en esta realización se refiere a la colocación con éxito de una endoprótesis vascular. Las evaluaciones clínicas, por ejemplo, de insuficiencia coronaria utilizando pruebas no realizadas en laboratorio, cateterismo cardíaco, medición de citocinas inflamatorias y medición de biomarcadores cardíacos se pueden usar para determinar el momento apropiado para administrar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con los métodos de la invención descrita. En algunas realizaciones, la detección de la producción máxima de la cascada de citocinas inflamatorias permite adaptar la administración a la ventana más crucial para el sujeto en particular. En algunas realizaciones, la producción máxima de la cascada de citocinas inflamatorias se determina midiendo los niveles de la o las citocinas adecuadas en plasma y/u orina. En otras realizaciones, el nivel o niveles de la o las citocinas adecuada se mide inmunoquímicamente, por ejemplo, mediante un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich, mediante ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) o kits de perlas multiplex.

De acuerdo con una realización, la composición se administra al sujeto en una primera fecha de infusión después de que la producción de la cascada de citocinas inflamatorias alcanza su punto máximo. En algunas realizaciones, la composición se administra al paciente de infarto de miocardio revascularizado en una primera fecha de infusión de aproximadamente 5 días a aproximadamente 14 días después del infarto. El tiempo mínimo para administrar la composición al paciente de infarto de miocardio revascularizado en la primera fecha de infusión es de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días. El tiempo máximo para administrar la composición en la primera fecha de infusión es de aproximadamente 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 días.

De acuerdo con algunas realizaciones, el número mínimo de células CD34⁺ en la población enriquecida de células CD34⁺ que contienen una subpoblación de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 es el número de células que proporciona un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. Por tanto, la invención descrita contempla que, en algunas realizaciones, donde la expresión de la movilidad mediada por CXCR-4 y CXCR-4 puede aumentarse, por ejemplo, mediante selección y enriquecimiento de células móviles CXCR-4⁺, puede ser necesario un número menor de células CD34⁺ para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, una población enriquecida de al menos 1×10^5 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporciona un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 5×10^5 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 9×10^5 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 1×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 2×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 3×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 4×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 5×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 6×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 7×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 8×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, al menos 9×10^6 células madre hematopoyéticas CD34⁺ autólogas aisladas proporcionan un número suficiente de células CD34⁺ potentes que expresan CXCR-4 y que tienen motilidad mediada por CXCR-4 para producir el efecto de mejora de la perfusión de la zona del infarto.

De acuerdo con algunas realizaciones, una cantidad mejoradora de la perfusión de la zona de infarto de las células

- de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 34 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 35 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 36 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 37 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 38 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 39 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 40 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 45 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 50 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 55 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 60 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 61 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 62 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 63 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 64 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 65 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 66 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 67 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 68 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 69 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 70 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 75 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 75 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 80 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 85 días después de la primera fecha de infusión. De acuerdo con algunas de dichas realizaciones, la tercera fecha de infusión es al menos 90 días después de la primera fecha de infusión.
- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
- En algunas realizaciones, el aparato de administración utilizado para administrar la composición farmacéutica de la invención descrita 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 aparato de administración comprende (a) un dispositivo de infusión unido a una llave de paso estéril de cuatro vías que contiene la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas; (b) un dispositivo de lavado unido a la llave de paso estéril de cuatro vías, el dispositivo de lavado que contiene una solución de lavado, y (c) un catéter unido al aparato de administración por la llave estéril de cuatro vías. De acuerdo con una realización, el dispositivo de infusión es una jeringa hecha de cualquier material adecuado. El cuerpo y el mango de las llaves de paso de cuatro vías adecuadas pueden estar hechos del mismo material o de un material diferente. Ejemplos de llaves de paso de cuatro vías adecuadas incluyen, sin limitaciones, una llave de paso que tiene un cuerpo de policarbonato/mango de policarbonato, una llave de paso que tiene un cuerpo de polietileno/mango de polietileno, una llave de paso que tiene un cuerpo de policarbonato/mango de polietileno o una llave de paso desechable. En otra realización, un dispositivo se fija adicionalmente a la llave de paso para regular la presión ejercida sobre la solución administrada. En algunas realizaciones, un dispositivo o jeringa de lavado integral está unido a la llave de paso. En una realización, el catéter es un catéter con balón. El término "catéter con balón" se refiere a un tipo de tubo flexible delgado "blando" que tiene un "balón" inflable en su punta, que se usa durante un procedimiento de cateterismo para ampliar una abertura o paso estrecho dentro del cuerpo. El catéter con balón desinflado se coloca, se infla para realizar el procedimiento necesario y se desinfla de nuevo para su retirada.
- 55
- La viabilidad y la eficacia potencial del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita que comprende células CD34⁺CXCR-4⁺ 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 tenga un diámetro interno de al menos 0,36 mm puede ser eficaz para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención descrita.
- 60
- Por ejemplo, un catéter de control de flujo, que retarda el drenaje de sangre a través de la vasculatura de la arteria coronaria, permite que las células transcurran a través de la pared del vaso sanguíneo y hacia el tejido.
- 65
- En algunas realizaciones, el catéter es un catéter con balón. Por ejemplo, sin limitaciones, se han validado los siguientes catéteres de dilatación con balón disponibles en Cordis, Boston Scientific, Medtronic y Guidant que tienen un diámetro interno de aproximadamente 0,36 mm (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Catéter con balón validado para la infusión de células CD34⁺ seleccionadas a través de la IRA

| Fabricante | Nombre y N.º de modelo | Dimensiones del balón | Diámetro interno de la luz |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Cordis | Raptor OTW 579-130 | 15 mm x 3,0 mm | 0,36 mm (0,14 pul) |
| Boston Scientific | OTW Maverick 20620-1530 | 15 mm x 3,0 mm | 0,36 mm (0,14 pul) |
| Medtronic | OTW Sprinter SPR 3015W | 15 mm x 3,0 mm | 0,36 mm (0,14 pul) |
| Guidant | Voyager OTW 1009443-15 | 15 mm x 3,0 mm | 0,36 mm (0,14 pul) |

Además, se han descrito catéteres que tienen un orificio de administración de fluido adyacente al globo de tal manera que el balón se puede inflar contra una pared del vaso para aislar el sitio de administración de la hemodinámica opuesta al globo desde el orificio, que puede estar situada distalmente al balón. Además, se han divulgado catéteres con balón que tienen luces que terminan en puertos laterales dispuestos proximalmente al catéter con balón; estos catéteres con balón generalmente se pueden denominar catéteres de "balón/administración", aunque las referencias particulares pueden usar diferentes factores de descripción. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.415.636 de Forman.

En algunas realizaciones, el método de tratamiento o reparación de una lesión de zona de infarto en el período posterior a un infarto agudo de miocardio resultante de un proceso de enfermedad natural comprende administrar la composición farmacéutica mejoradora de la perfusión de la zona de infarto mediante cateterismo con balón por vía intravascular (es decir, dentro de un vaso sanguíneo) una arteria infartada. En algunas realizaciones, después de la angioplastia, se inserta un catéter con balón de administración a través de una arteria femoral en una arteria coronaria deseada, tal como la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Algunas afecciones médicas pueden requerir tanto un catéter con balón como un catéter de administración de fluido para facilitar el tratamiento. En algunas realizaciones, se utiliza un catéter para inyectar directamente células en el miocardio.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, al décimo 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 declarado o intermedio en el intervalo indicado está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también se incluyen dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen los límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o análisis de la invención descrita también se pueden describir cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y materiales preferentes. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento divulgan y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado.

40 Ejemplos

Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se efectúa y usa la invención descrita y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni se pretende que representen que los siguientes experimentos sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deben tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o está cerca de la misma.

50 Protocolo de ensayo clínico de fase I

Ejemplo 1. Selección de sujetos elegibles

55 Los sujetos/pacientes que presentan síntomas y hallazgos clínicos sugestivos de un infarto de miocardio recibieron diagnóstico y tratamiento clínico de emergencia de acuerdo con las pautas institucionales. Si se confirmó un infarto de miocardio transmural (es decir, a través de la pared), se registró el momento de los primeros síntomas y el

momento de la colocación con éxito de la endoprótesis vascular. Los sujetos revascularizados recibieron tratamiento médico adecuado para reducir las tensiones de la pared ventricular de acuerdo con pautas institucionales. El término "revascularizado" tal como se utiliza en esta realización se refiere a la colocación con éxito de una endoprótesis vascular.

5 Todos los tipos de endoprótesis vasculares, incluidas 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 (IRA). Estudios anteriores que emplean catéteres con balón para infundir productos celulares han indicado que no hay límites para el diámetro del vaso de referencia para la colocación de la endoprótesis vascular. Dado que
10 este estudio se diseñó para distribuir el producto celular en la circulación de la IRA, y en un intento de limitar el potencial de daño a los vasos muy pequeños, la invención descrita requirió colocar las endoprótesis vasculares antes de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita.

15 Los efectos del fármaco relacionados con la endoprótesis vascular se producen predominantemente en el sitio de contacto de la endoprótesis vascular con la pared del vaso. Como consecuencia de la dilatación con balón, hay un flujo sanguíneo limitado a través de la endoprótesis vascular durante la infusión celular y, por lo tanto, no se esperaba ningún efecto adverso significativo mediado por el fármaco sobre las células CD34⁺ en el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas. Además, estudios clínicos previos han demostrado que para las 96 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular liberadora de fármaco, los niveles en sangre entera de
20 paclitaxel o sirolimus están por debajo de los límites de detección. Por lo tanto, se esperaba que los niveles de tejido en los sitios del miocardio a los que se pretendía que migraran las células CD34⁺ infundidas que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 no tuvieran consecuencias. Véase Sousa, J. y col., *Circulation* 107: 2274-79, 2383-89 (2003).

25 Durante la revascularización, la función cardíaca y la perfusión de un sujeto se evaluó por métodos estándar. Las medidas relevantes de la función cardíaca después de un infarto de miocardio incluyen la evaluación de la fracción de expulsión global, los volúmenes ventriculares, la perfusión en reposo y el tamaño del infarto.

30 La expresión "fracción de expulsión" ("FE") se refiere al porcentaje de sangre vaciada del ventrículo durante la contracción. Más específicamente, es la fracción del volumen telediastólico que se expulsa con cada latido; es decir, es el volumen sistólico (VS) dividido por el volumen telediastólico (VTD). El volumen de sangre dentro de un ventrículo inmediatamente antes de una contracción se conoce como volumen telediastólico, mientras que el volumen de sangre que queda en un ventrículo al final de la contracción se conoce como volumen telesistólico. La diferencia entre los volúmenes telediastólico y telesistólico es el volumen sistólico, el volumen de sangre expulsado
35 con cada latido. En un varón sano de 70 kg (154-lb) de peso, el VS es de aproximadamente 70 ml y el VTD ventricular izquierdo es de 120 ml, lo que da una fracción de expulsión de 70/120, o 0,58 (58 %). Una FE dentro del intervalo de 55-60 % se considera normal. La fracción de expulsión del ventrículo derecho ("FEVD") es normalmente igual a la del ventrículo izquierdo ("FEVI") dentro de límites estrechos.

40 La ecocardiografía, la gammagrafía [por ejemplo, la ventriculografía isotópica (MUGA), una exploración nuclear que evalúa la función de bombeo de los ventrículos, las cámaras y cómo se contrae el corazón] y la ventriculografía izquierda fueron medidas precisas y fácilmente disponibles de la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo ("FEVI"). La ecocardiografía se ha utilizado para determinar los volúmenes telesistólicos y telediastólicos utilizando el método de longitud de zona biplana.
45

Otras medidas de la función cardíaca en el período posterior al infarto incluyeron la evaluación del índice del volumen sistólico y la velocidad del acortamiento circunferencial de la fibra. Strauer, et al., *Circulation* 106: 1913-18 (2002). El volumen sistólico (VS) es la cantidad de sangre que el ventrículo izquierdo expulsa en un latido medida en mililitros por latido (ml/latido). El VS se puede indexar con respecto al tamaño del cuerpo del paciente dividiendo el
50 VS por el área de superficie corporal (BSA) para obtener el índice de sistólico (IS).

La evaluación de la reparación del miocardio infartado también incluyó la evaluación de la perfusión de la región periinfarto mediante gammagrafía con talio. *Id.*

55 La resonancia magnética (MRI) es una herramienta útil para evaluar la función cardíaca y la viabilidad (tamaño del infarto) en este contexto. Véase Yin, A, et al., *Blood* 90: 5002-5012 (1997).

60 Al día siguiente de la colocación con éxito de una endoprótesis vascular, se evaluó la elegibilidad de los sujetos para el estudio y, en su caso, se les ofreció el consentimiento informado para participar en el estudio. Los sujetos que presentaron síntomas durante no más de tres (3) días antes de la colocación con éxito de la endoprótesis vascular fueron evaluados, antes del alta, para determinar la elegibilidad para el estudio. A los sujetos que cumplían los criterios de elegibilidad (véase más adelante) se les ofreció el consentimiento informado para participar.

65 A los sujetos que otorgaron el consentimiento se les realizó un ecocardiograma de entrada en el estudio no antes de 96 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular. Los sujetos eran elegibles para continuar el estudio si (i) la FEVI era menor o igual al 50 % en la ecocardiografía y (ii) se observó una anomalía del segmento de la pared

ventricular en la IRA.

Los sujetos elegibles completaron inmediatamente la función cardíaca basal y la evaluación de la perfusión. Específicamente, la función cardíaca basal incluía: ecocardiografía transtorácica en reposo y dosis bajas de
 5 dobutamina para evaluar la función cardíaca, incluyendo la fracción de expulsión, los volúmenes telesistólicos y telediastólicos y el índice de la puntuación del movimiento de la pared y la viabilidad.

Ecocardiografía. Se utilizó ecocardiografía de contraste miocárdico en el cribado del estudio cuatro días después de colocar la endoprótesis vascular para identificar pacientes con disfunción ventricular izquierda (fracción de
 10 expulsión ecocardiográfica $\leq 50\%$).

Perfusión Cardíaca. La perfusión se evaluó utilizando una exploración con radionúclido tecnecio (Tc-99m) Sestamibi en reposo y después de la adenosina intravenosa basal y después de 6 meses. El tamaño del defecto de la perfusión se estimó como la puntuación de la gravedad total en reposo (RTSS) utilizando la tomografía
 15 computarizada de emisión de fotón único en reposo (SPECT). El Emory Cardiac Toolbox se utilizó para la cuantificación de la imagen; la evaluación utilizó un modelo de 17 segmentos. Un laboratorio de revisión central evaluó los estudios de perfusión con el intérprete enmascarado para la cohorte del estudio. Las mejoras en la perfusión se expresaron en términos semicuantitativos (sí/no). Se comparó el porcentaje de pacientes en los que se ha observado que presentan una mejora de la perfusión entre las cohortes de dosis.

RMN. A todos los sujetos se les realizó una resonancia magnética cardíaca (MRI) potenciada con gadolinio para evaluar los volúmenes telesistólicos y telediastólicos del ventrículo izquierdo (VTSVI y VTDVI), la fracción de
 20 expulsión del ventrículo izquierdo (FEVI) y el tamaño del infarto al inicio del estudio, a los 3 meses y a los 6 meses. Los sujetos recibieron contraste de gadolinio durante la exploración. La RMN utilizó la técnica de retención del aliento. Se realizó la obtención de imágenes de precesión en estado estacionario para obtener la función global y regional del VI, al igual que la formación de imágenes con Gadolinio. Los volúmenes telesistólicos y telediastólicos del ventrículo izquierdo, la FEVI, la dimensión telediastólica del VI, el grosor de la pared en la sístole y la diástole de la región infartada y el tamaño del infarto se indicaron utilizando el modelo de 17 segmentos de AHA/AVV con extensión transmural del infarto como $<25\%$, 26% - 50% , 51% - 75% y $>76\%$. Un laboratorio de revisión central
 25 evaluó la RMN con el intérprete enmascarado a la cohorte del estudio.

Los sujetos seleccionados para este estudio deben haber cumplido todos los siguientes criterios clínicos siguientes ("criterios de inclusión"):

- 35 • Edad: 18 - 75 años;
- Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST que cumple los criterios de ACC/AHA, con síntomas de dolor torácico en un plazo de 3 días desde la admisión. Estos criterios incluyen (elevación del ST > 1 mm en las derivaciones de las extremidades o 2 mm en dos o más derivaciones precordiales y aumento de los niveles de troponina, creatina quinasa MB (CPK MB) o ambos), clase de insuficiencia cardíaca de la Asociación del
 40 Corazón de Nueva York (NYHA) (pendiente de registro) de I, II o III;
- Elegible para intervención coronaria percutánea (ICP);
- Elegible para RMN;
- Elegible para tomografía computarizada de emisión de protón único (SPECT);
- Conclusión del laboratorio ecocardiográfico sobre la capacidad para evaluar adecuadamente los parámetros
 45 cardíacos tras la revisión de la ecocardiografía de admisión;
- Ecocardiograma de entrada en el estudio [96 a 144 horas {es decir, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 6 días} después de la colocación de la endoprótesis vascular], FEVI menor o igual al 50 % en la ecocardiografía y anomalía del segmento de la pared ventricular en la circulación de la IRA mediante ecocardiografía tras reperfusión;
- 50 • El sujeto debe haber sido capaz de proporcionar un consentimiento informado por escrito y debe haber estado dispuesto a participar en todas las evaluaciones de seguimiento del estudio requeridas;
- Los sujetos deben haber tenido un contenido de hemoglobina (Hgb) > 10 gramos/dl, un recuento de glóbulos blancos (GB) > 3500 células/mm³, un recuento de plaquetas > 100.000 células/mm³ y un índice internacional normalizado (INR, una prueba de coagulación de la sangre) $< 2,0$ el día antes de la recolección de médula ósea;
- 55 • Los sujetos deben haber tenido una creatinina sérica $< 2,5$, bilirrubina total $< 2,0$ en un plazo de 7 días de la recolección de médula ósea;
- La IRA y la lesión diana deben haber sido claramente identificables cuando la enfermedad estaba presente en más de un vaso;
- La reperfusión con éxito y la colocación de una endoprótesis vascular intracoronaria, con trombólisis en el infarto de miocardio (TIMI) 2 o 3 y una IRA con $< 20\%$ de estenosis después de la revascularización;
- 60 • Los sujetos deben haber sido considerados elegibles para recibir sedación consciente, la recolección de la médula ósea y el segundo cateterismo para la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas;
- El tipo de endoprótesis vascular utilizada y la fecha y hora de inserción deben haberse registrado;

65 Las endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos estaban limitadas a los tipos de paclitaxel o sirolimus;

- Los sujetos incluidos deben haber tenido una supervivencia esperada de al menos un año y no deben haber tenido enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización, o no se esperaba que requirieran intervención en los 6 meses posteriores a la entrada al estudio.

5 Los sujetos que cumplieron cualquiera de los siguientes criterios no eran aptos para el estudio y se excluyeron del estudio ("criterios de exclusión"):

- Los sujetos que no eran candidatos a intervención percutánea, sedación consciente, RMN, formación de imágenes SPECT o recolección de médula ósea mini;
- 10 • Antecedentes de dolor torácico sostenido no aliviado con nitratos, que se producir 4 o más días antes de la revascularización;
- Los sujetos que no pudieron volver a perfundir la arteria coronaria relacionada con el infarto ni se pudo realizar una colocación con éxito de la endoprótesis vascular;
- 15 • Conclusión del laboratorio de ecocardiografía después de la revisión ecocardiográfica de admisión que el estudio no era adecuado para evaluar los parámetros cardíacos;
- Sujetos con shock cardiogénico (presión sistólica <80 sobre vasopresores o contrapulsación intraaórtica);
- Los sujetos con una rama lateral de la lesión diana > 2 mm y con estrechamiento del ostium > 50 % de estenosis de diámetro después de la revascularización;
- Sujetos que no pueden tomar aspirina, clopidogrel o ticlopidina;
- 20 • Los sujetos que recibieron warfarina deben haber tenido un INR menor o igual a 2 [el término INR se refiere al índice internacional normalizado, INR, que es un sistema establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia para informar sobre los resultados de las pruebas de coagulación sanguínea (coagulación)];
- Sujetos con estenosis aórtica grave;
- 25 • Sujetos con estados de inmunodeficiencia grave (por ejemplo, SIDA);
- Sujetos con cirrosis que requieren manipulación médica activa;
- Sujetos con neoplasia maligna que requiere tratamiento activo (excepto cáncer de piel de células basales);
- Sujetos con alcohol activo documentado y/u otro abuso de otras sustancias;
- 30 • Las mujeres en edad fértil, a menos que la prueba de embarazo fuera negativa dentro de los 7 días siguientes a la recolección de la médula ósea;
- Sujetos con fracciones de expulsión superiores al 50 % en el ecocardiograma de entrada en el estudio (de 96 a 144 horas después de la colocación de la endoprótesis vascular);
- Sujetos con menos de tres meses de tratamiento antiplaquetario planificado posterior al procedimiento índice;
- 35 • Sujetos con enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización que requieren la posterior intervención planificada durante los siguientes 6 meses;
- Sujetos con participación en un ensayo de investigación en curso;
- Sujetos con infección bacteriana activa que requieren antibióticos sistémicos.

40 Las evaluaciones basales de la función cardíaca y la perfusión cardíaca se obtuvieron un día antes de la recolección planificada de la médula ósea y la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas (véase más adelante). Se realizó una recolección de médula ósea mini ("MMH") al día siguiente de la evaluación basal de la función cardíaca y la perfusión cardíaca.

45 **Ejemplo 2. Cateterismo cardíaco**

Preparación y colocación de paños quirúrgicos en esterilidad

Se llevó a cada sujeto al laboratorio de cateterismo cardíaco después de que el investigador hubo obtenido el consentimiento informado. El sujeto recibió una preparación y colocación de paños quirúrgicos en esterilidad en el laboratorio de cateterismo cardíaco.

Cateterismo cardíaco

55 El acceso vascular se obtuvo mediante la técnica estándar utilizando la ingle derecha o izquierda. Se colocó una vaina en la arteria femoral o en la arteria braquial derecha o izquierda. El examen arteriográfico coronario se realizó mediante la obtención de vistas estándar de las arterias coronarias derecha e izquierda. Se obtuvieron múltiples vistas para identificar la arteria relacionada con el infarto antes de la endoprótesis vascular. Todos los sujetos recibieron medicamentos estándar durante el procedimiento de cateterismo de acuerdo con la práctica rutinaria.

60 **Ejemplo 3: Proceso de adquisición para adquirir producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que pueden enriquecerse para células CD34⁺**

65 Aunque se contempla que cualquier proceso de adquisición apropiado para adquirir el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que comprende células CD34⁺ potentes está dentro del alcance de la invención descrita, el siguiente ejemplo ilustra uno de tales procedimientos denominado en el presente documento una técnica de recolección de médula ósea mini.

Preparación de jeringas de cosecha

Antes de la recolección de médula ósea, cuarenta jeringas de 10 cc cargadas con aproximadamente 2 ml de una solución salina heparinizada libre de conservante (aproximadamente 100 unidades/ml a aproximadamente 125 unidades/ml, APP Cat. n.º 42592B o equivalente) en condiciones estériles. Se inyectó heparina a través de un orificio estéril en cada una de dos bolsas de 100 ml de una solución salina normal al 0,9 % ("solución salina normal", Hospira Cat. n.º 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 final de heparina de aproximadamente 100 unidades/ml (U/ml) a aproximadamente 125 unidades/ml (U/ml). Se cargaron en condiciones estériles 2 ml de la solución de heparina libre de conservante (aproximadamente 100 U/ml a aproximadamente 125 U/ml) en cada una de las cuarenta jeringas de 10 cc, que luego se taparon y se colocaron en una bolsa estéril para el transporte al centro de la recolección.

Los sujetos fueron preparados para la recolección de médula ósea después de obtener el consentimiento informado por escrito como se detalla en el Ejemplo 1. La sedación consciente se proporcionó utilizando procedimientos y directrices institucionales estándar. La recolección de la médula ósea se llevó a cabo en condiciones estériles. El término "condiciones estériles", tal como se usa en el presente documento, incluye el lavado y preparación adecuados con una mascarilla estéril y guantes usados por el encargado y ayudante de la recolección.

El procedimiento de recolección, que se puede realizar fuera de un quirófano, fue el siguiente: después de la preparación y colocación de paños quirúrgicos en esterilidad, cada cresta ilíaca se anestesió con una solución de lidocaína al 1 % usando un mínimo de 10 ml por cada cresta. La zona de anestesia era un zona circular de no menos de 10 cm de diámetro. La aguja de recolección se insertó hasta que se perforó la cresta ilíaca. Se retiraron la tapa y el estilete y se recogieron 2 ml de médula en la jeringa de recolección 10 ml que contenía 2 ml de la solución de heparina. Después se retiró la jeringa y se colocó en el campo estéril. Después de volver a insertar el estilete, la aguja de recolección se hizo avanzar ligeramente y después se giró 90 °. Luego se retiró el estilete y se extrajeron 2 ml adicionales de médula en la jeringa de recolección recuperada del campo estéril. Este procedimiento se repitió dos veces más hasta que la jeringa de recolección contenía 8 ml de médula para un total de 10 ml de médula heparinizada a una concentración final de heparina de aproximadamente 20 U/ml a aproximadamente 25 U/ml. Finalmente, la jeringa de recolección completa se entregó al asistente de la recolección y se agitó y se infundió en la bolsa colectora estéril como se describe a continuación. El médico encargado de la recolección cogió luego la otra aguja de recolección que se había sido lavado previamente con la solución de heparina y se repitió este proceso.

La jeringa de recolección completa se infundió en la bolsa colectora estéril como sigue. El asistente encargado de la recolección recibió la jeringa de recolección llena y la vació en la bolsa colectora de 500 ml a través del adaptador estéril unido a la bolsa. A continuación, la aguja de recolección se lavó con la solución de heparina en la jeringa de lavado y se devolvió al campo estéril.

El proceso de recolección se repitió en una cresta ilíaca hasta que se recogieron 19 jeringas y se vaciaron en la bolsa colectora. El mismo proceso se repitió en la otra cresta ilíaca hasta que se llenaron otras aproximadamente 19 jeringas. Un total de treinta y ocho aspiraciones de 8 ml de ambas crestas ilíacas (idealmente 19 de cada cresta ilíaca) produjo 302 ml de médula ósea cosechada en un volumen final de 380 ml a una concentración de heparina de aproximadamente 20 U/ml a aproximadamente 25 U/ml.

La bolsa colectora se selló atando el tubo de conexión tres veces y después, sujetando la parte distal a los nudos. La bolsa se etiquetó adecuadamente como "Recolección de médula ósea humana" y los resultados del procedimiento de recolección, incluyendo el volumen final recolectado y cualquier complicación relacionada con el procedimiento, se registraron en el cuaderno de recogida de datos de la escala del riesgo de la Clínica Mayo (MCRS). La etiqueta completa se pegó en la bolsa de médula ósea. A continuación, la bolsa se colocó en una bolsa de transporte estéril para su transporte a la planta de procesamiento.

Ejemplo 4. Preparación del producto de médula ósea para el transporte

En una realización, En una realización, la médula ósea cosechada es transportada a una planta de procesamiento como sigue. Cuando se prepara el centro clínico para enviar la preparación de médula ósea se proporciona aviso de 24 horas a la planta de procesamiento. El laboratorio de procesamiento realiza los arreglos de envío lo más pronto posible para la recogida para la entrega el mismo día al laboratorio de procesamiento. Inmediatamente después de recoger la médula ósea, el producto de médula ósea se coloca en el recipiente de envío suministrado. El recipiente de envío contiene dos pequeños bloques de hielo húmedo congelado en la parte inferior y una hoja de papel de embalaje 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 sobre el papel de embalaje de burbujas. Un monitor marcador de la temperatura (un sensor utilizado para vigilar la temperatura interna) se fija al interior de la caja. A continuación se coloca otra capa de papel de embalaje de burbujas encima del producto antes de sellar el recipiente de envío.

65 Ejemplo 5: Selección de células CD34⁺ del producto de médula ósea cosechado

Se aislaron las células CD34⁺ del producto de médula ósea cosechado. En una realización, las células CD34⁺ se aislaron usando el anticuerpo monoclonal anti-CD34 (Mab), IgG anti-ratón de oveja Dynabeads® M-450 Sheep y componentes de agente liberador de células madre PR34⁺ (™) del sistema de selección celular magnético Isolex 300i (Baxter Healthcare Corp. Cat. No. 4R9734) como se describe en las patentes de Estados Unidos números 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, la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2003/0232050 y la ficha técnica 300i. Este sistema operativo se adaptó para el aislamiento de células CD34⁺ de la médula ósea de acuerdo con la invención descrita.

A su llegada al laboratorio de procesamiento, el producto cosechado de médula ósea (en la bolsa colectora) se inspeccionó inmediatamente y se comprobó que la bolsa no tuviera fugas. Lo recolectado debe ser fluido sin grumos aparentes y no debe estar hemolizado. Lo recolectado no se utilizó si la integridad de la bolsa estaba alterada de alguna manera.

El producto de médula ósea se procesó en un plazo de aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 24 horas desde la inspección. Se obtuvo un recipiente de embalaje para transferencia de 300 ml o 400 ml y se fijó un equipo de transferencia de plasma al puerto de obtención de muestras del recipiente. El producto de médula ósea se transfirió desde la bolsa colectora al recipiente de embalaje para transferencia. El producto de recogida de médula ósea agrupado se mezcló completamente invirtiendo el recipiente veinte (20) veces.

A continuación, se obtuvieron muestras del producto de médula ósea recolectado agrupada para su análisis. De acuerdo con una realización, se extrajo un volumen total de 2,0 ml del producto y se dividió en partes alícuotas de la siguiente manera: se usaron 0,3 ml para un ensayo duplicado de hemograma completo (CBC) utilizando un analizador de hematología; se dispensaron 0,2 ml en un tubo de vidrio de 75x100 mm para la detección de bacterias grampositivas y gramnegativas mediante tinción de Gram (Kit de tinción de Gram, VWR, N.º de cat. BB231401); como verificación de la esterilidad, se dispensaron 0,6 ml en un frasco con caldo de digerido de soja y caseína (TSB) (VWR, n.º de cat. 29446-184) para ensayo de crecimiento de bacterias aerobias, se dispensaron 0,6 ml en un frasco con medio fluido de tioglicolato (FTM, N.º de cat. 29446-138) para el ensayo de crecimiento de bacterias anaerobias y se usaron 0,3 ml en análisis de flujo para la enumeración de las células CD34⁺ y la viabilidad celular.

Se pesó lo recolectado en una balanza electrónica y se registró el peso de tara apropiado de la bolsa colectora. La relación entre el volumen del producto de médula ósea y el peso del producto se puede expresar como

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

(Fórmula 1)

El número de células nucleadas totales (TNC) en el producto de médula ósea se calculó usando el recuento de glóbulos blancos (WBC) obtenido del CBC de acuerdo con la siguiente relación:

$$\text{TNC} = \text{WBC}/\mu\text{l} \times 1000 \times \text{volumen del producto (ml)} \quad (\text{Fórmula 2})$$

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

$$\text{Células CD34}^+ \text{ totales en el producto de médula ósea} = \text{Número de células CD34}^+/\mu\text{l} \times 1.000 \times \text{volumen del producto (ml)} \quad (\text{Fórmula 3})$$

El volumen de glóbulos rojos (RBC) del producto de recogida de médula ósea se calculó a partir de la siguiente relación:

$$\text{Volumen de RBC (ml)} = \text{volumen del producto (ml)} \times \text{Hematocrito (\%)} / 100 \quad (\text{Fórmula 4}),$$

Después de un cálculo inicial del volumen de glóbulos rojos, el producto de médula ósea se envasa y se centrifuga a 100 g durante 20 minutos a 20 °C con el freno desactivado. Después de la centrifugación, el recipiente de la médula ósea se retira cuidadosamente de la centrifuga y se cuelga dentro de un armario de seguridad biológica Clase 100 con los puertos de obtención de muestras hacia abajo. Un equipo de transferencia de plasma se coloca cuidadosamente en el puerto de obtención de muestras central de la bolsa y se extrae la fracción de RBC con una jeringa. Este procedimiento se repite con jeringas frescas adicionales hasta que los RBC restantes se eliminan de la MMH. La MMH se prepara a partir de un procedimiento de lavado, que comienza por centrifugación a 1.000 g durante diez (10) minutos a 20 °C con el freno "desactivado" seguido de prensado de plasma, todo ello en preparación para un lavado en una solución tampón de lavado basado en PBS [HSA al 1 % y citrato sódico al 0,41 % (p/v) en PBS (sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺)] preparado anteriormente en el proceso. Después de la adición del tampón de lavado, las células se centrifugan de nuevo a 1.000 g durante diez (10) minutos a 20 °C con el freno en la posición "desactivado". Después de esta centrifugación (final), las células se expresan usando una prensa de plasma, se extrae el sobrenadante y se transfieren 150 ml de solución de lavado de PBS a la bolsa de producto usando una jeringa de 60 ml. Las células concentradas se resuspenden mediante masaje manual. Después de este

procedimiento de lavado, la reducción de RBC y la recuperación de células nucleadas (NC) se calculan como sigue. El TNC del producto de médula ósea empobrecida en RBC se determinó a partir de la relación:

$$\text{TNC total del producto sin RBC} = \text{WBC}/\mu\text{l del producto sin RBC} \times 1000 \times \text{volumen de MMH sin RBC (ml)}$$

(Fórmula 5)

La recuperación de TNC del producto empobrecido en RBC, que debe ser al menos el 80 % del recuento del producto original, se calculó a partir de la relación:

$$\text{Recuperación de TNC} = \text{TNC del producto agotado de RBC} \div \text{TNC del producto sin procesar} \times 100 \%$$

(Fórmula 6)

El volumen total de RBC se calculó según lo descrito anteriormente; el volumen de RBC en el producto empobrecido en RBC debe ser ≤ 20 ml.

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

- (i) La médula ósea se lavó automáticamente para eliminar las plaquetas;
- (ii) las células positivas para CD34 (CD34⁺) se marcaron específicamente para su selección mediante incubación con el anticuerpo monoclonal de CD34 Isolex 300i (Mab);
- (iii) El reactivo no unido se eliminó lavando la suspensión celular con solución tampón;
- (iv) las células CD34⁺ sensibilizadas (es decir, células CD34⁺ marcadas con el Mab de CD34) se capturaron mediante IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-450;
- (v) Se usó una columna de selección para separar las Dynabeads marcadas magnéticamente que habían capturado células CD34⁺ de células no deseadas, que se lavaron a través de la columna de selección y se recogieron en la bolsa de fracciones negativas; y
- (vi) el agente de liberación de células madre PR34⁺ liberó células CD34⁺ de la columna y las células CD34⁺ se recogieron en la bolsa de producto final. El sistema realizó varias etapas de lavado, eliminando la mayor parte del líquido en la bolsa de desechos del tampón.

La fracción de CD34⁺ seleccionadas con Isolex^(R) se analizó como sigue para determinar los rendimientos de WBC y de células CD34⁺. El volumen de la fracción positiva para CD34 se determinó mezclando las células en la bolsa de producto final; la bolsa se masajó suavemente a mano para asegurar una distribución uniforme de las células. Se insertó un equipo de transferencia en el puerto de obtención de muestras de la bolsa de producto final y se conectó una jeringa de 60 ml. La suspensión celular se extrajo con jeringa (máximo 50 ml a la vez) para medir el volumen total.

Se utilizó una jeringa de 3 ml o de 5 ml para retirar 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 alícuotados de las muestras y los análisis realizados sobre esas muestras fueron como se ha descrito anteriormente, es decir, CBC: 0,3 ml; tinción de Gram: 0,3 ml; enumeración de células CD34⁺ y viabilidad celular: 0,2 ml;

El TNC total de la fracción positiva para CD34 se calculó a partir de la relación:

$$\text{TNC total de la fracción positiva} = \text{WBC}/\mu\text{l de la fracción positiva} \times 1000 \times \text{volumen de la fracción positiva}$$

(Fórmula 7)

La recuperación de TNC de la fracción positiva, que debe ser menos del 5 % del recuento del producto original, se calculó a partir de la relación siguiente:

$$\text{Recuperación de TNC} = \text{TNC total de la fracción positiva} \div \text{TNC total del producto sin procesar} \times 100 \%$$

(Fórmula 8)

El número total de células CD34⁺ viables en la fracción positiva se determinó a partir de la relación siguiente:

$$\text{Células CD34}^+ \text{ totales en la fracción positiva} = \text{Número de células CD34}^+/\mu\text{l del producto final} \times 1.000 \times \text{volumen del producto final (ml)}$$

(Fórmula 9)

La recuperación de células CD34⁺ en la fracción positiva se calculó a partir de la relación siguiente:

$$\text{Recuperación de células CD34}^+ = \text{células CD34}^+ \text{ totales de la fracción positiva} \div \text{células CD34}^+ \text{ totales del producto sin procesar} \times 100 \%$$

(Fórmula 10).

Ejemplo 6. Preparación de células CD34⁺ seleccionadas para transfusión

Se retiraron muestras del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas para analizar el recuento de glóbulos blancos, mediante citometría de flujo (para la enumeración de y viabilidad de las células CD34⁺), tinción de Gram y esterilidad.

Las células CD34⁺ se caracterizaron mediante análisis de citometría de flujo con fluorescencia CD34^{brillante} y CD45^{oscuro} mediante marcaje doble con anticuerpos anti-CD34 y anti-CD45 (Beckman Coulter, PN IM3630). La viabilidad de las células CD34⁺ y las células CD45⁺ se determinó excluyendo las células moribundas, que absorben el colorante de ADN intercalante 7-aminoactinomicina D (7AD). Véase Brocklebank AM, Sparrow RL. Cytometry. 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 n.º 4.520.110; 4.859.582; 5.055.556; patente europea n.º 76,695; patente canadiense n.º 1.179.942 (PE, APC); patente de Estados Unidos n.º 4.876.190 (PerCP); patentes de Estados Unidos n.º 5.268.486; 5.486.616; 5.569.587; 5.569.766; 5.627.027 (Cy); patentes de Estados Unidos n.º 4.714.680; 4.965.204; 5.035.994 (CD34); patente de Estados Unidos n.º 5.776.709 (método de Lyse/sin lavado); patentes de Estados Unidos n.º 5.723.218 y 5.187.288 (tubos Tru-COUNT).

Puede usarse cualquier citómetro de flujo o un dispositivo equivalente para realizar el análisis de la enumeración de células CD34⁺ y la viabilidad. En una realización, el laboratorio de procesamiento empleó un citómetro de flujo BD FACSCalibur (TM) y se utilizó el software BD FACSComp (TM) para la configuración y monitorización del instrumento. Una plantilla y un panel de etiquetas de leyendas se preinstalaron para su adquisición y análisis. Antes de usar, los reactivos, a saber CD45FITC/CD34PE, fluoroesferas Stem-Count, solución de lisis de cloruro amónico concentrado y colorante de viabilidad 7AAD, se llevaron a temperatura ambiente. Los controles de células CD34⁺ se realizaron como un control positivo para afirmar que el instrumento se había configurado para analizar las células CD34⁺ y los resultados se compararon con el intervalo de porcentaje de CD34 predeterminado del fabricante.

El producto de médula ósea sin procesar y los productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas procesadas Isolex® pueden analizarse mediante muchos procedimientos diferentes. En una realización, por ejemplo, inmediatamente después de recibir la muestra, si el recuento de WBC de la muestra es mayor que 2×10^7 células por ml, la muestra se diluye con fluido envolvente para alcanzar un recuento de células de aproximadamente 2×10^7 WBC por ml. 100 µl del producto diluido se alicuotó en dos tubos de 15 x 100 mm. Utilizando un micropipeteador, se añaden 20 µl de CD45FITC/CD34 PE y reactivo de colorante de viabilidad 7-AAD en cada tubo y las muestras se agitan suavemente. Los tubos se cubren con papel de aluminio y se dejan a temperatura ambiente durante de 15 a 20 minutos. Los RBC se lisan añadiendo 1,5 ml de solución de lisado 1x a cada tubo, agitando en vórtex suavemente. Los tubos se incuban durante diez minutos a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Las muestras se almacenan a aproximadamente 2 °C a 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 debe realizarse en el plazo de una hora después de añadir el tampón de lisis. Antes de la adquisición de datos, se resuspenden fluoroesferas Stem-Count mediante rotación de extremo a extremo (10 veces). Se añaden 100 µl de fluoroesferas a cada tubo y se agitan suavemente en vórtex teniendo cuidado de no generar burbujas de aire. El recuento absoluto de células CD34⁺ en el producto se calcula a partir de la relación:

$$\text{Número de células CD34}^+ \text{ viables por } \mu\text{l de producto} = \text{LCD34} \times \text{FAC}$$

(Fórmula 11)

donde LCD34 es el número promedio de acontecimientos para CD34⁺/todas CD 45⁺ vivas; "FAC" es la concentración analizada con fluoroesferas; y F es el número promedio de singletes de fluoroesfera contados.

El volumen de la fracción positiva para CD34⁺ se calculó para obtener el número de células CD34⁺ necesarias para la dosificación requerida. El volumen de fracción positiva requerida (ml) se define como:

$$\text{La dosificación de células CD34}^+ \text{ requerida} \div (\text{Total células CD34}^+ \text{ totales por } \mu\text{l en la fracción positiva} \times 1.000).$$

(Fórmula 12)

Se dispensó un número apropiado de células en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró usando una pipeta serológica de 30 ml y se eliminó como desecho mientras se ejercitaba cuidado de no dispersar los gránulos de células en el fondo de los tubos durante este proceso. La solución de infusión (20 ml) se añadió al tubo de la fracción positiva de células CD34⁺ y las células se dispersaron utilizando una pipeta serológica de 10 ml mediante pipeteo repetido. Las células resuspendidas se centrifugaron durante 10 minutos a 500 g. Se utilizó 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 fijada de "Sobrenadante de la fracción positiva". El tubo que contenía el sobrenadante se agitó en vórtex para homogeneizar la solución. Se utilizó una pipeta serológica de 10 ml para transferir 10 ml del sobrenadante homogeneizado al tubo de la fracción positiva de células CD34⁺. Los 10 ml restantes de la suspensión en el tubo de sobrenadante se usaron para pruebas de esterilidad (5 ml de cada una en un frasco de TSB (caldo de soja) y un frasco de FTM (tioglicolato fluido). Las células

en la fracción positiva de células CD34⁺ se resuspendieron 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 introdujo en la jeringa, se aspiraron todas las burbujas de aire y se retiró la aguja de extremo romo. La jeringa de infusión se unió al puerto de inyección de una llave de paso de 4 vías.

5 El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita se liberó para infusión solo si cumplía los criterios siguientes:

- pureza de células CD34⁺ de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %;
- 10 • un resultado negativo en la tinción de Gram para la fracción positiva seleccionada;
- niveles de endotoxina: menos de aproximadamente 0,5 unidades de endotoxina/ml;
- el rendimiento de células CD34⁺ viables del "producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas" cumplió la dosificación requerida según la cohorte de tratamiento;
- 15 • las células CD34⁺ tuvieron al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de viabilidad mediante 7-AAD;
- resultado de esterilidad USP para el "sobrenadante de la fracción positiva": negativo (14 días después); y
- la selección de las células CD34⁺ de la médula se inició en un plazo de aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 24 horas desde la finalización de la recolección de la médula ósea.

20 La evaluación de la esterilidad en el producto de células madre incluyendo la tinción de gram y los niveles de endotoxinas se realizó antes de la liberación del producto para infusión. Se realizó el cultivo de esterilidad según USP (bacterias y hongos) y los resultados se notificaron al investigador principal. En caso de un resultado positivo de esterilidad según la USP, se notificará al sujeto y el médico que lo atiende inmediatamente, con la identificación y sensibilidad del organismo cuando se disponga de las mismas y el centro de investigación y el promotor registrarán la documentación del tratamiento antimicrobiano adecuado y el resultado del tratamiento.

Después de cumplir estos criterios de administración, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se liberó para infusión y se envasó para su transporte a la instalación de cateterismo. También se envió una muestra para pruebas *in vitro*. El producto solo se liberó si la selección de células CD34⁺ se inició en un plazo de 12 horas hasta aproximadamente 24 horas desde la finalización de la recolección de médula ósea y solo si se iba a infundir en aproximadamente 48 horas a aproximadamente 72 horas desde la finalización de la recolección de la médula ósea.

Ejemplo 7. Formulación del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que comprende células CD34⁺

35 El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se formuló en 10 ml de solución salina (cloruro sódico al 0,9 %, inyección, USP, Hospira, n.º de cat. 7983-09) suplementado con HSA al 1 % (albúmina humana USP, alfa, n.º de cat. 521303) ("solución de infusión") y al menos 20 % de suero autólogo. Además, puede haber alguna cantidad mínima de materiales (cantidades no determinadas) en el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que se usan y se dejan durante el procesamiento del producto. Estos materiales incluyen: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (D-PBS) (Baxter, n.º de cat. EDR9865), citrato sódico (Baxter/Fenwal, n.º de cat. 4B7867), Hetastarch (Abbott Laboratories, n.º de cat. 0074-7248 - 03), IVIg (Gammagard® inmunoglobulina intravenosa, Baxter, n.º de cat. 060384) y los reactivos en el kit de reactivos para células madre Isolex® 300i (Baxter, n.º de cat. 4R9734) incluyendo anticuerpo monoclonal anti-CD34, agente de liberación de células madre y perlas magnéticas anti-ratón de oveja.

Ejemplo 8. Transporte del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas a la instalación de cateterismo

50 El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que cumplía los criterios de liberación se cargó en una jeringa estéril de 10 cc en un armario de seguridad biológica de clase 100 situado dentro de un entorno aséptico controlado; por ejemplo, como mínimo, una planta de procesamiento de células de clase 100.000; es preferente la clase 10.000, pero no es necesario. El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se suspendió en 10 ml de PBS suplementado con HSA y el recipiente se etiquetó de acuerdo con los criterios de administración. El ensayo clínico se diseñó de modo que tuviera cuatro cohortes de dosificación que consiste en cinco sujetos cada uno en cada cohorte. El primero iba a recibir aproximadamente 5 x 10⁶ células CD34⁺, el segundo aproximadamente 10 x 10⁶ células CD34⁺, el tercero aproximadamente 20 x 10⁶ células CD34⁺ y el cuarto aproximadamente 30 x 10⁶ células CD34⁺. Los sujetos en las cohortes 2-4 con cantidades de células CD34⁺ inadecuadas para cumplir la dosis de la cohorte asignada se añadieron a una cohorte previa a la dosis de células CD34⁺ más alta posible. La jeringa de infusión cargada se unió a una llave de paso de cuatro vías junto con una jeringa de lavado y se tapó; se aplicaron protectores de seguridad para evitar fugas. El aparato de administración se selló en una bolsa doble estéril y se colocó en una caja de transporte segura para su transporte a la instalación de cateterismo cardíaco. Tras la liberación del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas y la asignación de cohortes, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se envió al centro de cateterismo. En algunas realizaciones, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se administró por vía intravascular, es decir, mediante infusión directamente en la arteria relacionada con el infarto. En algunas realizaciones, el producto de células madre

hematopoyéticas quimiotácticas se administró por vía parenteral en el miocardio.

Ejemplo 9. Infusión intracoronaria del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas

5 Tras la notificación del centro de procesamiento de células de que el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se ha liberado para infusión (ver anteriormente), se programó que el sujeto/paciente llegara a la instalación de cateterismo en un momento que coincidiera con la llegada del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas.

10 Se determinaron las enzimas cardíacas (péptido natriurético cerebral (BNP), troponina y CPK MB), hemogramas completos, un panel de bioquímica completo (prueba de la función renal y hepática) y un ECG justo antes de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas. Se registró la evaluación clínica de la etapa de insuficiencia cardíaca según el sistema de clasificación funcional de la Asociación del Corazón de Nueva York (NYHA).

15 Tras la recepción del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas y la liberación final de garantía de calidad (por fax) para infusión, el sujeto fue sometido a cateterismo cardíaco como se ha detallado anteriormente. La arteriografía coronaria se realizó para evaluar la permeabilidad (es decir, el estado de permeable, libre de bloqueo) de la arteria relacionada con el infarto y la trombólisis en el flujo angiográfico del infarto de miocardio (TIMI). Se colocó un catéter con balón sobre un alambre en el segmento con endoprótesis vascular de la arteria relacionada con el infarto. Se puede usar cualquier catéter de dilatación con balón apropiado que tenga un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm compatible con la infusión de producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas. Después del posicionamiento, se retiró el alambre del globo. El aparato de liberación de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se retiró del estuche de transporte.

25 El aparato de liberación estaba en una bolsa estéril y tenía bloques de seguridad unidos a la jeringa de infusión (que contenía el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas) y la jeringa de lavado. El aparato consistió en la jeringa de infusión (que contenía 10 ml del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas) y la jeringa de lavado (que contenía 6 ml de solución de lavado) donde ambas estaban unidas a una llave estéril de cuatro vías. El aparato de liberación 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 en el aparato (para evitar embolias de aire) y el aparato de liberación se fijó a continuación al catéter de dilatación con balón a través de la llave de paso.

35 La administración del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas al sujeto por infusión procedió como sigue. En primer lugar, con la llave de paso abierta entre la jeringa de lavado (6 ml de solución) y la luz central del catéter con balón, se infundió 1 ml de solución de lavado en la luz central del catéter durante 15 segundos. En segundo lugar, se infló el balón a dos atmósferas de presión dentro de la endoprótesis vascular para evitar dañar al endotelio de la arteria coronaria y, después, se ajustó la válvula de la llave de paso para permitir la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas distal al balón inflado (después de retirar el protector). Con el balón inflado, se infundió 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 (para medir y documentar). El balón permaneció inflado para permitir la adhesión de las células CD34⁺ y para evitar el reflujo durante un total de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 3 minutos (incluyendo el tiempo de infusión). Entre las infusiones, el balón permaneció desinflado durante 3 minutos para permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperusión). En general, se requieren 3 infusiones para vaciar la jeringa de infusión. En tercer lugar, al completarse la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas 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. Finalmente, con el balón inflado (de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 3 minutos), los 4 ml de solución de lavado ahora en la jeringa de infusión se infundieron durante un período de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 45 segundos para desalojar cualquier resto de células CD34⁺ de la jeringa y el catéter en la circulación de la IRA. Luego se retiró el catéter.

55 Se realizó una evaluación de la isquemia relacionada con la infusión (flujo sanguíneo inadecuado) durante las primeras 24 horas después de la infusión de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas. Se realizó un ECG aproximadamente a las 12 horas y aproximadamente a las 24 horas y un análisis bioquímico 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 de células madre hematopoyéticas quimiotácticas. La ecocardiografía transtorácica de rutina para evaluar la función ventricular izquierda global y regional se realizó antes del alta los sujetos después de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas.

65 Las visitas de seguimiento adicionales para las evaluaciones de seguridad incluyeron visitas las semanas 1 y 2 después de la administración del producto. Las evaluaciones de las visitas incluyeron una historia médica completa y una exploración física, un ECG, hemogramas completos, panel de bioquímica completa (prueba de función renal y hepática) y medición de marcadores cardíacos séricos (BNP, troponina y CPK MB). La evaluación clínica de la clase

funcional de la NYHA se registró en las semanas 1 y 2.

A las 4 semanas después de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, se realizó un ECG y se determinaron 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 realizó una prueba de esfuerzo en tapiz rodante utilizando un protocolo Bruce de limitación de síntomas.

Aproximadamente 3 meses y aproximadamente 6 meses después de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, se realizó un monitor Holter de 24 horas. Se registró la evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA. Aproximadamente 6 meses después de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, se registró una prueba de esfuerzo en tapiz rodante con limitación de síntomas.

Una evaluación de seguridad aproximadamente a los 12 meses de la infusión de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas incluye una historia médica completa y una exploración física, un ECG, hemogramas completos, panel de bioquímica completa (prueba de función renal y hepática) y medición de marcadores cardíacos séricos (BNP, troponina y CPK MB). Se realiza un monitor Holter de 24 horas y se registra la evaluación clínica de la clase funcional de la NYHA.

Análisis estadístico

En algunas realizaciones se usó un diseño pareado, donde cada sujeto sirve como su propio control. Se analizaron las diferencias entre antes y después del tratamiento, por sujeto, para cada una de las cuatro funciones cardíacas numéricas (es decir, la contractilidad miocárdica; el volumen telesistólico, el volumen telediastólico; y la perfusión). El análisis de regresión lineal se utilizó para evaluar la importancia del aumento de los niveles de dosificación. La hipótesis nula es que la pendiente de la línea de regresión (el nivel de dosificación que sirve como variable independiente y la diferencia de "después" menos "antes" que sirve como variable dependiente) es igual a cero. La potencia de rechazar una hipótesis nula falsa es de 0,68 al nivel de significación alfa de 0,05 para una alta correlación de 0,5 entre la dosificación y la mejora de la función cardíaca. El intervalo de confianza del 95 % sobre la pendiente de la línea de regresión se utilizó para evaluar la importancia médica del aumento del nivel de dosificación. Si la pendiente de la línea de regresión no era significativamente diferente de cero, pero la intersección de la línea de regresión es diferente de cero, todos los grupos de tratamiento se combinaron y se realizó 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.

Las características clínicas y demográficas basales se compararon mediante el grupo de tratamiento usando la prueba t de Student para variables continuas y las pruebas de chi cuadrado para variables categóricas. Las tasas de incidencia de los acontecimientos adversos se compararon entre los grupos de tratamiento utilizando las pruebas de chi cuadrado. Para las mediciones de la eficacia, se compararon las diferencias pareadas de los valores basales a los de seguimiento a 6 meses en la función cardíaca y perfusión miocárdica regional entre los grupos de tratamiento y control usando la prueba t de Student. Las distribuciones de las variables de eficacia por grupo de tratamiento se examinaron con gráficas de representaciones de cajas. En el análisis *a posteriori*, se examinó la influencia de un umbral de dosis sobre la respuesta al tratamiento combinando los sujetos control y la cohorte de 5 millones de células y comparándolos con los sujetos de la cohorte de 10 y 15 millones de células utilizando la prueba t de Student. Además, se examinó el impacto de las características celulares sobre las medidas del resultado. Para cada uno de los pares de las variables de interés, el coeficiente de correlación de Pearson producto-momento (r) se calculó junto con el correspondiente valor de p.

El error de tipo 1 (alfa) se estableció en 0,05 para probar la hipótesis nula con la prueba de cola. Dado que los análisis de los criterios de valoración secundarios fueron de naturaleza exploratoria, no se realizó ningún ajuste para múltiples comparaciones a los errores alfa informados. No se hicieron imputaciones a valores faltantes en ninguna de las variables analizadas y los pacientes que se retiraron del estudio fueron censurados en el punto de retirada. Todos los programas y análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS versión 9.1 (Carey, Carolina del Norte).

Un grupo concurrente (controles no tratados) que cumple los requisitos de elegibilidad pero que no reciben células CD34⁺ se evaluó similar al grupo tratado y se evaluó la mejora significativa de la función cardíaca/perfusión. Cada centro de estudio alternó la acumulación de controles tratados y no tratados. Se usó una moneda al aire para determinar la secuencia de sujetos inicial (tratada o no tratada) en cada centro. Se realizó una comparación de los resultados entre los grupos tratados y no tratados. El laboratorio central no conocía el tratamiento o el no tratamiento.

Se realizó una evaluación para determinar si existía una correlación entre el resultado clínico y el contenido celular (CD34⁺) y/o crecimiento de colonias *in vitro* (UFC-GM, UFC-GEMM, BFU-E), la movilidad de CXCR-4 y la expresión del antígeno de superficie CXCR-4 y/o VEGF. [Véase la figura 4 y la discusión a continuación].

Como estaba previsto, un total de 20 sujetos recibirían el producto de células hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita. Había cuatro cohortes de dosis (aproximadamente 5×10^6 , aproximadamente 10×10^6 ,

aproximadamente 20×10^6 y aproximadamente 30×10^6 células CD34⁺. Si el contenido del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas en cualquier sujeto no era suficiente para la cohorte asignada, se reasignó a dicho sujeto a una cohorte previa a la dosis más alta posible. Los sujetos con menos de 5×10^6 células CD34⁺ disponibles para la infusión se retiraron del estudio, no sufrieron cateterismo de repetición y no se contaron como parte del grupo de estudio de 20 sujetos. Además, si el producto de células hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita no cumplía los criterios de liberación, el sujeto no recibió el producto celular y no se contó como candidato de estudio para su reemplazo por el sujeto siguiente. En cualquier grupo de dosificación de cohortes, si un sujeto experimentó una toxicidad inesperada aguda (es decir, inmediata a aproximadamente 7 días después de la infusión) considerada como (probablemente) un resultado de la infusión de producto celular, se suspendió el aumento escalonado de la dosis y se agruparon 3 sujetos adicionales a ese nivel de dosis. Si no se observó otra toxicidad inesperada, entonces, se reanudó el aumento escalonado de la dosis; sin embargo, no se superó el total de 20 sujetos. Si se produjo otra toxicidad a ese nivel de dosis entonces, se agruparon todos los pacientes posteriores al siguiente nivel de dosis más bajo.

El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita no se administró a ningún sujeto en la cohorte de dosis más alta hasta que todos los sujetos de la cohorte de dosis anterior habían 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 proceso de fabricación de la recolección de médula ósea mini (MMH);
- (2) Evaluar la estabilidad del producto de MMH entrante y el producto hematopoyético saliente;
- (3) Evaluar la tolerancia de diámetro interno y la seguridad de los catéteres;
- (4) Evaluar la compatibilidad del producto celular con los catéteres destinados a su uso en el estudio; y
- (5) Evaluar la idoneidad de utilizar el sobrenadante del producto celular hematopoyético final para representar el producto celular hematopoyético final para pruebas de estabilidad.

Estudio 1: Optimizar el proceso de fabricación de la recolección de médula ósea mini (MMH)

Se evaluó el efecto de variables clave de fabricación sobre el rendimiento de células CD34 viables a partir de productos de médula ósea representativos. Un total de seis (6) donantes voluntarios mayores de 45 años de edad (basado en un intervalo de 45-57) y tres menores de 30 años de edad (basado en un intervalo de 21-28) acordaron donar un promedio de 45 ml (basado en un intervalo de 31 ml-54 ml) de médula ósea y proporcionaron el consentimiento informado por escrito para el procedimiento. La técnica de aspiración de médula empleada fue idéntica a la que se ha de realizar para la escala clínica de MMH (véase el Ejemplo 3, anterior). Como se muestra en la Tabla 2, los recuentos celulares de células nucleadas (NC) y células CD34⁺ de células derivadas de recolección de médula ósea mini ("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 MMH.

| Donante | Grupo de edad del donante | | | | | |
|---------|---------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------------|
| | Más de 45 (45-57) | | | Por debajo de 30 (23-28) | | |
| | Volumen de MMH (ml) | Viabilidad (%) | Células CD34 (10^5 por ml) | Volumen de MMH (ml) | Viabilidad (%) | Células CD34 (10^5 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 celular promedio de los productos de médula ósea de donantes mayores (N = 6) fue de $28,4 \times 10^6$ (basado en un intervalo de $15,8 \times 10^6$ - $49,5 \times 10^6$) células nucleadas por ml ["NC/ml"], con una viabilidad promedio, determinada mediante exclusión del colorante 7-AAD y citometría de flujo, de 90,42 % (basado en un intervalo de 80,95 % -98,21 %) y contenido de CD34⁺ de $3,06 \times 10^5$ / ml (basado en un intervalo de $1,27 \times 10^5$ / ml - $5,58 \times 10^5$ / ml). En el grupo de sujetos más jóvenes (N = 3), el recuento de células promedio recogidas de la aspiración de

médula ósea fue de $46,2 \times 10^6$ NC/ml (basado en un intervalo de $39,9 \times 10^6$ NC/ml - $50,6 \times 10^6$ NC/ml), con una viabilidad promedio de 7-AAD de 93,5 % (basada en un intervalo de 87,17 % - 96,90 %) y un contenido total de CD34⁺ de $8,5 \times 10^5$ / ml (basado en un intervalo de $5,99 \times 10^5$ células CD34⁺/ ml - $11,60 \times 10^5$ células CD34⁺/ ml).

5 Reducción de glóbulos rojos y selección de CD34

Tabla 3: Recuperación de células CD34⁺ tras la reducción de RBC de MMH de los donantes del grupo de mayor edad (4557).

| | Donante | | | | | |
|--|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Promedio |
| Método para la reducción de RBC | Hetastarch | Capa leucocitaria | Capa leucocitaria | Capa leucocitaria | Capa leucocitaria | - |
| % de células CD34 ⁺ en MMH: Pre-reducción de RBC | 1,09 | 1,64 | 1,63 | 1,45 | 1,99 | 1,58 |
| % de células CD34 ⁺ en MMH: Post-reducción de RBC | 1,33 | 1,55 | 1,51 | 1,61 | 1,84 | 1,57 |
| Recuperación de células CD34 ⁺ después de la reducción de RBC (%) | 65,68 | 92,36 | 80,66 | 78,79 | 81,67 | 79,83 |

10 Como se muestra en la Tabla 3, después de la reducción de los glóbulos rojos de los productos de médula ósea derivados de MMH recolectados de los donantes de más edad, se recuperó un promedio de 79,83 % (basado en un intervalo de 65,68 % a 92,36 %) de las células CD34 de la MMH inicial. No hubo diferencias significativas entre la pureza inicial de las células CD34 (1,58 %, en el intervalo de 1,09 % - 1,99 %) y la de después de la reducción de glóbulos rojos (1,57 %, basado en un intervalo de 1,33 % - 1,84 %).

Método de ensayo para cuantificar la quimiotaxis

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

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

| | Donante | | | | | |
|---|---------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Promedio |
| Tiempo de almacenamiento (horas) a 4 °C-8 °C | 0 | 0 | 0 | 12 | 10,50 | - |
| Recuperación de células CD34 ⁺ (%) | 32,36 | 29,09 | 15,31 | 43,60 | 40,20 | 32,11 |
| Pureza de células CD34 ⁺ (%) | 76,76 | 73,64 | 71,66 | 72,52 | 72,01 | 73,32 |
| Viabilidad de las células CD34 ⁺ | 98,49 | 93,80 | 97,38 | 98,28 | 98,39 | 97,27 |
| Actividad migratoria de CXCR-4 de células CD34 ⁺ (%) | 22,10 | 2,60 | 22,00 | 19,90 | 19,70 | 17,26 |
| UFC hematopoyéticas/100 células CF34 ⁺ cultivadas | 27,5 | 25,0 | 18,9 | 17,0 | 21,00 | 21,9 |

Como se muestra en la Tabla 4, después de la selección de CD34 utilizando el sistema Isolex, que incluye

Dynabeads^(R) inmunomagnéticos y mAb anti-CD34, se recuperó un promedio de 32,11 % (basado en un intervalo de 15,31 % a 43,60 %) de las células CD34 con una pureza promedio de 73,32 % (basado en un intervalo de 71,66 % a 73,64 %) y un promedio de viabilidad de 97,27 % (basado en un intervalo de 93,80 % - 98,49 %). Además, estas células CD34⁺ mostraron un promedio de 17,26 % (basado en un intervalo de 2,60 % - 22,10 %) de capacidad migratoria de CXCR-4 inmediatamente después de la selección y fueron capaces de generar colonias hematopoyéticas (21,89 colonias/100 células CD34⁺ (sobre la base de un intervalo de 17,0 colonias/100 células CD34⁺ sembradas en placas - 27,5 colonias/100 células CD34⁺ sembradas en placas) en cultivo de MethoCult.

Estudio 2: Evaluación de la estabilidad de la recolección mini de médula ósea entrante y del producto de células hematopoyéticas quimiotácticas saliente.

Se realizó una serie de experimentos utilizando voluntarios sanos, con el fin de evaluar la estabilidad de la MMH entrante y del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas saliente de la invención descrita. La evaluación de la viabilidad funcional de los productos entrantes y salientes se evaluó mediante la viabilidad celular (7-AAD), la migración de células CD34⁺ mediada por SDF-1/CXCR-4⁺ y la capacidad para formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (capacidad de formación de colonias UFC).

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

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

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

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

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

Como se muestra en la Tabla 5, las células tCD34⁺ aisladas del producto de células madre hematopoyéticas quimiotáctica tenían una viabilidad promedio de 97,24 % (basado en un intervalo de 96,90 % -97,59 %) y una capacidad migratoria promedio mediada por CXCR-4 de 7,60 % (basado en un intervalo de 7,50 % --7,70 %). Como se muestra en la Tabla 6, tras el almacenamiento durante n promedio de 26,3 horas (basado en un intervalo de 26,0 h a 26,5 h), estas células tenían una viabilidad promedio de 96,81 % (basado en un intervalo de 96,39 % a 97,22 %) y una capacidad migratoria promedio mediada por CXCR-4 de 4,75 % (basado en un intervalo de 4.50 % - 5.00 %). Adicionalmente, las células aún mantenían su capacidad para generar colonias hematopoyéticas *in vitro*.

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

| | Donante | | |
|---|---------|-------|----------|
| | 1 | 2 | Promedio |
| Viabilidad de las células CD34 ⁺ (%) | 97,22 | 96,39 | 96,81 |
| Actividad migratoria de CXCR-4 de células CD34 ⁺ (%) | 4,50 | 5,00 | 4,75 |

| | Donante | | |
|--|---------|-------|----------|
| | 1 | 2 | Promedio |
| UFC hematopoyéticas/100 células CD34 ⁺ cultivadas | 28,00 | 14,00 | 21,00 |

Por tanto, un promedio de 13,3 horas (basado en un intervalo de 13,0 h - 13,5 h) después de la selección de células CD34⁺, que representa 26,0-26,5 horas después de la MMH, la población de células CD34⁺ tuvo una viabilidad promedio del 97,24 % (basada en un intervalo de 96,90 % a 97,59 %), con una capacidad migratoria promedio mediada por CXCR-4 de 7,60 % (basada en un intervalo de 7,50 % -7,70 %). A un promedio de 26,3 horas (basado en un intervalo de 26,0 h - 26,5 h) después de la MMH, la viabilidad promedio de las células fue de 96,81 % (basado en un intervalo de 96,39 % - 97,2 %) y mantuvo una capacidad migratoria mediada por CXCR-4 del 4,75 % (basada en un intervalo de 4,50 % - 5,00 %).

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

En un experimento posterior, se recogieron cuatro (4) productos de MMH (A - D) y se almacenaron a 4 °C durante un promedio de 12,8 horas (basado en un intervalo de 12,5 h - 13,0 h) antes de aislar las células CD34⁺ mediante el procedimiento Isolex. Este grupo, que representa el grupo de "12 horas en la fecha" (lo que significa que el producto se formuló dentro del tiempo en fecha de aproximadamente 12 horas), se evaluó para determinar 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 recolección de MMH. Los datos, resumidos en las Tablas 7-9, demuestran que después de la MMH, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que comprende células CD34⁺ enriquecidas mantienen 1) alta viabilidad (> 90,0 % de viabilidad promedio, 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.

Tabla 7: Viabilidad de las células CD34⁺ en función del tiempo después de MMH: 12 horas de entrada y 48 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la MMH).

| Tiempo (h) después de LA MMH (SD) | Viabilidad de las células CD34 ⁺ (%) | | | | |
|-----------------------------------|---|-------|-------|-------|---------------|
| | A | B | C | D | Promedio (SD) |
| | 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) |

la Tabla 8 muestra la migración de células CD34⁺ mediada por SDF-1/CXCR-4 (% de células CD34⁺ migrantes) en función del tiempo después de la MMH: 12 horas de entrada y 48 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH). Con el fin de determinar el impacto del tiempo después de la MMH sobre la capacidad migratoria de las células CD34⁺, se consideró el punto de tiempo "X" como el punto de referencia, ya que se determinó que representaba el punto de tiempo más temprano después de la MMH donde se esperaba devolver las células al sujeto en una formulación acabada. La actividad migratoria restante en los siguientes puntos de tiempo (Y = 33 horas, Z = 48 horas) se calculó como el porcentaje de capacidad migratoria que quedaba después del punto de tiempo de 24 horas (X).

Tabla 8: Migración de células CD34⁺ mediada por SDF-1/CXCR-4 (% de células CD34⁺ migrantes) en función del tiempo después de la MMH: 12 horas de entrada y 48 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH).

| Tiempo (h) después de la MMH | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | | | |
|------------------------------|---|--------|--------|--------|---------------|
| | A | B | C | D | Promedio (SD) |
| 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) |

| Tiempo (h) después de la MMH | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | | | Promedio (SD) |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|------------------|
| | A | B | C | D | |
| 33 (Y) | 21,80 | 10,50 | - | - | 16,15 (7,99) |
| *% restante | 109,00 | 56,76 | - | - | S2.8S (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) |

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

$$@ = (Z \div X) \times 100 \%$$

La Tabla 9 muestra el número de unidades formadoras de colonias (UFU) por 100 células iCD34⁺ como una función del tiempo: 12 horas de entrada y 48 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH).

5

Tabla 9: Número de unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 células CD34⁺ viables sembradas en placas en función del tiempo después de la MMH

| Tiempo (h) después de la MMH | N.º de UFC por 100 células CD34 ⁺ viables sembradas en placas | | | | Promedio (SD) |
|------------------------------|--|-------|-------|-------|---------------|
| | A | B | C | D | |
| 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) |

10 En un intento de extender tanto los parámetros de estabilidad tanto de la fecha de entrada como de la fecha de salida para el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita que comprende células CD34⁺ desde 12 horas (fecha de entrada) y de 48 horas (fecha de salida) (12/48), respectivamente, a 24 horas (fecha de entrada) y 72 horas (fecha de salida) (24/72), respectivamente, las células CD34 se purificaron aproximadamente 12 horas después de la recolección de MMH (12 horas de fecha de entrada) y aproximadamente 24 horas después de la recolección de MMH (24 horas fecha de entrada) y se analizaron para determinar la viabilidad funcional a aproximadamente 48 horas y aproximadamente 72 horas de tiempo total desde la MMH al tiempo de la infusión de prueba/prevista (48 horas de salida y 72 horas de fecha de salida, respectivamente). Específicamente, se evaluaron las características de viabilidad funcional de dos productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas/MMH de la invención descrita a las 48 horas y 72 horas. Los datos resultantes se compararon adicionalmente con los mismos índices derivados en los puntos de tiempos previos de 12/48 (Tablas 7-9).

25 Las Tablas 10-12 muestran que a las 33 horas (basado en $32,5 \pm 0,71$, (N= 2), 48 horas (basado en un punto de datos a 49 horas) y a las 72 horas (basado en $72,5h \pm 0,71$, N = 2), las células CD34⁺ aisladas del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita mantuvieron 1) una viabilidad de aproximadamente el 90 % (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).

30 Tabla 10: Viabilidad de las células CD34⁺ en función del tiempo después de MMH: 24 horas de entrada y 72 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH).

| Tiempo (h) después de la MMH | Viabilidad de las células CD34 ⁺ (%) | | Promedio (SD) |
|------------------------------|---|-------|---------------|
| | A | B | |
| 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 población de células CD34⁺ migrantes en función del tiempo después de la MMH): 24 horas de entrada y 72 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH).

| Tiempo (h) después de la MMH (SD) | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | |
|-----------------------------------|---|--------|----------------------|
| | A | B | Promedio (intervalo) |
| 33 | 8,20 | 14,05 | 11,13 (2,93) |
| % restante | 100,00 | 100,00 | 100,00 (0,00) |

5

| Tiempo (h) después de la MMH (SD) | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | |
|-----------------------------------|---|--------|----------------------|
| | A | B | Promedio (intervalo) |
| 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 (32,64) |

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

10 Tabla 12: Número de UFC por 100 células CD34⁺ viables sembradas en placas en función del tiempo después de la MMH: 24 horas de entrada y 72 horas de salida (todos los puntos de tiempo medidos a partir de la finalización de la MMH).

| Tiempo (h) después de la MMH (SD) | N.º de UFC por 100 células CD34 ⁺ viables sembradas en placas | | |
|-----------------------------------|--|-------|----------------------|
| | A | B | Promedio (intervalo) |
| 33 | 26,00 | 28,50 | 22,25 (1,25) |
| 48 | - | 16,80 | 16,80 (-) |
| 72 | 14,50 | 27,50 | 21,00 (6,5) |

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

20

Tabla 13: Experiencia 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 ⁺ (%) | | | | |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|---------------|
| | A | B | C | D | Promedio (SD) |
| 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) |

25

Tabla 14: Experiencia del producto clínico: Migración de células CD34⁺ mediada por SDF-1/CXCR-4 (% de células CD34⁺ migrantes en función del tiempo después de la MMH).

| Tiempo (h) después de la MMH | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | | | Promedio (SD) |
|------------------------------|---|-------|-------|-------|------------------|
| | A | B | c | D | |
| 12 (X) | 14,31 | 13,08 | 9,74 | 31,73 | 17,97 (11,34) |
| % restante | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 (0) |

| Tiempo (h) después de la MMH | Células CD34 ⁺ migrantes (%) | | | | Promedio (SD) |
|------------------------------|---|-------|-------|---|------------------|
| | A | B | C | D | |
| 33 (Y) | - | 6,17 | - | - | 6,17 |
| *% restante | - | 47,17 | - | - | 47,17 |
| 48 (Y) | - | 4,88 | 8,21 | - | 6,55 (2,35) |
| *% restante | - | 37,30 | 84,20 | - | 60,70 (23,40) |
| 72 (Y) | - | 3,7 | 6,6 | - | 5,15 (2,05) |
| *% restante | - | 28,29 | 21,19 | - | 24,74 (3,55) |

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

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

10 Tabla 15: Experiencia del producto clínico: Número de UFC por 100 células CD34⁺ viables sembradas en placas en función del tiempo después de la MMH.

| Tiempo (h) después de la MMH | N.º de UFC por 100 células CD34 ⁺ viables sembradas en placas | | | | Promedio (SD) |
|------------------------------|--|-------|-------|-------|---------------|
| | A | B | C | D | |
| 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 Según estos datos, la extensión de la entrada a 24 horas (desde 12 horas) y la salida a 72 horas (desde 48 horas) para el producto clínico de células CD34⁺ de la invención descrita está justificada.

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

20 **Estudio 3: Seguridad del catéter.**

25 La viabilidad y la eficacia potencial del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita que comprende células CD34⁺ 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 tenga un diámetro interno de al menos 0,36 mm puede ser eficaz para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención descrita.

30 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 concentraciones altas de células y las perfusiones repetidas afectan negativamente a la viabilidad celular, a la recuperación celular o a la integridad del catéter. Se utilizaron progenitores de sangre periférica no movilizados para obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Se evaluaron los catéteres para la infusión del producto celular de la invención descrita que comprende células CD34⁺ a través de la IRA. Ninguno de los catéteres de 0,36 mm de diámetro interno analizados afectó negativamente a la viabilidad celular seleccionada de CD34⁺, el crecimiento en cultivo o la movilidad en ensayos de CXCR-4.

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

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

5 Como se muestra en la Tabla 16, en todos los catéteres probados, la viabilidad promedio de las células CD34⁺ estaba en o por encima del 70 % después del paso a través de los catéteres.

10 Para demostrar que la infusión del producto de células CD34⁺ no plantea ningún fallo de seguridad del catéter utilizado y que un porcentaje significativo de producto celular no se adhiere a las paredes interiores del catéter, los catéteres se expusieron a infusiones repetidas de un producto de células CD34⁺ con una concentración celular considerablemente mayor que la utilizada clínicamente. Se evaluaron cuatro marcas de catéteres (Sprinter, Voyager, Maverick y Raptor) usando 5 catéteres de cada tipo. Se utilizaron productos de aféresis no movilizados para obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Una concentración de células mayor que tres veces la planeada como dosis de tratamiento para el ensayo, es decir, 160 x 10⁶ células nucleadas que contienen células CD34⁺ en 10 ml de la solución de infusión, se pasó dos veces a través de cada catéter. La recuperación promedio de 15 células CD34⁺ fue del 100,59 % (basado en un intervalo de 76,99 % a 228,70 %) después del paso a través de los catéteres.

20 Se examinó la integridad de los veinte catéteres usando una prueba de fugas de colorante de azul de metileno después de dos perfusiones con las células nucleadas. No hubo evidencia de fugas y los puntos de contacto y, tras la inspección, las puntas del catéter fueron normales.

25 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 de catéter y hacer entre los catéteres probados y fue independiente de la cantidad de tiempo que las células se almacenaron antes del procesamiento y/o después de la selección de células CD34⁺ y antes de la perfusión, lo que da como resultado una formulación final que contiene una recuperación promedio del 96,0 % (intervalo 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 promedio de las células fue del 96,5 % (intervalo 92,5 % - 98,6 %, N=16); las células mantuvieron la capacidad migratoria de CXCR-4 (datos no mostrados) y su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (promedio de 25,8 UFC/100 células sembradas en placas (intervalo 30 21,0 % -30,5 %)

Tabla 17a: Recuperación de células CD45 y viabilidad después de su infusión a través de los catéteres.

| Catéter | Condición | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | Promedio | |
|----------------------------------|---------------------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|-----------------------|---------------------|
| | | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab |
| Raptor | Tras 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 %) |
| | Tras 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 | Tras 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 %) |
| | Tras 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 | Tras 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 %) |
| | Tras 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 | Tras 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 %) |
| | Tras 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 %) |
| Promedio de todos los catéteres: | | | | | | | | | | 86,36 % | 1,26 % | | |

^a Recuperación de células CD45⁺ = (n.º de células CD45 tras la infusión ÷ n.º de CD45 antes de la infusión) x 100 %

^b Reducción de la viabilidad de las células CD45⁺ = [1 - (% de viabilidad de las células CD45⁺ tras la infusión ÷ % de viabilidad de las células CD45 antes de la infusión)] x 100 %

Tabla 17b: Recuperación de células CD34 y viabilidad después de su infusión a través de los catéteres.

| Cáteter usado | Condición | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | Promedio | |
|----------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|-------------------|---------------|
| | | Recuperación ^a | R'd viab ^b | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación | R'd viab | Recuperación (SD) | R'd viab (SD) |
| Raptor | Tras la 1ª infusión | 116,49 % | -3,48 % | 121,62 % | 12,91 % | 110,89 % | -7,91 % | 97,55 % | -8,06 % | 96,14 % | -3,97 % | 108,54 % | -2,10 % |
| | Tras la 2ª infusión | 91,66 % | 1,53 % | 85,18 % | -23,26 % | 122,47 % | 1,71 % | 111,33 % | 9,21 % | 98,96 % | 1,78 % | (45,46 %) | (7,79 %) |
| Sprinter | Tras la 1ª infusión | 89,19 % | - | 83,34 % | 11,83 % | 102,72 % | -3,29 % | 84,57 % | -8,39 % | 88,65 % | -0,28 % | 89,69 % | -7,69 % |
| | Tras la 2ª infusión | 103,52 % | 14,66 % | 99,82 % | 0,01 % | 82,11 % | -0,89 % | 114,87 % | 12,05 % | 100,45 % | 4,84 % | (37,26 %) | (6,16 %) |
| Voyager | Tras la 1ª infusión | 81,02 % | - | 96,08 % | -5,84 % | 90,16 % | -2,00 % | 82,73 % | 4,82 % | 89,32 % | 14,46 % | 87,86 % | -0,85 % |
| | Tras la 2ª infusión | 106,48 % | 15,67 % | 81,66 % | 1,74 % | 95,04 % | 4,58 % | 94,81 % | -0,75 % | 91,01 % | 10,23 % | (36,28 %) | (10,13 %) |
| Maverick | Tras la 1ª infusión | 76,99 % | - | 101,79 % | -10,21 % | 98,62 % | 11,46 % | 112,58 % | -4,96 % | 96,05 % | 0,18 % | 97,21 % | -7,39 % |
| | Tras la 2ª infusión | 228,70 % | -1,05 % | 88,66 % | 2,65 % | 103,35 % | 9,70 % | 89,35 % | 6,31 % | 117,63 % | -5,12 % | (41,34 %) | (5,34 %) |
| Promedio de todos los catéteres: | | | | | | | | | | | | 100,59 % | -1,68 % |

^aRecuperación de células CD34⁺ = (n.º de células CD34 tras la infusión ÷ (n.º de CD34 antes de la infusión)) x 100 %

^bReducción de la viabilidad de las células CD34⁺ = [1-(viabilidad de células CD34⁺ en % tras la infusión ÷ viabilidad de células CD34⁺ en % antes de la infusión)] x 100 %

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

10 Estudio 4: Compatibilidad del producto celular con los catéteres

Para probar adicionalmente la compatibilidad del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que comprende células CD34⁺ con cada uno de los catéteres que pueden utilizarse para la entrega del producto celular en el estudio, los productos celulares se analizaron después de múltiples pasos 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 del tratamiento.

A las 48 horas de la recolección de MMH, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que comprende un intervalo de aproximadamente 5,73 x 10⁶ células CD34⁺ a aproximadamente 21,10 x 10⁶ células CD34⁺ (es decir, dosis que reflejan la cohorte de tratamiento) obtenidas de donantes individuales se infundió secuencialmente a través de tres catéteres de la misma marca, un tipo de catéter para cada donante (Sprinter, Voyager o Maverick) y el producto celular evaluado para la recuperación de células CD34⁺, la formación de colonias y la viabilidad.

Como se muestra en la Tabla 18, se recuperaron las células viables de formación de colonias en todos los experimentos para los tres catéteres analizados (recuperación de células 99 %, 99 % y 106 %).

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

| Condición | Parámetro | Cáteter usado | | |
|-------------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Sprinter | Voyager | Maverick |
| Preinfusión | Rendimiento de células CD34 ⁺ | 9,72 x 10 ⁶ | 2,11 x 10 ⁷ | 5,73 x 10 ⁶ |
| Después del 1 ^{er} catéter | Recuperación de células CD34 ⁺ | 111 % | 103 % | 99 % |
| Después del 2 ^o catéter | Recuperación de células CD34 ⁺ | 94 % | 104 % | 97 % |
| Después del 3 ^{er} catéter | Recuperación de células CD34 ⁺ | 99 % | 99 % | 106 % |
| | Esterilidad (microbios aerobios y anaerobios) | Negativo | Negativo | Negativo |

Como se muestra en la Tabla 19, la viabilidad promedio de las células CD34⁺ después de pasar a través del tercer catéter fue de 94,000 % (basado en un intervalo de 93,55 % -94,40 %) frente al 96,01 % (basado en el intervalo de 94,18 % -97,93 %) del producto celular de preinfusión.

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

| Condición | Viabilidad de las células CD34 ⁺ | | | |
|-------------------------------------|---|---------|----------|----------|
| | Sprinter | Voyager | Maverick | Promedio |
| Preinfusión | 94,18 % | 95,91 % | 97,93 % | 96,01 % |
| Después del 1 ^{er} catéter | 94,73 % | 96,31 % | 95,45 % | 95,50 % |
| Después del 2 ^o catéter | 95,34 % | 95,72 % | 95,01 % | 95,36 % |
| Después del 3 ^{er} catéter | 93,55 % | 94,40 % | 94,04 % | 94,00 % |

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

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

| Condición | UFC por 100 células CD34 ⁺ cultivadas | | |
|--|--|---------|----------|
| | Sprinter | Voyager | Maverick |
| Preinfusión | 30,5 | 11,5 | 11,0 |
| Después del 1 ^{er} catéter | 22,0 | 14,0 | 22,0 |
| Después del 2 ^o catéter | 20,5 | 4,0 | 19,0 |
| Después del 3 ^{er} catéter | 24,0 | 5,0 | 18,0 |
| Recuperación del producto preinfundido tras el 3 ^{er} catéter | 78,69 % | 43,47 % | 163,64 % |
| Recuperación promedio | 95,27 % | | |

15 Para determinar el efecto de la perfusión del catéter sobre la movilidad de las células CD34⁺ y su capacidad para crecer en cultivo, se llevó a cabo una serie de experimentos en los que las células de MMH obtenidas de donantes sanos se almacenaron a 4° C durante 12 o 24 horas antes del inicio del procesamiento Isolex. El producto de células CD34⁺ aislado que se había almacenado durante aproximadamente 12 horas antes del procesamiento Isolex, después se almacenaron 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 evaluaron la movilidad de SDF-1/CXCR4 y el crecimiento de UFC antes y después de la perfusión a través de un catéter de balón cardíaco de 0,36 mm de diámetro interno (d.i.). De manera similar, las células que se almacenaron antes del
20 procesamiento Isolex durante 24 horas se almacenaron después a 4 °C hasta que habían transcurrido 48 horas desde el final del procesamiento Isolex, durante un total de 72 horas, y después se evaluaron.

25 Los resultados de la Tabla 21 demuestran que ni la movilidad de células mediadas por CD34⁺ CXCR-4 ni la capacidad de la célula para crecer en cultivo en ninguno de los puntos de tiempo analizados se vieron afectadas de forma adversa por la perfusión a través de un catéter con un diámetro interno de al menos 0,36 mm.

30 Tabla 21: 12 entrante/ 48 saliente y 48 horas entrante/72 horas saliente de la MMH: Movilidad de SDF-1/CXCR4 (% de población de células CD34⁺ que han migrado) y UFC (por 100 células CD34⁺ viables sembradas en placas) antes de la perfusión en catéter ("PRE") y después de la perfusión en catéter ("POST").

| Tiempo (h) después de la MMH entrante/saliente | Movilidad SDF-1/ CXCR4 (%) // n.º de UFC por 100 células CD34 ⁺ viables sembradas en placas | | | | |
|--|--|------------|------------|----------|--------------|
| | 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 |

Efecto estabilizante del suero

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

5 Como se muestra en la Tabla 22, no se observó actividad migratoria de CXCR-4 para todas las muestras analizadas, incluidas las muestras previas a la infusión del catéter cuando la composición que comprende un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas se formuló sin suero.

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

| Condición | Migración (%) | | |
|-------------------------------------|---------------|---------|----------|
| | Sprinter | Voyager | Maverick |
| Preinfusión | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| Después del 1 ^{er} catéter | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Después del 2 ^o catéter | 0,0 | 0,0 | 0,1 |
| Después del 3 ^{er} catéter | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

15 Las Figuras 2 y 3 ilustran además que las células CD34⁺ seleccionadas con Isolex conservan su capacidad migratoria más tiempo cuando se formulan en presencia de suero humano. Después del procesamiento Isolex, el producto de células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea que comprende células CD34⁺ se formuló en (1) solución salina tamponada con fosfato (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, sin Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Baxter n.º de cat. EDR9865) ("PBS") que contiene seroalbúmina humana 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 seroalbúmina humana al 1 %, 25 U/ml de heparina sódica y (aproximadamente 0 % o aproximadamente 10 %) de suero autólogo. Se evaluó la capacidad migratoria de las células CD34⁺ mediada por SDF-1/CXCR-4 en diferentes momentos durante el almacenamiento del producto final (a 2 °C-8 °C) y después de pasar las células a través del catéter a la misma velocidad y duración que la prevista por el protocolo clínico. Ninguna de estas formulaciones afectó a la viabilidad de células CD34⁺ o la recuperación de células CD34⁺ después de haberlas pasado a través del catéter.

20 Independientemente de si los productos de células hematopoyéticas quimiotácticas que comprenden células CD34⁺ seleccionadas (i) se formuló en suero con PBS o en suero-solución salina y (ii) se hizo pasar a través del catéter inmediatamente o se pasó a través del catéter después de un intervalo de almacenamiento de prueba de estabilidad prolongado de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C, mantuvieron un promedio de la viabilidad de 96,6 % (intervalo de 92,5 % - 98,6 %) y una capacidad migratoria promedio mediada por CXCR-4 de 11,4 % (intervalo 2,4 % - 30,6 %), representando un tiempo total desde la recolección hasta el análisis de movilidad de hasta 48 horas.

30 Como se muestra en la figura 2, panel (a), las células formuladas en PBS solo a aproximadamente 25 horas retenían aproximadamente el 10 % de su capacidad migratoria de CXCR-4, que descendía a cerca de 0 aproximadamente a las 48 horas. Como se muestra en el panel (b), las células formuladas en solución salina normal solo retenían poca, si es que hay, o nada de su capacidad migratoria. Como se muestra en los paneles (c) y (d), las células formuladas con PBS que contenía al menos aproximadamente 10 % de suero retenían aproximadamente el 10-15 % de su capacidad migratoria hasta aproximadamente 55 horas (c), mientras que las células formuladas con solución salina y al menos aproximadamente 10 % de suero retenían aproximadamente el 20 % de su capacidad migratoria hasta aproximadamente 50 horas. Como se muestra en los paneles (e) y (f), las células retenían una mayor capacidad migratoria durante más tiempo en PBS suplementado con concentraciones aún más altas de suero.

45 Como se muestra en la figura 3, el producto de la invención descrita que comprende células CD34⁺ seleccionadas cuando se formuló en 10 % de suero, conservó el 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 recolección, respectivamente. La Figura 3 muestra además que el producto de la invención descrita que comprende células CD34⁺ seleccionadas, cuando se formuló en 20 % de suero retuvo el 18,25 %, 10,25 %, 17 % y 11 % de su capacidad migratoria mediada por CD34⁺CXCR4 aproximadamente 24, aproximadamente 32, aproximadamente 48 y aproximadamente 56 horas después de la recolección, respectivamente. La expresión "cantidad estabilizante" como se usa en el presente documento, 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 la capacidad de formación de colonias hematopoyéticas.

55

Estudio 5: Pruebas de esterilidad del producto final

Debido al rendimiento limitado de células CD34⁺ obtenidas a partir de 300 ml MMH, se evalúa la esterilidad final del producto celular utilizando el sobrenadante eliminado de la formulación del producto final con el fin de preservar el producto celular para infusión. Las muestras de sobrenadantes se cargan en las jeringas de una manera idéntica a la utilizada para cargar el producto celular en las jeringas usadas para infusión (véase anteriormente).

Para demostrar que tal muestra es representativa de la formulación de 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 23). Después de la centrifugación, se evaluó la esterilidad de las fracciones de sedimento celular y de sobrenadante no celular utilizando ensayos aeróbicos y anaerobios según la USP.

Tabla 23: Bacterias y hongos utilizados para el estudio de la esterilidad. Cada vial de microorganismo de origen preparado por entornos microbiológicos contenía 400 microbios por ml, pero el número de UFC derivadas de cada especie es variado.

| Microbio | N.º 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>C. albicans</i> | 400 | 62 | 3 |
| <i>B. subtilis</i> | 400 | 349 | 17 |

Como se muestra en la Tabla 24, tanto la fracción de sedimento celular como las fracciones de suspensión de todas las muestras analizadas mostraron sobrecrecimiento de los microorganismos inoculados, mientras que los controles no inoculados no mostraron crecimiento. Adicionalmente, no se observó ninguna tasa de crecimiento diferencial aparente entre la prueba de las fracciones de sedimento celular y las fracciones de suspensión para todos los microorganismos analizados. Las muestras tomadas antes de cada etapa del procedimiento de procesamiento y después de la perfusión final a través de los catéteres resultaron todas negativas para la contaminación microbiana.

Tabla 24: Ensayo de esterilidad de 14 días de muestras de células nucleadas (NC) inoculadas con especies específicas de microorganismos (400 microbios en una muestra de NC de 21 ml).

| Muestra con microbio inoculado | Tipo de medio | Fracción de la muestra | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 |
|--------------------------------|------------------|------------------------|----------|----------|----------|
| <i>C. sporogenes</i> | FTM ^a | 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 ^b | 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 |

| Muestra con microbio inoculado | Tipo de medio | Fracción de la muestra | Prueba 1 | Prueba 2 | Prueba 3 |
|---|---------------|------------------------|----------|----------|----------|
| 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: Sin microbios | FTM | Suspensión celular | Negativo | | |
| Control negativo: Sin microbios | TSB | | Negativo | | |
| ^a Medio de tioglicolato fluido ^b Caldo de digerido de soja y caseína | | | | | |

Resumen del estudio preclínico

5 De manera colectiva, 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 envío y la perfusión a través del catéter de una manera que no plantee preocupaciones de seguridad adicionales al sujeto distintas de las asociadas con el uso rutinario de infusión de fluidos a través del catéter de balón.

10 Ejemplo 11. Datos de eficacia de la fase 1

Los siguientes datos de eficacia de fase I muestran que dentro de $\geq 10 \times 10^6$ células CD34⁺ aisladas, existen suficientes células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 para producir un efecto biológico (paracrino y neoangiogénico), que evita la muerte de células cardiomiocíticas y cambios posteriores consistentes con remodelado ventricular.

15 De acuerdo con la divulgación en el Ejemplo 1, un total de 31 sujetos otorgaron su consentimiento, fueron elegibles y se les reclutó para el estudio. Los 31 pacientes inscritos en el estudio de fase I fueron asignados aleatoriamente a un grupo de tratamiento con recolección de células madre autólogas o a un grupo control cinco días después de un infarto de miocardio con elevación de ST (STEMI) caracterizado por un período prolongado de hipoperfusión (es decir, bloqueo del riego sanguíneo). De los 31 sujetos inscritos, 16 estaban en el grupo de tratamiento y 15 en el grupo de control. El primer sujeto en cada centro fue asignado al azar al grupo de tratamiento o control, y se inscribió a cada paciente posterior a grupos de tratamiento o control alternados. Si se asignó al sujeto a tratamiento, continuaron a la fase de tratamiento siempre y cuando siguieran cumpliendo todos los criterios de inclusión/exclusión. Los sujetos asignados al grupo control pasaron a la fase de seguimiento. No hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las características demográficas o clínicas basales. Los pacientes incluidos tenían de 34 a 71 años de edad, el 87 % eran varones, el 77 % de raza blanca, el 61 % pertenecía a la clase II o III de NYHA y el 49 % a la clase I de NYHA, el 74 % experimentó una arteria coronaria descendente anterior izquierda infartada y el 55 % recibió una endoprótesis vascular liberadora de fármaco. Las FEVI obtenidas en la ecocardiografía de detección variaron entre el 25 % y el 50 %.

20 Las células CD34⁺ se aislaron de la médula ósea mediante el procedimiento de recolección de médula ósea mini como se describe en el Ejemplo 3 en un plazo de 5-8 días después del reemplazo de la endoprótesis vascular. A continuación, la médula cosechada se envió a la planta de procesamiento de células cGMP como se describe en el Ejemplo 4 y se aisló como se describe en el Ejemplo 5.

35 Como se había planeado originalmente, y como se describe en el Ejemplo 8, en el estudio debía haber cuatro cohortes de dosificación (5 millones, 10 millones, 15 millones y 20 millones de células CD34⁺). Sin embargo, no se

puieron obtener más de 15 millones de células después de la selección de CD34⁺ de manera fiable. Por lo tanto, la inclusión terminó al final de la cohorte 3, siendo 15 x 10⁶ la dosis celular más alta evaluada.

5 Tras la liberación del producto celular y la asignación de la cohorte, el producto de células CD34⁺ se envió al centro de cateterismo para su infusión directa en la arteria relacionada con el infarto. La infusión del tratamiento se produjo 6-9 días después del reemplazo de la endoprótesis vascular (y en un plazo de 48 horas de la recolección de la médula ósea mini). Únicamente se llevó a los sujetos al laboratorio de cateterismo después de que el producto de células CD34⁺ había llegado a la planta y habían recibido liberación final para infusión.

10 Las cohortes de dosificación consistieron en 5 sujetos en las cohortes 1 y 2, 6 sujetos en la cohorte 3 y 15 sujetos control. Para la cohorte 1, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención comprendía 5 x 10⁶ células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas que contenían una subpoblación de al menos 0,5 x 10⁶ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR -4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representada como "5 M"]. Para la cohorte 2, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención comprendía 10 x 10⁶ células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas que contenían una subpoblación de al menos 0,5 x 10⁶ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR -4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representada como "10 M"]. Para la cohorte 3, el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención comprendía 15 x 10⁶ células madre hematopoyéticas CD34⁺ aisladas que contenían una subpoblación de al menos 0,5 x 10⁶ células CD34⁺ potentes que expresan CXCR -4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 [representada como "15 M"]. No se esperaba que los sujetos control (es decir, aquellos que no recibían infusión de células CD34⁺) tuvieran mejoras significativas en la función cardíaca (fracción de expulsión, volúmenes telesistólicos y telediastólicos, índice de puntuación del movimiento de la pared ventricular) o perfusión de la región infartada a los 6 meses de seguimiento.

25 La subpoblación de células potentes que (i) expresan CXCR-4 y (ii) tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, expresaron VEGFR-2 a niveles muy bajos (media 0,84 %, intervalo 0 a 2,39 %). Debido a que la subpoblación de células potentes CD34⁺ coexpresa CXCR-4, {coexpresión de CXCR-4; media 60,63 %, mediana 52 %, intervalo 31-98 % de las células CD34⁺, capaces de migrar en un gradiente de SDF-1} mientras que menos del 2,5 % de las células CD34⁺ coexpresa VEGFR-2, funcionalmente, estas células son VEGFR-2-, es decir, VEGFR-2 no es lo que dirige las células a la zona periinfarto.

35 Se administró a cada sujeto de las cohortes 1, 2 y 3 una composición farmacéutica estéril de la invención descrita por vía parenteral mediante infusión a través de la arteria relacionada con el infarto mediante un catéter de siete a once días después del STEMI como se describe en el Ejemplo 9. La composición farmacéutica estéril comprendía: (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas estériles, comprendiendo el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas una población enriquecida de células CD34⁺ aisladas que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; que, cuando se pasan a través del catéter, siguen siendo potentes, y (b) una cantidad estabilizante de suero.

40 El seguimiento de la función cardíaca se realizó a los 3 y 6 meses después de la infusión. La perfusión de la región del infarto cardíaco se evaluó a los 6 meses después de la infusión. Tanto la perfusión como las pruebas de seguimiento funcionales fueron evaluadas por un laboratorio central enmascarado para el estado de tratamiento del estudio de cada sujeto. Se realizó una comparación de estos resultados con los índices basales. Las visitas de seguimiento a largo plazo se realizan a los 12 meses y la entrevista telefónica con los sujetos se realizará anualmente los años 2 a 5. En los ecocardiogramas de la visita de seguimiento de 12 meses, algunos de los sujetos presentaron anomalías segmentarias del movimiento de la pared, algo no infrecuente en esta población de pacientes y ninguno de los sujetos presentó derrames pleurales clínicamente significativos. Ninguno de los ecocardiogramas de seguimiento de 12 meses produjo un acontecimiento adverso grave. Para los sujetos que completaron la llamada telefónica de seguimiento de dos años, no se notificaron acontecimientos adversos graves y, por tanto, no se detectaron acontecimientos de seguridad a largo plazo en este momento.

50 Se evaluaron las medidas de funcionamiento cardíaco, puntuación de la gravedad total en reposo (RTSS), el porcentaje de infarto ("% de infarto"), el volumen telesistólico (VTS) y la fracción de expulsión ("FE") a los 3 meses del tratamiento y a los 6 meses después del tratamiento y en comparación con los controles para evaluar la eficacia de las composiciones en comparación con los controles.

60 **EXPLORACIÓN SPECT.** Tal como se usa en el presente documento, una exploración de tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT) es un tipo de prueba de imagen nuclear, que utiliza una sustancia radiactiva y una cámara especial para crear imágenes tridimensionales del corazón para mostrar flujos de sangre al corazón. En general, la "puntuación de gravedad total en reposo (RTSS) es una puntuación basada en la cantidad de tecnecio que no es captada en una EXPLORACIÓN SPECT. Los datos de la puntuación de gravedad total en reposo representan la perfusión cardíaca, es decir, el flujo sanguíneo a nivel microvascular y la función del músculo. En resumen, el tecnecio utilizado en una EXPLORACIÓN SPECT es absorbido por el músculo cardíaco sano y perfundido. Por tanto, si el músculo cardíaco está sano y hay un flujo sanguíneo adecuado, el músculo absorberá el tecnecio. Si el músculo cardíaco está hibernando o es apoptótico, la absorción de tecnecio está disminuida o no se

produce en absoluto.

Porcentaje de infarto (RMN). El tamaño del infarto determina la medida en que un paciente se recuperará del IAM.

- 5 Un paciente que ha sufrido daños en más del 30 por ciento del ventrículo izquierdo del corazón es dos veces más propenso a morir en un año por la lesión que un paciente que ha sufrido menos daño y los infartos más grandes a menudo requieren un tratamiento más agresivo. Un método informático calcula la cantidad de tejido dañado comparando la intensidad de la señal de RMN entre tejido dañado e intacto. El tejido cardíaco dañado es más denso que el tejido no dañado porque la estructura del músculo se ha destruido y la RMN puede distinguir entre tejidos de diferente densidad. El término "porcentaje (%) de infarto" tal como se utiliza en el presente documento se refiere al
- 10 área infartada en comparación con el resto del corazón. Para los propósitos de este estudio, un % de infarto mayor del 20 % se considera significativo.

Cambio en la perfusión miocárdica y la función cardíaca

- 15 En la Tabla 25 se muestran los resultados.

Tabla 25: Medidas cuantitativas de perfusión y función ventricular izquierda

| Prueba de la función cardíaca | Control | Tratados (5 Millones) N=5 | Tratados (10 Millones) N=5 | Tratados (15 Millones) (N=6) | Todos tratados (N=16) | Valor P (todos los tratados frente al control) | Valor P (Control frente al control 10 + 15 Millones) | Controles combinados (Controles + 5 Millones) | Tratados combinados (10 Millones + 15 Millones) | Valor P (Controles + 5 Millones frente a 10 + 15 Millones) |
|-------------------------------|------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|--|--|---|---|--|
| SPECT RTSS (perfusión) | n= 13 | n= 5 | 11= 5 | 11= 4 | n= 14 | 11= 13 | n= 9 | N=18 | n= 9 | |
| Basal | 259+/-282 | 714+/-657 | 998+/-753 | 585+/-439 | 778+/-619 | | | 385+/-449 | 814+/-635 | |
| 6 meses | 273+/-394 | 722+/-520 | 635+/-531 | 462+/-289 | 616+/-448 | | | 398+/-465 | 558+/-425 | |
| Diferencia | 14,4+/-210 | 7,8+/-216 | -362+/-306 | -122+/-260 | -162+/-293 | 0,08 | 0,02 | 13+/-205 | -255+/-297 | 0,01 |
| Valor p cambio a 6 meses | (INI) | 0,94 | 0,05 | 0,41 | 0,00 | | | 0,79 | 0,03 | |
| RMN | n= 10 | 11= 5 | n= 4 | n= 2 | n= 11 | n= 10 | 11= 6 | n= 15 | n= /-386 | |
| Basal | 53,2+/-10 | 46,96+/-13 | 47,3+/-10 | 49,9+/-7 | 47,6+/-10 | | | 51,1 +/--11 | 48,2+/-9 | |
| Diferencia a 3 meses | -1,0+/-5,4 | 1,8+/-6,7 | 3,4+/-5,1 | -3,3+/-2,7 | 1,4+/-5,8 | | | -0,02+/-5,8 | 1,1+/-5,5 | |
| Valor p cambio a 3 meses | 0,57 | 0,57 | 0,26 | 0,32 | 0,41 | | | -,99 | 0,61 | |
| 6 meses | 54,2+/-11 | 46,794+/-13 | 54+/-11 | 50,1+/-6 | 50,1+/-11 | | | 51,8+/-12 | 52,7+/-8 | |
| Diferencia | 1,0+/-7,8 | -0,02+/-13 | 6,7+/-4 | 0,2+/-0,8 | 2,5+/-9 | 0,70 | 0,33 | 0,7+/-9 | 4,5+/-5 | 0,35 |
| Valor p cambio a 6 meses | 0,68 | 0,99 | 0,04 | 0,78 | 0,39 | | | 0,77 | 0,05 | |
| VTD (ml) | 154,7+/-55 | 153,3+/-30 | 176,6+/-51 | 175,7+/-12 | 165,8+/-36,1 | | | 154,2+/-47 | 176,4+/-39,9 | |
| 6 meses | 154,1+/-55 | 176,3+/-53 | 182,4+/-58 | 180,1+/-41 | 179,2+/-48 | | | 161,5+/-53,3 | 181,7+/-48,7 | |
| Diferencia | -0,56+/-20 | 23+/-37 | 5,83+/-29 | 4,39+/-29 | 13,4+/-31 | 0,24 | 0,61 | 7,3+/-28,1 | 5,4+/-25,9 | 0,88 |
| Basal | 76,1+/-45 | 81+/-23 | 97+/-46 | 88+/-18 | 88+/-30 | | | 78+/-38 | 94+/-37 | |

| Prueba de la función cardíaca | Control | Tratados (5 Millones) N=5) | Tratados (10 Millones) N=5) | Tratados (15 Millones) (N=6) | Todos tratados (N=16) | Valor P (todos los tratados frente al control) | Valor P (Control frente al control 10 + 15 Millones) | Controles combinados (Controles + 5 Millones) | Tratados combinados (10 Millones + 15 Millones) | Valor P (Controles + 5 Millones frente a 10 + 15 Millones) | Prueba de la función cardíaca |
|--|------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|--|--|---|---|--|-------------------------------|
| | 6 meses | 74,3+/-44 | 95+/-46 | 87+/-46 | 91+/-32 | 91,5+/-40 | | | 81,3+/-44 | 88,5+/-38 | |
| | Diferencia | -1,84+/-17 | 14+/-25 | -9,9+/-18 | 2,69+/-13 | 3,4+/-22 | 0,55 | 0,66 | 3,6+/-21 | -5,7+/-16 | 0,34 |
| Tamaño del infarto (% de la masa del VI) | Basal | 16,64+/-8 | 18,8+/-8,6 | 33,2+/-14 | 11,7+/-1 | 22,7+/-13 | | | 17,3+/-8,2 | 26+/-16 | |
| | 6 meses | 9,95+/-9 | 16,2+/-10,9 | 22,3+/-12 | 11,1+/-2 | 17,5+/-11 | | | 12+/-9,8 | 18,5+/-11 | |
| | Diferencia | -6,1+/-1-5 | -2,6+/-5,9 | -10,9+/-3 | -0,57+/-1 | -5,2+/-6 | 0,57 | 0,79 | -5,3+/-5,8 | -7,5+/-5,7 | 0,45 |

5 Dos pacientes en el grupo control (rechazaron) y dos en el grupo de 15 millones (1 muerte después de la infusión, 1 restenosis aguda de la endoprótesis vascular antes de la infusión) no completaron la exploración SPECT a los 6 meses. Para la RMN, 5 pacientes del grupo control (1 muerte, 2 rechazaron, 2 dispositivos intracoronarios (DIC), UNO en el grupo de 10 millones y 3 en el grupo de 15 millones (1 muerte, una imagen basal mala, 1 DIC) no completaron la prueba de imagen. La comparación entre grupos utiliza datos solo de los pacientes que completan los estudios. Como se muestra en la Tabla 25, los pacientes control tenían un tamaño de defecto de perfusión basal (RTSS) menor ($p < 0,04$) y un tamaño de infarto menor en cuanto al porcentaje de la masa del VI ($p < 0,03$) en comparación con los pacientes del grupo de tratamiento.

10 Como se muestra en la Tabla 25, el defecto de la perfusión medido como SPECT RTSS permaneció sin cambios a los 6 meses en comparación con el valor basal en los controles (259 ± 282 a 273 ± 394 , $p = 0,80$) y los pacientes que recibieron 5 millones de células CD34⁺ (714 ± 657 a 722 ± 520 , $p = 0,94$). Por el contrario, los pacientes que recibieron 10 millones y 15 millones de células CD34⁺ experimentaron una disminución en el defecto de perfusión miocárdica (998 ± 753 a 635 ± 531 , $p = 0,57$ y 584 ± 439 a 462 ± 289 , $p = 0,41$, respectivamente). La disminución del defecto de perfusión fue significativa (-255 ± 297 , $p = 0,03$) y significativamente mayor entre los pacientes que recibieron > 10 millones de CD34⁺ en comparación con los controles ($p = 0,02$) y los controles y el grupo de 5 millones combinado ($p = 0,01$). Cabe destacar que 9 de 10 pacientes (90 %) que recibieron > 10 millones de células CD34⁺ tuvieron una disminución de la RTSS en comparación con solo 7 de 13 controles (54 %) y 2 de 5 pacientes que recibieron 5 millones de células (40 %). El único paciente del grupo de 15 millones cuya RTSS no disminuyó fue el único paciente tratado (todos los grupos) cuya movilidad de CD34⁺ en SDF-1 fue $< 1,0$ % (0,43 %).

25 Se observó una tendencia a una mayor reducción del defecto de perfusión miocárdica en el grupo tratado en comparación con los controles, $p = 0,08$. Un análisis *a posteriori* examinó los cambios en la perfusión miocárdica entre los sujetos que recibieron las dos dosis más altas (10 millones o 15 millones de células) versus la dosis baja (5 millones de células) o la terapia de control. Los sujetos que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺ tuvieron una mejoría significativa en la RTSS en comparación con los que recibieron 5 millones de células o ninguna terapia celular, $p = 0,02$. Los resultados no se vieron afectados por las características demográficas, la disfunción ventricular basal o el tamaño inicial del infarto.

30 Como se muestra en la Tabla 25, no hubo diferencias significativas en el cambio en estos parámetros en los grupos tratados en comparación con los grupos de control después de 6 meses. Dado que la mejoría en la perfusión solo se observó en los dos niveles de dosis más alta, un análisis *a posteriori* analizaba los cambios en la función cardíaca entre los sujetos que recibieron una infusión de células CD34⁺ de dosis alta (10 millones o 15 millones de células) frente a la infusión de dosis baja (5 millones de células) y controles. Mientras que no hubo cambios en la FEVI (+0,7 %, $p = 0,68$) en los controles y en el grupo tratado con 5 millones de células, hubo una fuerte tendencia hacia la mejora de la FEVI (+4,5 %, $p = 0,059$) en los que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺. Aunque se observaron tendencias similares con cambios en el volumen telesistólico, el volumen telediastólico y la reducción del tamaño del infarto, estos cambios no alcanzaron significación estadística.

40 Movilidad de las células CD34⁺ en un gradiente de SDF-1

Para investigar si la expresión de CXCR-4 o la movilidad en SDF-1 de las células CD34⁺ infundidas influía sobre los resultados, se evaluó la relación entre el número de células infundidas que expresaban CXCR-4 y la movilidad en SDF-1 y los cambios en la RTSS y el tamaño del infarto. Los resultados se muestran en la Figura 4 a continuación.

45 La Figura 4(A) muestra el cambio en el tamaño del infarto como un porcentaje de la masa del LV en comparación con el % de veces de la dosis de CD34⁺ de las células CD34⁺ móviles en un gradiente SDF. La Figura 4(B) muestra el cambio en el defecto de la perfusión (RTSS) frente al % de veces de la dosis de CD34⁺ de las células CD34⁺ móviles en un gradiente SDF. En toda la cohorte tratada, se observó una correlación significativa entre la cantidad de células móviles CD34⁺/SDF-1 infundidas (producto de células CD34⁺ y movilidad en SDF-1) y la disminución en la RTSS ($r^2 = 0,45$, $p = 0,011$) y el tamaño del infarto como un porcentaje de la masa del VI ($r^2 = 0,49$, $p = 0,015$), lo que sugiere que una mayor movilidad en SDF-1 se asoció con una mayor reducción en el tamaño del infarto y mejor perfusión en la región del infarto. Sin embargo, no hubo correlaciones significativas entre el número de células CD34⁺/CXCR-4⁺ infundidas, células CD34⁺/VEGF⁺ infundidas o la capacidad de formación de colonias (UFC) y el cambio en la RTSS o el tamaño del infarto, probablemente porque no hubo correlación alguna entre la expresión de CXCR-4 y la movilidad en SDF-1. No se identificaron correlaciones significativas entre los cambios en la FEVI o el VTSVI y las características celulares (datos no mostrados).

60 Discusión

65 Estos resultados muestran que la infusión en la IRA de ≥ 10 millones de células CD34⁺ fue segura y se asoció con una reducción significativa (31 %) de la RTSS a los 6 meses en comparación con el valor basal. Por el contrario, los pacientes que recibieron 5 millones de células CD34⁺ y los controles no presentaron ningún cambio significativo en la RTSS. La RTSS es un compuesto de la extensión y la gravedad del defecto de perfusión evaluado mediante SPECT y es potencialmente también un índice de la viabilidad de los cardiomiocitos que se ha validado para detectar diferencias de 10 % o más en individuos individuales en medidas repetidas. Como apoyo adicional de un

efecto umbral de la dosis a los 6 meses en comparación con el valor basal, se observó una tendencia en la mejora de la FEVI entre los pacientes que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺ en comparación con los controles, los pacientes que recibieron 5 millones e células CD34⁺ y los grupos de control y de tratamiento con 5 millones combinados. El tamaño más grande del infarto después del implante de la endoprótesis vascular, en particular si está asociado con un defecto de perfusión más extenso, da como resultado una mayor probabilidad de remodelado ventricular adverso que se manifiesta en una disminución de la FEVI y un aumento del VTSVI con el tiempo. En el estudio descrito, en el momento basal, los pacientes que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺ tenían un mayor tamaño de infarto y mayor RTSS. Sin embargo, a pesar de ello, se observó una mayor reducción de la RTSS y una mejora (tendencia) en la FEVI en estos pacientes. Además, entre los pacientes de los grupos de tratamiento con 5 millones y control combinados, la FEVI media no mejoró a los 3 meses o a los 6 meses, y el VTSI aumentó de forma constante con respecto al valor basal, en consonancia con el remodelado ventricular adverso. Sorprendentemente, entre los pacientes que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺, a pesar de comenzar con infartos y defectos de perfusión mayores, la FEVI mejoró a los 3 meses y, en mayor medida, a los 6 meses, mientras que el VTSVI mejoró de los 3 meses a los 6 meses después de empeorar durante los tres primeros meses, lo que en conjunto sugiere un efecto terapéutico continuo.

Como se muestra en la Tabla 26, en la cohorte de 10 y 15 millones, ninguno de los pacientes presentó una disminución de la FEVI superior al 1 % (es decir, ninguno tuvo una disminución clínicamente relevante de la FEVI), frente al 30 % de los controles y el 40 % del grupo tratado con 5 millones (intervalo 2,9 a -17,4 %). Esto es consistente con la conclusión de que el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención puede prevenir el remodelado ventricular (manifestado clínicamente en una disminución de la FEVI a los 6 meses).

Tabla 26. Cambio a 6 meses en la RTSS y la FEVI.

| Paciente | Cambio en la RTSS a 6 meses | Cambio en la FEVI a 6 meses |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Cohorte 1 | | |
| 1 | -71 | 18,2 % |
| 2 | 164 | 5,2 % |
| 3 | 46 | 1,6 % |
| 4 | -322 | -12,7 % |
| 5 | 222 | -12,4 % |
| Cohorte 2 | | |
| 1 | -859 | |
| 2 | -97 | 7,7 % |
| 3 | -427 | 6,0 % |
| 4 | -294 | 11,4 % |
| 5 | -137 | 1,8 % |
| Cohorte 3 | | |
| 1 | | |
| 2 | 263 | 0,8 % |
| 3 | -274 | |
| 4 | -287 | |
| 5 | -190 | -0,4 % |
| Control | | |
| 1 | -210 | -2,98 % |
| 2 | -99 | 4,60 % |
| 3 | 342 | 2,12 % |
| 4 | 0 | |

| Paciente | Cambio en la RTSS a 6 meses | Cambio en la FEVI a 6 meses |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 5 | -250 | 3,24 % |
| 6 | 528 | 5,90 % |
| 7 | -54 | |
| 8 | 13 | 4,60 % |
| 9 | -30 | -17,43 % |
| 10 | 1 | |
| 11 | -584 | -3,70 % |
| Control | | |
| 12 | 78 | 11,20 % |
| 13 | -93 | 2,90 % |
| 14 | -38 | |
| 15 | -1266 | |

Además del número de células infundidas, los datos descritos indican que el umbral de dosis para los pacientes depende del número y la movilidad de las células infundidas y que la movilidad disminuye con el tiempo con un descenso medio del 57 % entre 24 y 48 horas después de la terminación de la recolección de médula y un 11 % adicional a las 72 horas. De hecho, entre los pacientes que recibieron ≥ 10 millones de células CD34⁺, el único paciente que no experimentó una disminución de la RTSS tuvo la menor movilidad de las células CD34⁺ de todos los pacientes evaluados (0,43 %).

10 **Ejemplo 12. Múltiples administraciones a sujetos de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas**

15 El suministro de sangre en las zonas límite isquémicas periinfarto es marginal, poniendo en riesgo a los cardiomiocitos de la zona límite. Las múltiples administraciones de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, mediante el apoyo a las células en la zona límite, pueden preservar/restaurar la viabilidad del miocardio periinfarto.

De acuerdo con este aspecto de la invención descrita, se administra una primera alícuota de la composición en una primera fecha de infusión, se administra una segunda alícuota de la composición e una segunda fecha de infusión y se administra una tercera alícuota de la composición en una tercera fecha de infusión. El médico responsable del tratamiento determinará la programación de las fechas para la segunda y la tercera infusión para un paciente dado según su criterio médico. De acuerdo con una realización, la composición se administra en una primera fecha de infusión, 30 días después de la primera fecha de infusión, en una segunda fecha de infusión y 60 días después de la primera fecha de infusión en una tercera fecha de infusión.

25 Los sujetos/pacientes elegibles que presentaron síntomas y hallazgos clínicos sugestivos de infarto de miocardio y elegibles para su inclusión en el estudio se seleccionarán como se describe en el Ejemplo 1 y se les realizará el cateterismo como se describe en el Ejemplo 2. La médula ósea que comprende células CD34⁺ potentes se adquirirá del sujeto/paciente como se describe en el Ejemplo 3 y, en algunas realizaciones, la médula ósea cosechada será transportada a la planta de procesamiento como se describe en el Ejemplo 4. Las células CD34⁺ se seleccionarán del producto cosechado de médula ósea tal como se describe en el Ejemplo 5.

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

- 35 (i) La médula ósea se lava automáticamente para eliminar las plaquetas;
- (ii) las células positivas para CD34 (CD34⁺) se marcan específicamente para su selección mediante incubación con el anticuerpo monoclonal de CD34 Isolex 300i (Mab);
- 40 (iii) El reactivo no unido se elimina lavando la suspensión celular con solución tampón;
- (iv) las células CD34⁺ sensibilizadas (es decir, células CD34⁺ marcadas con el Mab de CD34) se capturan mediante IgG anti-ratón de oveja Dynabeads M-450;

(v) Se usa una columna de selección para separar las Dynabeads marcadas magnéticamente que habían capturado células CD34⁺ de células no deseadas, que se lavan a través de la columna de selección y se recogieron en la bolsa de fracciones negativas; y

- 5 (vi) el agente de liberación de células madre PR34⁺ libera 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 en la bolsa de desechos del tampón.

10 La fracción de CD34⁺ seleccionadas con Isolex(R) se analizará como sigue para determinar los rendimientos de WBC y de células CD34⁺ como se describe en el ejemplo 6. Una primera alícuota del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que contiene al menos 10 x 10⁶ células CD34⁺ se formulará como se describe en el Ejemplo 7, se transportará a la planta 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. Al menos dos alícuotas adicionales del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas que contiene al menos 10 x 10⁶ células CD34⁺ por alícuota se congelarán a -70°C para su posterior administración. (véase "Estudio de Crioconservación" más adelante).

Estudio de crioconservación

20 Este estudio se llevó a cabo para evaluar la capacidad de la parte basada en Isolex del proceso de fabricación de productos de células madre hematopoyéticas quimiotácticas 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 del enriquecimiento de la MMH crioconservada. El estudio se ha diseñado para evaluar y describir el efecto sobre el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la crioconservación de la MMH empobrecida en RBC antes de la selección de CD34 basada en Isolex.

25 Se han aplicado las siguientes condiciones experimentales:

- 30 (1) Dos (2) MMH para cada uno de tres (3) repeticiones con el fin de proporcionar un rendimiento celular adecuado para cumplir los requisitos del diseño experimental; con un intervalo de veinticuatro (24) horas entre la MMH y el comienzo del procedimiento de reducción de RBC.
- (2) Control del estudio: Producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas recién preparado, Con caracterización completa del producto después de la perfusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas a través de un catéter a las 48 y 72 horas después de LA MMH.
- 35 (3) Sección experimental: el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas derivado de la MMH criopreservada, con caracterización completa del producto después de la perfusión del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas derivado de MMH crioconservada a través de un catéter a las 48 y 72 horas después de la MMH, menos el tiempo en que la MMH criopreservada permanece almacenada (definido como > 24 horas)

40 Diseño del estudio

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

- 45 Almacenamiento entrante: las muestras se almacenarán a 2-8 °C durante veinticuatro (24) horas antes de comenzar el procedimiento de reducción de RBC.

50 Después de la reducción de RBC, la MMH de ambos donantes se agrupará y luego se dividirá en dos fracciones iguales. Se utilizará una fracción como control de producto fresco (sin congelar) y la otra fracción se usará para la prueba de crioconservación.

Para el ensayo de crioconservación, la MMH reducida en RBC se congelará en un congelador de -86 °C y luego se crioalmacenará en la fase de vapor (≤ -150 °C) de un congelador de nitrógeno líquido (LNF) utilizando el crioprotector que contiene la fuente de líquido Hetastarch (6 % de Hetastarch en cloruro sódico al 0,9 % fabricado por Hospira). El procedimiento para la preparación del crioprotector y la congelación y el crioalmacenamiento de la MMH reducida en RBC es como sigue. Se transfieren 145 ml de HSA al 25 % (seroalbúmina humana Baxter, 060-998 o equivalente) y 71,4 ml de DMSO (Cryoserv) en una (1) bolsa de 500 ml de Hetastarch al 6 % (Hospira, 0074-7248-03 o equivalente). El crioprotector completo contiene 10 % de DMSO, 4,2 % de Hetastarch y 5 % de HSA). La bolsa Hetastarch se invierte aproximadamente 10 veces para mezclar. El crioprotector preparado se almacena en un refrigerador de 2-8 °C durante al menos 2 horas y no más de 24 horas después de la preparación. El volumen requerido de crioprotector se transfiere a la preparación de MMH de modo que las concentraciones finales de DMSO, Hetastarch y HSA en el producto de células progenitoras humanas sean del 5 %, 2,1 % y 2,5 %, respectivamente. Las muestras del producto de MMH con crioprotector añadido se recogen para el análisis de exclusión con azul tripán (viabilidad), recuento de glóbulos blancos y esterilidad. El tubo de la bolsa de congelación preparada se sella térmicamente, se determina el volumen del producto de MMH para cada bolsa de congelación preparada y la bolsa de congelación se coloca dentro de un recipiente/bote de congelación. El bote/casete de

congelación se coloca horizontalmente dentro de un congelador mecánico de -86 °C. El producto de MMH puede almacenarse en el congelador mecánico a -86 C para almacenamiento de corto plazo hasta seis (6) meses. Para almacenamiento a largo plazo, el (los) casete (s) se retiran del congelador mecánico de -86 °C y se colocan en el congelador de nitrógeno líquido (LNF) para almacenamiento en la fase de vapor de nitrógeno líquido junto con la(s) muestra(s) del producto de MMH para análisis.

Las muestras tanto de control (sin congelar) como crioconservadas (después de descongelar) se procesarán 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 realizará en los siguientes puntos temporales: ((i) Después de la perfusión del producto a través de un catéter 48 horas después de la MMH; y (ii) después de la perfusión del producto a través de un catéter 72 horas después de la MMH. Para las muestras crioconservadas, el término "72 horas de recolección", por ejemplo, significa el tiempo desde la recolección hasta el momento de la prueba, excluyendo el tiempo transcurrido desde la congelación y el crioalmacenamiento de la médula ósea empobrecida en glóbulos rojos.

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

Resumen de los resultados

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 27 resume la información relevante sobre los donantes de la médula ósea utilizada en este estudio.

Tabla 27: Edad y sexo de los donantes de médula ósea para el estudio de crioconservación.

| | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
|---------|--------|----|--------|----|--------|----|
| Donante | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Edad | 26 | 26 | 22 | 62 | 32 | 24 |
| Sexo | F | F | F | F | F | F |

La tabla 28 resume el volumen de la muestra, el contenido de RBC y el rendimiento, la viabilidad y la pureza de las células en la MMH preprocesada después de almacenar durante 24 horas en un refrigerador de 2-8 °C.

Tabla 28: 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 |
| WBC por µl# | 1,39E+04 | 1,26E+04 | 1,39E+04 | 1,44E+04 | 1,94E+04 | 2,45E+04 |
| TNC# | 1,62E+09 | 8,03E+08 | 1,47E+09 | 1,51E+09 | 1,99E+09 | 2,76E+09 |
| HCT# | 33,85 % | 33,40 % | 29,10 % | 27,85 % | 31,60 % | 32,60 % |
| Vol. de RBC (ml)# | 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 µl* | 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 células CD34 ⁺ * | 1,44 % | 1,32 % | 1,23 % | 0,97 % | 1,21 % | 0,88 % |
| Células CD34 ⁺ que expresan CXCR4~ | 77,68 % | 77,03 % | 71,88 % | 64,57 % | 75,75 % | 68,36 % |
| N.º total de células CD34 ⁺ * | 1,74E+07 | 9,50E+06 | 1,49E+07 | 1,20E+07 | 1,55E+07 | 2,30E+07 |

| | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Donante 1 | Donante 2 | Donante 3 | Donante 4 | Donante 5 | Donante 6 |
| # Determinado mediante analizador hematológico | | | | | | |
| * Determinado mediante análisis de citometría de flujo de anticuerpos CD45-FITC/CD34-PE y tinción con 7-AAD de la muestra ~ ~ Determinado mediante análisis de citometría de flujo de anticuerpos CD34-FITC y CXCR4-PE con tinción de la muestra | | | | | | |

En cada uno de los experimentos, la MMH de cada par de donantes se reunieron después de la reducción de RBC.

5 La Tabla 29 presenta el contenido de RBC, la viabilidad y la recuperación celular de la MMH agrupada después de la reducción de RBC:

Tabla 29: Tras la reducción de RBC - Contenido de RBC 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 RBC | 15,35 ml | 13,80 ml | 20,85 ml |
| Recuperación de TNC# | 76,95 % | 85,93 % | 89,37 % |
| Viabilidad de las células CD45⁺ | 84,97 % | 93,35 % | 95,60 % |
| Recuperación de CD34# | 72,89 % | 84,00 % | 88,36 % |
| Viabilidad de las células CD34⁺ | 93,99 % | 97,92 % | 98,95 % |
| Células CD34⁺ que expresan CXCR4 | 71,33 % | 64,89 % | 74,64 % |
| #En comparación con las muestras pre-procesadas | | | |

10 Después de la reducción de RBC, cada una de las muestras agrupadas de MMH se dividió en dos fracciones iguales. Una se usó como control fresco (no congelado) y el otro se usó para la prueba de crioconservación.

15 Para la crioconservación, la MMH mezclada con un volumen igual de crioprotector enfriado se cargó de forma uniforme en dos recipientes de Cryocyte de 250 ml, se congeló en un congelador mecánico (-86 °C) y después se almacenó crioconservado en la fase de vapor de un LNF de acuerdo con el Protocolo. La Tabla 30 presenta los datos obtenidos de MMH después de descongelar y lavar:

Tabla 30: MMH tras la congelación y lavado- Calidad celular y recuperación de células

| Muestra crioconservada descongelada y lavada | | | |
|---|------------------------------|-----------------|-------------------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| Duración del almacenamiento antes de la descongelación | 10 días | 8 días | 8 días |
| Medio de lavado | Solución de trabajo con PBS* | 2 % de dextrano | 8,3 % de dextrano |
| Volumen de RBC | 0,39 ml | 1,11 ml | 0,38 ml |
| Recuperación de TNC# | 36,11 % | 50,73 % | 28,61 % |
| Viabilidad de las células CD45⁺ | 61,85 % | 32,18 % | 43,97 % |
| Recuperación de células CD34⁺# | 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 CXCR4 | 51,42 % | 50,74 % | 37,85 % |

| Muestra crioconservada descongelada y lavada | | | |
|--|---------------|---------------|---------------|
| | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 3 |
| <p># En comparación con la MMH empobrecida en RBC antes de la crioconservación. * La solución de trabajo con PBS contenía 1 % de HSA y 0,41 % de citrato sódico (p/v) en PBS (sin Ca⁺⁺ y Mg⁺). El lavado de las células con esta solución se realizó de acuerdo con lo indicado en el Protocolo. Esta solución de lavado contenía 2 % de dextrano 40, 1 % de HSA y 0,4 % de citrato de Na en PBS (sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺). La muestra descongelada se expandió con 200 ml de esta solución y después se lavó dos veces con 200 ml de esta solución. La centrifugación se fijó en 600 g, 10 minutos a 20 °C. Las células lavadas se resuspendieron con 150 ml de solución de trabajo PBS para el proceso Isolex. Esta solución contenía 8,3 % de dextrano 40 y HSA al 4,2 % en solución salina. El procedimiento de lavado fue esencialmente como se describe para la solución de lavado de dextrano 40 al 2 %.</p> | | | |

La Tabla 31 resume la calidad de las células CD34⁺ y la recuperación del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas preparado a partir de la MMH sin congelar y crioconservada después del procesamiento Isolex.

5

Tabla 31: Después de Isolex - Calidad celular y recuperación de células

| | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
|--|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Fuente de MMH | Sin congelar | Congeladas | Sin congelar | Congeladas | Sin congelar | Congeladas |
| Recuperación de células CD34⁺# | 47,28 % | 37,88 % | 35,94 % | 49,29 % | 44,05 % | 82,25 % |
| Viabilidad de las células CD34⁺# | 99,37 % | 96,89 % | 98,97 % | 95,05 % | 98,26 % | 95,38 % |
| Pureza de células CD34⁺ | 87,51 % | 83,95 % | 86,47 % | 81,91 % | 81,71 % | 50,87 % |
| N.º total de células CD34⁺ viables | 4,63E+06 | 1,95E+06 | 4,07E+06 | 2,58E+06 | 7,50E+06 | 2,20E+06 |
| # En comparación con la muestra reducida en RBC para muestras sin congelar y después de descongelar, las muestras se lavaron para muestras congeladas. | | | | | | |

Después del procesamiento Isolex de cada par agrupado combinado de MMH reducida en RBC, se prepararon dos muestras de producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas ("AMR-001") con igual número de células CD34⁺, cada una en una jeringa de 10 ml. Ambas muestras con AMR-001 se almacenaron a 2-8 °C para las pruebas de estabilidad. A las 48 y 72 horas de la MMH (para las muestras de MMH crioconservadas, no se incluyó el tiempo para el criomacernamiento), un AMR-001 preparado se perfundió a través de un catéter de dilatación de balón realizado de una manera como para un AMR-001 clínico. Se realizó una caracterización completa de células CD34⁺ en las muestras AMR-001 perfundidas y los resultados se presentan en las Tablas 32, 33, 34 y 35. La Tabla 36 muestra el catéter de dilatación de balón utilizado.

15

Tabla 32: Tras infusión a través de catéter - pureza, viabilidad y recuperación de las células CD34⁺

| Experimento | AMR-001 perfundido con catéter | | | | |
|--------------------|---|---------------------|----------|------------------|----------|
| | Fuente de MMH | Sin congelar | | Congelada | |
| | Tiempo tras la MMH | 48 h | 72 h | 48 h | 72 h |
| 1 | Recuperación de células CD34⁺# | 101,73 % | 92,32 % | 91,71 % | 69,35 % |
| | Viabilidad de las células CD34⁺ | 99,08 % | 98,13 % | 94,98 % | 91,80 % |
| | Pureza de células CD34⁺ | 85,92 % | 84,93 % | 82,94 % | 74,24 % |
| | N.º total de células CD34⁺ | 2,36E+06 | 2,14E+06 | 8,92E+05 | 6,74E+05 |
| 2 | Recuperación de células CD34⁺# | 95,65 % | 89,20 % | 77,10 % | 74,01 % |
| | Viabilidad de las células CD34⁺ | 98,29 % | 97,29 % | 89,47 % | 82,82 % |
| | Pureza de células CD34⁺ | 81,49 % | 82,42 % | 75,30 % | 70,50 % |

| Experimento | AMR-001 perfundido con catéter | | | | |
|-------------|---|--------------|----------|-----------|----------|
| | Fuente de MMH | Sin congelar | | Congelada | |
| | N.º total de células CD34 ⁺ | 1,95E+06 | 1,81E+06 | 9,96E+05 | 9,56E+05 |
| 3 | Recuperación de células CD34 ⁺ # | 104,17 % | 101,99 % | 77,35 % | 79,12 % |
| | Viabilidad de las células CD34 ⁺ | 98,46 % | 97,51 % | 86,86 % | 85,59 % |
| | Pureza de células CD34 ⁺ | 83,18 % | 82,80 % | 47,81 % | 43,71 % |
| | N.º total de células CD34 ⁺ | 3,91E+06 | 3,83E+06 | 8,52E+05 | 8,71E+05 |

En comparación con el AMR-001 preparado antes de la perfusión

Tabla 33: Tras la infusión a través de catéter -Células CD34⁺ que expresan CXCR4 (% de células CD34⁺ totales).

| Perfusión con catéter | Fuente de MMH de las muestras de AMR-001 | | | | | |
|------------------------|--|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|
| | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
| | Sin congelar | Congelada | Sin congelar | Congelada | Sin congelar | Congelada |
| 48 h después de la MMH | 66,52 % | 53,31 % | 57,64 % | 41,35 % | 60,14 % | 54,16 % |
| 72 h después de la MMH | 73,87 % | 53,89 % | 56,73 % | 44,07 % | 64,60 % | 50,67 % |

5 Tabla 34: Tras la infusión a través de catéter -Células CD34⁺ migratorias (% de células CD34⁺ viables).

| Perfusión con catéter | Fuente de MMH de las muestras de AMR-001 | | | | | |
|------------------------|--|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | Exp. 1 | | Exp. 2 | | Exp. 3 | |
| | Sin congelar | Congelada | Sin congelar | Congelada | Sin congelar | Congelada |
| 48 h después de la 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 después de la MMH | (1,07 %)# | (1,51 %) | (1,06 %) | (2,19 %) | (1,44 %) | (1,56 %) |

* Migración inducida por SDF-1. % de células CD34⁺ migratorias de células CD34⁺ viables totales con desviación estándar de tres repeticiones.
Migración natural (sin adición de SDF-1)

Tabla 35: Tras infusión a través de catéter - Número de UFC por 100 células CD34⁺ viables cultivadas.

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

10

Tabla 36: Catéteres de dilatación con balón utilizados

| Exp. | Fuente de MMH de la muestras de AMR001 | Hora de la perfusión (Horas de MMH) | Fabricación | Longitud del balón/día. | N.º de catálogo | N.º de lote | Comentarios |
|------|--|-------------------------------------|-------------|-------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| 1 | Sin congelar | 48 h | Sprinter | 12/3,5 mm | SPR3512W | 258795 | Obsoleto |

| Exp. | Fuente de MMH de la muestras de AMR001 | Hora de la perfusión (Horas de MMH) | Fabricación | Longitud del balón/día. | N.º de catálogo | N.º de lote | Comentarios |
|------|--|-------------------------------------|-------------|-------------------------|-----------------|-------------|--------------|
| | | 72 h | Sprinter | 12/4,0 mm | SPR4012W | 254243 | Obsoleto |
| | Congelada | 48 h | Sprinter | 15/3,0 mm | SPR3015W | 412090 | Obsoleto |
| | | 72 h | Voyager | 15/3,0 mm | 1009443-15 | 8111462 | - |
| 2 | Sin congelar | 48 h | Sprinter | 15/3,5 mm | SPR3515W | 443152 | Obsoleto |
| | | 72 h | Sprinter | 15/3,5 mm | SPR3515W | 443152 | Obsoleto |
| | 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 | Obsoleto |
| | Congelada | 48 h | Sprinter | 15/3,0 mm | SPR3015W | 476734 | Obsoleto |
| | | 72 h | Sprinter | 15/3,0 mm | SPR3015W | 476734 | Obsoleto |

* Antes de usar la 2ª vez, el catéter y la luz central se lavaron primero y se aclararon con alcohol isopropílico al 70 % y, después, con PBS estéril. La luz central se inyectó luego con aire para eliminar el líquido residual en el interior. El procedimiento de lavado se realizó dentro de un armario de seguridad biológica.

Discusión

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

5 La recuperación de células CD34⁺ después de Isolex del AMR-001 fabricado a partir de MMH sin congelar (muestras de control) fue, en promedio, de 34,6 ± 4,35 % (intervalo 30,3 % a 39 %) que está dentro del intervalo de aceptación para la fabricación de AMR-001 para uso clínico. Debe observarse que los datos presentados anteriormente se estiman sin tener en cuenta las células eliminadas para las pruebas en proceso, por lo tanto, la recuperación de células CD34⁺ real será ligeramente superior a la presentada.

15 La recuperación de células CD34⁺ después del catéter fue de 100,52 ± 4,39 % (95,65 % a 104,17 %) a 48 horas después de la MMH y 94,50 ± 6,67 % (89,20 % a 101,99 %) 72 horas después de la MMH. No hubo una reducción sustancial de la viabilidad (Tabla 32), la expresión de CXCR-4 (Tabla 33), la actividad migratoria (Tabla 34) y el crecimiento de UFC (Tabla 35) de células CD34⁺ 72 horas después de la MMH en comparación con las monitorizadas a las 48 horas después de la MMH.

20 Para el ensayo de crioconservación, las muestras de MMH reducidas en RBC se crioconservaron de acuerdo con el protocolo para crioconservación de médula ósea para trasplante, donde las muestras de MMH se mezclaron con un volumen igual de crioprotector con una concentración final de DMSO al 5 %, 2,5 % HSA y 2,1 % de Hetastarch (de la fuente de líquido, 6 % de Hetastarch, Hospira) se congelaron a -86 °C y, a continuación, se crioalmacenaron en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido (LNF).

25 Después de la crioconservación y descongelación, se mantiene la estabilidad, la viabilidad, la movilidad y el crecimiento en cultivo de las células CD34⁺ seleccionadas con Isolex. Por tanto, las células congeladas-descongeladas cumplen los criterios de uso clínico. En algunas realizaciones, una segunda alícuota comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas congeladas. En algunas realizaciones, la alícuota se descongelará 30 días después de la primera fecha de infusión y se retirarán muestras del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descongeladas para su análisis para el recuento de WBC, mediante citometría de flujo (para la enumeración de y viabilidad de las células CD34⁺), tinción de Gram y esterilidad. El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descongeladas se liberará para infusión 1 a 2 días después de la descongelación solo si cumple los siguientes criterios:

- 35 • pureza de células CD34⁺ de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %;
- un resultado negativo en la tinción de Gram para la fracción positiva seleccionada;
- niveles de endotoxina: menos de aproximadamente 0,5 unidades de endotoxina/ml;
- el rendimiento de células CD34⁺ viables del "producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas" cumplió la dosificación requerida según la cohorte de tratamiento;
- las células CD34⁺ tuvieron al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de viabilidad

mediante 7-AAD;

- resultado de esterilidad USP para el "sobrenadante de la fracción positiva": negativo (14 días después).

La evaluación de la esterilidad en el producto de células madre incluyendo la tinción con gram y Los niveles de endotoxinas se realizará antes de la liberación del producto para infusión. Se realizó el cultivo de esterilidad según USP (bacterias y hongos) y los resultados se notificarán al investigador principal. En caso de un resultado positivo de esterilidad según la USP, se notificará al sujeto y el médico que lo atiende inmediatamente, con la identificación y sensibilidad del organismo cuando se disponga de las mismas y el centro de investigación y el promotor registrarán la documentación del tratamiento antimicrobiano adecuado y el resultado del tratamiento.

La segunda alícuota que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descongelado se formulará como se describe en el Ejemplo 7, se transportará a la instalación de cateterismo como se describe en el Ejemplo 8 y se infundirá al paciente como se describe en el Ejemplo 9 en la segunda fecha de infusión. En algunas realizaciones, la segunda fecha de infusión es 30 días después de la primera fecha de infusión.

En algunas realizaciones, una tercera parte alícuota que comprende el producto de producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas congelado se descongelará 60 días después de la primera fecha de infusión y se retirarán muestras de la tercera alícuota que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descongelado para analizar el recuento de WBC, mediante citometría de flujo (para la enumeración de y viabilidad de las células CD34⁺), tinción de Gram y esterilidad. El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita se liberará para infusión de 1 a 2 días después de la descongelación solo si cumple los criterios siguientes:

- pureza de células CD34⁺ de al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %;
- un resultado negativo en la tinción de Gram para la fracción positiva seleccionada;
- niveles de endotoxina: menos de aproximadamente 0,5 unidades de endotoxina/ml;
- el rendimiento de células CD34⁺ viables del "producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas" cumplió la dosificación requerida según la cohorte de tratamiento;
- las células CD34⁺ tuvieron al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de viabilidad mediante 7-AAD; y
- resultado de esterilidad USP para el "sobrenadante de la fracción positiva": negativo (14 días después)

La evaluación de la esterilidad en el producto de células madre incluyendo la tinción con gram y Los niveles de endotoxinas se realizará antes de la liberación del producto para infusión. Se realizó el cultivo de esterilidad según USP (bacterias y hongos) y los resultados se notificarán al investigador principal. En caso de un resultado positivo de esterilidad según la USP, se notificará al sujeto y el médico que lo atiende inmediatamente, con la identificación y sensibilidad del organismo cuando se disponga de las mismas y el centro de investigación y el promotor registrarán la documentación del tratamiento antimicrobiano adecuado y el resultado del tratamiento.

El producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas descongelado de la tercera alícuota se formulará como se describe en el Ejemplo 7, se transportará a la instalación de cateterismo como se describe en el Ejemplo 8 y se infundirá al paciente como se describe en el Ejemplo 9 en la tercera fecha de infusión. En algunas realizaciones, la tercera fecha de infusión será 60 días después de la primera fecha de infusión.

Se propone que la administración de una dosis de células potentes temporizada apropiadamente después del IAM de acuerdo con la invención descrita puede resultar en una reducción de los acontecimientos cardíacos adversos importantes, incluyendo, pero sin limitaciones, muerte prematura, infarto de miocardio recurrente, insuficiencia cardíaca congestiva, arritmias significativas y síndrome coronario agudo.

Ejemplo 13. Coadministración del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas con un agente que puede estimular el crecimiento de cardiomiocitos.

La invención descrita demuestra la prevención de la pérdida de cardiomiocitos después del 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 regenerativa de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos regeneradores requerirán una perfusión adecuada para permitir el crecimiento sostenible de cardiomiocitos o sufrirán las consecuencias de la isquemia, incluida la hibernación y la apoptosis.

Se propone que una composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos, puede (i) restablecer la función cardíaca después del IAM y (ii) prevenir acontecimientos cardíacos adversos importantes. En una realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos aumenta la perfusión en la zona periinfarto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos aumenta la perfusión en el

miocardio en hibernación. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos rescata los cardiomiocitos de la apoptosis. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos rescata los cardiomiocitos de la hibernación. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos genera nuevos cardiomiocitos para reemplazar a los cardiomiocitos perdidos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la presente invención y al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos previene el remodelado ventricular izquierda.

En una realización, el al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos comprende neuregulina 1. La neuregulina 1 humana recombinante se obtendrá a partir de fuentes comerciales. (Cell Sciences, Novus Biologicals, R & D Systems, Raybiotech, Inc., Shenandoah Biotechnology, Spring Bioscience). Los agentes activos compatibles adicionales que estimulan el crecimiento de cardiomiocitos incluyen, pero sin limitaciones, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), catecolaminas, tal como, pero sin limitaciones, norepinefrina (Adams, J.W., y Brown, J.H. *Oncogene*. 20(14): 1626-1634, 2001; Laks, M.M., et al. *Chest*. 64:75-78, 1973), endotelina-1 (Adams, J.W., y Brown, J.H. *Oncogene*. 20(14):1626-1634), una prostaglandina F_{2α} (Adams, J.W., y Brown, J.H. *Oncogene*. 20(14):1626-1634), angiotensina II (Adams, J.W., y Brown, J.H. *Oncogene*. 20(14):1626-1634), ésteres de forbol (Schluter, K.D., y Piper, H.M. *FASEB J.* 13:S17-S22, 1999), neuropéptido Y (Schluter, K.D., y Piper, H.M. *FASEB J.* 13:S17-S22, 1999), factor transformante de crecimiento β1 (TGF-1β), proteína Gq (Schluter, K.D., y Piper, H.M. *FASEB J.* 13:S17-S22, 1999; Adams, J.W., y Brown, J.H. *Oncogene*. 20(14):1626-1634), diacil glicerol (DAG) (Schluter, K.D., y Piper, H.M. *FASEB J.* 13:S17-S22, 1999), salusina-α (Yu, F., et al. *Regul. Pep.* 122(3):191-197, 2004), salusina-β (Yu, F., et al. *Regul. Pep.* 122(3): 191-197, 2004), factor de crecimiento, similar a la insulina (IGF-1) (Davis, M.E., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*. 103(21):8155-8160, 2006), miostatina (Sharma, M., et al. *J. Cell. Physiol.* 180(1):1-9, 1999), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Ohki, Y., et al. *FASEB J.* doi:10.1096/fj.04-3496fje), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Okazaki, T., et al. *Am. J. Pathol.* 171:1093-1103, 2007), TWEAK, tiazolidindionas, tal como, pero sin limitaciones, rosiglitazona (Duan, S.Z., et al. *Circul. Res.* 97:372-379, 2005), y variantes o derivados recombinantes de los mismos.

Las dosis crecientes de al menos uno de neuregulina 1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), catecolaminas, tal como, pero sin limitaciones, norepinefrina, endotelina -1, prostaglandina F_{2α}, angiotensina II, ésteres de forbol, neuropéptido Y, factor de crecimiento transformante activo β1 (TGF-1β), proteína Gq, diacilglicerol (DAG), salusina-α, salusina-β, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), miostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), TWEAK, tiazolidindionas, tal como, pero sin limitaciones, rosiglitazona y variantes o derivados recombinantes de los mismos, se mezclarán con el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas de la invención descrita y se analizarán *in vitro* tras el paso a través de un catéter para determinar la viabilidad, la esterilidad, la pureza y la potencia del producto, es decir, la viabilidad, la capacidad migratoria y el crecimiento de UFC, después de un almacenamiento de hasta 72 horas. Si se mantienen la potencia, la pureza y la viabilidad, se infundirán células CD34⁺ humanas purificadas, estériles, humanas, que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 a través de la vena de la cola en ratones Nod SCID después de la ligadura y alivio 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, ratones Nod SCID que no reciben células). Estudios previos han demostrado una mejora en la perfusión, La neoangiogénesis humana, la prevención de la apoptosis y la función cardíaca conservada en animales tratados frente a animales de control. A continuación, las dosis crecientes de al menos uno de neuregulina 1, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), catecolaminas, tal como, pero sin limitaciones, norepinefrina, endotelina -1, prostaglandina F_{2α}, angiotensina II, ésteres de forbol, neuropéptido Y, factor de crecimiento transformante activo β1 (TGF-1β), proteína Gq, diacilglicerol (DAG), salusina-α, salusina-β, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), miostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), TWEAK, tiazolidindionas, tal como, pero sin limitaciones, rosiglitazona y variantes o derivados recombinantes de los mismos, se añadirán a las células CD34⁺ humanas derivadas humanas estériles y purificadas que contienen una subpoblación de células 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 con los animales tratados con células CD34⁺ que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita sola.

Si dicho modelo preclínico muestra un efecto beneficioso sinérgico con las células CD34⁺ humanas purificadas y estériles derivadas de humanos que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita combinada con al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos, se propone un ensayo clínico de seguridad y

- eficacia de aumento escalonado de la dosis en el sostenimiento y en pacientes con IAM. Para este estudio, los pacientes recibirán las células CD34⁺ purificadas y estériles derivadas de seres humanos que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención con o sin el al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos. El
- 5 al menos un agente activo compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos se administrará en dosis crecientes para determinar (i) la dosis terapéutica media (DTB) y (ii) si la perfusión y la función cardíaca se potencian mediante la combinación de neuregulina 1 y células CD34⁺ estériles derivadas de humanos que contienen una subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita en comparación con las células CD34⁺ estériles derivadas de humanos que contienen una
- 10 subpoblación de células potentes que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la invención descrita solo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento o reparación de una lesión en la zona de infarto en un sujeto revascularizado después de un infarto agudo de miocardio (IAM), donde la lesión de la zona de infarto comprende remodelado ventricular adverso, comprendiendo la composición:
- 5 (a) una cantidad de mejora de la perfusión de la zona del infarto de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas aisladas estériles no expandidas, comprendiendo el producto una población enriquecida de al menos 10×10^6 células madre hematopoyéticas $CD34^+$ autólogas aisladas que contienen una subpoblación de al menos $0,5 \times 10^6$ células $CD34^+/CXCR-4^+$ potentes que tienen actividad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4;
- 10 (b) una cantidad estabilizante de suero a una concentración de al menos 10 % (v/v); y
- (c) opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos;
- 15 donde la población enriquecida de células $CD34^+$ aisladas, cuando se pasa a través de un catéter y se analiza *in vitro*, comprende al menos 70 % de células $CD34^+$; y donde la población enriquecida de células $CD34^+$ aisladas, cuando se pasa a través de un catéter y se analiza *in vitro*:
- 20 (1) retiene la actividad migratoria mediada por SDF-1/CXCR-4;
- (2) tiene una viabilidad de al menos un 70 %; y
- (3) es capaz de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*
- 25 durante al menos 24 horas después de la adquisición del sujeto de la población enriquecida de células $CD34^+$; y donde la composición se administra al sujeto por vía parenteral a través de un catéter.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente compatible que estimula el crecimiento de cardiomiocitos seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un betabloqueante, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agonista del receptor tirosina quinasa, un agente vasoactivo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, un agente hipercolesterolémico, neuregulina 1, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, factor de crecimiento de la placenta (PIGF), una catecolamina, por ejemplo norepinefrina, endotelina -1, una prostaglandina $F2\alpha$, angiotensina II, un éster de forbol, neuropéptido Y, factor de crecimiento transformante activo βI (TGF- β), proteína Gq, diacilglicerol (DAG), salusina- α , salusina- β , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), miostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), una tiazolidindiona, por ejemplo, rosiglitazona, y el inductor débil de apoptosis débil similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK).
- 30 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la población enriquecida de células madre hematopoyéticas $CD34^+$ autólogas aisladas se purifica de los componentes celulares de un aspirado de médula ósea adquirido del sujeto.
- 40 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la población enriquecida de células madre hematopoyéticas $CD34^+$ autólogas aisladas se purifica de sangre periférica.
- 45 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición se administra a través del catéter por vía intravascular a una arteria relacionada con infarto.
- 50 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha composición se administra a través del catéter al miocardio.

FIG. 1

RESULTADOS ESTUDIO AMORCYTE: VIABILIDAD, EXPRESIÓN DE CXCR-4 Y MIGRACIÓN

MEDIADA POR SDF-1/CXCR-4 DE CÉLULAS CD34+ TRAS SELECCIÓN CON ISOLEX

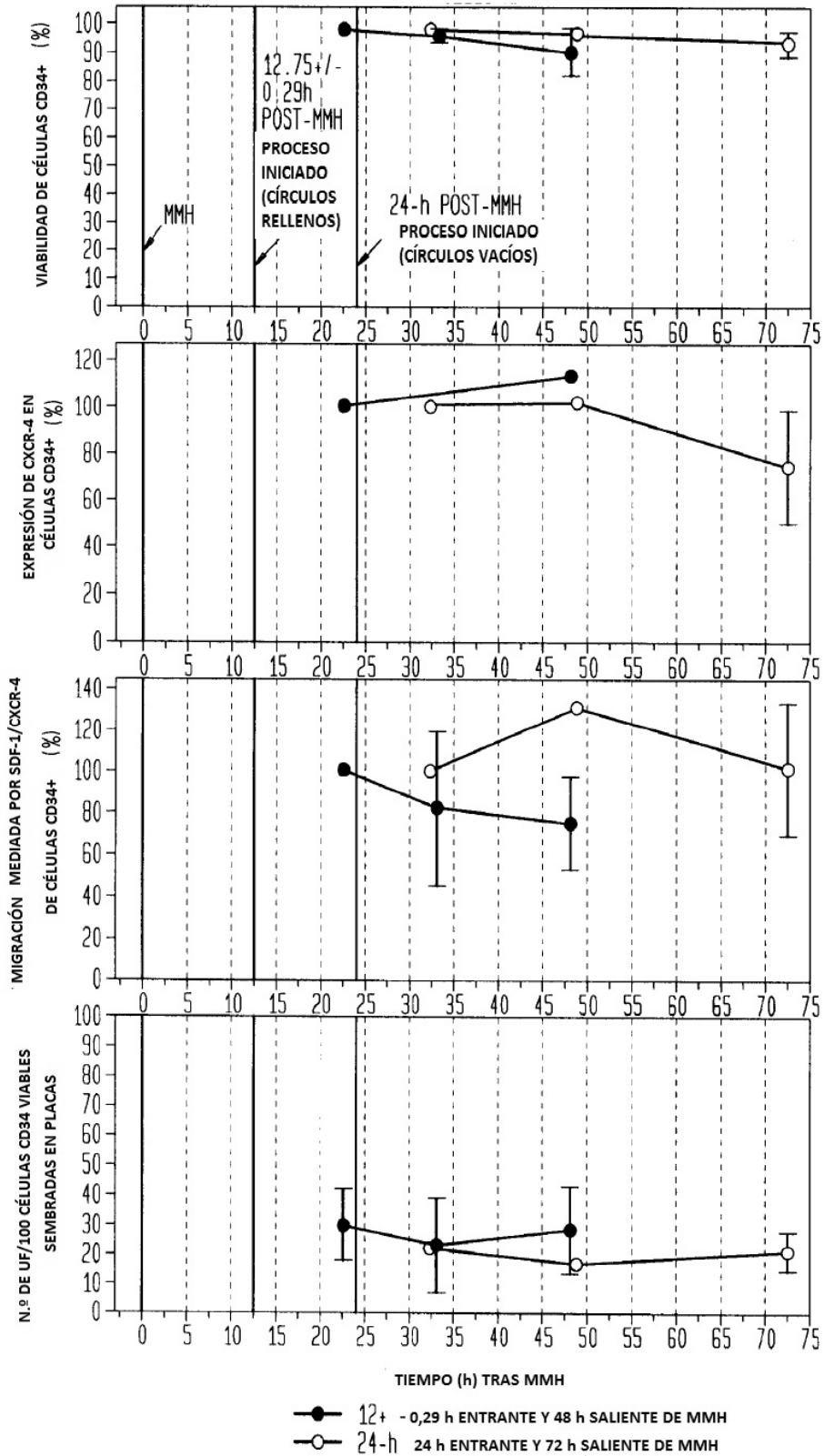
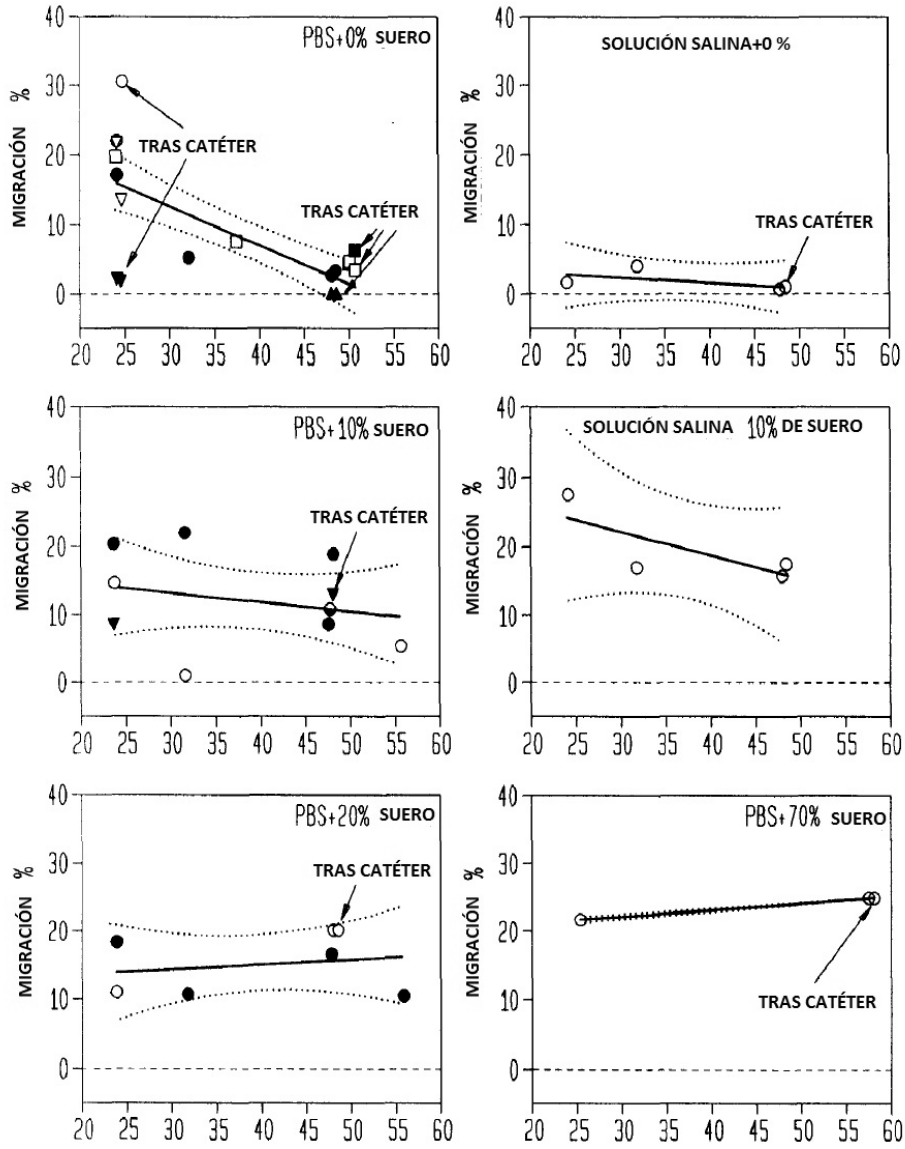


FIG. 2

EFICIENCIA MIGRATORIA DE CÉLULAS CD34+ SELECCIONADAS CON ISOLEX



MECENAMIENTO DEL PRODUCTO DE CÉLULAS CD34+ TRAS EL PROCESAMIENTO CON ISOLEX (HORAS DESPUÉS DE LA OBTENCIÓN DE MO)

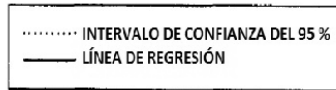


FIG. 3

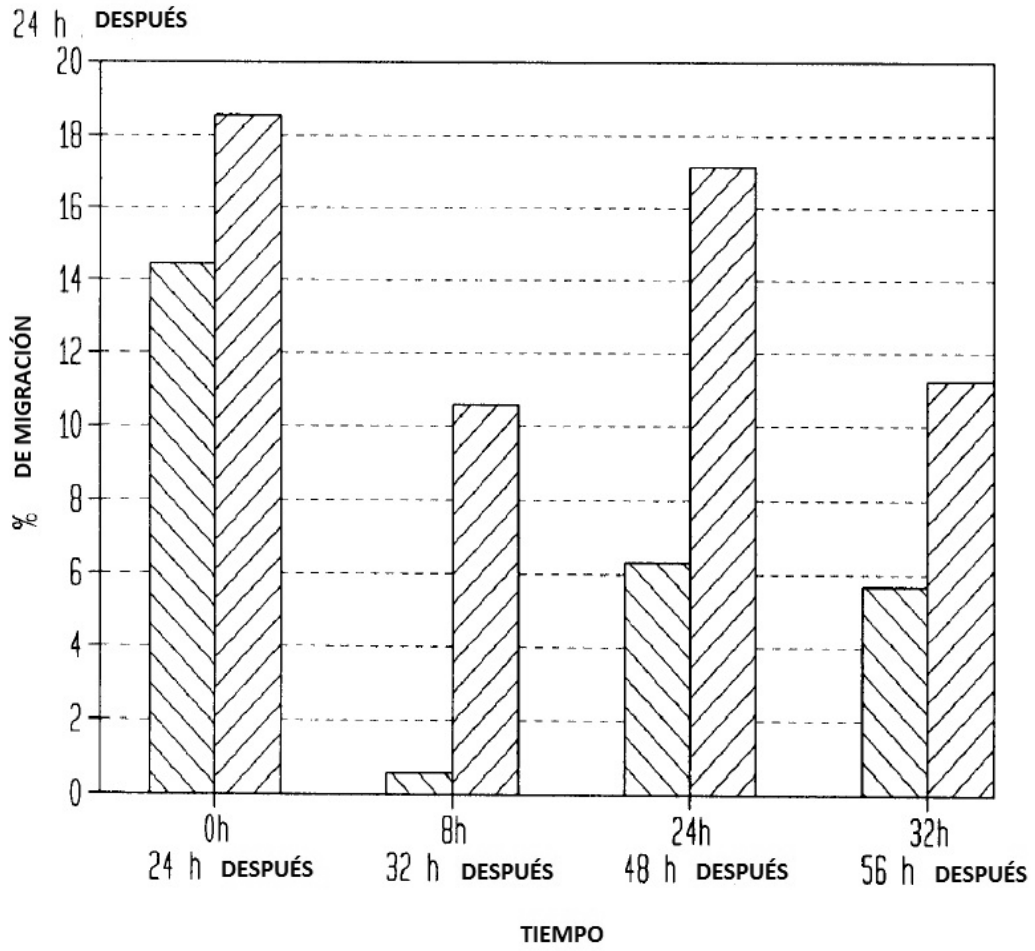


FIG. 4A

Δ RTSS vs CD34+ DOSIS X % MOVILIDAD SDF

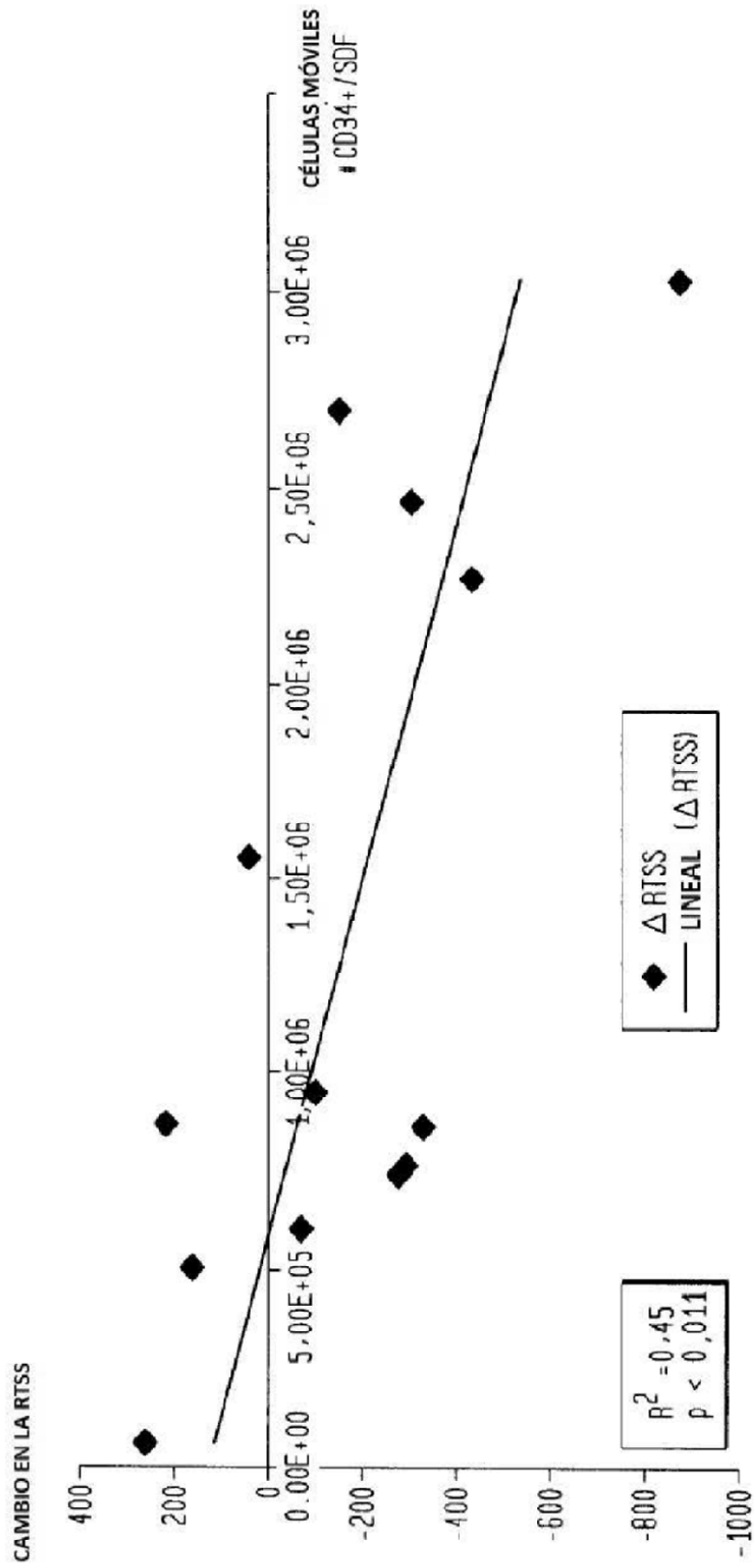


FIG. 4B

