

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 017**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/06** (2006.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**C12N 5/0789** (2010.01)

**A61K 35/28** (2015.01)

**A61K 35/44** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2009 PCT/US2009/037625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09117553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2009 E 09723461 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2271748**

54 Título: **Mejorar el potencial de retorno y reparación de células madre en lesiones vasculares**

30 Prioridad:

**20.03.2008 US 38164 P**

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

**24.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

**223 Grinter Hall**

**Gainesville, FL 32611, US y**

**BARTELMEZ, STEPHEN H. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARTELMEZ, STEPHEN, H. y**

**GRANT, MARIA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 665 017 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**

Mejorar el potencial de retorno y reparación de células madre en lesiones vasculares

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta aplicación reivindica la prioridad para el número de serie de EE. UU. 61/038,164.

**ANTECEDENTES**

Se ha demostrado que las células derivadas de la médula ósea circulante (BM) desempeñan un papel importante en el mantenimiento fisiológico normal y la reparación de la vasculatura corporal con aproximadamente 1-12% de células endoteliales en cualquier momento derivadas de BM (Schatteman, G.C. Adult bone marrow-derived hemangioblasts, endothelial cell progenitors, and EPCs, *Curr Top Dev Biol* 64, 141-80 (2004)). La capacidad de reparar el daño vascular podría tener un profundo impacto en las complicaciones inducidas por la diabetes. La diabetes afecta a 20 millones de estadounidenses o aproximadamente el 7 por ciento de la población. Las complicaciones diabéticas incluyen enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal, ceguera, así como enfermedad vascular periférica y nerviosa que puede conducir a amputaciones de miembros inferiores. Además, la prevención de complicaciones diabéticas podría ahorrar \$2,5 mil millones anualmente. La evidencia reciente sugiere que las células madre hematopoyéticas (HSC) se diferencian en estructuras vasculares, así como en todos los linajes de células hematopoyéticas y esto ha generado la era de las terapias celulares para la insuficiencia vascular. Estas terapias ahora intentan reemplazar metodologías tradicionales como cánulas intraluminales, angioplastia o injertos vasculares para aliviar la isquemia tisular (Losordo, D.W. & Dimmeler, S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies, *Circulation* 109, 2692-7 (2004)). Las células derivadas de BM pueden diferenciarse en células endoteliales y se cree que estas células son importantes en procesos tales como vasculogénesis y reparación vascular. Todo el endotelio diabético sufre daños como resultado del estrés oxidativo e hiperglucémico. El endotelio de la macrovasculatura lesionado, si no se repara, conduce a una propensión a la arteriosclerosis. Con respecto a la microvasculatura, este mismo daño endotelial produce daño capilar en el corazón, los nervios, la piel y la retina (Kugler, C.F. & Rudofsky, G. The challenges of treating peripheral arterial disease, *Vasc Med* 8, 109-14 (2003)).

En los capilares, un defecto en las células progenitoras endoteliales (EPCs) podría prevenir la reparación temprana de la lesión endotelial conduciendo a la isquemia del tejido. En la macrovasculatura, esta misma incapacidad para reparar el endotelio produce un aumento de las citocinas y una sobreexpresión de las moléculas de adhesión con un flujo de lipoproteínas, monocitos y células T; dando inicio a la lesión aterosclerótica (Ross, R., Glomset, J. & Harker, L. Response to injury and atherogenesis, *Am J Pathol* 86, 675-84 (1977)). Por lo tanto, la causa de la disfunción diabética microvascular y macrovascular puede ser la misma; falta de reparación de las EPC del endotelio. Caballero et al. divulga la reparación de daños vasculares isquémicos por EPCs CD34+ en ratones modelo diabéticos (Caballero S, Sengupta N, Afzal A et al., Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes*. 2007;56:960-967).

TGF-β1 es un regulador pleiotrópico de todas las etapas de la hematopoyesis (Ruscetti, F.W. & Bartelmez, S.H. Transforming growth factor beta, pleiotropic regulator of hematopoietic stem cells: potential physiological and clinical relevance, *Int J Hematol* 74, 18-25 (2001)). Además, las HSC expresan y secretan por sí mismas, formas activas de TGF-β (Ruscetti, F.W., Akel, S. & Bartelmez, S.H. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* 24, 5751-63 (2005)). Las tres isoformas de mamíferos (TGF-β1, 2 y 3) tienen efectos distintos pero superpuestos sobre la hematopoyesis, pero TGF-β1 es el gen expresado predominante en HSC. Dependiendo de la etapa de diferenciación de la célula diana, el ambiente local y la concentración de TGF-β, in vivo o in vitro, el TGF-β puede ser pro o antiproliferativo, pro o antiapoptótico, inducir o inhibir la diferenciación, y puede inhibir o aumentar la función celular diferenciada terminalmente. Aquí se describe por primera vez el descubrimiento de los inventores de que la neutralización transitoria del TGF-β endógeno en HSC aumenta dramáticamente el potencial de reparación vascular de la HSC circulante.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 muestra un gráfico que demuestra que los ratones trasplantados con células tratadas con anti TGF-β tenían un porcentaje de supervivencia aumentado en comparación con las células tratadas con control.

La figura 2 presenta una representación de una célula y los efectos de bloquear TGF-β.

La figura 3 muestra un gráfico que demuestra que las células CD34+ humanas tratadas con anti-TGF-β tenían migración mejorada en respuesta al factor de retorno de células madre/progenitoras SDF-1, sobre las células tratadas con control.

La figura 4 muestra un gráfico que demuestra que las células anti TGF- $\beta$  produjeron un mayor porcentaje de quimeras de células donantes en comparación con las células tratadas con control.

Figura 5: Efecto del bloqueo de TGF  $\beta$ 1-PMO en subconjuntos de CD34<sup>+</sup>: supervivencia en ausencia de factores de crecimiento y proliferación posterior inducida por la adición de HGF. (A) Supervivencia de células sanguíneas del cordón umbilical ordenadas lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (~99% de células CD34<sup>+</sup>) en ausencia de factores de crecimiento que muestran números de células viables en cultivo a lo largo del tiempo. Las células (10 células por pozo, X 8 pozos replicados) se clasificaron directamente en pozos de fondo redondo que contenían FBS al 10%/HS al 10%/IMDM (medio solo) o 40  $\mu$ g/ml de TGF- $\beta$ 1-PMO o 40  $\mu$ g/ml de PMO control. El día 5, se añadieron HGF a los pozos (concentraciones finales 20 ng/ml de Tpo, 50 ng/ml de SCF, 50 ng/ml de IL-3, 20 ng/ml de IL-6) para detectar las células que sobrevivieron durante el período de los primeros 5 días. (B) Supervivencia de células ordenadas de sangre de cordón umbilical línea<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (~1% de células CD34<sup>+</sup>) en ausencia de factores de crecimiento que muestran números de células viables en cultivo a lo largo del tiempo, como se describió anteriormente.

Figura 6: el tratamiento con TGF  $\beta$ 1-PMO de aumentos de HSC y la proliferación posterior inducida por la adición de HGF. Bajo condiciones similares a las discutidas para la figura 5, células CD34<sup>+</sup> de médula ósea humana normal o sangre de cordón umbilical (C), sangre periférica humana normal o diabética (D), (10 células por pozo, X 8 pozos replicados) se trataron con TGF- $\beta$ 1-PMO o PMO control (40  $\mu$ g/ml) y los resultados se expresan como % de pozos que exhibieron una proliferación significativa (>1.000 células por pozo) 5 días después de la adición del factor de crecimiento.

Figura 7: Efectos de las PMOs sobre la migración de EPCs CD34<sup>+</sup> no diabéticas y diabéticas en respuesta a SDF-1 (100 nM) en ensayo de cámara Boyden: la migración de células diabéticas fue significativamente menor en comparación con las células no diabéticas cuando se trataron con PMO control (P<0,05). El tratamiento con anti TGF- $\beta$ -PMO mejoró la migración a SDF-1 en ambos grupos (P<0,01 no diabético, P<0,05 diabético).

Figura 8: Efectos de las PMOs en la expresión del ARNm de los receptores CXCR4 y CXCR7 en EPCs CD34<sup>+</sup>: la expresión se cuantificó mediante PCR en tiempo real y los resultados se normalizaron para la expresión de  $\beta$ -actina. El tratamiento con PMO control causó un aumento en la expresión de CXCR4 en células CD34<sup>+</sup> no diabéticas en comparación con la de las células tratadas con medio (P<0,05), pero no en las células diabéticas. El tratamiento con anti TGF- $\beta$ -PMO provocó una subregulación de la expresión de CXCR4 en células no diabéticas (P<0,05), mientras que la expresión se sobrerregulaba en células diabéticas (P<0,001) en comparación con la de PMO control.

Figura 9: Vía de señalización implicada en la liberación de NO por SDF-1 en EPCs CD34<sup>+</sup>: la liberación de NO en células CD34<sup>+</sup> no diabéticas se evaluó mediante imágenes de fluorescencia DAF-FM. La liberación de NO en respuesta a SDF-1 se evaluó en ausencia y presencia de diferentes inhibidores farmacológicos. Los paneles (a)-(f) muestran imágenes representativas de la fluorescencia DAF-FM sin (a) tratamiento (tiempo-control) o (b) después del tratamiento con SDF-1 100 nM en ausencia de bloqueadores farmacológicos o en presencia de (c) 10  $\mu$ M de AMD3100 o (d) 100 ng/ml de toxina pertussis o (e) 20  $\mu$ M de LY294002 o (f) 20  $\mu$ M de triciribina. A la izquierda hay una escala de colores para la fluorescencia DAF-FM. (g) Resumen de los efectos de diferentes tratamientos farmacológicos sobre la liberación de NO mediada por SDF-1 expresada como aumento porcentual en comparación con el tiempo-control. Se observó una reducción significativa en la liberación de NO después del tratamiento con AMD3100 (P<0,001), toxina pertussis (P<0,01), LY294002 (P<0,001) o triciribina (P<0,01).

Figura 10: Efectos de las PMOs en la liberación de NO por SDF-1 en EPCs CD34<sup>+</sup> diabéticas y no diabéticas: la liberación de NO en respuesta a SDF-1 se evaluó mediante imágenes de fluorescencia DAF-FM en células diabéticas y no diabéticas después del tratamiento con control o anti TGF- $\beta$ -PMO. (a) Imágenes de fluorescencia DAF-FM representativas de células no diabéticas después del tratamiento con control o anti TGF- $\beta$ -PMO y estimuladas con 100 nM de SDF-1. A la izquierda se muestra la escala de colores para la fluorescencia DAF-FM. (b) Resumen de los efectos de las PMOs sobre la liberación de NO mediada por SDF-1 en células no diabéticas expresada como porcentaje de tiempo-control. La liberación de NO fue similar después del tratamiento con control o anti TGF- $\beta$ -PMOs. Paneles (c)-(h) imágenes de fluorescencia DAF-FM representativas de células diabéticas CD34<sup>+</sup> después del tratamiento de PMOs y estimuladas con SDF-1 en ausencia o presencia de bloqueadores farmacológicos. Control de células tratadas con PMO: (c) y (d) tiempo-control y células estimuladas con SDF-1, respectivamente. Células tratadas con anti TGF- $\beta$ -PMO (e) tiempo-control, (f) SDF-1 estimulado, (g) SDF-1-estimulado en presencia de 10  $\mu$ M AMD3100 y (h) SDF-1 estimulado en la presencia de 100 ng/ml de toxina pertussis. A la izquierda hay una escala de colores para la fluorescencia DAF-FM. (i) Resumen de los efectos de las PMOs y los tratamientos farmacológicos sobre la liberación de NO por SDF-1. La liberación de NO es significativamente mayor en células diabéticas tratadas con anti TGF- $\beta$ -PMO en comparación con PMO control (P<0,0001). El aumento de la liberación de NO por SDF-1 en las células diabéticas después del tratamiento con anti TGF  $\beta$ -PMO se redujo significativamente por AMD3100 (P <0,01) y la toxina pertussis (P<0,01).

Figura 11: el tratamiento con TGF- $\beta$ 1-PMO de HSC aumenta el retorno a áreas de lesión por láser en la retina. Análisis morfométrico que muestra un aumento en el reclutamiento de HSC a los sitios de lesión por láser después de la transferencia adoptiva de HSC que se sometió a un bloqueo nocturno de TGF- $\beta$  endógeno con TGF- $\beta$ 1-PMO frente a PMO control, \*p<0,05.

Figura 12: Las HSCs tratadas con anti-TGF- $\beta$ -PMO se integran en la vasculatura degenerada en ojos de ratón dañados por lesión I/R. (A) HSCs pretratadas con anti TGF- $\beta$ -PMO o PMO control inyectadas por vía intravítrea que muestran la incorporación en la vasculatura isquémica retiniana. Las HSCs muestran un aumento sustancial en la incorporación en el grupo pretratado con anti TGF- $\beta$ -PMO. (B) La cuantificación morfométrica de HSCs incorporadas expresadas en términos de intensidad de fluorescencia promedio por campo de 100 mm<sup>2</sup>.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa en y es un desarrollo adicional del descubrimiento de los inventores de que la exposición de las HSCs al bloqueo de TGF- $\beta$  justo antes del trasplante acelera el injerto de HSC y también aumenta su capacidad para rescatar de la falla hematopoyética a un ratón irradiado letalmente.

Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud es una composición que comprende EPCs CD34<sup>+</sup> tratados, obteniéndose dichos EPCs CD34<sup>+</sup> tratados mediante la obtención de EPCs CD34<sup>+</sup> de un sujeto y tratando dichos EPCs CD34<sup>+</sup> adquiridos, ex vivo, con una actividad de bloqueo del agente de TGF- $\beta$ 1 en dichas células para obtener EPCs CD34<sup>+</sup> tratados, para usar en un método de tratamiento de lesiones vasculares, en el que dicha actividad bloqueadora de agente de TGF- $\beta$ 1 en dichas células es un nucleótido antisentido específico para una secuencia de ARNm que codifica TGF- $\beta$ 1 o es un anticuerpo específico para TGF- $\beta$ 1.

Los inventores creen que el tratamiento de las células madre, en particular, las HSCs, aumenta su capacidad de retorno a lesiones vasculares y, por lo tanto, aumenta el potencial reparador de las HSCs tratadas. Las células precursoras endoteliales tienen la capacidad de promover la reparación vascular. La metodología descrita aquí del bloqueo transitorio de TGF- $\beta$  en EPCs aumenta la capacidad de tales células para proliferar, migrar y retornar a las áreas de lesión. Este bloqueo temporal de TGF- $\beta$  da como resultado la liberación de estas células de la inhibición del crecimiento. Estos típicamente expresan altos niveles de TGF- $\beta$  para mantener estas células en su estado natural de inactividad como células madre. Este tratamiento aumenta el potencial de reparación vascular, que se aplica a todos los vasos. De acuerdo con una realización de la invención, la reparación de vasos coronarios después de un infarto de miocardio se consigue mediante la administración de células madre tratadas. En otra realización, los vasos cerebrales se reparan después del accidente cerebrovascular. Además, los lechos vasculares periféricos lesionados se reparan mediante la administración de células tratadas.

Una realización de la presente invención se refiere a un método para tratar lesiones vasculares en un sujeto que lo necesita. El término sujeto como se usa en el presente documento se refiere a mamíferos humanos o no humanos. Los mamíferos no humanos incluyen, pero no se limitan a, roedores tales como ratas y ratones, gatos, perros, caballos, ganado, cabras, ovejas o cerdos. El método implica la obtención de células madre hematopoyéticas del sujeto para obtener células madre hematopoyéticas procuradas. Las células madre hematopoyéticas procuradas se tratan, ex vivo, bloqueando la actividad de TGF- $\beta$  en las células. Ejemplos de agentes bloqueadores de TGF- $\beta$  se divulgan en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6869795, 6841542 y 6627191. En una realización específica, el TGF- $\beta$  se bloquea sometiendo las células procuradas a un anticuerpo específico para TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 3. Los ejemplos específicos de anticuerpos útiles de acuerdo con las enseñanzas aquí se enseñan en la patente de los Estados Unidos No. 6627191. En otra realización específica, el TGF- $\beta$  está bloqueado por un oligómero antisentido. Ejemplos específicos de oligómeros antisentido útiles de acuerdo con las enseñanzas aquí se divulgan en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6869795 y 6841542.

Como se proporciona por los métodos de la presente invención, el término "administrando", "administrar" o "administración" con respecto a la administración de células a un sujeto se refiere a inyectar una o una pluralidad de células con una jeringa, insertando las células madre con un catéter o implantar quirúrgicamente las células madre. En ciertas realizaciones, las células madre se administran en una cavidad corporal conectada de manera fluida a un tejido diana. En otras realizaciones, las células madre se insertan utilizando una jeringa o catéter, o se implantan quirúrgicamente directamente en el sitio del tejido diana. En otras realizaciones, las células madre se administran sistémicamente (por ejemplo, parenteralmente). En otros ejemplos específicos, las células madre se administran por administración intraocular, administración intramuscular, administración subcutánea o administración intraperitoneal.

Como se proporciona por los métodos de la presente invención aquí, el término "administrando", "administrar" o "administración" con respecto a la administración de un agente de bloqueo de TGF- $\beta$  a un sujeto se refiere a administración parenteral, intraperitoneal, intramuscular, administración intraocular incluyendo transescleral y administración e inyección intravítrea; administración transdérmica, administración oral, administración intranasal, administración directa a un sitio objetivo o administración a una cavidad corporal en comunicación fluida con un sitio diana.

Como se usa aquí, el término "mejora de la reparación de una lesión vascular" se refiere a una mejora en el estado de una lesión en los vasos sanguíneos del cuerpo. La mejora en el estado puede implicar la cicatrización parcial o total de la lesión. La curación puede incluir la remodelación del tejido herido en la lesión y el tejido circundante.

Como se usa aquí, los términos "oligonucleótido antisentido" y "oligómero antisentido" se usan de forma intercambiable y se refieren a una secuencia de bases de nucleótidos y un esqueleto principal subunidad a

subunidad que permite que el oligonucleótido u oligómero antisentido se hibride con una secuencia diana en un ARN mediante emparejamiento de bases Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ARN:oligómero dentro de la secuencia diana. El oligómero puede tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o una complementariedad cercana. Dichos oligómeros antisentido pueden bloquear o inhibir la traducción del ARNm que contiene la secuencia diana, o inhibir la transcripción génica, pueden enlazarse a secuencias de doble cadena o de cadena sencilla, y se puede decir que están "dirigidos" a una secuencia con la que se hibrida.

El término "coadministración" o "administración simultánea", cuando se usa, por ejemplo con respecto al agente bloqueante de TGF- $\beta$  y una muestra de células tratadas, se refiere a la administración del agente y las células de manera que ambas puedan alcanzar simultáneamente un efecto fisiológico. Sin embargo, el agente y las células no necesitan administrarse juntos. En ciertas realizaciones, la administración de uno puede preceder a la administración del otro, sin embargo, tal coadministración típicamente da como resultado que tanto el agente como las células estén presentes simultáneamente en el cuerpo (por ejemplo, en el plasma) en una fracción significativa (por ejemplo, 20% o más, preferiblemente 30% o 40% o más, más preferiblemente 50% o 60% o más, lo más preferiblemente 70% o 80% o 90% o más) de su concentración de suero máxima para cualquier dosis dada.

La figura 1 muestra uno de una serie de experimentos en los que 10-12 ratones por grupo fueron transplantados con un número creciente de LTR-HSC altamente purificado en ausencia de "médula de soporte". La "médula de soporte" proporciona un mecanismo de repoblación rápida en el que las plaquetas donantes y neutrófilos se pueden generar dentro de las primeras 1,5 semanas después del trasplante, afectando así un rescate hematopoyético. Este bloqueo temporal de TGF- $\beta$  en LTR-HSC indujo la supervivencia en 60-100% de los ratones que recibieron solo 60-250 LTR-HSC por ratón. LTR-HSC tratado con isotipo de anticuerpos indujo solo el 10% de supervivencia y solo a la dosis de células más alta probada (1.000 LTR-HSC por ratón). Por lo tanto, estos estudios descubren un efecto profundo que tiene el bloquear transitoriamente el TGF- $\beta$  (2-4 días) en promover el injerto y la proliferación de LTR-HSC.

En estudios posteriores, se examinó la capacidad de LTR-HSC (CD45.1 congénica) para competir con otras células madre en la médula de soporte (CD45.2 congénica). La Figura 4 representa la notable diferencia en la repoblación de células donantes después de un breve tratamiento con anticuerpo anti TGF- $\beta$ . LTR-HSC purificado a partir de ratones B6SJL (CD45.1<sup>+</sup>) se trataron con anticuerpo anti TGF- $\beta$  en PBS durante 1-3 horas y luego se transplantaron en ratones C57Bl6 irradiados letalmente (950 rads) (CD45.2) junto con 400.000 médulas de soporte (células de soporte/competidoras de médula ósea no fraccionadas (CD45.2)). Las barras blancas ( $\pm$  S.D.) muestran un injerto relativamente bajo de LTR-HSC tratada con anticuerpo isotipo IgG1K de control, que es similar a la observada con LTR-HSC no tratada (no mostrado). Por el contrario, las barras rellenas muestran el injerto mediado por 100 LTR-HSC tratadas con anticuerpo anti TGF- $\beta$  durante 1-2 horas. Estas LTR-HSC se injertaron rápidamente después de un trasplante intravenoso para producir más de 30% de células donantes en tres semanas con injerto sostenido de 60-70% durante más de nueve meses. El injerto precoz fue predominantemente neutrófilos donantes seguidos por células B y luego células T en 1,5 meses. Por lo tanto, el bloqueo del TGF- $\beta$  endógeno en LTR-HSC indujo no solo una repoblación rápida sino también un injerto duradero de células donantes. Por lo tanto, el HSC donante repoblador retuvo su capacidad de repoblación a largo plazo y también generó altos niveles de HSC de repoblación a corto plazo que son realmente responsables de la reconstitución hematopoyética de las células diferenciadas.

Sin estar ligados a ninguna teoría particular, es la creencia de los inventores que uno de los mecanismos implicados en el aumento del potencial de injerto medular del bloqueo de TGF- $\beta$  en HSCs puede implicar el retorno a la médula o sitios de daño vascular mediante una expresión aumentada de ciertos receptores/factores, como se muestra en la figura 2. La figura 3 muestra la migración de células CD34<sup>+</sup> humanas después del pretratamiento con anticuerpo anti TGF- $\beta$  o anticuerpo de control de isotipo no inmune. Las células se expusieron al anticuerpo durante una hora y luego se cargaron en una cámara de Boyden. SDF-1, el principal factor de retorno de las células madre/progenitoras, se usó como el efector de la quimiotaxis. El bloqueo del ligando de TGF- $\beta$  claramente da como resultado una migración mejorada en respuesta a SDF-1. Los datos son medias  $\pm$  S.D. de pozos por triplicado. Los valores P son contra las células no tratadas expuestas solo a medios basales, es decir, sin señal migratoria.

En otra realización, las células madre hematopoyéticas se pueden obtener de un paciente que necesita un trasplante (por ejemplo, un paciente que tiene un accidente cerebrovascular o un evento de infarto de miocardio, un paciente que padece CNV, un paciente que padece de aterosclerosis, un paciente diabético o cualquier otro paciente que tiene una lesión vascular o riesgo de lesión vascular); enriquecido, tratado in vitro (ex vivo) usando los métodos descritos aquí, y devuelto al paciente.

Al practicar una realización específica de la invención, las células madre hematopoyéticas pueden tratarse in vitro (ex vivo) con uno o más oligonucleótidos antisentido para una secuencia de ácido nucleico que se expresa preferencialmente en células madre, seguido de la administración a un sujeto. El sujeto puede ser el mismo individuo del que se obtuvieron las células madre (trasplante autólogo) o un individuo diferente (trasplante alogénico). En el trasplante alogénico, el donante y el receptor se emparejan en función de la similitud de los antígenos HLA con el fin de minimizar la respuesta inmune de las células donantes y receptoras una contra la otra.

En un aspecto, la invención es dirigida a métodos para modificar el desarrollo de células madre hematopoyéticas, obteniendo una población de HSCs y exponiéndolas ex vivo a uno o más oligómeros antisentido resistentes a

nucleasa que tienen alta afinidad a una secuencia de ácido nucleico complementaria o casi complementaria preferencialmente expresada en células madre. En otro aspecto, una población de HSCs se expone a un anticuerpo anti TGF- $\beta$ .

5 En un aspecto, una vez extraídas y enriquecidas, las células madre, por ejemplo, HSC, se pueden cultivar ex vivo en presencia de una o más citocinas y uno o más oligómeros antisentido y/o anticuerpos descritos aquí. Tal oligómero antisentido, y/o composición de células madre hematopoyéticas tratadas con anti TGF- $\beta$  encuentran utilidad en la reparación, mejorando la reparación de las lesiones vasculares.

10 Los ejemplos de citocinas para dicho cultivo ex vivo incluyen, pero no se limitan a, IL-3, IL-6, SCF y TPO. Una población de células madre hematopoyéticas para usar en los métodos de la invención es típicamente tanto humana como alogénica, o autóloga.

15 Los oligómeros antisentido ejemplares tienen como objetivo a uno o más de un gen de dedo de zinc EVI-1, un gen de respuesta de privación de suero (SDR), un gen de multimerina, un gen de transglutaminasa tisular, un gen FE65, un gen RAB27, un gen Jagged2, un gen Notch1, un gen Notch2 y un gen Notch3.

20 Una vez que se obtiene un gran número de células, es decir, células de un linaje particular, las células pueden usarse inmediatamente o congelarse en nitrógeno líquido y almacenarse durante largos periodos de tiempo, usando condiciones estándar, de modo que puedan descongelarse y utilizarse posteriormente, por ejemplo, para administración a un paciente. Las células generalmente se almacenarán en DMSO al 10%, suero de ternera fetal (FCS) al 50% y medio de cultivo celular al 40%. Se divulgan aquí métodos para modificar el desarrollo de células madre in vivo en un paciente que lo necesita, administrando al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene oligonucleótidos antisentido, donde el oligómero antisentido modula la expresión de un producto genético expresado preferencialmente en células madre.

25 Dicha administración de oligómeros antisentido in vivo también puede ser eficaz para mejorar el resultado terapéutico del sujeto afectando un mejoramiento del potencial de reparación de células madre endógenas no tratadas, o células madre que se han sometido, ex vivo, a tratamiento y luego se han administrado al sujeto.

30 En un ejemplo, la composición de oligonucleótido antisentido se administra a una concentración y durante un período suficiente para aumentar la. Se entenderá que la administración in vivo de dicho oligómero antisentido a un sujeto puede proporcionar un medio para aumentar la población de células progenitoras comprometidas de linaje y su progenie en la circulación periférica del sujeto, y/o afectar un retraso o disminución del crecimiento de células cancerosas o un tumor sólido, o una reducción en el número total de células cancerosas o carga total del tumor, dependiendo de, (1) la duración, dosis y frecuencia de la administración antisentido, (2) el uno o más oligómeros antisentido usados en el tratamiento; y (3) la condición general del sujeto.

35 Se aprecia que también se contempla cualquier método que sea eficaz para administrar el agente bloqueante de TGF- $\beta$  a las células madre hematopoyéticas o para introducir el agente en el torrente sanguíneo.

40 La administración transdérmica de agente bloqueante de TGF- $\beta$  se puede lograr mediante el uso de un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para, por ejemplo, administración tópica. Un ejemplo de suministro de oligómero morfolino se describe en la solicitud de patente PCT WO 97/40854, incorporada aquí como referencia. El agente bloqueante de TGF- $\beta$ , contenido en un portador farmacéuticamente aceptable, puede administrarse por vía oral. Se puede administrar un agente bloqueante de TGF- $\beta$  a intervalos regulares durante un período de tiempo corto, por ejemplo, diariamente durante dos semanas o menos. Sin embargo, en algunos casos, el agente bloqueante de TGF- $\beta$  se administra intermitentemente durante un período de tiempo más largo.

45 Típicamente, se administran una o más dosis de agente bloqueante de TGF- $\beta$ , generalmente a intervalos regulares durante un período de aproximadamente una a dos semanas. Las dosis preferidas para la administración oral son desde aproximadamente 1  $\mu$ g de agente/paciente a aproximadamente 25 mg de oligómero/paciente (en base a un peso de un adulto de 70 kg). En algunos casos, pueden ser necesarias dosis mayores de 25 mg de agente bloqueante/paciente. Para la administración IV, las dosis preferidas son desde aproximadamente 0,05 mg de agente/paciente a aproximadamente 10 mg de agente/paciente (en base a un peso de un adulto de 70 kg).

50 El compuesto antisentido generalmente se administra en una cantidad suficiente para dar como resultado una concentración máxima en sangre de al menos 200-400 nM de agente de bloqueo.

55 En un ejemplo, el método comprende administrar a un sujeto, en un portador farmacéutico adecuado, una cantidad de un agente antisentido eficaz para inhibir la expresión de una secuencia diana de ácido nucleico de interés.

60 Se sigue que una composición de agente de bloqueo se puede administrar en cualquier vehículo conveniente, que es fisiológicamente aceptable. Dicha composición de agente de bloqueo puede incluir cualquiera de una variedad de portadores estándar farmacéuticamente aceptados empleados por las personas experimentadas en la técnica.

65

Ejemplos de tales portadores farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina regulada con fosfato (PBS), agua, etanol acuoso, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, emulsiones de triglicéridos, agentes humectantes, tabletas y cápsulas. Se entenderá que la elección del portador fisiológicamente aceptable adecuado variará dependiendo del modo de administración elegido.

En algunos casos, los liposomas se pueden emplear para facilitar la absorción del agente de bloqueo en las células. (Véase, por ejemplo, Williams, 1996; Lappalainen, et al., 1994; Uhlmann, et al., 1990; Gregoriadis, 1979). Los hidrogeles también pueden usarse como portadores para la administración de oligómeros antisentido, por ejemplo, como se describe en WO 93/01286. Alternativamente, el agente bloqueante se puede administrar en microesferas o micropartículas. (Véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987).

También se contemplan las composiciones de liberación prolongada. Estas pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados tales como películas o microcápsulas.

Se entenderá que el régimen de tratamiento in vivo eficaz del agente de bloqueo variará de acuerdo con la frecuencia y la ruta de administración, así como con la condición del sujeto bajo tratamiento. Por consiguiente, tal terapia in vivo generalmente requerirá monitorización mediante pruebas apropiadas para la afección que se está tratando y un ajuste correspondiente en la dosis o régimen de tratamiento con el fin de lograr un resultado terapéutico óptimo.

La eficacia de un régimen terapéutico dado, que implica los métodos descritos aquí, puede controlarse, por ejemplo, mediante ensayos FACS convencionales para el fenotipo de células en la circulación del sujeto bajo tratamiento con el fin de controlar los cambios en los números de células de diversos linajes (por ejemplo, células progenitoras de linaje comprometidas y su progeñie) en la circulación periférica del sujeto en respuesta a dicho tratamiento.

El análisis fenotípico generalmente se lleva a cabo usando anticuerpos monoclonales específicos para el tipo de célula que se analiza, por ejemplo, neutrófilos, plaquetas, linfocitos, eritrocitos o monocitos. El uso de anticuerpos monoclonales en dichos análisis fenotípicos se emplea rutinariamente para análisis celulares por las personas experimentadas en la técnica. Los anticuerpos monoclonales específicos para tipos de células particulares están disponibles comercialmente.

Las células madre hematopoyéticas se caracterizan fenotípicamente como se detalla anteriormente. Dichos análisis fenotípicos generalmente se llevan a cabo junto con ensayos biológicos para cada tipo de célula particular de interés, por ejemplo (1) células madre hematopoyéticas (LTCIC, ensayos de formación de adoquines y ensayos para HPP-CFC), (2) granulocitos o neutrófilos (ensayos de agar clonal o metilcelulosa en los que el medio contiene G-CSF o GM-CSF), (3) megacariocitos (ensayos de agar clonal o metilcelulosa en los que el medio contiene TPO, IL-3, IL-6 e IL-11), y (4) células eritroides (agar clonal o ensayos de metil celulosa en los que el medio contiene EPO y SCF o EPO, SCF e IL-3).

Se entenderá que la naturaleza exacta de tales ensayos fenotípicos y biológicos variará dependiendo de la afección que se trata y si el tratamiento está dirigido a potenciar la población de células madre hematopoyéticas o la población de células de un linaje o linajes particulares.

En los casos en que el sujeto ha sido diagnosticado con un tipo particular de lesión, el estado de la lesión también se controla usando técnicas de diagnóstico adecuadas al tipo de lesión bajo tratamiento para determinar si la reparación de la lesión ha progresado.

Ejemplo 1: El bloqueo de TGF- $\beta$  1 endógeno en células CD34<sup>+</sup> humanas por anti TGF- $\beta$ -PMO promueve la supervivencia de EPC en ausencia de factores de crecimiento.

Para este estudio, AVI-Biopharma ensambló morfolinos de cinco subunidades diferentes (incluida la inosina para aumentar la solubilidad), con cada subunidad unida a un anillo morfolino de seis miembros. Las subunidades individuales se ensamblaron en el orden deseado mediante enlaces entre subunidades de fósfordiamidato no iónicos. El diseño de PMO confirió una ventaja única de especificidad para la inhibición de TGF- $\beta$ 1, esencialmente sin efectos fuera del objetivo. Los estudios iniciales utilizaron conjugados de PMO-FITC para medir directamente la absorción de PMO en HSC murino altamente enriquecido y mostraron que PMO se absorbió por HSC y se estabilizó después de la incubación ex vivo durante la noche (datos no mostrados). De manera similar, tras el examen de la vida media de PMO en linfocitos humanos, se encontró que era de aproximadamente 2-4 días (datos no mostrados).

Dos poblaciones discretas de células madre de sangre de cordón, lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Figura 5A) o lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (Figura 5B), además de células lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> de sangre periférica y médula ósea (Figura 6A) fueron tratados con medio que contiene PMO o no fueron tratados. Después de 5 días, todas las células recibieron factores de crecimiento (Tpo, SCF, IL-3, IL-6) para detectar células vivas, que responden al factor de crecimiento y se determinó su potencial proliferativo después de 14 días. El día 14, las células expuestas a 20-300  $\mu$ g/ml de anti TGF- $\beta$ -PMO típicamente formaron macro colonias (>100.000 células) después de la adición de factores de crecimiento (Figura 5). Sin embargo, el anti TGF- $\beta$ -PMO a 40  $\mu$ g/ml dio como resultado la mayor supervivencia celular.

Las células derivadas de BM respondieron de manera similar a las células derivadas de sangre de cordón con tratamiento anti TGF- $\beta$ -PMO, mostrando una proliferación aumentada en comparación con las células tratadas con PMO de control (Figura 6A). Cuando las células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica de los diabéticos y los controles emparejados por edad y sexo se expusieron a anti TGF- $\beta$ -PMO (Figura 6B), las células respondieron con proliferación mejorada en ausencia de factores de crecimiento en comparación con las células tratadas con control PMO.

Ejemplo 2: bloqueo de TGF- $\beta$ 1 endógeno por anti TGF- $\beta$ -PMO acelera la migración de EPCs CD34<sup>+</sup> humanos a SDF-1

El potencial migratorio de HSC es vital para su movilización de la médula ósea a la circulación y de la circulación a las áreas de reparación vascular. SDF-1 es la citocina clave que estimula la migración de EPCs CD34<sup>+</sup> a sitios de isquemia (Urbich C, Aicher A, Heeschen C, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:733-742). Previamente, reportamos que la migración de las células CD34<sup>+</sup> en respuesta a SDF-1 está significativamente alterada en la diabetes.<sup>17</sup> Como se sabe que TGF- $\beta$ -1 subregula el SDF-1 y su receptor CXCR4 (Wright N, de Lera TL, Garcia-Moruja C, et al. Transforming growth factor-beta1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood.* 2003;102:1978-1984), preguntamos si el bloqueo de TGF- $\beta$  estimularía la migración de estas células en respuesta a SDF-1. Observamos que, como hemos hecho previamente (Segal MS, Shah R, Afzal A, et al. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes.* 2006;55:102-109), que la migración de EPCs CD34<sup>+</sup> diabéticas fue significativamente menor que la de células no diabéticas. El bloqueo de la expresión de TGF- $\beta$ 1 endógeno mejoró la migración tanto en células diabéticas ( $p < 0,05$ ) como no diabéticas ( $p < 0,01$ ) en comparación con células tratadas con PMO control (Figura 7).

Para caracterizar adicionalmente este efecto, se examinó la expresión del ARNm de CXCR4 y proteína después del tratamiento con PMO. Inesperadamente, en EPC CD34<sup>+</sup> normal, la expresión del ARNm de CXCR4 aumentó después del tratamiento con PMO de control, lo que sugiere que la expresión de CXCR4 cambia con el tiempo bajo estas condiciones experimentales en comparación con las células incubadas con medio solo ( $P < 0,05$ ). Además, el ARNm de CXCR4 disminuyó significativamente con el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 en comparación con las células en medio solo ( $P < 0,05$ ) (Figura 4A). Por el contrario, la expresión de CXCR-4 en células diabéticas CD34<sup>+</sup> no cambió mediante el tratamiento con PMO de control, pero aumentó significativamente en las células tratadas con anti TGF- $\beta$ -PMO ( $P < 0,001$ ).

A continuación se evalúa la expresión de superficie del receptor CXCR4 en células CD34<sup>+</sup> después de los tratamientos con PMO. Como se muestra en la Tabla 1, el porcentaje de células que son positivas para CXCR4 aumentó significativamente durante el período de tratamiento, independientemente del bloqueo de TGF- $\beta$ 1, o del origen celular (células no diabéticas y diabéticas).

Estos resultados imprevistos nos llevan a preguntarnos si el tratamiento anti TGF- $\beta$ -PMO altera la expresión de CXCR7, un segundo receptor recientemente identificado para SDF1 (Sierra F, Biben C, Martinez-Munoz L, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:14759-14764). CXCR7 se identificó inicialmente como un receptor del receptor huérfano acoplado a proteína G, RDC1, y recientemente desorfanizado y renombrado como CXCR7 (Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2005;280:35760-35766; Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med.* 2006;203:2201-2213). Los estudios de PCR en tiempo real revelaron que la expresión de ARNm de CXCR7 aumentaba por el bloqueo de TGF- $\beta$ 1 solo en las células CD34<sup>+</sup> no diabéticas ( $P < 0,001$ ) pero no en las células diabéticas (Figura 8B).

Ejemplo 3: bloqueo del TGF- $\beta$ 1 endógeno aumenta la generación de NO en EPCs CD34<sup>+</sup> diabéticos en respuesta a SDF-1

Los niveles intracelulares adecuados de NO son críticos para la migración de EPCs CD34<sup>+</sup> (Segal MS, Shah R, Afzal A, et al. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes.* 2006;55:102-109; Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-1376). Dado que observamos un efecto beneficioso significativo sobre la migración de las células no diabéticas y diabéticas por el bloqueo de TGF- $\beta$ 1, queríamos investigar si este efecto está asociado con cambios en la liberación de NO. Primero examinamos la liberación de NO en respuesta a SDF-1 en células CD34<sup>+</sup> tratadas con diferentes PMOs. La vía de transducción de señales implicada en la liberación de NO por SDF-1 en células CD34<sup>+</sup> no se ha elucidado. Por lo tanto, se utilizan diferentes inhibidores farmacológicos para delinear la vía en células CD34<sup>+</sup> de sujetos no diabéticos.

SDF-1 (100 nM) aumentó la generación de NO en un 45±4% (n=4, figura 9). La liberación de NO por los niveles de SDF1 disminuyó significativamente cuando las células fueron pretratadas con AMD3100 10 µM, un antagonista no peptídico específico del receptor CXCR4 (3±2%, P<0,001) o toxina pertussis, inhibidor de la proteína G<sub>i</sub> (100 ng/ml, 20±9%, P<0,01), o LY294002, un inhibidor de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) (20 µM, 12±3%, P<0,001) o triciribina, un inhibidor de Akt (30 µM, 12±3%, P<0,01) (Figura 9). Estos resultados sugieren que en las células CD34<sup>+</sup> la liberación de NO mediada por SDF-1 implica la vía CXCR4/proteína G<sub>i</sub>/PI3K/Akt.

Luego se estudió si el pretratamiento con control o anti TGF-β-PMO (40 µg/ml) influyó en la liberación de NO en estas células. Las células CD34<sup>+</sup> derivadas de sujetos no diabéticos pretratados con PMO control o anti TGF-β-PMO mostraron una liberación de NO en respuesta a SDF-1 en un grado similar, es decir, 60±5% y 54±4% (n=3) (Figura 10A y Figura 10B), respectivamente. En marcado contraste, las células diabéticas CD34<sup>+</sup> tratadas con anti TGFβ-PMO mostraron un marcado aumento en la generación de NO (69±7%, n=4, p<0,0001) en comparación con PMO control (9,2% n=4) (Figura 10C-6F y 10I). La liberación de NO restaurada en células diabéticas después del tratamiento con anti TGFβ-PMO se redujo significativamente por AMD3100 (28±2%, P<0,01) o toxina pertussis (16±3%, P<0,01) (Figuras 10G-6H y 10I), sugiriendo la activación del receptor CXCR4 en esta respuesta.

Ejemplo 4: bloqueo de TGF-β endógeno por anti TGF-β-PMO aumenta el retorno de HSCs murinas a lesiones de CNV

Para determinar si el bloqueo de TGF-β mejoraría el retorno de células madre a la retina dañada, se utilizó un modelo de lesión por láser. Como se muestra en la figura 11, el pretratamiento con TGF-β-PMO causó un aumento sustancial en el número de HSCs GFP+ que se reclutaron al sitio de lesión por láser. Por lo tanto, el tratamiento con TGF-β-PMO de HSCs dio como resultado que las células retornaran al sitio de la lesión más que las células tratadas con PMO control (p<0,05) o las células expuestas al medio solo.

Ejemplo 5: bloqueo de TGF-p endógeno en EPCs CD34<sup>+</sup> aumenta la reparación vascular en el modelo de lesión I/R retiniana

La exposición aguda de presión hidrostática a la cámara anterior del ojo causa una respuesta isquémica profunda y conduce a la degeneración capilar (formación de capilares acelulares, flecha blanca, figura 12). Estas lesiones son también el marcador característico patológico de la lesión isquémica retinopática en la diabetes. Las EPCs pretratadas con anti TGF-β-PMO mostraron un retorno profundo a las áreas de lesión isquémica en comparación con las EPCs CD34<sup>+</sup> tratadas con control PMO (Figura 12). Para cuantificar aún más la incorporación de HSC, las imágenes confocales individuales se analizaron para inmunorreactividad FITC por área de 100 µm<sup>2</sup>. El pretratamiento de EPCs con anti TGF-β-PMO dio como resultado un aumento de 2,5 veces en la incorporación de estas células a los capilares de la retina lesionados, en comparación con el pretratamiento con PMO control (P<0,001). Las células CD34<sup>+</sup> diabéticas tratadas con PMO control esencialmente no mostraron reparación, ya que estas células son defectuosas e incapaces de migrar o participar en la reendotelización de los capilares acelulares. En marcado contraste, el pretratamiento de las células diabéticas con anti TGF-β-PMO da como resultado una respuesta reparadora robusta con la restauración de la capacidad de las células defectuosas para reparar los capilares acelulares.

Materiales y métodos para los ejemplos 1-5

#### Métodos

##### Aislamiento de EPCs CD34+ humanos

Sangre de cordón umbilical y EPCs CD34<sup>+</sup> de médula ósea se compraron de AllCells (Emeryville, CA) como poblaciones de células lin<sup>-</sup> seleccionadas positivamente, congeladas purificadas por perlas magnéticas que eran >95% de células CD34<sup>+</sup> por análisis FACS. Las células se descongelaron en un baño de agua a 37 °C, se diluyeron en un exceso de IMDM FBS al 10%, se sedimentaron por centrifugación (300xg durante 10 minutos), se lavaron por centrifugación una vez más y, finalmente, se contaron usando un hemocitómetro. La viabilidad, según lo determinado por la exclusión del colorante azul tripano, fue rutinariamente >95% después de la descongelación y los lavados.

Se llevó a cabo purificación adicional antes de los estudios de supervivencia y proliferación. Las células se ajustaron a 5X10<sup>9</sup>/ml en solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía suero bovino fetal al 2% (v/v) (FBS) y se incubaron con controles de anticuerpo murino único y anti CD34-PE murino, anti CD45-PE-Cy5 y anti-CD38-APC. Justo antes de la clasificación de las células, se añadió yoduro de propidio (2 µg/ml) para detectar células no viables. Las células CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>mid</sup> (HSCs expresan CD45<sup>mid</sup> y pueden separarse claramente de los linfocitos contaminantes, que expresan CD45<sup>high</sup>) y células CD38<sup>+/-</sup> se clasificaron directamente en placas de 96 pozos de fondo redondo (10±2 células/pozo) que contienen IMDM, suero de caballo al 10 %, SFB al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, 1-glutamina 20 mM e hidrocortisona 1 µM ± PMOs. El día 5, se agregó a los pozos un cóctel de factores de crecimiento hematopoyético (cóctel Hgf) que consiste en 20 ng/ml de trombopoyetina, 50 ng/ml de factor de células madre, 50 ng/ml de interleucina-3 y 20 ng/ml de interleucina-6, todos comprados a

PeproTech, NJ,. Las células fueron seguidas por microscopía de luz directa diaria (X200) para evaluar la proliferación celular. Las células que proliferaron en respuesta a factores de crecimiento se calificaron como células que sobrevivieron después del período de 5 días en ausencia de factores de crecimiento.

5 Las células CD34<sup>+</sup> CD45<sup>mid</sup> también se aislaron de sangre periférica de pacientes diabéticos y no diabéticos y se analizaron en los ensayos de supervivencia y proliferación como se describió anteriormente. Brevemente, se recogieron 20 ml de sangre fresca de acuerdo con los protocolos aprobados por IRB en tubos heparinizados, se diluyeron 1:1 en PBS con FCS al 2% y se aplicaron capas sobre 1,077 g/ml de LymphoPrep (Greiner bio-one, NC) y se centrifugaron durante 20 minutos a 400xg. Se recogieron células mononucleares de baja densidad y luego se  
10 incubaron con anticuerpos específicos de linaje (StemCell Technologies, Vancouver, BC) durante 15 minutos, seguido de microperlas magnéticas para enlazar células de linaje positivo. Después de la separación magnética, las células lin<sup>-</sup> se incubaron con anticuerpos anti CD34-PE, anti CD45-PE-Cy7 y ± CD38-APC (BD PharMingen, San Diego CA) más controles positivos simples y anticuerpos de control de isotipo como se describió anteriormente, ordenados por FACS, y sometidos a las mismas condiciones para los estudios de supervivencia y proliferación  
15 descritos anteriormente.

#### Aislamiento de HSCs murinas

20 Las HSCs se cosecharon de la médula ósea obtenida de fémures y tibias de ratones homocigóticos para GFP<sup>2</sup>. Se usaron c-kit marcados fluorescentemente (CD117) y Sca-1 (ambos de BD PharMingen, San Diego, CA) para seleccionar HSC enriquecido a partir de fracciones de células mononucleares usando un clasificador celular BD (FACS Calibur-Citómetro de Flujo, BD Bioscience, San Jose, CA). Hemos demostrado previamente usando esta técnica que esto produce una población de células de hemangioblastos/HSC 95% puras<sup>4</sup>.

25 Bloqueo de TGF-β ex vivo justo antes de la administración in vivo

Se diseñaron y sintetizaron anti TGF-β-PMOs para o PMOs de control (AVI-Biopharma, Portland, OR) como un polvo liofilizado y se disolvieron inicialmente en agua destilada estéril y se diluyeron en serie. Las secuencias óptimas se eligieron empíricamente mediante pruebas tanto en ensayos in vitro como in vivo. La secuencia PMO control fue 5 'CGT TCT GAT AGC TGT ACC TC 3' (AVI BioPharma, secuencia ID # 0-1-0-555) mientras que la secuencia anti TGF-β-PMO fue 5 'GAG GGC GGC ATG III GAG GC 3' (AVI BioPharma, secuencia ID # 0-1-01067). Los TGF-β-PMOs control o anti se diluyeron posteriormente en RPMI para producir una solución madre. Probamos diferentes concentraciones de PMOs desde 40-320 µg/ml.

35 EPCs CD34<sup>+</sup> se aislaron de sangre de cordón umbilical, médula ósea humana y sangre periférica como se describió anteriormente y se clasificaron 10 células por pozo en una placa de 96 pozos en presencia o ausencia de factores de crecimiento y en presencia o ausencia de anti TGFβ-PMO. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C en IMDM que contiene suero de caballo al 10%, FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomina, 1-glutamina 20 mM e hidrocortisona 1 µM con PMOs o control. Este período de incubación se determinó previamente midiendo la absorción de PMOs marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en HSCs.  
40

#### Ensayo de migración

45 La migración celular después del bloqueo durante la noche con anti TGF-β-PMOs o PMO control se realizó usando un ensayo de cámara Boyden modificado como se describió anteriormente.<sup>11</sup> En pocas palabras, se incubaron las HSCs murinas anti TGF-β o PMO control con 6 µg/ml de calecina durante 30 minutos. La migración de las células al gradiente de SDF-1 se estudió a través de membrana de poro de 5 µM (Neuroprobe Labtek Gaithersburg, MD). Cada muestra se cargó por triplicado. RPMI solo o RPMI con 20% de FBS sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. La intensidad de fluorescencia de las células migradas se midió usando un lector de placas (Biotek Synergy2).  
50

#### PCR cuantitativa en tiempo real

55 El ARNm total de las células CD34 se aisló utilizando el Mini Kit Total ARN (BioRad, Hercules, CA). El ARNm se transcribió usando un kit de síntesis de cDNA de iScript (BioRad) y se realizó una PCR en tiempo real usando cebadores para CXCR4, CXCR7 o beta actina según las instrucciones del fabricante (Ambion, Austin, TX). El PCR en tiempo real se realizó en el sistema de PCR rápida en tiempo real 7.500 durante 40 ciclos y todas las reacciones se realizaron por triplicado.

60 Determinación de la producción de NO mediante imágenes de fluorescencia DAF-FM

Se incubaron EPCs CD34<sup>+</sup> humanas durante la noche con PMO de control o anti TGF-β-PMO a una concentración de 40 µg/ml. La producción de NO se cuantificó en células CD34<sup>+</sup> derivadas de sangre periférica humana usando colorante fluorescente permeable DAF-FM sensible a células NO. EPCs CD34<sup>+</sup> se cargaron con diacetato DAF-FM 20 µM (Invitrogen) en 500 µL de DPBS (MediaTech. Inc.) con glucosa (1 mg/mL) y L-arginina (1 mM). Se añadió SDF1 (100 nM) a la suspensión celular 15 minutos después de la adición de DAF-FM. Inhibidores farmacológicos se  
65

añadieron 30 minutos antes de la adición de DAF-FM. Las células se incubaron durante 3 horas, después de la adición de SDF1. Las células se lavaron (4X) y se colocaron 75  $\mu$ l de suspensión celular en el plato con fondo de cubreobjetos para obtención de imágenes de fluorescencia. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron usando una fuente de luz de excitación monocromador controlada por computadora (TILL Polychrome II, TILL-Photonics, Martinsried, Alemania) y una cámara CCD enfriada con control de exposición (SensiCam, Till-photonics). Durante la excitación a 488 nm con 50 ms de tiempo de exposición, la cámara recogió la emisión a 510 nm con una discretización de 2x2 y las imágenes fueron adquiridas por el software Till-Vision (Till Photonics, Martinsried, Alemania). Las imágenes se corrigieron por intensidad de fluorescencia de fondo y máxima en células individuales, se cuantificó en términos de unidades de fluorescencia arbitrarias usando el software Till-Vision. Los cambios en la fluorescencia con diferentes tratamientos se expresaron como cambio porcentual con respecto a las células que se usaron como control de tiempo/vehículo, es decir, las células no recibieron tratamiento pero se cargaron con DAF-FM. Se tomaron imágenes de hasta 75 números de células por muestra/donante y 'n' denota el número de donantes utilizados.

## 15 Estudios en animales

Todos los estudios en animales fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales y los estudios se realizaron de acuerdo con los Principios Guía para el Cuidado y Uso de Animales (NIH) y la Declaración ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y de Visión. Se obtuvieron ratones C57BL/6J sanos del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME) y se alojaron en nuestras instalaciones institucionales de cuidado de animales. Ratones transgénicos homocigóticos para GFP (C57BL/6-Tg (UBC-GFP) 30Scha/J) también se obtuvieron del Laboratorio Jackson. Al finalizar el estudio, los animales se sacrificaron por sobredosis de ketamina y xilazina (14 y 30 mg/kg, respectivamente) y los ojos se sacaron para el procesamiento inmunohistoquímico.

## 25 Lesión de CNV como modelo de lesión y reparación por HSCs murinas

Para generar áreas discretas de lesión, indujimos la neovascularización coroidea por rotura a láser de la membrana de Bruch como se describió anteriormente.<sup>12,13</sup> En resumen, ratones de médula ósea GFP<sup>+</sup> quiméricos anestesiados se sometieron a tres aplicaciones de luz láser verde argón con una longitud de onda de 532 nm, potencia de 150 mW, duración de 100 ms y tamaño de punto de 50  $\mu$ m, colocados en tres cuadrantes de la coroides, aproximadamente un diámetro de disco óptico en la distancia desde el disco óptico. Este tratamiento forma una "burbuja" cuando la membrana de Bruch se rompe por la energía de la aplicación del láser, lo que resulta finalmente en neovascularización y anastomosis coroides que pueden visualizarse claramente contra el fondo del epitelio pigmentado retiniano intacto circundante. Por lo tanto, las áreas discretas y limitadas de neovascularización se pueden cuantificar fácilmente.

Para evaluar el efecto del bloqueo de TGF- $\beta$ -PMO sobre la capacidad de las HSCs murinas para contribuir a la CNV y la naturaleza de esa contribución, se utilizó la transferencia adoptiva. Antes de inducir la lesión por láser, las HSCs de médula ósea se aislaron a partir de ratones donantes GFP<sup>+/+</sup> como se describió anteriormente. Después de la incubación durante la noche con vehículo (RPMI), TGF- $\beta$ -PMO control o anti, las HSCs se resuspendieron en suficiente PBS para asegurar una concentración mayor que o igual a 10.000 células/100  $\mu$ l y se inyectaron 100  $\mu$ l de esta suspensión en el seno retroorbital de cada ratón (n=12 para cada condición). La inyección se realizó inmediatamente después de la lesión con láser. Los ratones fueron sacrificados dos semanas después de la inducción de CNV y la transferencia adoptiva de HSCs pretratados.

Evaluación de lesiones de CNV y contribución de HSC. Los ojos se enuclearon y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 hora, después de lo cual se diseccionaron para eliminar la córnea, el cristalino, el vítreo y la retina neural. Las copas posteriores resultantes, que consisten en el RPE, la coroides subyacente y la esclera, se permeabilizaron mediante incubación durante la noche a 4 °C en regulador HEPES con Triton X-100 al 0,2%, y luego se hicieron reaccionar durante la noche con R. communis aglutinina I conjugada con rodamina (Vector Laboratories, Burlington, CA) con el fin de teñir la vasculatura dentro de las lesiones coroides. Las copas posteriores se montaron planas mediante cuatro cortes radiales y luego se realizaron capturas de imágenes digitales usando un microscopio confocal (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA).

Las imágenes digitales capturadas se evaluaron morfológicamente utilizando el software ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Las capturas de imagen de las series Z confocal de los canales rojo y verde se analizaron de la siguiente manera: 1) se aplicó una calibración para el objetivo específico y se aplicó un microscopio para establecer la proporción de píxel a longitud; 2) se aplicó un umbral usando el algoritmo de Otsu; 3) las imágenes se hicieron binarias; 4) se delineó una región de interés (ROI) para incluir toda el área de la lesión; 5) se realizó un análisis de partículas para cuantificar el área de píxeles por encima del nivel de umbral dentro de la ROI. La suma del área de la lesión en toda la serie z se multiplicó por el grosor de z (típicamente 4  $\mu$ m) para obtener el volumen de la lesión. Los volúmenes de lesión para cada animal se promedian y se tratan como una n de 1 para el análisis estadístico. Los cambios en el volumen de la lesión entre los grupos de tratamiento se determinan promediando el volumen medio de lesión para todos los animales en un grupo de tratamiento, y se reportan como media  $\pm$  error estándar de la media. Las comparaciones se prueban con respecto a la significación estadística mediante la prueba t de Estudiante o el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias en el

volumen de la lesión con un valor de p menor que o igual a 0,05 se consideraron significativas para el posterior análisis volumétrico cuantitativo.

Lesión vascular aguda: modelo de isquemia reperfusión

5 Los ratones (n=20) se mantuvieron bajo anestesia por inhalación (vapor de isoflurano) durante la inducción de la isquemia. La cámara anterior del ojo se canuló con una aguja de calibre 30 unida a una línea de infusión de solución salina estéril, y el ojo se sometió a 2 horas de presión hidrostática (80-90 mmHg, medida por TonoPen; Medtronic Solan, Jacksonville, FL) Esto dio como resultado isquemia de la retina confirmada por el blanqueamiento del iris y la pérdida del reflejo rojo. Después de 2 horas, la aguja se retiró y la presión intraocular se normalizó, lo que dio como resultado la lesión por reperfusión. El ojo contralateral sirvió como control.

15 Siete días después del traumatismo, en cuyo momento el daño capilar retiniano fue apreciable,<sup>14,15</sup> los animales se inyectaron intravítreamente con EPCs CD34<sup>+</sup> humanos aislados pretratados con anti TGF- $\mu$ -PMO o PMO de control. Después de 48 horas, los animales se sacrificaron, los ojos se enuclearon y las retinas neurales se aislaron por disección. Las retinas se permeabilizaron como se describió anteriormente y reaccionaron con la aglutinina I de R. communis conjugada con rodamina. Para evaluar la ubicación de las EPCs CD34<sup>+</sup> humanas inyectadas, las retinas se incubaron además con antígeno nuclear monoclonal de ratón anti humano (Chemicon) seguido de tinción secundaria con anticuerpos IgG de cabra anti ratón conjugados con FITC (Chemicon). Se tomaron imágenes confocales de seis campos aleatorios y se analizó la intensidad de fluorescencia en cada 100  $\mu$ m<sup>2</sup> utilizando el software ImageJ. Los anticuerpos apropiados no inmunes, así como la incubación sin anticuerpo primario, se usaron para determinar el fondo y el enlace no específico del anticuerpo.

25 Ejemplo 6: células CD34<sup>+</sup> sujetas a bloqueo de TGF- $\beta$  se adhieren a células endoteliales

Los inventores creen que un bloqueo transitorio de TGF- $\beta$  en EPCs CD34<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> diabéticos y normales aumentará su tasa de proliferación, aumentará su capacidad para formar tubos capilares y aumentará su adherencia a las células endoteliales. Para probar esta hipótesis, las células lin-CD34<sup>+</sup> y lin-CD34<sup>-</sup> se utilizan en una serie de ensayos in vitro que incluyen la adherencia de células endoteliales vasculares, proliferación celular y formación de tubos capilares celulares en fibronectina.

35 Los inventores han reconocido que el tratamiento con anti TGF- $\beta$  de células madre murinas y humanas aumenta el injerto de células madre hematopoyéticas. Como se discutió anteriormente, los inventores han demostrado que el tratamiento con anti-TGF- $\beta$  de células CD34<sup>+</sup> puede aumentar la migración hacia SDF-1 aumentando la expresión del receptor de superficie celular para SDF-1, CXCR-4. El bloqueo del TGF- $\beta$  endógeno corrige la tasa de proliferación disminuida observada en estas células precursoras de pacientes diabéticos. Además, la adherencia de EPC en sitios de lesión vascular es crítica para la reparación vascular y las células CD34<sup>+</sup> diabéticas in vitro tienen adherencia reducida en comparación con las células sanas no diabéticas. Por consiguiente, se mide la adherencia de células CD34<sup>+</sup> diabéticas a monocapas endoteliales y se determina si el pretratamiento con anti TGF- $\beta$  PMO mejora la adherencia y, a su vez, mejora la función reparadora de estas células. Un ensayo "estándar de oro" de la angiogénesis in vitro es el ensayo de formación de tubos. LA EPC diabética tiene una capacidad reducida para formar tubos in vitro,<sup>35</sup> por lo que los inventores evalúan si el tratamiento con anti TGF- $\beta$  corregirá este defecto y mejorará la formación del tubo con respecto a la observada con células no diabéticas.

45 Métodos:

Aislamiento de las células CD34<sup>+</sup>: la sangre se obtiene por venopunción de rutina en tubos CPT™ con heparina (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Las células se procesan en células lin-, luego las células CD34<sup>+</sup> se seleccionan positivamente usando autoMACS™ (Miltenyi Biotec Inc.) dando como resultado una población lin-CD 34- y CD+.

50 ELISA de TGF- $\beta$ 1: se utiliza una variación de un ELISA para detectar TGF- $\beta$ 1 activo y total tal como se publicó previamente.

55 Bloqueo de TGF- $\beta$ : las células aisladas lin-CD34<sup>+</sup> y lin-CD34- se incuban durante 8 horas a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> con 25  $\mu$ M de TGF- $\beta$  PMO, 25  $\mu$ M de oligonucleótido mezclado, o medio solo, después de lo cual son lavadas 3X por centrifugación (300xg, 10 minutos) en medio basal.

60 Cultivos endoteliales microvasculares: las células endoteliales retinianas humanas (HREC) se aíslan de retinas cadavéricas y se mantienen como se describió previamente<sup>58</sup>. Cultivos de células endoteliales macrovasculares: Las células endoteliales aórticas humanas (HAEC) (Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ) se cultivarán en medio EBM-2 (Corporación Cambrex) y los pasajes 3-5 se usan para estos estudios.

65 Adherencia celular CD34<sup>+</sup> a células endoteliales: 24-48 horas antes del ensayo, tanto HAEC como HREC se suspenden en EGM-2 (Cambrex, Walkersville, MD) y se siembran en una placa de 24 pozos y se cultivan hasta que se forma una monocapa. Las células CD34 aisladas y tratadas como anteriormente, se marcan vitalmente con LDL dil-acetilada (sondas moleculares), se lavan y resuspenden en PBS con suero bovino fetal al 10%. Se agregarán mil

células de cada grupo contenido en 25 µl a cada pozo. Se agrega el mismo número de células CD34<sup>+</sup> a los pozos sin células endoteliales, que sirven como control para el enlace no específico. Después de un período de incubación de 4 horas, las células CD34<sup>+</sup> no unidas se eliminan mediante aspiración y las monocapas y los pozos de control se lavan 2X con 1 ml de PBS. La adherencia se mide en un lector de placas fluorescentes Bio-Tek FL600 (Bio-Tek Instruments) a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/530.

Ensayo de formación de tubos: se realiza como se describió previamente.<sup>59</sup> En pocas palabras, las células lin-CD34<sup>+</sup> y lin-CD34<sup>-</sup> recién aisladas de individuos sanos control o diabéticos se tratan inmediatamente como se describió anteriormente y luego se cultivan en placas recubiertas con fibronectina durante 3 días en medio EndoCult™. (StemCell Technologies) antes de ser tripsinizado y dividido en pozos de una placa de 24 pozos.

Ejemplo 7: bloqueo de TGF-β mejorará su función reparadora

Se ha demostrado que las células CD34<sup>+</sup> reparan el endotelio dañado en una variedad de modelos animales. La terapia celular dio como resultado una mejora funcional similar a la descrita previamente utilizando otras poblaciones de precursores endoteliales. La transferencia adoptiva de células CD34<sup>+</sup> ha demostrado previamente restaurar el flujo sanguíneo y aumentar la densidad capilar, disminuyendo la pérdida de la extremidad y facilitando la recuperación de la lesión del miocardio. Los modelos de infarto en el ratón tienen una alta mortalidad y es difícil realizar estudios funcionales. Los inventores postulan que un bloqueo transitorio de TGF-β en EPCs CD34<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> mejora su función reparadora al facilitar su retorno a áreas de isquemia cardíaca en el corazón lesionado y generar células endoteliales reparadoras. Para probar esta hipótesis, los inventores usan la técnica de transferencia adoptiva para administrar células lin-CD34<sup>+</sup> y lin-CD34<sup>-</sup> modificadas de caucásicos y afroamericanos con diabetes tipo II trasplantada en un modelo de infarto de miocardio en rata inmunodeprimida.

Métodos

Animales: las ratas inmunodeprimidas se compran en Laboratorios Jackson.

El bloqueo de TGF-β y el marcado vital se realiza como se describe para el Ejemplo 6.

Aislamiento de células CD34<sup>+</sup> humanas: el aislamiento se lleva a cabo como se describe para el Ejemplo 6.

Infarto de miocardio y trasplante: la isquemia miocárdica se induce por ligadura de la arteria coronaria izquierda como se describió anteriormente.<sup>64</sup> Quince minutos después del infarto, las células pretratadas y marcadas (3x10<sup>5</sup> por animal) se inyectan en el miocardio isquémico y periisquémico.

Cuatro semanas después de la inducción de la isquemia miocárdica, los animales se sacrifican y se extrae su tejido cardíaco y se preserva mediante fijación por inmersión en paraformaldehído regulado al 4%. El tejido cardíaco se examina mediante inmunohistología para evaluar el grado de reparación del tejido infartado. La microscopía de fluorescencia se usa para determinar el grado en que la EPC humana se ha incorporado al tejido de la rata. El tejido de la rata se hace reaccionar con un anticuerpo específico humano a endotelio (clon PAL-E, Abcam, Cambridge, MA) para detectar células endoteliales de origen donante humano.

Ejemplo 8: Tratamiento de úlceras diabéticas con HSCs tratadas

En general, cuando la piel de un individuo se rasga, corta o perfora (herida), el cuerpo reacciona de manera natural para regenerar el tejido dérmico y epidérmico para cerrar la herida. El proceso de regeneración de heridas típicamente incluye un conjunto de eventos bioquímicos complejos que tienen lugar en una cascada estrechamente orquestada para reparar el daño. Estos eventos se superponen en el tiempo, pero pueden clasificarse en diferentes fases, específicamente, las fases inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

En la fase inflamatoria, las bacterias y los desechos se fagocitan y eliminan, y se liberan factores que causan la migración y división de las células involucradas en la fase proliferativa. En la fase proliferativa, los pasos principales incluyen angiogénesis, fibroplasias, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida. La angiogénesis implica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos capilares para el área de la herida para proporcionar oxígeno y nutrientes al tejido de curación. En las fibroplasias y la formación de tejido de granulación, los fibroblastos crecen y forman una nueva matriz extracelular provisional (ECM) mediante la excreción de colágeno y fibronectina. En la epitelización, las células epiteliales migran a través del lecho de la herida para cubrirlo. En contracción, la herida se hace más pequeña por la acción de los miofibroblastos, que establecen un agarre en los bordes de la herida y se contraen usando un mecanismo similar al de las células del músculo liso. Cuando las labores de las células están cerca de completarse, las células innecesarias sufren apoptosis.

Se sabe que varios estados de enfermedad obstaculizan el proceso normal de curación de heridas. Por ejemplo, las personas con diabetes a menudo experimentan problemas con lo que se denomina "úlceras del pie diabético". Las úlceras del pie diabético son llagas o heridas, típicamente, en los pies que generalmente ocurren en individuos que tienen diabetes. A menudo, estas úlceras diabéticas ocurren como un resultado directo o indirecto del daño a los

nervios en los pies del individuo ya que los altos niveles prolongados de azúcar en la sangre e insulina asociados con la diabetes están relacionados con el daño a los nervios en los pies. Tal daño a los nervios en los pies, conocido como neuropatía periférica, puede causar pérdida de sensibilidad como también causar deformidades en los pies.

5 Debido a la pérdida de sensibilidad, las personas con neuropatía periférica pueden lastimar sus pies con traumatismos menores repetitivos (por ejemplo, al caminar prolongadamente) o con un solo traumatismo mayor (por ejemplo, raspando la piel, pisando objetos, sumergiendo los pies en agua caliente, cortando las uñas de los pies inapropiadamente, o usando zapatos que no le quedan bien), pero sin embargo puede no notar tales lesiones. Una complicación adicional de la diabetes es una reducción en el flujo sanguíneo a los pies debido al bloqueo arterial u  
 10 otras causas, inhibiendo así severamente la capacidad del cuerpo para proporcionar y completar adecuadamente la etapa proliferativa de regeneración/curación de heridas descrita anteriormente. Como resultado, una vez rasgada, cortada o perforada la piel del pie, el proceso de curación de la herida (por ejemplo, la fase proliferativa) puede ser excesivamente lento en la reparación de la herida. Además, una vez que se desarrolla una herida grave, el riesgo de infección es alto ya que el cuerpo del individuo simplemente no puede curar la herida. Aún más, una vez que  
 15 comienza la infección, la infección puede ser muy difícil de revertir, y es común la amputación de la extremidad afectada.

Se han propuesto varios tratamientos para acelerar la cicatrización de heridas en pacientes que tienen úlceras diabéticas. Estos tratamientos incluyen el uso de injertos de piel o "equivalentes de tejido". Los equivalentes tisulares implican el aislamiento de células de piel de reemplazo que se expanden y se siembran sobre o en una estructura de soporte, tal como una matriz biorreabsorbible tridimensional, o dentro de un andamio con base de gel. Tanto los injertos de piel como los equivalentes de tejido son notablemente complejos y, especialmente en el caso de flujo sanguíneo reducido a los pies del paciente, a menudo no tienen éxito.

25 A la vista de los descubrimientos de los inventores del potencial de curación mejorado de las HSCs tratadas de acuerdo con las enseñanzas aquí, los inventores han reconocido que las HSCs tratadas pueden utilizarse en el tratamiento de heridas tópicas. Por lo tanto, se describe aquí un método mejorado para tratar úlceras diabéticas mediante la administración de HSCs tratadas a un paciente que experimenta una lesión o herida relacionada con la diabetes. También se describe un método para tratar una herida en un paciente que comprende administrar  
 30 tópicamente a la herida una cantidad efectiva de HSCs tratadas. También se describe un método para tratar una herida en un paciente que comprende administrar por vía parenteral una cantidad efectiva de HSCs tratadas.

También se describe un método para tratar un sujeto que tiene una herida. El método comprende administrar vía administración tópica una composición para herida que comprende una cantidad eficaz de HSCs tratadas en la  
 35 proximidad de la herida, de manera que las HSCs pueden migrar y adherirse a las localizaciones de la herida y/o áreas circundantes. Las áreas circundantes incluirían tejidos sanos contiguos a la herida. También se describe un método para tratar una úlcera diabética que comprende administrar a un paciente que lo necesita una composición para herida que comprende una cantidad eficaz de HSCs tratadas. También se describe un método para mejorar la progresión de una herida en un sujeto que comprende administrar a la herida una cantidad eficaz de HSCs tratadas.

40 El término "herida" como se usa en este Ejemplo se refiere a cualquier rotura en el epitelio. La rotura puede haber sido inducida por un corte, abrasión, adhesión, incisión quirúrgica, quemadura térmica, química o de fricción, úlcera o presión, o similares, como resultado de un accidente, incidente, procedimiento quirúrgico o similar. La herida puede definirse además como aguda y/o crónica. Se ha encontrado que las composiciones descritas aquí son  
 45 particularmente útiles en el tratamiento de úlceras diabéticas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende células progenitoras endoteliales (EPCs) CD34<sup>+</sup> tratadas, dichas células EPC CD34<sup>+</sup> tratadas siendo obtenidas procurando EPCs CD34<sup>+</sup> de un sujeto y tratando dichas células EPC CD34<sup>+</sup> procuradas, ex vivo, con una actividad de bloqueo del agente de TGF-β1 en dichas células para obtener EPCs CD34<sup>+</sup> tratadas, para usar en un método de tratamiento de lesiones vasculares, en el que dicha actividad bloqueadora de agente de TGF-β1 en dichas células es un nucleótido antisentido específico para una secuencia de ARNm que codifica TGF-β1 o es un anticuerpo específico para TGF-β1 .
- 10 2. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, en donde dichas lesiones vasculares están asociadas con la retinopatía diabética.
3. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, en donde dichas lesiones vasculares están asociadas con la oclusión de la vena retinal.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, en donde dichas lesiones vasculares están asociadas con la neovascularización coroidal.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, en donde dichas células CD34<sup>+</sup> son de origen autólogo o alogénico.
6. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, formulada para administración intraocular.
- 25 7. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, formulada para administración parenteral.
8. La composición de la reivindicación 1 para uso en un método para tratar lesiones vasculares, formulada para administración intravítrea.

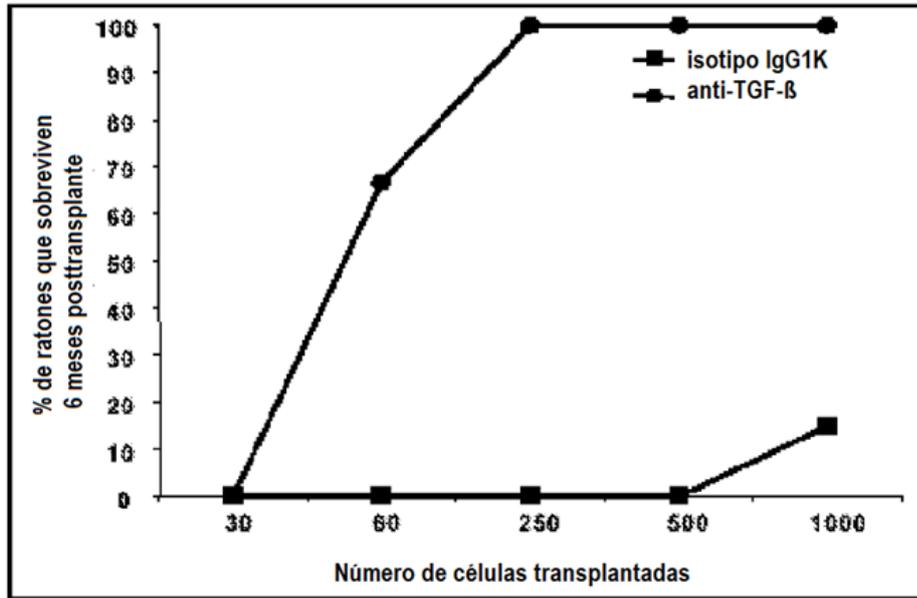


FIG. 1

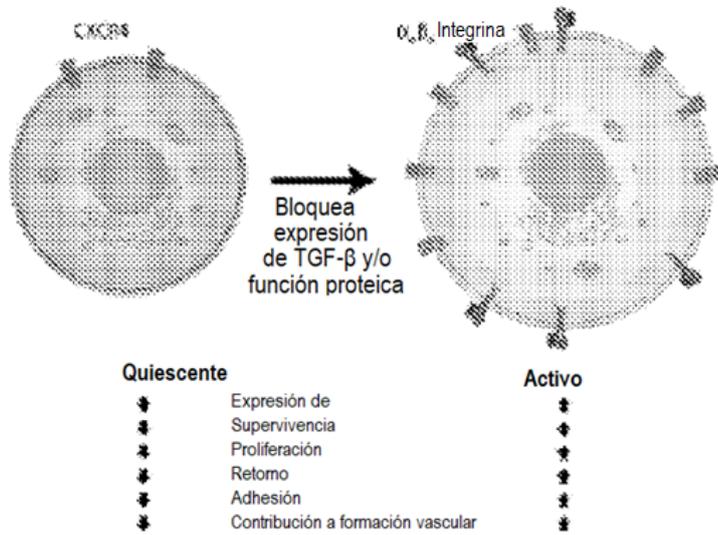


FIG. 2

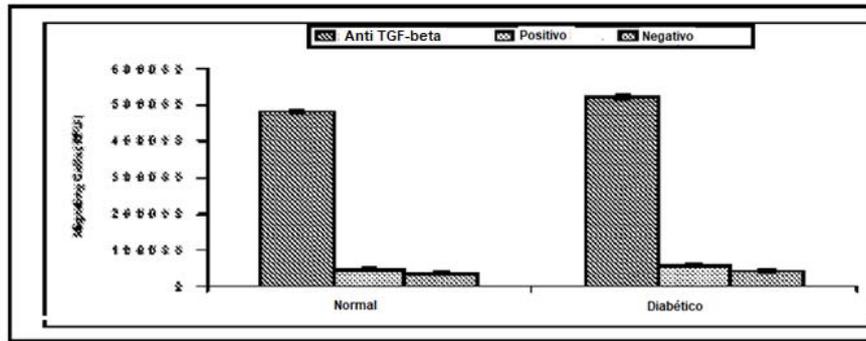
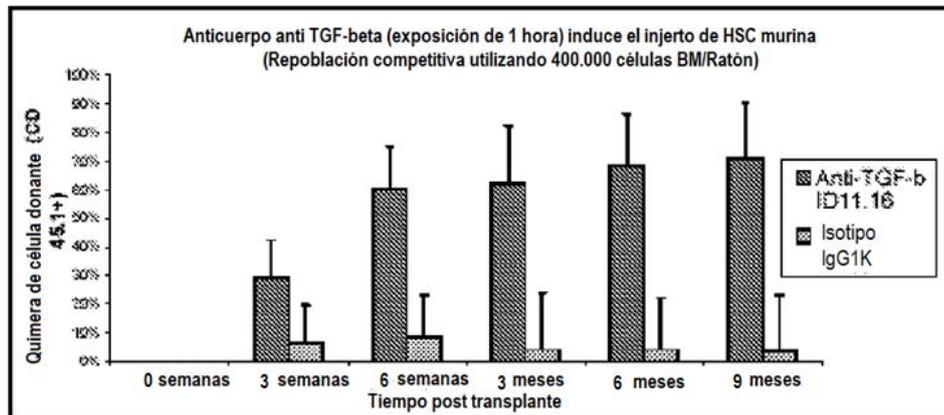


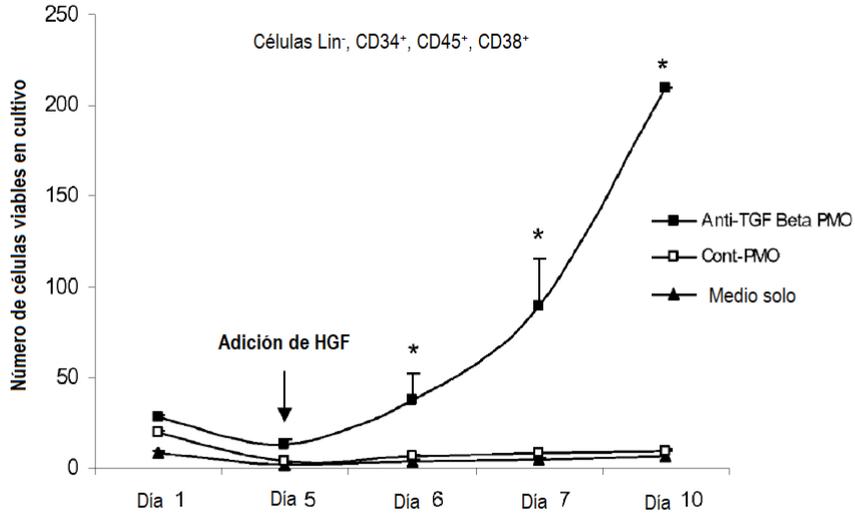
FIG. 3

FIG. 4

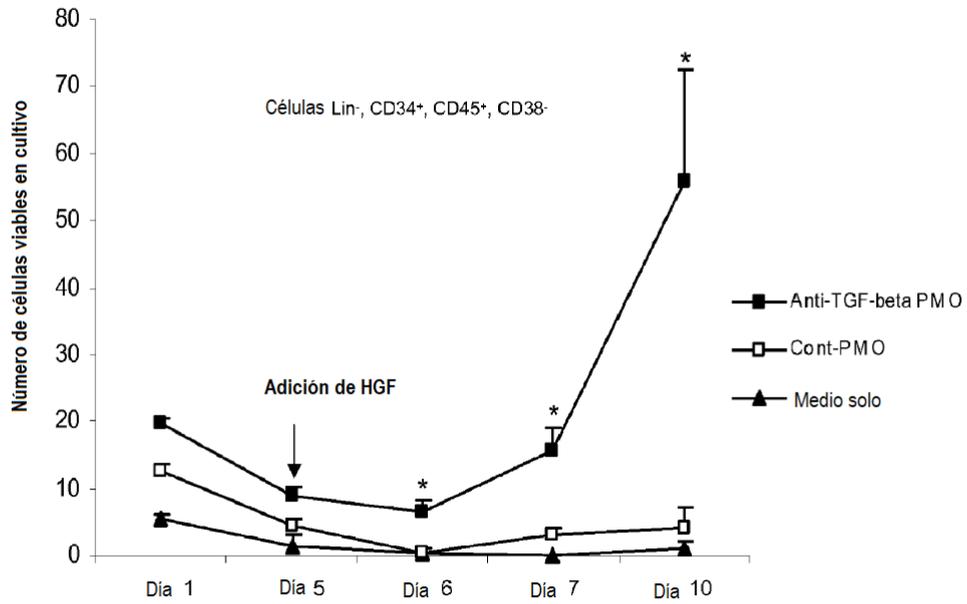


**A**

**FIG. 5**

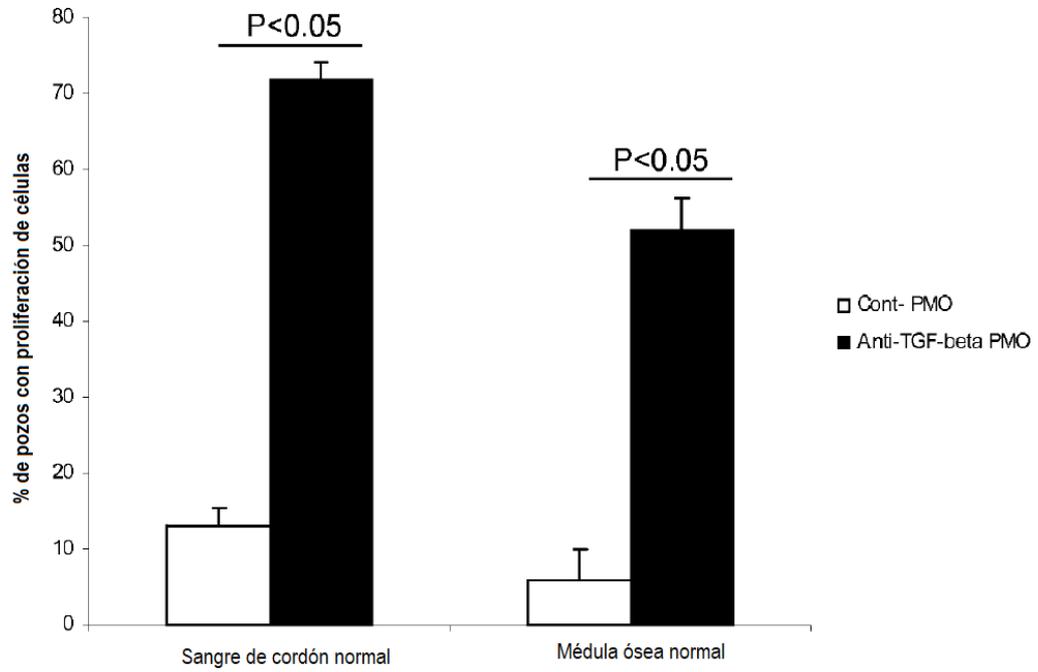


**B**

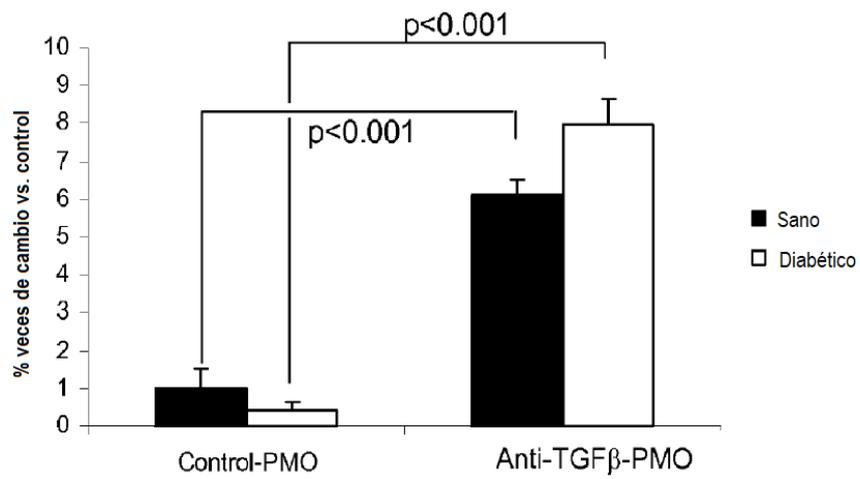


**FIG. 6**

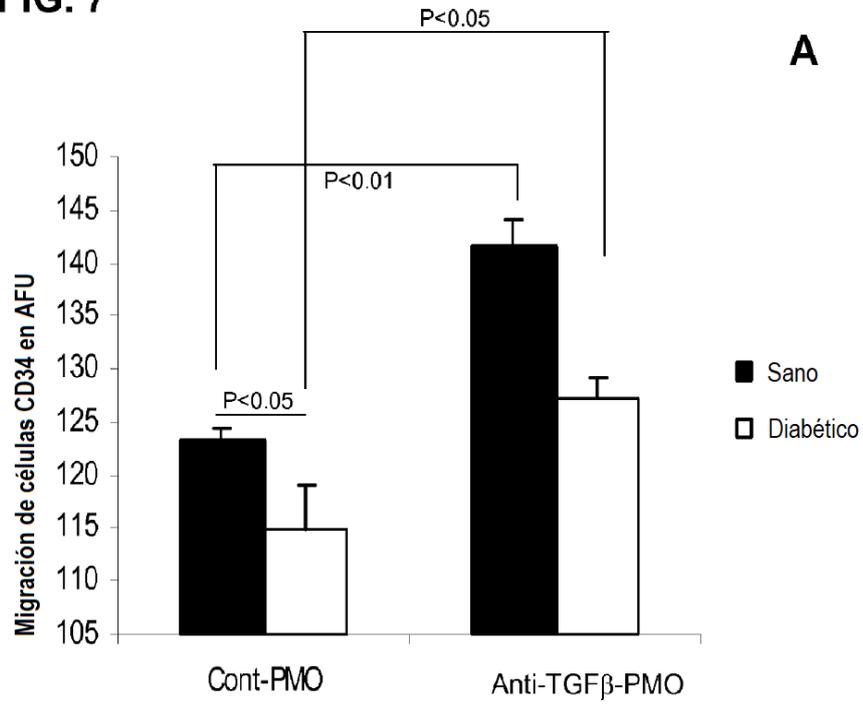
**A**



**B**

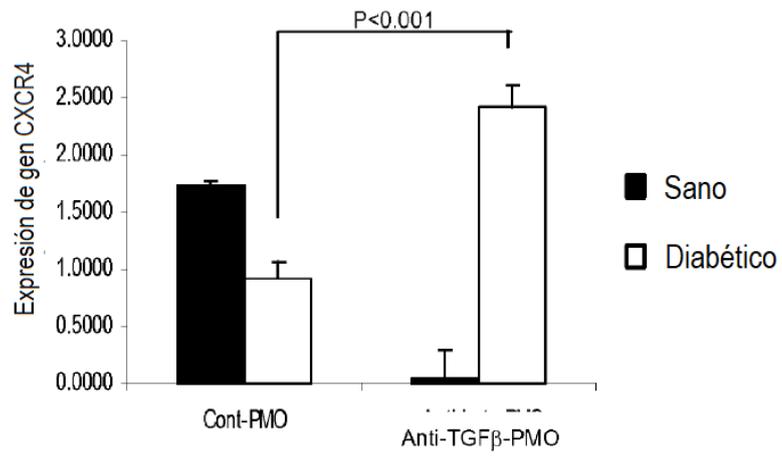


**FIG. 7**



**FIG. 8**

**A**



**B**

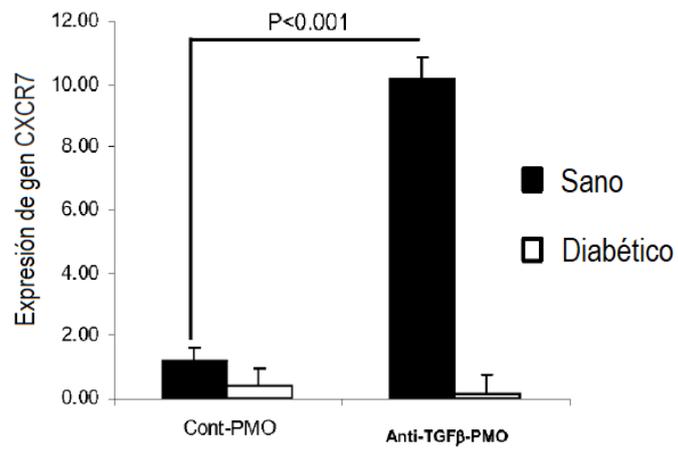
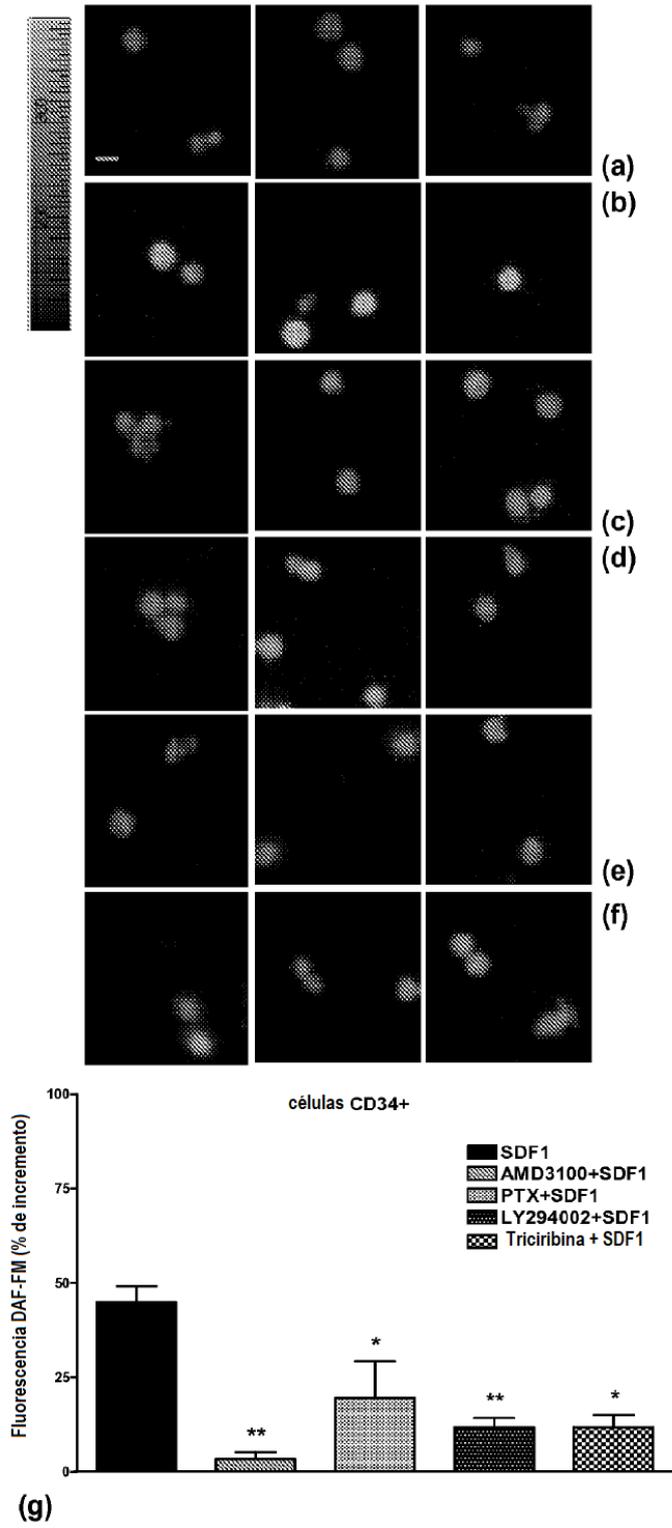


FIG. 9



**FIG. 10**

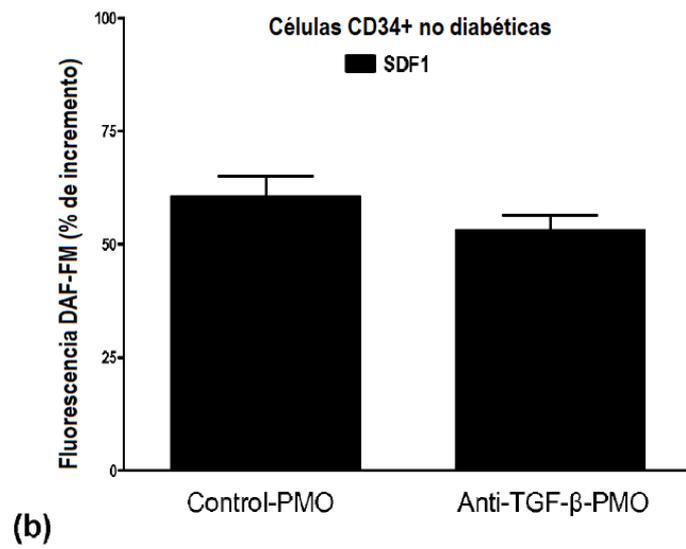
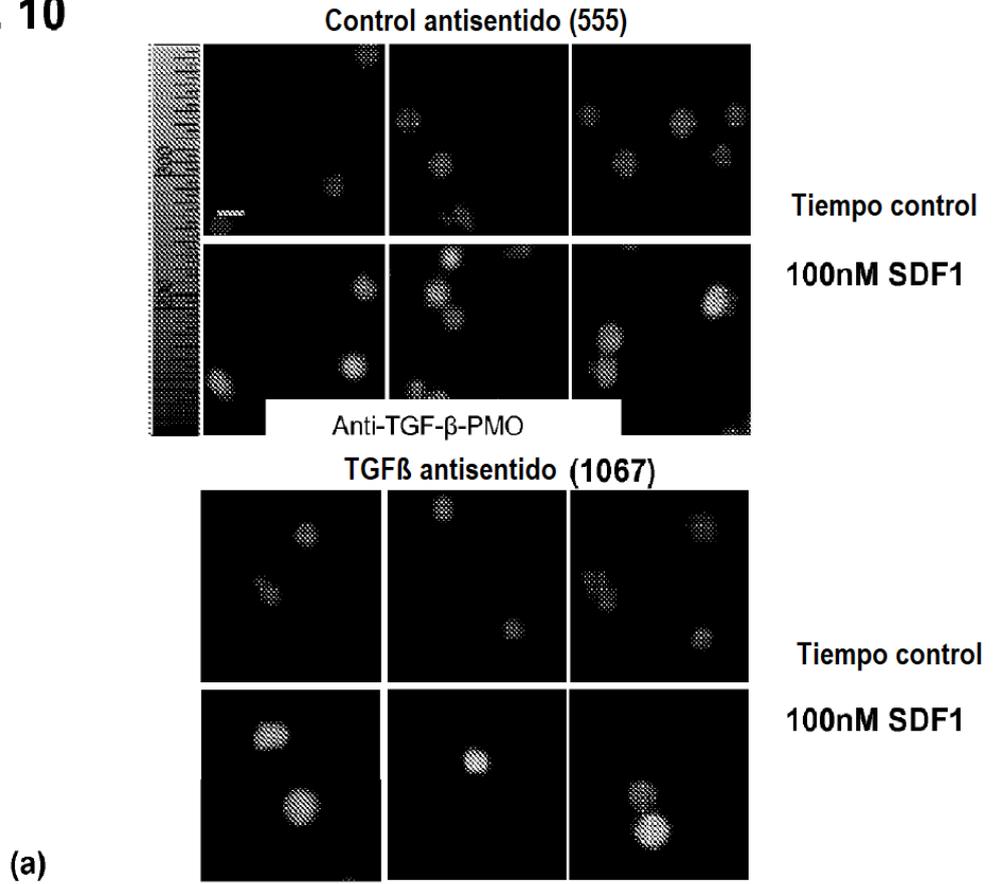
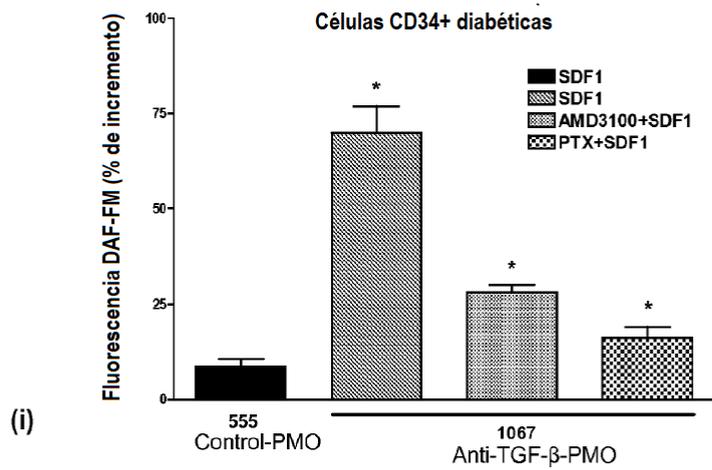
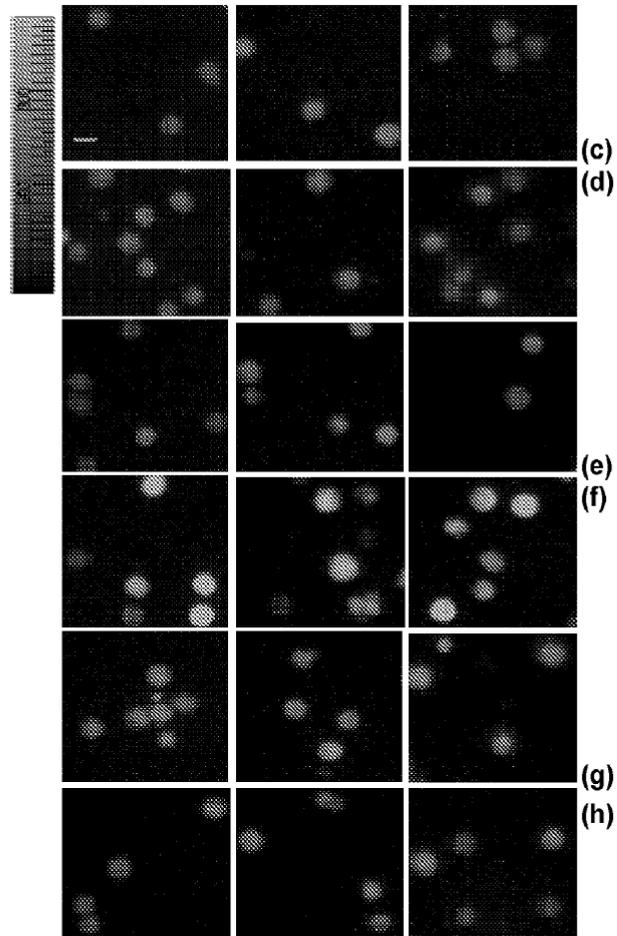
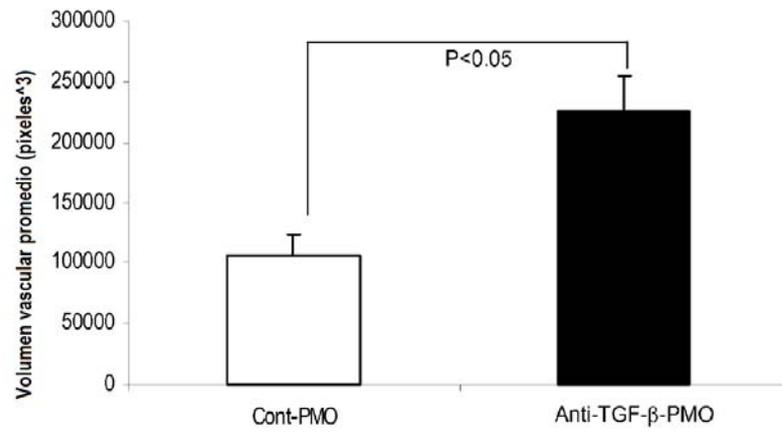


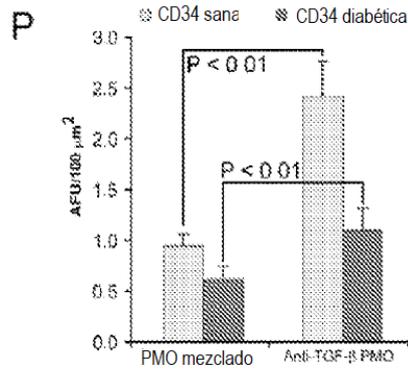
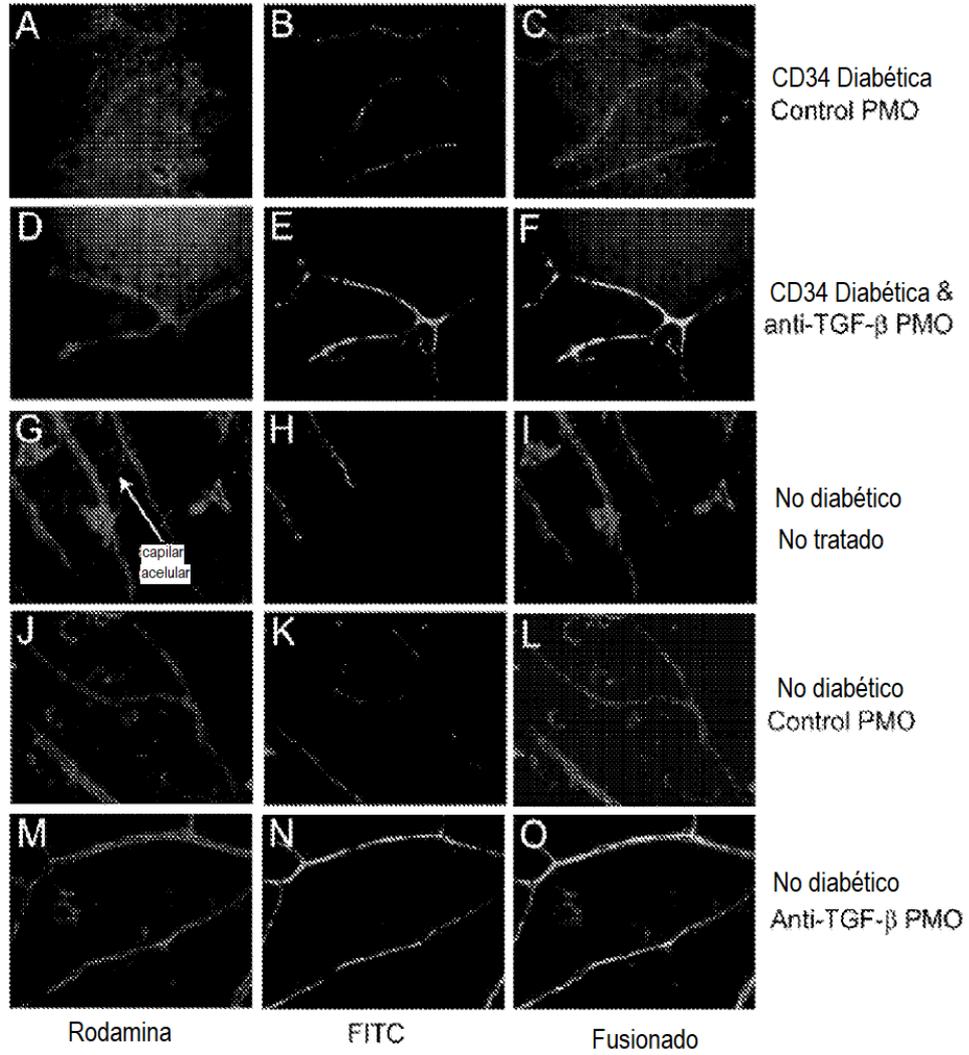
FIG. 10 cont.



**FIG. 11**



**FIG. 12**



**Tabla 1**

Antígeno de superficie celular	% de células MPB Normal CD34+CD45+			% de células PB* diabética CD34+CD45+		
	T=0	PMO 555 control	PMO 1067 Anti-TGFβ1	T=0	PMO 555 control	PMO 1067 Anti-TGFβ1
CXCR4	40.7	88.5	85.3	42.5	74.1	72.7
CD14	85.3	69.3	73.3	85.5	59.3	62.4
CD105	70.9	71.0	62.9	71.0	58.8	51.7
VEGFR-2	71.3	62.9	56.5	71.7	59.3	62.4
CD38	99.0	79.9	82.3	99.1	92.2	94.2