

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 932**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5585 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013 PCT/US2013/052695**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13825764 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2879682**

54 Título: **Tratamiento de hipertensión arterial pulmonar con células madre mesenquimatosas**

30 Prioridad:

01.08.2012 US 201261678207 P
09.01.2013 US 201361750458 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2018

73 Titular/es:

UNITED THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
1040 Spring Street
Silver Spring, MD 20910, US

72 Inventor/es:

JEFFS, ROGER;
PETERSEN, THOMAS;
ILAGAN, ROGER M. y
WADE, MICHAEL

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 671 932 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de hipertensión arterial pulmonar con células madre mesenquimatosas

5 **Antecedentes de la invención**

La presente solicitud se refiere a una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimatosas para su uso en el tratamiento de vasculopatía, incluyendo hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otros tipos de hipertensión pulmonar, vasculopatía periférica (PVD), isquemia crítica de las extremidades (CLI), arteriopatía coronaria, vasculopatía diabética, etc.

La hipertensión arterial pulmonar es un trastorno progresivo de los pulmones que, si no se trata, conduce a la muerte en un tiempo promedio de 2,8 años tras diagnosticarse. Una constricción creciente de la circulación pulmonar conduce a un aumento del estrés sobre el lado derecho del corazón, que puede evolucionar a insuficiencia del lado derecho del corazón. Por definición, la tensión arterial pulmonar media (mPAP) en un caso de hipertensión pulmonar crónica es de >25 mmHg en reposo o >30 mmHg durante el ejercicio (valor normal <20 mmHg). La fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar se caracteriza por vasoconstricción y remodelación de los vasos pulmonares. En PAH crónica hay neomuscularización de vasos pulmonares inicialmente no muscularizados y aumenta la circunferencia de los músculos vasculares de los vasos ya muscularizados. Esta obliteración creciente de la circulación pulmonar da como resultado un estrés progresivo sobre el lado derecho del corazón, que conduce a una emisión reducida del lado derecho del corazón y finalmente termina en insuficiencia del lado derecho del corazón (M. Humbert *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 43, 13S-24S). La PAH es un trastorno extremadamente poco común, con una prevalencia de 1-2 por millón. Se ha estimado que la edad promedio de los pacientes es de 36 años, y solo el 10 % de los pacientes estaban por encima de los 60 años de edad. De manera distintiva, se ven afectadas más mujeres que hombres (G. E. D'Alonzo *et al.*, Ann. Intern. Med. 1991, 115, 343-349).

Las terapias convencionales disponibles en el mercado (por ejemplo, análogos de prostaciclina, antagonistas del receptor de endotelina, inhibidores de fosfodiesterasa) pueden mejorar la calidad de vida, la tolerancia al ejercicio y el pronóstico de los pacientes. Los principios de estas terapias son principalmente hemodinámicos, influyendo en el tono de los vasos pero no teniendo influencia directa sobre los procesos de remodelación patogénica. Además, la posibilidad de usar estos medicamentos se restringe por los algunas veces graves efectos secundarios y/o tipos complicados de administración. El periodo a lo largo del cual la situación clínica de los pacientes puede mejorarse o estabilizarse por una monoterapia específica es limitado. Finalmente, la terapia se intensifica y, por tanto, se aplica una terapia de combinación, en donde deben administrarse una pluralidad de medicamentos simultáneamente. A pesar de todos los avances en la terapia de hipertensión arterial pulmonar, aun no hay una perspectiva de cura de este trastorno grave.

El término vasculopatía periférica (PVD) se refiere a daño, disfunción u obstrucción dentro de las venas y arterias periféricas. La arteriopatía periférica es la forma más común de PVD. La vasculopatía periférica es la enfermedad más común de las arterias y es una afección muy común en los Estados Unidos. Se produce principalmente en personas mayores de 50 años. La vasculopatía periférica es una causa principal de discapacidad entre personas mayores de 50 años, así como en personas con diabetes. Aproximadamente 10 millones de personas en los Estados Unidos tienen vasculopatía periférica, lo que se traduce en aproximadamente el 5 % de las personas mayores de 50 años. Se espera que el número de personas con esta afección crezca a medida que la población envejece. Los hombres tienen una probabilidad ligeramente mayor que las mujeres de tener vasculopatía periférica.

La isquemia crítica de las extremidades (CLI), debida a oclusión arterial periférica avanzada, se caracteriza por un suministro de oxígeno y flujo de sangre reducidos en reposo, dando como resultado dolor muscular en reposo y gangrena o úlceras cutáneas que no cicatrizan (Rissanen *et al.*, Eur. J. Clin. Invest 31:651-666 (2001); Dormandy y Rutherford, J. Vasc. Surg. 31:S1-S296 (2000)). Se estima que la isquemia crítica de las extremidades se desarrolla en de 500 a 1000 por millón de individuos en un año ("Second European Consensus Document on Chronic Critical Leg Ischemia", Circulation 84(4 supl.) IV 1-26 (1991)). En pacientes con isquemia crítica de las extremidades se recomienda a menudo amputación, a pesar de su morbilidad e implicaciones funcionales asociadas, como solución frente a los síntomas discapacitantes (M. R. Tyrrell *et al.*, Br. J. Surg. 80: 177-180 (1993); M. Eneroth *et al.*, Int. Orthop. 16: 383-387 (1992)). No existe una terapia médica óptima para la isquemia crítica de las extremidades (Circulation 84(4 supl.): IV 1-26 (1991)).

La arteriopatía coronaria (aterosclerosis) es una enfermedad progresiva en humanos en la que una o más arterias coronarias se obstruyen gradualmente a través de la acumulación de placa. Las arterias coronarias de los pacientes que tienen esta enfermedad se tratan a menudo mediante angioplastia con balón o la inserción de endoprótesis para mantener abiertas las arterias parcialmente obstruidas. En última instancia, se requiere que estos pacientes se sometan a cirugía de derivación de arterias coronarias con gran gasto y riesgo.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que células madre mesenquimatosas y una composición de exosomas de las mismas, cuando se administran en combinación con prostaciclina y/o células progenitoras epiteliales, pueden ser útiles en el tratamiento de vasculopatía, incluyendo hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otros tipos de

hipertensión pulmonar, vasculopatía periférica (PVD), isquemia crítica de las extremidades (CLI), arteriopatía coronaria y vasculopatía diabética.

Sumario de la invención

5

La invención se expone en las reivindicaciones.

Descripciones detalladas

10

A menos que se especifique otra cosa, “un” o “una” significa “uno o más”.

15

A menos que se defina específicamente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento debe considerarse que tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en biología de células madre, cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

20

A menos que se indique otra cosa, las técnicas de proteínas recombinantes, cultivos celulares e inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican en la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B. D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996) y F. M. Ausubel *et al.* (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J. E. Coligan *et al.* (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta el presente).

30

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” (también denominado en el presente documento “paciente”) incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, incluyendo humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización incluso más preferida, el sujeto es un humano.

35

Tal como se usan en el presente documento, los términos “que trata”, “tratar” o “tratamiento” incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células tal como se define en el presente documento suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma de vasculopatía.

40

Tal como se usan en el presente documento, los términos “que previene”, “prevenir” o “prevención” incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de células tal como se define en el presente documento suficiente para detener o impedir el desarrollo de al menos un síntoma de vasculopatía.

45

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula madre” se refiere a células que se autorrenuevan que son capaces de dar lugar a descendientes fenotípica y genotípicamente idénticos, así como al menos otro tipo de célula final (por ejemplo, células diferenciadas de manera terminal). El término “células madre” incluye células totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales, así como células progenitoras y/o precursoras derivadas de la diferenciación de las mismas.

50

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula totipotente” o “célula totipotencial” se refiere a una célula que puede formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocisto).

55

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula pluripotente” o “célula pluripotencial” se refiere a una célula que tiene una versatilidad de diferenciación completa, es decir, la capacidad de crecer dando cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de un mamífero. Una célula pluripotente puede autorrenovarse, y puede permanecer latente o quiescente dentro de un tejido.

60

Por “célula multipotencial” o “célula multipotente” quiere decirse una célula que es capaz de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. Tal como se usa en el presente documento, esta frase abarca células madre adultas o embrionarias y células progenitoras, y la progenie multipotencial de estas células. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.

65

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula progenitora” se refiere a una célula que está destinada a diferenciarse en un tipo de célula o a formar un tipo de tejido específico.

Células precursoras mesenquimatosas (MPC) son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de la pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periosteo; y son capaces de diferenciarse en diferentes líneas germinales tales como mesodermo, endodermo y ectodermo.

Por tanto, las MPC son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células incluyendo, pero sin limitarse a, tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conjuntivo fibroso. La ruta de diferenciación y destino de linaje específico en la que entran estas células depende de varias influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones del microentorno local establecidas por los tejidos huésped. Por tanto, las MPC son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen produciendo células hijas que son o bien células madre o bien células precursoras que con el tiempo se diferenciarán irreversiblemente produciendo una célula fenotípica.

En una realización preferida, las células usadas en la invención se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto. Los términos “enriquecido”, “enriquecimiento” o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la que la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de un número de tipos de células particulares aumenta en comparación con la población sin tratar.

En una realización preferida, las células usadas en la presente invención son TNAP⁺, STRO-1⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, CD45⁺, CD146⁺, 3G5⁺ o cualquier combinación de las mismas.

Cuando se hace referencia a que una célula es “positiva” para un marcador dado, puede ser un expresor bajo (lo, u oscuro) o alto (brillante, bri) de ese marcador dependiendo del grado en el que el marcador está presente sobre la superficie de la célula, en donde los términos se refieren a la intensidad de fluorescencia u otro color usado en el proceso de clasificación por color de las células. La distinción de lo (u oscuro o apagado) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que está clasificándose. Cuando se hace referencia en el presente documento a que una célula es “negativa” para un marcador dado, no significa que la célula no exprese el marcador en absoluto. Significa que la célula expresa el marcador a un nivel relativamente muy bajo, y que genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable.

Cuando se usa en el presente documento, el término “TNAP” pretende abarcar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En una realización preferida, la TNAP es BAP. En una realización particularmente preferida, TNAP tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que puede unirse al anticuerpo frente a STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 según las disposiciones del Tratado de Budapest con el número de registro de depósito PTA-7282.

Se prefiere que una proporción significativa de las células multipotenciales sean capaces de diferenciarse en al menos dos líneas germinales diferentes. Los ejemplos no limitativos de los linajes a los que las células multipotenciales pueden destinarse incluyen células endoteliales vasculares; células de músculo liso y esquelético; células precursoras óseas; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para células epiteliales del conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores para músculo cardíaco y cardiomiocitos, líneas de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero no se limitan a, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de lo siguiente: células epiteliales pigmentarias de la retina, fibroblastos, células de la piel tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículos pilosos, células epiteliales de conducto renal, progenitores testiculares, células de tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma de la médula, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocito y oligodendrocito.

En una realización, las “células multipotenciales” no pueden dar lugar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

Las células madre útiles para la invención pueden derivarse de tejido adulto, un embrión o un feto. El término “adulto” se usa en su sentido más amplio para incluir a un sujeto posnatal. En una realización preferida, el término “adulto” se refiere a un sujeto que es pospuberal. El término “adulto” tal como se usa en el presente documento puede incluir también sangre de cordón umbilical de un sujeto femenino.

La presente divulgación también se refiere al uso de células de progenie (que también pueden denominarse células expandidas) que se producen a partir del cultivo *in vitro* de las células madre descritas en el presente documento. Las células expandidas de la invención pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimuladores en el medio de cultivo), el número de pases y similares. En determinadas realizaciones, las células de progenie se obtienen tras aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pases de la población parental. Sin embargo, las células de progenie pueden obtenerse tras cualquier número de pases de la población parental.

Las células de progenie pueden obtenerse mediante cultivo en cualquier medio apropiado. El término “medio”, tal como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos, así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. El término “medio” también se refiere

a material que está previsto para su uso en un cultivo celular, incluso si no se ha puesto en contacto aún con células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio.

5 En una realización, se obtienen células de progenie útiles para la invención aislando células TNAP⁺ de médula ósea usando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo frente a STRO-3, y se siembran en placa en α -MEM complementado con suero bovino fetal al 20 %, L-glutamina 2 mM y L-ascorbato-2-fosfato 100 μ m.

10 En una realización, tales células expandidas (al menos tras 5 pases) pueden ser TNAP-, CC9+, HLA de clase I+, HLA de clase II-, CD14-, CD19-, CD3-, CD11a-c-, CD31-, CD86- y/o CD80-. Sin embargo, es posible que en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en el presente documento, la expresión de diferentes marcadores pueda variar. Además, mientras que las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de células expandidas, no significa que no haya una proporción minoritaria de las células que no tienen este(os) fenotipo(s) (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas pueden ser CC9-). En una realización preferida, las células expandidas de la invención tienen todavía la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

15 En una realización, una población de células expandidas usada en la invención comprende células en las que al menos el 25 %, más preferiblemente al menos el 50 %, de las células son CC9+.

20 En otra realización, una población de células expandidas usada en la invención comprende células en las que al menos el 40 %, más preferiblemente al menos el 45 % de las células son STRO-1+.

25 En una realización adicional, las células de progenie pueden expresar marcadores seleccionados del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD29, CD18, CD61, integrina beta, 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R, (STRO-2=leptina-R), RANKL, STRO-1bright y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

30 En una realización, las células de progenie son progenie de MPC expandida multipotencial (MEMP) tal como se define en el documento WO 2006/032092. Se describen métodos para preparar poblaciones enriquecidas de MPC a partir de las cuales puede derivarse la progenie en los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto *in vitro*, las MPC raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y estarán presentes generalmente con otras células que son células destinadas específicas de tejido (TSCC). El documento WO 01/04268 se refiere a recoger tales células de la médula ósea a niveles de pureza de aproximadamente el 0,1 % al 90 %. La población que comprende MPC a partir de la que se deriva la progenie puede recogerse directamente de una fuente de tejido, o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*.

40 Por ejemplo, la progenie puede obtenerse de una población recogida, no expandida de MPC sustancialmente purificadas, que comprende al menos aproximadamente el 0,1, el 1, el 5, el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80 o el 95 % de células totales de la población en la que están presentes. Este nivel puede lograrse, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en TNAP, STRO-1^{br}, 3G5+, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

45 La población de partida de MPC puede derivarse de uno cualquiera o más tipos de tejido expuestos en el documento WO 01/04268 o el documento WO 2004/085630, concretamente médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, o quizá más ampliamente de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

50 Pueden distinguirse MEMP de MPC recién recogidas porque son positivas para el marcador STRO-1^{br} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las MPC recién aisladas son positivas para tanto STRO-1^{br} como ALP. En una realización preferida de la presente invención, al menos el 15 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 95 % de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{br}, ALP-. En una realización adicional preferida, las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α 3 β 1. En aún una realización adicional preferida, las MEMP no presentan actividad de TERT y/o son negativas para el marcador CD18.

60 En una divulgación, las células se toman de un paciente con vasculopatía, se cultivan *in vitro* usando técnicas convencionales y se administran a un paciente como un trasplante autólogo o alogénico. En una divulgación alternativa, se usan células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otra divulgación útil de la invención, se usan células de un animal no humano (o si el paciente no es un humano, de otra especie).

65 La invención puede ponerse en práctica usando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo pero sin limitarse a células de primate no humano, células de ungulado, canino, felino, lagomorfo, roedor, ave y pez. Las células de primate con las que la invención puede realizarse incluyen pero no se limitan a células de chimpancés, babuinos, macacos cangrejeros y cualquier otro mono del nuevo o viejo mundo. Las células de ungulado con las que puede realizarse la invención incluyen pero no se limitan a células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos,

búfalo y bisonte. Las células de roedor con las que la invención puede realizarse incluyen pero no se limitan a células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo. Los ejemplos de especies de lagomorfos con las que la invención puede realizarse incluyen conejos domesticados, liebres norteamericanas, liebres, conejos de cola de algodón, liebre americana y picas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie de ave con la que la invención puede realizarse.

Las células útiles para la invención pueden almacenarse antes de su uso. Se conocen bien en la técnica métodos y protocolos para conservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamífero (véanse, por ejemplo, Pollard, J. W. y Walquer, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). Puede utilizarse cualquier método que mantenga la actividad biológica de las células madre aisladas tales como células progenitoras/madre mesenquimatosas, o progenie de las mismas, en relación con la presente invención. En una divulgación, las células se mantienen y se almacenan usando crioconservación.

Pueden obtenerse células útiles para la invención usando una variedad de técnicas. Por ejemplo, pueden usarse varias técnicas de clasificación de células mediante las que las células se separan físicamente en referencia a una propiedad asociada con el complejo célula-anticuerpo, o un marcador unido al anticuerpo. Este marcador puede ser una partícula magnética o una molécula fluorescente. Los anticuerpos pueden reticularse de manera que formen agregados de múltiples células, que pueden separarse por su densidad. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a una matriz estacionaria, a la que se adhieren las células deseadas.

En una divulgación preferida se usa un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a TNAP+, STRO-1+, VCAM-1+, THY-1+, STRO-2+, 3G5+, CD45+, CD146+ para aislar las células. Más preferiblemente, se usa un anticuerpo (u otro agente de unión) que se une a TNAP+ o STRO-1+ para aislar las células.

Se conocen diversos métodos de separación de células unidas a anticuerpos de las células no unidas. Por ejemplo, el anticuerpo unido a la célula (o un anticuerpo anti-isotipo) puede marcarse y entonces las células se separan mediante un clasificador mecánico de células que detecta la presencia del marcador. Se conocen bien en la técnica clasificadores de células activados por fluorescencia. En una divulgación, se unen anticuerpos anti-TNAP y/o anticuerpos frente a STRO-1 a un soporte sólido. Los expertos en la técnica conocen diversos soportes sólidos, incluyendo, pero sin limitarse a, perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibras huecas, polímeros y placas de Petri de plástico. Las células que están unidas por el anticuerpo pueden retirarse de la suspensión de células simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión de células.

Pueden usarse micropartículas supermagnéticas para las separaciones de células. Por ejemplo, las micropartículas pueden recubrirse con anticuerpos anti-TNAP y/o anticuerpos frente a STRO-1. Las micropartículas supermagnéticas etiquetadas con anticuerpo pueden incubarse entonces con una disolución que contiene las células de interés. Las micropartículas se unen a las superficies de las células madre deseadas, y estas células pueden recogerse entonces en un campo magnético.

En otro ejemplo, se permite que la muestra de células entre en contacto físicamente, por ejemplo, con anticuerpos monoclonales anti-TNAP y/o anticuerpos monoclonales anti-STRO-1 unidos a una fase sólida. La unión a una fase sólida puede comprender, por ejemplo, adsorber los anticuerpos sobre una superficie de plástico, nitrocelulosa u otra. Los anticuerpos pueden adsorberse también sobre las paredes de los poros grandes (suficientemente grandes para permitir el flujo pasante de las células) de una membrana de fibras huecas. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse covalentemente a una superficie o perla, tal como macroperlas Sepharose 6 MB de Pharmacia. Las condiciones y duración de incubación exactas para los anticuerpos unidos a una fase sólida con la suspensión que contiene células madre dependerá de varios factores específicos para el sistema empleado. La selección de condiciones apropiadas, sin embargo, está bien dentro de la experiencia de la técnica.

Las células no unidas se eluyen o se retiran por lavado entonces con tampón fisiológico tras permitir un tiempo suficiente para que se unan las células madre. Las células no unidas pueden recuperarse y usarse para otros fines o desecharse tras haberse realizado pruebas apropiadas para garantizar que se ha logrado la separación deseada. Las células unidas se separan entonces de la fase sólida mediante cualquier método apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y el anticuerpo. Por ejemplo, las células unidas pueden eluirse de una placa de Petri de plástico mediante agitación vigorosa. Alternativamente, las células unidas pueden eluirse "mellando" o digiriendo enzimáticamente una secuencia "espaciadora" sensible a enzimas entre la fase sólida y el anticuerpo. Están disponibles comercialmente espaciadores unidos a perlas de agarosa de, por ejemplo, Pharmacia.

La fracción de células enriquecida eluida puede lavarse entonces con un tampón mediante centrifugación y dicha fracción enriquecida puede crioconservarse en un estado viable para su uso posterior según la tecnología convencional, expandirse en cultivo y/o introducirse en el paciente.

Normalmente, las células se administran en una composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuados para

su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una razón de beneficio/riesgo razonable. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material encapsulante de disolvente.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, disoluciones acuosas de tampón, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de tales portadores se conoce bien en la técnica. La disolución es preferiblemente estéril y fluida hasta el grado de que existe una fácil jeringabilidad. Preferiblemente, la disolución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos a través del uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.

Algunos ejemplos de materiales y disoluciones que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un portador polimérico o una matriz extracelular.

Una variedad de materiales de matriz sólida biológicos o sintéticos (es decir, matrices de soporte sólido, vendajes o adhesivos biológicos y armazones biológicos/médicos) son adecuados para su uso en esta invención. El material de matriz es preferiblemente médicamente aceptable para su uso en aplicaciones *in vivo*. Los ejemplos no limitativos de tales materiales médicamente aceptables y/o biológica o fisiológicamente aceptables o compatibles incluyen, pero no se limitan a, materiales de matriz sólida que son absorbibles y/o no absorbibles, tales como submucosa del intestino delgado (SIS), por ejemplo, de origen porcino (y otras fuentes de SIS); alginato reticulado o no reticulado, hidrocoloide, espumas, gel de colágeno, esponja de colágeno, malla de poli(ácido glicólico) (PGA), malla de poliglactina (PGL), vellones, vendaje de espuma, bioadhesivos (por ejemplo, pegamento de fibrina y gel de fibrina) y equivalentes de piel desepidermizada en una o más capas.

Los pegamentos de fibrina son una clase de sellantes quirúrgicos que se han usado en diversos entornos clínicos. Tal como será consciente el experto, numerosos sellantes son útiles en composiciones de la invención. Sin embargo, una realización preferida de la invención se refiere al uso de pegamentos de fibrina con las células descritas en el presente documento.

Cuando se usa en el presente documento, el término "pegamento de fibrina", se refiere a la matriz insoluble formada por la reticulación de polímeros de fibrina en presencia de iones de calcio. El pegamento de fibrina puede estar formado por fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, fibrina (monómeros o polímeros solubles) y/o complejos de la misma derivados de fluido o tejido biológico que forma una matriz de fibrina. Alternativamente, el pegamento de fibrina puede formarse a partir de fibrinógeno, o un derivado o metabolito del mismo, o fibrina, producida mediante tecnología de ADN recombinante.

El pegamento de fibrina también puede formarse mediante la interacción de fibrinógeno y un catalizador de formación de pegamento de fibrina (tal como trombina y/o factor XIII). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, el fibrinógeno se escinde proteolíticamente en presencia de un catalizador (tal como trombina) y se convierte en un monómero de fibrina. Los monómeros de fibrina pueden formar entonces polímeros que pueden reticularse para formar una matriz de pegamento de fibrina. La reticulación de polímeros de fibrina puede potenciarse mediante la presencia de un catalizador tal como factor XIII. El catalizador de la formación de pegamento de fibrina puede derivarse de plasma sanguíneo, crioprecipitado u otras fracciones plasmáticas que contienen fibrinógeno o trombina. Alternativamente, el catalizador puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

La velocidad a la que se forma el coágulo depende de la concentración de trombina mezclada con fibrinógeno. Al ser una reacción dependiente de enzima, cuanto más alta es la temperatura (hasta 37 °C) más rápida es la formación del coágulo. La resistencia a la tracción del coágulo depende de la concentración de fibrinógeno usada.

El uso del pegamento de fibrina y los métodos para su preparación y uso se describen en la patente estadounidense n.º 5.643.192. La patente estadounidense n.º 5.643.192 divulga la extracción de componentes de fibrinógeno y

trombina de un único donante, y la combinación de solo estos componentes para su uso como pegamento de fibrina. La patente estadounidense n.º 5.651.982 describe otra preparación y método de uso para pegamento de fibrina. La patente estadounidense n.º 5.651.982 proporciona un pegamento de fibrina con liposomas para su uso como sellante tópico en mamíferos.

5 Varias publicaciones describen el uso de pegamento de fibrina para la administración de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.983.393 divulga una composición para su uso como inserto intravaginal que comprende agarosa, agar, solución salina, glicosaminoglicanos, colágeno, fibrina y una enzima. Además, la
10 patente estadounidense n.º 3.089.815 divulga una preparación farmacéutica inyectable compuesta por fibrinógeno y trombina y la patente estadounidense n.º 6.468.527 divulga un pegamento de fibrina que facilita la administración de diversos agentes biológicos y no biológicos a sitios específicos dentro del cuerpo. Tales procedimientos pueden usarse en la invención.

15 Los portadores poliméricos adecuados incluyen esponjas o mallas porosas formadas por polímeros sintéticos o naturales, así como disoluciones de polímero. Una forma de matriz es una esponja o malla polimérica; la otra es un hidrogel polimérico. Los polímeros naturales que pueden usarse incluyen proteínas tales como colágeno, albúmina y fibrina; y polisacáridos tales como alginato y polímeros de ácido hialurónico. Los polímeros sintéticos incluyen tanto polímeros biodegradables como no biodegradables. Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros de hidroxácidos tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), y poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA), poliortoésteres, polianhídridos, polifosfazenos y combinaciones de los mismos. Los polímeros no
20 biodegradables incluyen poliacrilatos, polimetacrilatos, etileno-acetato de vinilo y poli(alcoholes vinílicos).

Se usan polímeros que pueden formar hidrogeles iónicos o reticulados covalentemente que son maleables para encapsular células. Un hidrogel es una sustancia formada cuando se reticula un polímero orgánico (natural o
25 sintético) por medio de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que pueden usarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato, polifosfazinas y poliacrilatos, que se reticulan iónicamente, o copolímeros de bloque tales como PluronicTM o TetronicsTM, copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol que se reticulan mediante temperatura o pH, respectivamente. Otros materiales incluyen
30 proteínas tales como fibrina, polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido hialurónico y colágeno.

En general, estos polímeros son al menos parcialmente solubles en disoluciones acuosas, tales como agua, disoluciones de sal tamponadas o disoluciones de alcohol acuosas, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden reaccionar con
35 cationes son poli(fosfazenos), poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonatado. También pueden usarse copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados mediante la reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de vinil éter. Ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos.
40 Ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina), poli(vinilimidazol) y algunos polifosfazenos sustituidos con imino. La sal cuaternaria o de amonio de los polímeros también puede formarse a partir de los grupos imino colgantes o nitrógenos de estructura principal. Ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

45 Además, una composición de la invención puede comprender al menos un agente terapéutico. Por ejemplo, la composición puede contener un analgésico para ayudar en el tratamiento de la inflamación o el dolor, o un agente antiinfeccioso para prevenir la infección del sitio tratado con la composición. Más específicamente, los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos útiles incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agonistas de opiáceos y salicilatos; agentes antiinfecciosos, tales como
50 antihelmínticos, antianaerobios, antibióticos, antibióticos de aminoglicósidos, antibióticos antifúngicos, antibióticos de cefalosporina, antibióticos macrólidos, antibióticos de beta-lactama misceláneos, antibióticos de penicilina, antibióticos de quinolona, antibióticos de sulfonamida, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosis, antiprotozoarios, antiprotozoarios, antipalúdicos, agentes antivirales, agentes antirretrovirales, escabicidas, agentes antiinflamatorios, agentes antiinflamatorios de corticosteroides,
55 antiprurícticos/anestésicos locales, antiinfecciosos tópicos, antiinfecciosos tópicos antifúngicos, antiinfecciosos tópicos antivirales; agentes renales y electrolíticos, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, diuréticos inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos del asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, sustitutos de electrolitos y agentes uricosúricos; enzimas, tales como enzimas pancreáticas y enzimas trombolíticas; agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agentes antiulcerosos de antácidos,
60 agentes antiulcerosos inhibidores de la bomba de ácido gástrico, agentes antiulcerosos de la mucosa gástrica, agentes antiulcerosos bloqueantes de H₂, agentes colelitólicos, digestivos, eméticos, laxantes y ablandadores de las heces, y agentes procinéticos; anestésicos generales, tales como anestésicos de inhalación, anestésicos de inhalación halogenados, anestésicos intravenosos, anestésicos intravenosos de barbitúricos, anestésicos intravenosos de benzodiazepina y anestésicos intravenosos de agonistas de opiáceos; hormonas y modificadores de hormonas, tales como abortivos, agentes suprarrenales, agentes suprarrenales de corticosteroides, andrógenos,
65

antiandrógenos, agentes inmunobiológicos, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides y vacunas; anestésicos locales, tales como anestésicos locales de amida y anestésicos locales de éster; agentes musculoesqueléticos, tales como agentes antiinflamatorios antigotosos, agentes antiinflamatorios de corticosteroides, agentes antiinflamatorios de compuestos de oro, agentes antiinflamatorios inmunosupresores, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), agentes antiinflamatorios de salicilato, minerales; y vitaminas, tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir componentes de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo que incluyen aminoácidos, metales, factores de coenzimas, así como pequeñas poblaciones de otras células, por ejemplo, algunas de las cuales pueden surgir por la diferenciación posterior de las células madre.

Las composiciones de la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, sedimentando las células objeto del medio de cultivo y resuspendiéndolas en la disolución o material deseado. Las células pueden sedimentarse y/o cambiarse del medio de cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración, ultrafiltración, etc.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y portador(es) opcional(es) en composiciones y que va(n) a administrarse en la invención. En una realización, cualquier aditivo (además de la(s) célula(s) activa(s)) está presente en una cantidad del 0,001 al 50 % (peso) de disolución en solución salina tamponada con fosfato, y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 5 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1 % en peso, todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05 % en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 % en peso y todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5 % en peso. Por supuesto, para cualquier composición que va a administrarse a un animal o humano, y para cualquier método de administración particular, se prefiere que se determine: la toxicidad, tal como determinando la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como ratón; y, la dosificación de la(s) composición(ones), la concentración de componentes en la misma y el momento de la administración de la(s) composición(ones), que provocan una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren una experimentación excesiva aparte del conocimiento del experto en la técnica, esta divulgación y los documentos mencionados en el presente documento. También, el momento de las administraciones secuenciales puede determinarse sin experimentación excesiva.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por medio de, entre otros, inyección localizada, incluyendo administración por catéter, inyección sistémica, inyección localizada, inyección intravenosa, inyección intrauterina o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión, emulsión).

En una realización, las células usadas en la invención se modifican genéticamente. Preferiblemente, las células se modifican genéticamente para producir una proteína heteróloga. Normalmente, las células se modificarán genéticamente de manera que la proteína heteróloga se secreta de las células. Sin embargo, en una realización las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido no codificante de proteína funcional tal como ARNbc (normalmente para silenciamiento por ARN), un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico catalítico (tal como una ribozima o ADNzima).

Las células modificadas genéticamente pueden cultivarse en presencia de al menos una citocina en una cantidad suficiente para soportar el crecimiento de las células modificadas. Las células modificadas genéticamente así obtenidas pueden usarse inmediatamente (por ejemplo, en trasplante), cultivarse y expandirse *in vitro*, o almacenarse para usos posteriores. Las células modificadas pueden almacenarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, congeladas en nitrógeno líquido.

La modificación genética tal como se usa en el presente documento abarca cualquier método de modificación genética que implique la introducción de un polinucleótido exógeno o foráneo en una célula descrita en el presente documento o modificación de un gen endógeno dentro de la célula. La modificación genética incluye pero no se limita a transducción (transferencia mediada viralmente de ADN del huésped de un huésped o donante a un receptor, o bien *in vitro* o bien *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN viral aislados), transferencia mediada por liposomas, electroporación, transfección por fosfato de calcio o coprecipitación y otros. Los métodos de transducción incluyen cocultivo directo de células con células productoras (Bregni *et al.*, 1992) o cultivo con sobrenadante viral solo con o sin factores de crecimiento y policones apropiados.

Se introduce preferiblemente un polinucleótido exógeno en la célula en un vector. El vector incluye preferiblemente los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se conocen bien en la técnica métodos usados para construir tales vectores. Por ejemplo, se describen en detalle técnicas para construir vectores de expresión adecuados en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (3ª ed., 2000); y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1999).

- Los vectores pueden incluir, pero no se limitan a, vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes simple; cósmidos; vectores de plásmido; vectores sintéticos; y otros vehículos de recombinación normalmente usados en la técnica. Se conocen bien en la técnica vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que un polinucleótido puede unirse operativamente. Tales vectores pueden transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están disponibles comercialmente de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.). Los ejemplos específicos incluyen pSG, pSV2CAT, pXtl de Stratagene; y pMSG, pSVL, pBPV y pSVK3 de Pharmacia.
- Los vectores preferidos incluyen vectores retrovirales (véase, Coffin *et al.*, "Retroviruses", capítulo 9, págs. 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Pueden producirse vectores útiles en la invención de manera recombinante mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO94/29438, WO97/21824 y WO97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retroviral y líneas celulares de empaquetamiento. Los vectores a modo de ejemplo incluyen los vectores de expresión de mamífero pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo y pBluescript-Sk+. Ejemplos no limitativos de vectores retrovirales útiles son los derivados de retrovirus murinos, aviares o de primate. Los vectores retrovirales comunes incluyen los basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector de MoMLV). Otros vectores derivados de MoMLV incluyen Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT. Los vectores adicionales incluyen los basados en el virus de la leucemia del mono gibón (GAIN) y virus del sarcoma murino de Moloney (MOMSV) y virus formador de foco en el bazo (SFFV). Los vectores derivados del virus de células madre murinas (MESV) incluyen MESV-MiLy. Los vectores retrovirales incluyen también vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitativos incluyen vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).
- En la producción de constructos de vectores retrovirales, pueden eliminarse las secuencias gag, pol y env virales del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN foráneo. Los genes codificados por ADN foráneo se expresan habitualmente bajo el control de un promotor viral fuerte en la repetición terminal larga (LTR). La selección de secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula huésped usada y la selección está dentro del conocimiento de un experto en la técnica. Se conocen numerosos promotores además del promotor de la LTR. Los ejemplos no limitativos incluyen el promotor PL de fago lambda, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano; el promotor de la región U3 del virus del sarcoma murino de Moloney (MMSV), virus del sarcoma de Rous (VSR) o virus formador de foco en el bazo (SFFV); promotor de granzima A; y el promotor de granzima B. Adicionalmente, pueden usarse elementos de control múltiples o inducibles. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la técnica.
- Un constructo de este tipo puede empaquetarse en partículas virales eficazmente si se proporcionan las funciones gag, pol y env en trans mediante una línea celular de empaquetamiento. Por tanto, cuando el constructo de vector se introduce en la célula de empaquetamiento, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula se ensamblan con el ARN de vector produciendo viriones infecciosos que se secretan al medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas virales infecciosas puesto que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos independientes, que contienen cada uno las secuencias codificantes necesarias, de modo que son necesarios múltiples acontecimientos de recombinación antes de que pueda producirse un virus de replicación competente. Alternativamente, la línea celular de empaquetamiento alberga un provirus. El provirus se ha incapacitado de modo que aunque puede producir todas las proteínas requeridas para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no puede empaquetarse para dar un virus. El ARN producido a partir del virus recombinante se empaqueta en su lugar. Por tanto, la reserva de virus liberada de las células de empaquetamiento contiene solo virus recombinante. Los ejemplos no limitativos de líneas de empaquetamiento retrovirales incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSI.CRIP, RDI 14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67.
- Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovirales (véase el documento WO 95/27071) y vectores virales adenoasociados. Estos vectores se conocen bien en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry *et al.*, John Wiley & Sons, 1998; y las patentes estadounidenses n.^{os} 5.693.531 y 5.691.176. El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en una determinada situación porque no son capaces de infectar a células que no se dividen. A diferencia del ADN retroviral, el ADN adenoviral no se integra en el genoma de la célula diana. Además, la capacidad para transportar ADN foráneo es mucho más grande en vectores adenovirales que en vectores retrovirales. Los vectores virales adenoasociados son otro sistema de administración útil. El ADN del virus puede integrarse en células que no se dividen, y se han introducido satisfactoriamente varios polinucleótidos en diferentes tipos de células usando vectores virales adenoasociados.
- En algunas divulgaciones, el constructo o vector incluirá dos o más secuencias de polinucleótido heterólogas. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico adicional es un polinucleótido que codifica para un marcador selectivo, un gen estructural, un gen terapéutico o un gen de citocina/quimiocina.
- Puede incluirse un marcador selectivo en el constructo o vector para los propósitos de monitorizar la modificación genética satisfactoria y para la selección de células en las que se ha integrado el ADN. Los ejemplos no limitativos

incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G148 o higromicina. Adicionalmente, puede usarse selección negativa, por ejemplo, en la que el marcador es del gen de tk de VHS. Este gen hará que las células sean sensibles a agentes tales aciclovir y ganciclovir. El gen NeoR (resistencia a neomicina/G148) se usa comúnmente, pero puede usarse cualquier gen marcador conveniente cuyas secuencias génicas no estén ya presentes en la célula diana. Los ejemplos no limitativos adicionales incluyen factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR), proteína fluorescente verde potenciada (EFGP), gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de hisD bacteriano, CD24 murino (HSA), CD8a(lyt) murino, genes bacterianos que confieren resistencia a puomicina o fleomicina, y beta-galactosidasa.

La(s) secuencia(s) de polinucleótido adicional(es) puede(n) introducirse en la célula en el mismo vector o puede(n) introducirse en las células huésped en un segundo vector. En una divulgación, se incluirá un marcador selectivo en el mismo vector que el polinucleótido.

La presente divulgación también abarca modificar genéticamente la región promotora de un gen endógeno de manera que la expresión del gen endógeno se regule por incremento dando como resultado la producción aumentada de la proteína codificada en comparación con una célula de tipo natural.

Según una divulgación, las MPC pueden coadministrarse con al menos otro medicamento para PAH, que comprende prostaglandina I₂ (PGI₂), análogos de prostaciclina, inhibidor de fosfodiesterasa-5 (PDE-5), antagonista del receptor de endotelina (ETRA), inhibidores de tirosina cinasa y estimulador de guanilato ciclasa soluble.

Según una divulgación, las MPC pueden coadministrarse también con células progenitoras endoteliales.

Según una divulgación, el método para tratar PAH puede comprender además reducir la trombosis en arterias pulmonares; reducir la inflamación en arterias pulmonares; reducir la proliferación de músculo liso de la íntima en arterias pulmonares; reducir la formación de lesiones plexiformes en arterias pulmonares; aumentar la cantidad de óxido nítrico en arterias pulmonares; aumentar la cantidad de PGI₂ en arterias pulmonares; reducir el nivel de endotelina-1 en arterias pulmonares; reducir la cantidad de factores de crecimiento en arterias pulmonares; o promover una morfología endotelial apropiada en arterias pulmonares.

Además, se descubre en el presente documento que tanto la prostaciclina como las células madre mesenquimatosas (MSC) presentan actividades terapéuticas para vasculopatía. La combinación de prostaciclina y MSC, además, produce efectos sinérgicos. Tal combinación puede ser o bien coadministración, que puede ser simultánea o separada, de prostaciclina y MSC a un paciente, o bien administración al paciente de una composición de MSC que se ha pretratado con una prostaciclina.

Se muestra que las MSC pueden mejorar la vasculopatía en pacientes, y se contempla que un efecto terapéutico de este tipo se logra debido a la capacidad de las MSC de mejorar el microentorno local suministrando factores antiinflamatorios y proangiogénicos a la zona enferma. Sin embargo, las MSC tienen una vida corta en el cuerpo y no se regeneran.

Se ha usado prostaciclina, tal como treprostínilo (TP), para tratar a pacientes con hipertensión arterial pulmonar (PAH). En este sentido, se ha mostrado que la prostaciclina presenta actividades vasodilatadoras y contra la agregación plaquetaria.

Un descubrimiento inesperado es que la prostaciclina puede potenciar la actividad de MSC para el tratamiento de vasculopatía, presentando sinergismo para tal tratamiento. En este sentido, se observa que las MSC potencian el efecto beneficioso de la prostaciclina sobre el crecimiento de vasos sanguíneos. Tal sinergismo también es evidente cuando al paciente se le administra además una célula progenitora endotelial (EPC). Se contempla, por tanto, que la prostaciclina puede potenciar la actividad de EPC a través de MSC. En virtud de tal sinergismo, por tanto, el uso combinado de prostaciclina y MSC, opcionalmente junto con EPC, puede conducir a un desenlace terapéutico mejorado y/o una necesidad reducida de cada agente solo que, a su vez, puede dar como resultado efectos adversos reducidos provocados potencialmente por cada agente solo, a una dosis superior.

Se contempla además que tal sinergismo es aplicable a medio de cultivo acondicionado con MSC. Tal como se usa en el presente documento, un "medio de cultivo acondicionado con MSC" se refiere a un medio de cultivo que se ha puesto en contacto con una MSC (por ejemplo, para el propósito de cultivar la MSC) y, por tanto, contiene compuestos liberados de la MSC. Los ejemplos no limitativos de tales compuestos liberados incluyen exosomas u otras microvesículas que pueden encerrar ARN mensajero, ADN no codificante, microARN, mitocondrias, factores de crecimiento u otros tipos de agentes bioactivos.

Un "medio de cultivo" tal como se usa en el presente documento abarca (a) tanto un medio de cultivo que contiene los componentes típicos usados para cultivar una MSC, tales como aminoácidos, glucosa y diversas sales, con o sin la MSC, como (b) una composición aislada del medio de cultivo que contiene compuestos liberados de la MSC durante el cultivo.

Por consiguiente, una realización de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una prostaciclina y una composición que comprende una célula madre mesenquimatosas (MSC) o un medio de cultivo acondicionado con MSC (conjuntamente, una "composición de MSC").

5 En un aspecto, la prostaciclina y la composición de MSC se administran simultáneamente. En otro aspecto, la prostaciclina y la composición de MSC se administran por separado. Cuando se administran por separado, la prostaciclina puede administrarse antes de o después de la administración de la composición de MSC.

10 En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía en un sujeto que lo necesita, que comprende poner en contacto una composición que comprende una célula madre mesenquimatosas (MSC) aislada o un medio de cultivo acondicionado con MSC con una prostaciclina, y luego administrar la composición de MSC al sujeto.

15 Los ejemplos no limitativos de vasculopatía incluyen hipertensión arterial pulmonar (PAH), vasculopatía periférica (PVD), isquemia crítica de las extremidades (CLI), arteriopatía coronaria y vasculopatía diabética.

Prostaciclina

20 El término "prostaciclina" usado en el presente documento comprende explícitamente cualquier prostaglandina I₂ (PGI₂), cualquier análogo de prostaciclina y cualquier agonista de receptor de PGI₂. Los ejemplos no limitativos de prostaciclina adecuada para la presente tecnología incluyen epoprostenol sódico (por ejemplo, Flolan®), treprostinilo (por ejemplo, TYVASO®, Remodulin®), ilprost (por ejemplo, Ventavis®) y agonista de receptor de PGI₂ (por ejemplo, Selexipag). En un aspecto, la prostaciclina es treprostinilo o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

Células madre mesenquimatosas (MSC)

25 Las células madre mesenquimatosas (MSC) son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de la pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periosteo; y son capaces de diferenciarse en diferentes líneas germinales tales como mesodermo, endodermo y ectodermo. Por tanto, las MSC son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células incluyendo, pero sin limitarse a, tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conjuntivo fibroso. La ruta de diferenciación y destino de linaje específico en la que entran estas células depende de varias influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones del microentorno local establecidas por los tejidos huésped. Las MPC son, por tanto, células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen produciendo células hijas que son o bien células madre o bien células precursoras que con el tiempo se diferenciarán irreversiblemente produciendo una célula fenotípica. Los ejemplos de MSC incluyen células precursoras mesenquimatosas (MPC).

Medios de cultivo acondicionados con MSC

30 Se descubre que las MSC pueden llevar a cabo sus actividades a través de compuestos que pueden liberarse al entorno extracelular durante el crecimiento o la diferenciación. En algunos aspectos, tales compuestos incluyen una microvesícula, denominada exosoma, que tiene entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 200 nm de diámetro. Los exosomas pueden internalizarse en células huésped *in vivo*.

35 Los exosomas son vesículas derivadas de la ruta de clasificación de cuerpos multivesiculares. Recientes estudios muestran que los exosomas son vesículas bioactivas útiles para la comunicación intercelular y la facilitación del proceso inmunorregulador. Los exosomas de MSC contienen proteasomas 20S y numerosos ARN (ARN mensajero, ARN no codificante, microARN).

40 Además de los exosomas, las MSC también liberan otras moléculas/vesículas bioactivas útiles para el propósito de la presente divulgación. Tales moléculas y vesículas incluyen, sin limitación, mitocondrias y factores de crecimiento. Se conocen en la técnica métodos de preparación de medios de cultivo que contienen tales moléculas y vesículas liberadas de MSC y de aislamiento adicional de moléculas y vesículas particulares. Véase, por ejemplo, Hu *et al.*, *Frontiers in Genetics*, 2:56, 1-9 (2012).

Pretratamiento de MSC con prostaciclina

45 En algunas realizaciones, antes de la coadministración de una MSC o un medio de cultivo acondicionado con MSC con prostaciclina a un paciente, la MSC o medio de cultivo acondicionado con MSC se pretratan con prostaciclina. Por consiguiente, también se proporciona en una divulgación un método para preparar una célula madre mesenquimatosas (MSC) o un medio de cultivo acondicionado con MSC para la administración *in vivo*, que comprende poner en contacto la MSC o medio de cultivo acondicionado con MSC con una prostaciclina. Aún otra divulgación proporciona una MSC tratada o medio de cultivo acondicionado con MSC que puede obtenerse

mediante un método de este tipo.

El pretratamiento de una célula o un medio con un compuesto químico abarca técnicas conocidas. En un aspecto, la prostaciclina puede añadirse a y coincubarse con un medio de cultivo que contiene una MSC. Opcionalmente, sin embargo, tal coincubación puede implicar además la adición de un factor de crecimiento (por ejemplo, VEGF y angiopoyetina-1 o 2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y/o hipoxia.

Las MSC o los medios de cultivo acondicionado con MSC pueden tratarse con prostaciclina de diversos modos. Por ejemplo, en la presente invención puede usarse prostaciclina para tratar MSC *ex vivo* durante la expansión de las MSC; en otras divulgaciones, también puede usarse prostaciclina para tratar MSC tras la administración. Según una divulgación, pueden prepararse MSC a partir de la propia sangre o médula ósea del receptor. En ese caso, también puede usarse prostaciclina para tratar MSC antes de que se aislen de los receptores.

Célula progenitora endotelial (EPC)

Tal como se proporciona, el sinergismo entre la prostaciclina y las MSC para el tratamiento de vasculopatía también es evidente cuando se le administra a un paciente una célula progenitora endotelial (EPC). Por tanto, en otra divulgación, al paciente se le administra además una célula progenitora endotelial (EPC).

En algunas divulgaciones, la EPC también puede pretratarse con prostaciclina. Las EPC tratadas con prostaciclina presentan un fenotipo hiperproliferativo con propiedades angiogénicas potenciadas, que son ventajosas en el tratamiento de vasculopatía en comparación con EPC sin tratar.

Las EPC pueden tratarse con prostaciclina de diversos modos. Por ejemplo, puede usarse prostaciclina para tratar EPC *ex vivo* durante la expansión de EPC; puede coadministrarse prostaciclina con EPC al receptor; también puede usarse prostaciclina para tratar EPC tras el trasplante. Según una divulgación, se preparan EPC a partir de la propia sangre o médula ósea del receptor. En ese caso, también puede usarse prostaciclina para tratar EPC antes de que se aislen de los receptores.

Una EPC es una célula indiferenciada que puede inducirse a que prolifere. Las EPC son capaces de automantenerse, de manera que con cada división celular, al menos una célula hija también será una célula EPC. Las EPC son capaces de expandirse 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más veces.

El fenotipado de las EPC revela que estas células expresan el marcador hematopoyético de destino CD45. Adicionalmente, una EPC puede ser inmunorreactiva para VEGFR-2 y/o Tie-2. Opcionalmente, la EPC es inmunorreactiva para CD14. La EPC es una célula progenitora multipotente.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) actúa a través de receptores tirosina cinasa específicos que incluyen VEGFR-1 (flt-1) y VEGFR-2 (flk-1/KDR) y VEGFR-3/Flt-4 que transmiten señales que son esenciales para la angiogénesis y hematopoyesis embrionarias. Aunque VEGF se une a los tres receptores, la mayoría de las funciones biológicas están mediadas por medio de VEGFR-2 y el papel de VEGFR-1 se desconoce actualmente. Se sabe que la señalización por VEGFR3/Flt4 es importante para el desarrollo de células endoteliales linfáticas y la señalización por VEGFR3 puede conferir fenotipos de tipo endotelial linfático a células endoteliales. Los VEGFR transmiten señales para procesos esenciales en la estimulación del crecimiento de vasos, vasorrelajación, inducción de permeabilidad vascular, migración de células endoteliales, proliferación y supervivencia. Las células endoteliales expresan todos los diferentes VEGF-R. Durante la embriogénesis, se ha notificado que una única célula progenitora, el hemangioblasto puede dar lugar a los sistemas tanto hematopoyético como vascular.

Tie-2 es una tirosina cinasa receptora específica de células endoteliales y un receptor para angiopoyetina 1. Es una proteína de membrana de tipo I que se expresa predominantemente en el endotelio de vasos sanguíneos en crecimiento activo y puede representar el marcador de linaje de células endoteliales de mamífero más temprano. Tie-2 está probablemente implicado en la regulación de la proliferación y diferenciación de células endoteliales y puede dirigir la orientación especial de células endoteliales durante la formación de vasos sanguíneos.

El antígeno CD14 es un receptor de alta afinidad para el complejo de lipopolisacáridos (LPS) y proteína de unión a LPS (LBP). El antígeno CD14 es parte del complejo de receptor de LPS heteromérico funcional compuesto por CD14, TLR4 y MD-2. CD14 se expresa fuertemente en la mayoría de los monocitos y macrófagos humanos en sangre periférica, otros fluidos corporales y diversos tejidos, tales como ganglios linfáticos y bazo. CD14 se expresa débilmente en subpoblaciones de neutrófilos humanos y células dendríticas mieloides.

El antígeno CD45 es una tirosina fosfatasa, también conocida como antígeno común leucocitario (LCA). CD45 está presente en todas las células humanas de origen hematopoyético, excepto células eritroides, plaquetas y sus células precursoras. La molécula de CD45 se requiere para la diferenciación de células T y B y se expresa en al menos 5 isoformas, dependiendo del estado de activación de la célula.

Las células VEGFR-1+, VEGFR-2+ y Tie-2+ constituirían aproximadamente el 3,0+/-0,2 %, el 0,8+/-0,5 %, el 2,0+/-

0,3 % de la población total de células mononucleares en la sangre, respectivamente. Las células CD14+/VEGFR-2+ constituían aproximadamente el 2,0+-0,5 % de la población total de monocitos y el 0,08+-0,04 % de las células mononucleares en la sangre.

5 Las EPC pueden mantenerse *in vitro* en cultivos a largo plazo. Las EPC son capaces de someterse a pases de cultivo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces.

10 Las EPC comprenden células formadoras de colonias endoteliales, normalmente desarrolladas tras 1-3 semanas de cultivo celular. Las células formadoras de colonias endoteliales tienen las características de células precursoras destinadas al linaje endotelial y son capaces de fundirse para dar nuevos vasos, según Smardja *et al.*, *Angiogenesis* 14(1):17-27 (2011).

15 El aislamiento, la purificación, el cultivo *ex vivo* y la caracterización de EPC se describen en Hill *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 348:593-600 (2003), Assmus *et al.*, *Circulation* 106:3009-16 (2002), Wang *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 49:1566-71 (2007) y Kalka *et al.*, *P.N.A.S.* 97:3422-7 (2000), cuyo contenido se incorpora por el presente documento como referencia en su totalidad. Además, el aislamiento, la purificación, el cultivo *ex vivo* y la caracterización de células formadoras de colonias endoteliales se describen en Yoder *et al.*, *Blood* 109:1801-1809 (2007), Ingram *et al.*, *Blood* 104:2752-2760 (2004) y Smardja *et al.*, *Angiogenesis* 14(1): 17-27 (2011).

20 Por ejemplo, la población de células se aísla por medio de selección positiva, o mediante una mezcla de selección tanto positiva como negativa en cualquier orden. La población de células progenitoras se purifica. Una población purificada de EPC contiene una proporción significativamente superior de EPC que la población en bruto de células a partir de la que se aíslan las células.

25 Por ejemplo, el procedimiento de purificación debe conducir al menos a un aumento de cinco veces, preferiblemente al menos un aumento de diez veces, más preferiblemente al menos un aumento de quince veces, lo más preferiblemente al menos un aumento de veinte veces y óptimamente al menos un aumento de veinticinco veces en EPC con respecto a la población total. La población purificada de EPC debe incluir al menos el 15 %, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente al menos el 25 %, lo más preferiblemente al menos el 35 % y óptimamente al menos el 50 % de EPC.

30 Los métodos descritos en el presente documento pueden conducir a mezclas que comprenden hasta el 75 %, preferiblemente hasta el 80 %, más preferiblemente hasta el 85 %, lo más preferiblemente hasta el 90 % y óptimamente hasta el 95 % de células madre. Tales métodos son capaces de producir mezclas que comprenden el 99 %, el 99,90 % e incluso el 100 % de EPC. Por consiguiente, las poblaciones purificadas de la divulgación contienen niveles significativamente mayores de EPC que los que existen en la naturaleza, tal como se describió anteriormente.

35 La población purificada de EPC puede aislarse poniendo en contacto una mezcla en bruto de células que contiene una población de células madre que expresan un antígeno característico de las EPC con una molécula que se une específicamente a la porción extracelular del antígeno. Una técnica de este tipo se conoce como selección positiva. La unión de las EPC a la molécula permite que las EPC se distinguen suficientemente de las células contaminantes que no expresan el antígeno permitiendo el aislamiento de las células madre de las células contaminantes. El antígeno es preferiblemente VEGFR, y más preferiblemente VEGFR-2.

40 La molécula usada para separar las células progenitoras de las células contaminantes puede ser cualquier molécula que se una específicamente al antígeno que caracteriza a las EPC. La molécula puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de un anticuerpo monoclonal o, en el caso de un antígeno que es un receptor, el ligando de ese receptor. Por ejemplo, en el caso de un receptor de VEGF, tal como FLK-1, el ligando es VEGF.

45 Las células aisladas únicas de la presente divulgación pueden separarse de otras células en virtud de su estado de CD45+ y la posición de receptores de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), por ejemplo, VEGFR-2. Las células pueden aislarse mediante técnicas convencionales para separar células, tales como las descritas en Civin, patentes estadounidenses n.ºs 4.714.680, 4.965.204, 5.035.994 y 5.130.144, Tsukamoto *et al.*, patente estadounidense n.º 5.750.397 y Loken *et al.*, patente estadounidense n.º 5.137.809. Por tanto, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico de CD45 o un anticuerpo específico de VEGFR pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido tal como nitrocelulosa, perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibras huecas, perlas magnéticas y placas de Petri de plástico. Toda la población de células se hace pasar entonces a través del soporte sólido o se añade a las perlas.

50 Las células que se unen a la molécula de unión pueden retirarse de la suspensión de células separando físicamente el soporte sólido de la suspensión de células restante. Por ejemplo, las células no unidas pueden eluirse o retirarse por lavado con tampón fisiológico tras permitir un tiempo suficiente para que el soporte sólido se una a las células madre.

55 Las células unidas pueden separarse de la fase sólida mediante cualquier método apropiado, dependiendo

principalmente de la naturaleza de la fase sólida y la molécula de unión. Por ejemplo, las células unidas pueden eluirse de una placa de Petri de plástico mediante agitación vigorosa. Alternativamente, las células unidas pueden eluirse "mellando" o digiriendo enzimáticamente una secuencia "espaciadora" sensible a enzimas entre la fase sólida y un anticuerpo. Están disponibles comercialmente espaciadores unidos a perlas de agarosa de, por ejemplo, Pharmacia.

La fracción de células enriquecida eluida puede lavarse entonces con un tampón mediante centrifugación y conservarse en un estado viable a bajas temperaturas para su uso posterior según la tecnología convencional. Las células también pueden usarse inmediatamente, por ejemplo, infundiéndose por vía intravenosa en un receptor.

Las que permanecen unidas al soporte sólido son las células que contienen un marcador que reconoce el anticuerpo usado. Por tanto, si se usa el anticuerpo anti-CD45, entonces la población resultante se enriquecerá en gran medida en células CD45+. Si el anticuerpo usado es VEGFR, entonces la población resultante se enriquecerá en gran medida en células VEGFR+. Esa población puede enriquecerse entonces en el otro marcador repitiendo las etapas usando una fase sólida que tiene unida a la misma un anticuerpo frente al otro marcador.

Otro modo de clasificar las células CD45+ VEGFR+ es por medio de citometría de flujo, lo más preferiblemente por medio de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS), tal como los fabricados por Becton-Dickinson con los nombres FACScan o FACSCalibur. Por medio de esta técnica, las células que tienen un marcador CD45 sobre las mismas se etiquetan con un colorante fluorescente particular por medio de un anticuerpo anti-CD45 que se ha conjugado con un colorante de este tipo. De manera similar, el marcador de VEGFR de las células se etiqueta con un colorante fluorescente diferente por medio de un anticuerpo anti-VEGFR que se conjuga con el otro colorante. Cuando las células teñidas se colocan sobre el instrumento, se dirige una corriente de células a través de un haz de láser de argón que excita el fluorocromo para que emita luz. Esta luz emitida se detecta mediante un tubo fotomultiplicador (PMT) específico para la longitud de onda de emisión del fluorocromo en virtud de un conjunto de filtros ópticos. La señal detectada por el PMT se amplifica en su propio canal y se presenta mediante un ordenador en una variedad de diferentes formas, por ejemplo, un histograma, presentación de puntos o presentación de contorno. Por tanto, las células fluorescentes que emiten a una longitud de onda expresan una molécula que es reactiva con el reactivo marcado con fluorocromo específico, mientras que las células no fluorescentes o células fluorescentes que emiten a una longitud de onda diferente no expresan esta molécula pero pueden expresar la molécula que es reactiva con el reactivo marcado con fluorocromo que fluoresce a la otra longitud de onda. El citómetro de flujo es también semicuantitativo porque presenta la cantidad de fluorescencia (intensidad de fluorescencia) expresada por la célula. Esto se correlaciona, en un sentido relativo, con el número de las moléculas expresadas por la célula.

Los citómetros de flujo también pueden estar equipados para medir parámetros no fluorescentes, tales como volumen celular o luz dispersada por la célula a medida que pasa a través del haz de láser. El volumen celular es habitualmente una medición directa. Los PMT de dispersión de luz detectan la luz dispersada por la célula o bien en un ángulo delantero (dispersión delantera; FSC) o en un ángulo recto (dispersión lateral; SSC). La FSC es habitualmente un índice de tamaño, mientras que la SSC es un índice de la complejidad celular, aunque ambos parámetros pueden estar influidos por otros factores.

Preferiblemente, el citómetro de flujo está equipado con más de un detector de emisión de PMT. Los PMT adicionales pueden detectar otras longitudes de onda de emisión, permitiendo la detección simultánea de más de un fluorocromo, cada uno en canales separados individuales. Los ordenadores permiten el análisis de cada canal o la correlación de cada parámetro con otro. Los fluorocromos que se usan normalmente con máquinas de FACS incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), que tiene un pico de emisión a 525 nm (verde), R-ficoeritrina (PE), que tiene un pico de emisión a 575 nm (naranja-rojo), yoduro de propidio (PI), que tiene un pico de emisión a 620 nm (rojo), 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que tiene un pico de emisión a 660 nm (rojo), R-ficoeritrina Cy5 (RPE-Cy5), que tiene un pico de emisión a 670 nm (rojo) y alofococianina (APC), que tiene un pico de emisión a 655-750 nm (rojo oscuro).

Estos y otros tipos de máquinas de FACS pueden tener la capacidad adicional de separar físicamente las diversas fracciones desviando las células de propiedades diferentes a recipientes diferentes.

Cualquier otro método para aislar la población CD45+ VEGFR+ de un material de partida, tal como médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical, puede usarse también según la presente divulgación. Las diversas subpoblaciones (por ejemplo, CD14+, Tie2+, CD144-) de la presente divulgación pueden aislarse de maneras similares.

O bien antes o bien después de que las poblaciones de células en bruto se purifiquen tal como se describió anteriormente, la población de células progenitoras puede concentrarse adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células progenitoras pueden enriquecerse mediante selección positiva para uno o más antígenos característicos de EPC. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, CD14 o Tie-2.

En una divulgación, se extrae sangre directamente de la sangre periférica circulante de un donante. La sangre se

percola de manera continua a través de una columna que contiene la molécula de unión unida a la fase sólida, tal como un anticuerpo frente a VEGFR-2, para capturar EPC. La sangre agotada en células progenitoras se devuelve inmediatamente al sistema circulatorio del donante mediante métodos conocidos en la técnica, tales como hemaféresis. La sangre se procesa de este modo hasta que un número suficiente de células progenitoras se une a la columna. Las células madre se aíslan entonces de la columna mediante métodos conocidos en la técnica. Este método permite que las células progenitoras de la sangre periférica poco comunes se recojan a partir de un volumen muy grande de sangre, ahorrando al donante el gasto y el dolor de recoger médula ósea y los riesgos asociados de anestesia, analgesia, transfusión de sangre e infección.

Las EPC se cultivan y proliferan usando los métodos descritos en el presente documento. Se obtienen células de sangre periférica aislando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Se siembran suspensiones de células en cualquier receptáculo capaz de sostener células, particularmente frascos de cultivo, placas de cultivo o botellas rodantes, y más particularmente en frascos de cultivo pequeños tales como frascos de cultivo de 25 cm². Las células cultivadas en suspensión se resuspenden a de aproximadamente 5x10⁴ a 2x10⁵ células/ml (por ejemplo, 1x10⁵ células/ml). Las células sembradas en placa sobre un sustrato fijo se siembran en placa a aproximadamente 2-3x10³ células/cm². Opcionalmente, las placas de cultivo se recubren con una proteína de matriz tal como colágeno. Las células pueden colocarse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de soportar el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-12, y similares, que contiene complementos que se requieren para el metabolismo celular tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas tales como transferrina y similares. El medio de cultivo también puede contener antibióticos para prevenir la contaminación con levaduras, bacterias y hongos tales como penicilina, estreptomina, gentamicina y similares. El medio de cultivo puede contener suero derivado de bovino, equino, pollo y similares.

Las condiciones para el cultivo deben estar próximas a las condiciones fisiológicas. El pH del medio de cultivo debe estar próximo al pH fisiológico (por ejemplo, entre pH 6-8, entre aproximadamente pH 7 y 7,8, o a pH 7,4). Las temperaturas fisiológicas oscilan entre aproximadamente 30 °C y 40 °C. Las EPC se cultivan a temperaturas de entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 38 °C (por ejemplo, entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 37 °C).

Opcionalmente, el medio de cultivo se complementa con al menos un factor de crecimiento que induce proliferación ("mitogénico"). Un "factor de crecimiento" es una proteína, un péptido u otra molécula que tiene un efecto de crecimiento, inducción de la proliferación, inducción de la diferenciación o trófico sobre EPC. Los "factores de crecimiento que inducen proliferación" son factores tróficos que permiten que las EPC proliferen, incluyendo cualquier molécula que se una a un receptor sobre la superficie de la célula ejerciendo un efecto trófico, o de inducción del crecimiento, sobre la célula. Los factores de crecimiento que inducen proliferación incluyen EGF, anfiregulina, factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), VEGF y combinaciones de los mismos. Se añaden habitualmente factores de crecimiento al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre aproximadamente 1 fg/ml y 1 mg/ml. Concentraciones de entre aproximadamente 1 y 100 ng/ml son habitualmente suficientes. Pueden realizarse fácilmente ensayos de valoración sencillos para determinar la concentración óptima de un factor de crecimiento particular.

Los efectos biológicos del crecimiento y factores tróficos están mediados generalmente a través de la unión a receptores de la superficie celular. Los receptores para varios de estos factores se han identificado y están disponibles anticuerpos y sondas moleculares para receptores específicos. Las EPC pueden analizarse para detectar la presencia de receptores de factores de crecimiento en todos los estadios de diferenciación. En muchos casos, la identificación de un receptor particular proporciona orientación para la estrategia a usar en la diferenciación adicional de las células a lo largo de rutas de desarrollo específicas con la adición de factores tróficos o de crecimiento exógenos.

Generalmente, tras aproximadamente 3-10 días *in vitro*, el medio de cultivo de las EPC se repone aspirando el medio y añadiendo medio nuevo al frasco de cultivo. Opcionalmente, el medio aspirado se recoge, se filtra y se usa como de acondicionamiento para realizar pases posteriormente de las EPC. Por ejemplo, se usa el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 % o más de medio de condicionamiento.

El cultivo celular de EPC puede someterse a pase fácilmente para reiniciar la proliferación. Por ejemplo, tras 3-7 días *in vitro*, los frascos de cultivos se agitan bien y las EPC se transfieren entonces a un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugan a baja velocidad. El medio se aspira, las EPC se resuspenden en una pequeña cantidad de medio de cultivo. Entonces se cuentan las células y vuelven a sembrarse en placa a la densidad deseada para reiniciar la proliferación. Este procedimiento puede repetirse semanalmente para dar como resultado un aumento logarítmico del número de células viables en cada pase. El procedimiento se continúa hasta que se obtiene el número deseado de EPC.

Las EPC y la progenie de EPC pueden criopreservarse mediante cualquier método conocido en la técnica hasta que

se necesiten. (Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.071.741, las solicitudes de patente internacional PCT WO93/14191, WO95/07611, WO96/27287, WO96/29862 y WO98/14058, Karlsson *et al.*, 65 Biophysical J. 2524-2536 (1993)). Las EPC pueden suspenderse en una disolución isotónica, preferiblemente un medio de cultivo celular, que contiene un crioprotector particular. Tales crioprotectores incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y similares. Estos crioprotectores se usan a una concentración del 5-15 % (por ejemplo, el 8-10 %). Las células se congelan gradualmente hasta una temperatura de -10 °C a -150 °C (por ejemplo, de -20 °C a -100 °C, o de -70 °C a -80 °C).

Modificación genética de las células

En una realización, las células de la presente divulgación, MSC y/o EPC, se modifican genéticamente. En un aspecto, tal modificación genética potencia la actividad terapéutica de las células. Los ejemplos no limitativos de tal modificación incluyen expresión o activación potenciada de una óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), hemo oxigenasa (HMOX1) y prostaciclina sintasa (PTGIS).

En un aspecto, la célula se transforma con un ácido nucleico que aumenta la expresión de actividad biológica de una proteína seleccionada del grupo que consiste en óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), hemo oxigenasa (HMOX1) y prostaciclina sintasa (PTGIS). En un aspecto, el ácido nucleico codifica para la proteína.

Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Una realización de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula madre mesenquimatosa (MSC) o un medio de cultivo acondicionado con MSC y una prostaciclina y un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende además una célula progenitora endotelial (EPC).

Según una realización de la presente divulgación, las composiciones pueden coadministrarse con al menos otro medicamento para vasculopatía, que comprende prostaglandina I₂ (PGI₂), análogos de prostaciclina, inhibidor de fosfodiesterasa-5 (PDE-5), antagonista del receptor de endotelina (ETRA), inhibidores de tirosina cinasa y estimulador de guanilato ciclasa soluble.

Según una realización de la presente divulgación, el método para tratar vasculopatía puede comprender además reducir la trombosis en las arterias pulmonares; reducir la inflamación en las arterias pulmonares; reducir la proliferación de músculo liso de la íntima en las arterias pulmonares; reducir la formación de lesiones plexiformes en las arterias pulmonares; aumentar la cantidad de óxido nítrico en las arterias pulmonares; aumentar la cantidad de PGI₂ en las arterias pulmonares; reducir el nivel de endotelina-1 en las arterias pulmonares; reducir la cantidad de factores de crecimiento en las arterias pulmonares; o promover una morfología endotelial apropiada en las arterias pulmonares.

El tratamiento de la vasculopatía administrando/trasplantando células progenitoras se describe en Wang *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 49:1566-71 (2007), Zhao *et al.* Circ. Res. 96:442-450 (2005) y Nagaya *et al.*, Circulation 108:889-895(2003).

La administración/el trasplante de células a los vasos sanguíneos dañados tiene el potencial de reparar el tejido vascular dañado, por ejemplo, venas, arterias, capilares, restaurando de ese modo la función vascular. Sin embargo, la ausencia de células adecuada para propósitos de trasplante ha impedido que se cumpla el potencial completo de este procedimiento. Las células "adecuadas" son células que cumplen uno o más de los siguientes criterios: (1) pueden obtenerse en grandes números; (2) pueden proliferar *in vitro* para permitir la inserción de material genético, si es necesario; (3) son capaces de sobrevivir indefinidamente y facilitar la reparación vascular en trasplante; y (4) no son inmunogénicas, preferiblemente obtenidas del propio tejido del paciente o de un donante compatible. Las células adecuadas pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas.

Las células pueden administrarse a un sujeto con vasculatura anómala o síntomas de insuficiencia coronaria. Las células pueden prepararse a partir de la propia sangre o médula ósea del receptor. En tales casos, las EPC pueden generarse a partir de tejido disociado y proliferado *in vitro* usando los métodos descritos anteriormente. Tras la expansión adecuada de números de células, las EPC pueden recogerse, modificarse genéticamente si es necesario y prepararse para la inyección directa en la vasculatura del receptor.

Las células pueden prepararse a partir de un tejido de donante que es xenogénico para el huésped. Para que los xenoinjertos tengan éxito, se emplea habitualmente algún método de reducción o eliminación de la respuesta inmunitaria en el tejido implantado. Por tanto, los receptores pueden estar inmunosuprimidos, o bien a través del uso de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina, o bien a través de estrategias de inmunosupresión locales que emplean inmunosupresores aplicados localmente. Se divulga la inmunosupresión local en Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). La patente estadounidense n.º 5.026.365 divulga métodos de encapsulación adecuados para inmunosupresión local.

Como alternativa a emplear técnicas de inmunosupresión, pueden aplicarse métodos de desactivación o reemplazo génico usando recombinación homóloga en células madre embrionarias, enseñados por Smithies *et al.*, 317 Nature 230-234 (1985), y extendidos a desactivación o reemplazo génico en líneas celulares (Zheng *et al.*, 88 Proc. Natl. Acad. Sci. 8067-8071 (1991)), a EPC para la supresión de genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

5 Las EPC que carecen de expresión de MHC permiten el injerto de poblaciones de células endoteliales enriquecidas a través de barreras de histocompatibilidad alogénica, y quizá incluso xenogénica, sin la necesidad de inmunosuprimir al receptor. También se divulgan citas y revisiones generales para el uso de métodos recombinantes para reducir la antigenicidad de células del donante en Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). Se divulgan enfoques a modo de ejemplo para la reducción de la inmunogenicidad de trasplantes mediante modificación de la
10 superficie en la solicitud de patente internacional PCT WO 92/04033 y el documento PCT/US99/24630. Alternativamente, la inmunogenicidad del injerto puede reducirse preparando EPC a partir de un animal transgénico que tiene antígenos de CMH alterados o delecionados.

15 Las células pueden encapsularse y usarse para administrar factores al huésped, según tecnologías de encapsulación conocidas, incluyendo microencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.^{os} 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350) y macroencapsulación (véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses n.^{os} 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/19195 y WO 95/05432). La macroencapsulación se describe en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.284.761; 5.158.881; 4.976.859; 4.968.733; 5.800.828 y la solicitud de patente internacional PCT WO 95/05452. Pueden implantarse
20 múltiples dispositivos de macroencapsulación en el huésped.

Las células preparadas a partir de tejido que es alogénico con respecto al del receptor pueden someterse a prueba para su uso mediante los métodos bien conocidos de tipificación tisular, para que coincida estrechamente con el tipo de histocompatibilidad del receptor.

25 Las células administradas a la vasculatura pueden formar un injerto vascular, de modo que las células forman conexiones normales con células vasculares vecinas, manteniendo el contacto con células endoteliales trasplantadas o existentes. Por tanto, las células trasplantadas pueden restablecer el tejido vascular que se ha dañado debido a enfermedad y envejecimiento.

30 La integración funcional del injerto en el tejido vascular del huésped puede evaluarse examinando la eficacia de los injertos sobre la restauración de diversas funciones.

35 Según una realización de la presente divulgación, pueden coadministrarse células al receptor con al menos un factor de crecimiento, tal como FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4, TGF-Beta, etc.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un cultivo de células madre mesenquimatosas y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el cultivo de células madre mesenquimatosas se ha tratado previamente con una prostaciclina *ex vivo* añadiendo la prostaciclina como compuesto químico al cultivo de células madre mesenquimatosas e incubando la prostaciclina con la célula madre mesenquimatosas, y en la que el cultivo de células madre mesenquimatosas comprende la prostaciclina, en la que el cultivo de células madre mesenquimatosas comprende un factor de crecimiento liberado de la célula madre mesenquimatosas.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la célula madre mesenquimatosas se obtiene de médula ósea.
- 15 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la célula madre mesenquimatosas es una célula precursora mesenquimatosas.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la célula madre mesenquimatosas se ha modificado genéticamente.
- 20 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la prostaciclina es treprostínilo o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende además células progenitoras endoteliales.
- 25 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía que comprende administrar a un sujeto que lo necesita la composición farmacéutica.
- 30 8. Composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía según la reivindicación 7, en la que el sujeto padece hipertensión pulmonar.
9. Composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía según la reivindicación 7, en la que el uso comprende coadministrar la composición con células progenitoras endoteliales.
- 35 10. Composición farmacéutica para su uso en un método para tratar o prevenir la vasculopatía según la reivindicación 7, en la que el uso comprende coadministrar la composición al sujeto con al menos uno de un inhibidor de fosfodiesterasa-5 (PDE-5), un antagonista del receptor de endotelina (ETRA), un inhibidor de tirosina cinasa y un estimulador de guanilato ciclasa soluble.
- 40 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la célula madre mesenquimatosas no está modificada genéticamente.