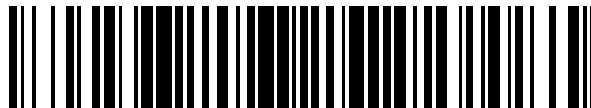


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 005**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2009 PCT/EP2009/060171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2010 WO10015665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2009 E 09781530 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2323626**

54 Título: **Composición parenteral que comprende microesferas con un diámetro entre 10 y 20 micras**

30 Prioridad:

05.08.2008 GB 0814302

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

27.07.2018

73 Titular/es:

**CORETHERAPIX SLU (100.0%)
Calle Santiago Grisolia N° 2
28760 Tres Cantos, Madrid , ES**

72 Inventor/es:

NADAL GINARD, BERNARDO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 677 005 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición parenteral que comprende microesferas con un diámetro entre 10 y 20 micras

Compuestos y métodos**Campo de la invención**

5 La presente divulgación se refiere a formulaciones farmacéuticas adecuadas para dirigirse a un tejido y/u órgano u órganos particulares con un ingrediente activo formulado, por ejemplo cuando se administra aguas arriba del órgano o tejido diana. La divulgación se refiere también al uso de las mismas en tratamiento y a los métodos de preparación de las formulaciones.

10 En particular, se emplean diferentes factores de crecimiento y citocinas para estimular la capacidad regenerativa intrínseca de los tejidos sólidos mediante la activación de su población de células madre residentes utilizando un dispositivo, tal como un catéter, para la administración localizada de los compuestos activos al tejido diana.

Antecedentes de la invención

15 La mayor parte de los medicamentos/productos farmacéuticos se administran por vía sistémica, por ejemplo, por vía oral, por vía intravenosa, por vacuna, por vía intramuscular o similares. Son excepciones notables los stents recubiertos con ingredientes activos, ciertas formulaciones respiratorias administradas directamente a los pulmones, ciertas radioterapias que se dirigen a zonas diana y ciertos tratamientos dermatológicos, oftalmológicos y otológicos que se administran tópicamente.

20 Sin embargo, cuando sea apropiado, sería ventajoso poder administrar el producto farmacéutico principalmente a un tejido u órgano enfermo, porque esto podría reducir la dosis requerida y también minimizar los efectos secundarios. Tal estrategia sería particularmente ventajosa para dos áreas principales de la medicina: a) la administración de factores de crecimiento y citocinas capaces de activar el crecimiento y la diferenciación de células madre residentes en un tejido particular. Debido a la potente actividad biológica de estas moléculas, sería deseable limitar su acción al tejido deseado, con un derrame mínimo o nulo en el resto del cuerpo; b) la administración de agentes quimioterapéuticos para el cáncer porque si se pudieran dirigir específicamente al tejido canceroso, entonces sería posible la administración de dosis más altas a las células diana, a la vez que se reducirían los terribles efectos secundarios tóxicos de los mismos, al menos en gran medida.

30 En situaciones más agudas, tales como en ataques cardíacos e ictus, serían posibles mejores tratamientos, en particular los dirigidos a regenerar el tejido dañado, si los órganos afectados pudieran ser el objetivo específico. En situaciones crónicas, tales como la enfermedad de Parkinson, la diabetes o la fibrosis pulmonar, la administración local de agentes capaces de reconstituir el tipo o tipos de células deficientes tiene el potencial de mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Sin embargo, la administración reproducible de ingredientes activos al tejido diana o a un órgano diana de una manera terapéuticamente eficaz es influida en gran medida por los componentes (incluidos los excipientes) empleados, sus características físicas, la dosis y el modo de administración.

35 El documento WO2007/055561 se refiere a métodos para la regeneración vascular a través de la modulación de la actividad de R-Ras. Se puede administrar una proteína R-Ras en una composición de liberación controlada que comprende microesferas biodegradables impregnadas con la proteína R-Ras, que se pueden unir a un péptido localizador (homing) para administrar la composición a una localización requerida. Las microesferas pueden tener un diámetro de 10-50 μm .

40 El documento WO2004/022000 se refiere a microesferas para la liberación controlada casi lineal de un antibiótico. Las microesferas se destinan a la implantación o inyección dentro del cuerpo en un sitio de infección real o potencial. Se ejemplifican microesferas de aproximadamente 15-20 μm y 7,46 μm de diámetro.

45 El documento EP1350518 se refiere a formulaciones para la liberación prolongada controlada de GM-CSF. Las formulaciones se basan en micropartículas sólidas formadas por polímeros sintéticos biodegradables y que tienen un tamaño entre 10 y 100 μm .

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1: Muestra la distribución y caracterización de las células cardíacas c-kit^{POS} en el corazón de porcino adulto.
- Figura 2: Muestra imágenes de microscopía óptica que presentan varias células cardíacas porcinas expandidas
- Figura 3: Muestra la tinción por H&E de corazones porcinos tratados con GF
- 50 Figura 4: Muestra evidencia de activación de CSC endógenas

- Figura 5: Muestra bandas de regeneración de células pequeñas recién formadas
- Figura 6: Muestra varias imágenes de tejido recién formado
- Figura 7: Muestra una imagen de microscopio óptico de partículas de PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)) con IGF-1 preparado como en el Ejemplo 1.
- 5 Figura 8 Muestra una micrografía electrónica de partículas de PLGA con IGF-1 preparado como en el Ejemplo 1.
- Figura 9: Muestra secciones de corazón porcino.
- Figura 10: Muestra secciones de miocardio porcino después de la administración de microesferas de poliestireno o de PLGA y microesferas de factor de crecimiento.
- Figura 11: Muestra secciones de corazón porcino en las que se destacan las células madre cardíacas endógenas.
- 10 Figura 12: Muestra imágenes histológicas de músculo cuádriceps control y dañado.
- Figura 13A: Compara el efecto del número de miocitos cardíacos regenerados en cerdos post AMI (infarto de miocardio agudo) tratados con una combinación de dos tipos de microesferas.
- Figura 13B: Muestra la fracción de eyección del ventrículo izquierdo antes, inmediatamente después y 4 semanas después del AMI determinada por ecocardiografía de los cerdos tratados con diferentes combinaciones de microesferas.
- 15

La presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica para administración intraarterial aguas arriba de un tejido diana, que comprende partículas esféricas que contienen un ingrediente activo y un excipiente biodegradable, en donde:

20 el diámetro medio de las partículas es de 15 micras y el 99 % o más de las partículas tienen un diámetro de 15 ± 1 micras;

el diámetro de 15 ± 1 micras hace posible la retención de partículas en un tejido diana después de la administración de la formulación farmacéutica aguas arriba del tejido diana; y

la formulación está sustancialmente libre de partículas con un diámetro mayor que 50 micras y menor que 5 micras;

25 de tal manera que cuando la formulación se administra aguas arriba del tejido diana, la capacidad del ingrediente activo de pasar a través del tejido diana y pasar a la circulación sistémica se restringe gracias al atrapamiento de las partículas en los capilares del tejido diana.

30 Es decir, el ingrediente activo se retiene en el tejido diana mientras que su capacidad para atravesar el tejido diana y pasar a la circulación sistémica está severamente restringida o anulada. Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica como se ha definido antes para la administración intraarterial aguas arriba de un tejido cardíaco.

35 En un aspecto de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica como se ha definido antes para la administración intraarterial a un tejido cardíaco, comprendiendo dicha composición farmacéutica partículas que contienen un ingrediente activo, seleccionado del grupo que consiste en HGF e IGF-1, y un excipiente biodegradable, en donde el 90 % o más de las partículas tienen un diámetro entre 10 y 20 micras, de tal modo que cuando se administra la formulación aguas arriba del tejido cardíaco, la capacidad del ingrediente activo para atravesar el tejido cardíaco y pasar a la circulación sistémica está restringida .

40 Aunque no se desea limitarse a la teoría, se cree que las formulaciones de la presente divulgación, cuando se administran en la sangre arterial aguas arriba del tejido u órgano diana, se transportan hasta el tejido u órgano diana por la circulación y debido al tamaño de partícula y al centro de distribución, en otras palabras, quedan atrapadas o cogidas en los capilares del tejido u órgano, que tienen un diámetro de aproximadamente 5-10 μm . Las partículas que se alojan en los capilares y bloquean el flujo sanguíneo generalmente no son deseables, pero el número de capilares afectados por la formulación de la divulgación es relativamente pequeño, particularmente porque la formulación permite emplear dosis terapéuticas muy bajas. Además, el excipiente biodegradable se funde, se disuelve, se degrada o de alguna forma se disocia del ingrediente activo y, por lo tanto, finalmente se elimina el "bloqueo". Por lo tanto, el movimiento de la partícula se restringe/retrasa por el alojamiento en los capilares, un proceso reversible que hace que los capilares vuelvan a la condición natural después de un corto período. El retrasar el movimiento de las partículas durante un período corto permite que el ingrediente activo se mantenga cerca del objetivo durante un período de tiempo apropiado para facilitar la acción local o la absorción del ingrediente activo en el espacio extravascular del tejido.

50 La formulación se diseña de tal manera que la mayor parte, si no todo el ingrediente activo se libera de las partículas mientras están inmovilizadas en el lecho vascular del tejido diana. Una vez que se libera la carga activa, las

partículas están diseñadas para ser degradadas y para que sus materiales constituyentes sean liberados a la circulación general para ser o metabolizados o eliminados a través del hígado y/o el riñón.

La presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica para administración parenteral a un tejido diana que comprende partículas esféricas que contienen un ingrediente activo y un excipiente biodegradable, en donde

- 5 el diámetro medio de las partículas es de 15 micras y el 99 % o más de las partículas tienen un diámetro de 15 ± 1 micras;

el diámetro de 15 ± 1 micras hace posible la retención de partículas en un tejido diana después de la administración de la formulación farmacéutica aguas arriba del tejido diana; y

la formulación está sustancialmente libre de partículas con un diámetro mayor que 50 micras y menor que 5 micras;

- 10 de tal manera que cuando la formulación se administra aguas arriba del tejido diana, el ingrediente activo es retenido en el tejido u órgano diana durante un período terapéuticamente eficaz.

- 15 En particular, las formulaciones de la presente divulgación permiten emplear cantidades más bajas de los ingredientes activos porque la mayor parte del ingrediente activo se retiene en el tejido objetivo en lugar de pasar a la circulación sistémica. Esto parece aumentar la ventana terapéutica del ingrediente activo. Esto es, el intervalo de dosis en el que el ingrediente es terapéuticamente activo se incrementa permitiendo que se puedan administrar cantidades absolutas más pequeñas. La administración local de una dosis más baja significa que es probable que se minimicen los efectos secundarios.

Las dosis adecuadas están, por ejemplo, en el intervalo de 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tal como 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a aproximadamente 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en particular 0,15, 0,2, 0,25, 0,35, 0,4 o 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

- 20 La administración de dosis más bajas por vía local para el efecto terapéutico es particularmente importante para moléculas potentes, por ejemplo, factores de crecimiento, que se sabe que tienen potencial para estimular la oncogénesis. Estos efectos secundarios potencialmente dañinos limitan la utilidad de tales moléculas aunque en circunstancias correctas producen efectos terapéuticamente beneficiosos.

- 25 Las formulaciones de la presente divulgación no emplean microesferas que comprenden un poliestireno, sílice u otra perla no biodegradable con ingrediente activo unido a la misma, porque los materiales elásticos duraderos, es decir materiales no biodegradables tales como el poliestireno y la sílice pueden causar daños a los capilares locales, y pueden actuar como cuerpos extraños y producir reacciones inflamatorias locales. Además, tales perlas no biodegradables podrían eventualmente tener acceso a la circulación sistémica y pueden entonces, por ejemplo, acumularse en un tejido distante tal como los pulmones y el hígado, todos los cuales son indeseables.

- 30 Generalmente, cada partícula comprenderá ingrediente activo y excipiente. No se pretende que la descripción de la formulación se refiera a partículas discretas de ingrediente activo y partículas separadas de polímero biodegradable en una mezcla simple.

- 35 La expresión sustancialmente libre de partículas de más de 50 micras, como se emplea *supra*, se pretende que se refiera a formulaciones que cumplen los criterios para ser administradas como una formulación parenteral establecida en la farmacopea de Estados Unidos y/o en la farmacopea europea.

En una realización, sustancialmente libre puede incluir contener menos del 5 % de dichas partículas, particularmente menos del 1 %, por ejemplo menos del 0,5 %, tal como menos del 0,1 %.

En una realización, la formulación no contiene partículas de menos de 1 micra de diámetro.

En una realización, la formulación no contiene partículas de menos de 5 micras de diámetro.

- 40 En una realización, al menos el 80 % de las partículas con el ingrediente activo son retenidas en el tejido diana después de la administración.

En una realización, las partículas del ingrediente activo se retienen en el tejido u órgano diana durante un período en el intervalo de 5 minutos a 24 horas, por ejemplo de 30 minutos a 5 horas, tal como 1, 2, 3 o 4 horas.

- 45 El período en que la formulación es retenida en el tejido u órgano relevante depende principalmente del excipiente o de la combinación de excipientes empleados. Por lo tanto, las propiedades requeridas del excipiente *in vivo* son:

- que sea biocompatible (es decir, en general no tóxico y adecuado para administración a humanos y/o animales),
 - que dentro de un marco de tiempo apropiado después de la administración, contribuya a mantener la integridad de la partícula suficientemente para que el movimiento de la partícula se retarde, por ejemplo, alojándose en un capilar o arteriola en el tejido u órgano diana, y
- 50

- que sea biodegradable (es decir, es capaz de ser procesado o metabolizado) por el cuerpo para liberar el ingrediente activo y después de que se haya liberado el ingrediente activo.

5 Por lo tanto, un excipiente polimérico biodegradable adecuado para uso en la presente divulgación es un polímero o copolímero que no tenga un largo tiempo de residencia *in vivo*, es decir, que no incluya entidades tales como poliestireno, polipropileno, polietileno de alta densidad y material con propiedades similares. Los polímeros biodegradables deben ser no tóxicos y se deben descomponer en subunidades no tóxicas preferiblemente localmente, de tal manera que la cantidad de fragmentos/restos circulantes del excipiente sea mínima.

10 Los excipientes adecuados se pueden encontrar en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) e incluyen polímeros inorgánicos así como orgánicos, naturales y artificiales. Los ejemplos pueden incluir polímeros tales como ácido poliláctico, poli-glicolida o una combinación de los mismos, a saber, ácido poli(láctico-co-glicólico), policaprolactona (que tiene una velocidad de biodegradación más lenta que el ácido poli(láctico-co-glicólico)), polihidroxibutirato o combinaciones de los mismos. También pueden ser adecuados poliuretanos, polisacáridos, proteínas y poliaminoácidos, carbohidratos, quitosano, heparina, ácido polihialurónico, etc. El excipiente generalmente está en forma de una partícula, una esfera aproximada (microesfera) a la que se puede unir el
15 ingrediente activo o con la que se asocia el ingrediente activo o se incorpora dentro.

20 Los liposomas son excipientes poliméricos no biodegradables dentro del significado de la presente divulgación. Los liposomas son vesículas de una bicapa de fosfolípidos que generalmente comprenden colesterol. Para enfermedades tales como infarto de miocardio inducido por arterioesclerosis, se monitorizan los niveles de colesterol como uno de los factores de riesgo para la enfermedad y, por lo tanto, puede ser aconsejable evitar la administración de formulaciones que contienen colesterol a tales pacientes. Además, los pacientes con cirrosis hepática pueden tener una mayor dificultad para metabolizar los lípidos y las grasas de la dieta, por lo tanto, la administración de liposomas a dichos pacientes puede no ser aconsejable.

En una realización, el excipiente biodegradable no es un hidrogel (una fase continua de una fase dispersa coloidal correspondiente).

25 Así, tanto la velocidad de "liberación" del ingrediente activo como la velocidad de "disolución" de la partícula se pueden modificar cambiando el excipiente y/o el método de unión del ingrediente activo al excipiente, de modo que, por ejemplo, el empleo de policaprolactona proporcionaría una partícula que tarda más tiempo en disolverse o desintegrarse que una partícula correspondiente que emplea ácido poli(láctico-co-glicólico). Si el ingrediente activo está incluido dentro del excipiente, se liberará más lentamente que si está en la superficie de la partícula. Si está en
30 la superficie y unido por carga electrostática, se liberará más rápidamente que si estuviera unido covalentemente.

En una realización, el excipiente comprende ácido poli(láctico-co-glicólico).

En una realización, sustancialmente todas las partículas, por ejemplo, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de las partículas comprenden ácido poli(láctico-co-glicólico).

En una realización, el ácido poli(láctico-co-glicólico) está en la relación 75:25, respectivamente.

35 En una realización, el excipiente comprende dos o más polímeros distintos, el término polímero incluye copolímeros.

En una realización, el excipiente puede incluir un polímero de acrilato, por ejemplo un polímero de metacrilato.

En una realización, la partícula comprende alginato.

En una realización, el excipiente comprende una forma biodegradable de poliuretano.

En una realización, el excipiente está en forma de una microesfera.

40 En una realización, la divulgación emplea una formulación de microesferas de alcohol polivinílico.

En una realización, las microesferas no son albúmina.

En una realización, el ingrediente o ingredientes activos empleados se encapsulan dentro de una cubierta biodegradable, por ejemplo, seleccionada de la cadena Eudragit.

En una realización, una o más moléculas de ingrediente activo están incluidas dentro de la partícula.

45 Para que los compuestos activos funcionen, como se describe en la presente descripción, necesitan ser administrados a la circulación como una micropartícula que debido a su tamaño, morfología y composición viajará con el flujo sanguíneo para alcanzar su tejido diana. En la diana, la partícula debe liberar su carga activa de una manera controlable. Para lograr este objetivo, una vez descargada, la partícula debe ser degradada y sus constituyentes deben ser metabolizados o administrados a la circulación sistémica para ser eliminados por los
50 sistemas de excreción normales del cuerpo.

Para lograr estos objetivos, las micropartículas deben cumplir las siguientes características:

Las micropartículas deben ser de tamaño y morfología uniformes con el fin de asegurar que lleguen y se alojen en el nivel diseñado del sistema circulatorio. La uniformidad de tamaño y forma se controla mejor cuando las partículas son esféricas.

- 5 La mayor parte de los lechos capilares permiten el paso libre de partículas con un diámetro < 6 micras de diámetro, las microesferas de esta divulgación deben tener un diámetro de ~ 15 micras. Las partículas en el intervalo de 20 micras de diámetro o mayor se alojan en arteriolas precapilares o arteriolas y bloquean el flujo de sangre a varios capilares a la vez. Por lo tanto, podrían crear infartos microscópicos. Por lo tanto, para la administración de terapias regenerativas, el diámetro más adecuado de las microesferas está en el intervalo de 15 micras. El tiempo requerido para liberar el compuesto activo una vez que las microesferas hayan alcanzado su diana puede variar desde minutos hasta días e incluso semanas, dependiendo del tipo de microesfera y del objetivo terapéutico.

- 15 Las microesferas deben estar hechas con un compuesto biodegradable y no tóxico. La estabilidad de la partícula y su tiempo de degradación dependerán de la composición y del tipo de la microesfera. Puede estar diseñada para administrar su carga antes de que empiece a degradarse; alternativamente, puede estar diseñada de manera que la administración de su carga tenga lugar cuando la partícula se desintegra.

La naturaleza del polímero utilizado como excipiente, su tamaño, la labilidad de los enlaces entre los monómeros y el grado de reticulación, si la hubiera, afectarán a la velocidad de liberación del ingrediente activo así como a la estabilidad y degradabilidad de la partícula.

- 20 En todas las realizaciones, las microesferas deben ser lo suficientemente estables en solución para que no se rompan ni se degraden sustancialmente durante su administración a la circulación y durante el tiempo requerido para que alcancen el lecho vascular objetivo.

- 25 En una realización adecuada de la divulgación, cada partícula llevará un único tipo de compuesto activo. Cuando se cree que una mezcla de compuestos es beneficiosa para fines terapéuticos, se puede administrar una mezcla de micropartículas, cada una cargada con un único tipo de compuesto. Este diseño simplifica la producción de los compuestos terapéuticos y ofrece una mayor flexibilidad terapéutica, permitiendo así que se preparen rápidamente medicamentos individualizados para satisfacer las necesidades específicas individuales del paciente.

En una realización, la partícula o partículas empleadas tienen sólo un tipo de molécula activa unida a ellas.

En una realización, la partícula o partículas empleadas tienen una mezcla, tal como dos, tres o cuatro moléculas activas unidas a ellas.

- 30 El compuesto activo puede ser cargado en la partícula en el momento de su formación y, por ejemplo, se puede dispersar por toda la partícula.

El compuesto activo puede estar encapsulado dentro de la partícula donde el excipiente forma la cubierta de la microesfera.

- 35 En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a la partícula o partículas mediante enlaces covalentes, por ejemplo, un polipéptido o proteína se une a una microesfera a través de reticulación por tratamiento con un aldehído tal como formaldehído o glutaldehído, por ejemplo emulsionando la microesfera (o ingrediente de las microesferas) en presencia del ingrediente o ingredientes activos, un aldehído adecuado y homogeneizando la mezcla en condiciones adecuadas para formar partículas del tamaño requerido. Alternativamente, el ingrediente activo se puede unir a un grupo carboxilato localizado sobre la microesfera del excipiente.

- 40 En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a la partícula o partículas por fuerzas electrostáticas (carga).

En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a una partícula o partículas a través de un polielectrolito tal que, por ejemplo, comprende iones de sodio, potasio, magnesio y calcio con contraiones de cloruro en solución acuosa.

- 45 En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a una partícula o partículas entre capas de polielectrolitos.

El compuesto activo se puede cargar sobre la superficie de la partícula ya sea por carga (fuerzas electrostáticas) o unido covalentemente. En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a la partícula por carga electrostática.

- 50 En una realización, el ingrediente o ingredientes activos se unen a la partícula por polielectrolitos, por ejemplo por medio de una cubierta de polielectrolito que cubre la partícula sobre la cual se une el ingrediente activo por carga.

El compuesto activo puede formar una única capa sobre la superficie de la partícula o se puede depositar en

múltiples capas, ya sean contiguas o separadas por capas de polielectrolito.

El compuesto activo se puede unir a la partícula por medio de "enlazadores" que por un lado se unen a la matriz de excipiente y por el otro al compuesto activo. Estos enlaces pueden ser electrostáticos o covalentes.

5 Las micropartículas se pueden estabilizar, por ejemplo, por liofilización. La micropartícula también puede ser estable cuando se congela.

En una realización, el excipiente se degrada rápidamente en el intervalo de minutos a horas, o durante un período más largo tal como semanas a meses.

En una realización, la formulación es tal que, una vez en la circulación, uno o más ingredientes activos se liberan rápidamente, por ejemplo, en un período en el intervalo de 1 a 30 minutos a aproximadamente 1 a 12 horas.

10 En una realización, la divulgación se refiere a una población mixta de partículas, es decir, partículas con diferentes velocidades de "disolución", que se pueden usar para proporcionar una formulación con liberación controlada o pulsada.

Por lo tanto, las formulaciones de la divulgación pueden comprender partículas con diferentes cinéticas de liberación y velocidades de degradación.

15 En una realización, el ingrediente activo se libera a lo largo de un período de 1 a 24 horas.

En una realización, el ingrediente activo se libera a lo largo de un período de 1 día a 7 días.

Por lo tanto, en una o más realizaciones, toda la formulación de la divulgación se metaboliza dentro de los 7 días de la administración.

20 En una realización una vez en la circulación del individuo, el ingrediente o ingredientes activos se liberan muy lentamente, a lo largo de un período de semanas a meses, por ejemplo de 1 semana a 1, 2 o 3 meses.

En una realización, la población de partículas está bien caracterizada y, por ejemplo, tiene las mismas características. Es decir, las propiedades físicas y/o químicas de cada partícula están dentro de un intervalo definido estrecho.

En una realización, el tamaño de las microesferas se monodispersa.

25 Así, en una realización, las partículas de la formulación tienen un tamaño medio de partícula con una pequeña desviación estándar, de tal modo que al menos el 99 % de las partículas tienen un tamaño de partícula de +/- 1 micra de la media (15 +/- 1 micras). En una realización, la formulación comprende una población de partículas caracterizada porque las poblaciones contienen al menos dos tipos distintos de partículas, por ejemplo, las partículas distintas pueden tener diferentes ingredientes activos, recubrimientos, tamaño de partícula o una combinación de los mismos.

30 En una realización, la divulgación se refiere a una población mixta de partículas que comprenden partículas de ingrediente activo en mezcla con partículas de uno o más ingredientes activos distintos adicionales.

35 Parece que el tamaño de partícula y la distribución de la formulación influye en el perfil de la formulación *in vivo*, incluyendo cómo se distribuye la formulación en el tejido. Parece que es insuficiente tener simplemente un tamaño medio de partícula dentro del intervalo de 10 a 20 micras porque esto permite que algunas partículas tengan un tamaño de partícula mucho más grande y también un tamaño de partícula mucho más pequeño. Esta variación puede causar problemas *in vivo* porque, por ejemplo, las partículas pequeñas no son retenidas en el tejido relevante y las partículas más grandes pueden dañar el tejido.

40 La cantidad de ingrediente activo:excipiente empleada puede estar en la relación de 1 %:99 % p/p, 5 %:95 % p/p, 10 %:90 % p/p, 20 %:80 % p/p, 30 %:70 % p/p, 40 %:60 % p/p, 50 %:50 % p/p, 60 %:40 % p/p, 70 %:30 % p/p, 80 %:20 % p/p o 90 %:10 % p/p, dependiendo de qué perfil de liberación se requiere. Si se requiere que el ingrediente activo se libere rápidamente o inmediatamente *in vivo*, se puede elegir una relación más alta de ingrediente activo a excipiente.

En una realización, la microesfera empleada tiene una semivida de aproximadamente 16 horas.

45 En una realización, la formulación se liofiliza.

En otra realización, la formulación se congela.

Las partículas de la divulgación son no magnéticas en una extensión apreciable.

El ingrediente activo puede ser cualquier medicamento o producto farmacéutico que se pueda administrar en forma de una partícula según la divulgación.

En una realización, se administran 15×10^6 partículas (microesferas), se administran tal como 14×10^6 , 13×10^6 , 12×10^6 , 11×10^6 , 10×10^6 , 9×10^6 , 8×10^6 , 7×10^6 , 6×10^6 , 5×10^6 , 4×10^6 , 3×10^6 , 2×10^6 o 1×10^6 partículas.

5 Una partícula como se emplea en la presente memoria puede comprender, por ejemplo, un fármaco micronizado, entidades semisólidas o hidratadas tales como proteínas o ingredientes activos derivados biológicamente formulados como partículas discretas, siempre que la partícula mantenga su estructura durante un período suficiente para realizar la función requerida. La divulgación se extiende también a partículas con un núcleo líquido a condición de que la integridad externa de la partícula sea tal que pueda realizar su función *in vivo*. La divulgación no se extiende a partículas con un núcleo de gas.

10 Las microesferas se pueden fabricar emulsionando una solución de polímero, seguido por la evaporación del disolvente. En otros casos, se emulsionan los monómeros seguido por polimerización térmica o por UV. Alternativamente, un polímero fundido se emulsiona y se enfría sucesivamente para solidificar las gotitas. Se puede obtener una reducción del tamaño de la emulsión homogeneizando o sometiendo a ultrasonidos el volumen. Las microesferas se pueden recoger filtrando y/o centrifugando la mezcla de reacción.

15 Las microesferas y microcápsulas biodegradables de biopolímeros para la liberación controlada y la administración dirigida de diferentes compuestos farmacéuticos y macromoléculas terapéuticas se conocen desde hace mucho tiempo en una serie de formas, particularmente las de diámetros relativamente grandes como se describe en la presente divulgación (véase D.D. Lewis "Biodegradable polymers and drug delivery systems" M. Chasin and R. Langer, editors (Marcel Dekker, New York, 1990); J.P. McGee *et al.*, *J. Control. Release* 34:77, 1995).

20 Las microesferas y las microcápsulas se producen rutinariamente mediante métodos físico-mecánicos tales como pulverización de los monómeros constituyentes en microgotitas del tamaño correcto seguido por una etapa de secado o de polimerización. Tales micropartículas se pueden formar también mediante emulsificación seguida de la eliminación del disolvente emulsionante (B. Miksa *et al.*, *Colloid Polym. Sci.* 273: 47, 1995; G. Crotts *et al.*, *J. Control. Release* 35:91, 1995). El principal desafío de estos métodos es la producción de una población monodispersa de partículas en forma y tamaño. Esto, por ejemplo, se puede lograr empleando una técnica de enfoque de flujo en la que se usa un nebulizador capilar para formar microgotitas del tamaño apropiado. En el procedimiento, los componentes se sumergen en una solución de recogida/disolvente que sirve para disolver/suspender los componentes de la micropartícula, seguido por la evaporación del disolvente para proporcionar micropartículas solidificadas.

30 Este procedimiento puede requerir que todos los componentes de la micropartícula se combinen en una única mezcla (el compuesto enfocado) a partir de la cual se generan las microgotitas que formarán las micropartículas. Como muchos de los polímeros utilizados para la administración de fármacos son hidrófobos, mientras que la mayoría de las macromoléculas terapéuticas, y particularmente las proteínas, son hidrófilas, la mezcla requiere emulsionarse para asegurar que se obtiene una composición homogénea antes de que se formen las micropartículas.

35 Alternativamente, se pueden preparar las partículas, por ejemplo, aspirando una solución de ingrediente activo a las microesferas en una corriente de convección, desde una boquilla con una carga eléctrica neta hacia una placa o entidad con una contracarga, en una disposición de tipo ánodo/cátodo.

40 En una realización, las partículas empleadas tienen una carga eléctrica neta, por ejemplo, una carga positiva o una carga negativa. Esto puede ayudar, por ejemplo, a que el movimiento de la partícula sea retardado en el tejido u órgano diana. Esta carga neta se puede equilibrar en la formulación para administración mediante esferas de contracción (por ejemplo sin ingrediente activo) de una dimensión pequeña, por ejemplo menos de 5 micras, que no son retenidas dentro del tejido diana después de la administración.

En una realización, el ingrediente activo es una molécula biológica o derivada de la misma, por ejemplo, una proteína tal como un anticuerpo o un factor de crecimiento, una citocina o una combinación de entidades.

45 En particular, las formulaciones de la divulgación son, particularmente útiles para seleccionar/activar las células madre residentes que se encuentran en el tejido relevante.

En una realización preferida, la divulgación se utiliza para activar las células madre, progenitoras y/o precursoras residentes de un tejido u órgano particular para estimular la regeneración de dicho tejido u órgano.

50 En una realización, la divulgación se refiere a la administración localizada de ligandos para los receptores expresados por las células madre presentes en el tejido posnatal para iniciar la regeneración del mismo. El ligando puede ser, por ejemplo, una hormona del crecimiento como se describe en la presente memoria.

55 En una realización, los ligandos se administran para activar a los receptores presentes en las células madre más indiferenciadas presentes en cada tejido diana. Estas células expresan los llamados "genes de multipotencia", tales como Oct 4, Sox2, Nanog, etc. y tienen una potente capacidad regenerativa (de aquí en adelante, conocidas como células madre que expresan Oct4).

En una realización, el ligando se administra al corazón para minimizar y/o regenerar el daño tisular causado, por ejemplo, por un infarto de miocardio.

5 Cuando una arteria está obstruida, el efecto principal es una pérdida del tejido aguas abajo de la obstrucción. La consecuencia específica de la obstrucción de una arteria coronaria es un infarto de miocardio (MI, por sus siglas en inglés) que produce la pérdida irreversible de una porción del músculo cardíaco. Esta pérdida da como resultado una disminución de la capacidad contráctil del miocardio y de la capacidad de bombeo del corazón lo que, cuando es suficientemente importante, limita su capacidad de proporcionar el gasto cardíaco apropiado y produce una limitación grave y progresiva de la capacidad de la persona (revisado en Nadal-Ginard *et al.*, *Circ. Res.* 2003; 92: 139).

10 Sólo en los Estados Unidos y en la Unión Europea son tratados cada año más de 1,5 millones de infartos de miocardio y hay más de 11 millones de supervivientes de infarto de miocardio (American Heart Association, 2007; British Heart Association, 2007). De estos, más del 30 % mueren durante el primer año posterior al infarto. La supervivencia post-MI depende en gran medida del tamaño del infarto (% de la masa muscular perdida) debido al suceso isquémico. Cuando la pérdida afecta ~40-45 % de la masa del ventrículo izquierdo, produce un shock cardiogénico irreversible que es uniformemente letal (Page *et al.*, 1971. *N. Engl. J. Med.* 285; 133). Esta pérdida segmentaria de miocardio produce una reorganización del miocardio restante con aumento de muerte celular por apoptosis, hipertrofia de los miocitos supervivientes, aumento de fibrosis del tejido y dilatación de la cámara ventricular (Pfeffer, M.A. & Braunwald, E., 1990. *Circulation* 81: 1161). Esta reorganización, conocida como "remodelación", debido a sus efectos negativos sobre la contractilidad, frecuentemente evoluciona hacia la insuficiencia cardíaca (CF). Después del primer episodio de insuficiencia cardíaca después de infarto de miocardio, la media de supervivencia es < 5 años con una mortalidad anual de ~ 18 % (American Heart Association, 2000).

15 La mayoría o todas las terapias para tratar la pérdida de tejido parenquimatoso, debida a isquemia o a otras causas, están dirigidas a preservar o mejorar la función del tejido superviviente. En el caso de un infarto de miocardio, todas las terapias actualmente en uso para tratar las consecuencias de la pérdida del músculo contráctil cardíaco están dirigidas a preservar o mejorar la función contráctil del tejido superviviente y a reducir la pérdida continuada de estas células musculares por apoptosis o por necrosis (véase Anversa & Nadal-Ginard, 2002. *Nature* 415: 240; Nadal-Ginard *et al.*, 2003. *Circ. Res.* 92:139). En la actualidad no existe una sola terapia aprobada diseñada para regenerar o reemplazar los miocitos perdidos en el infarto de miocardio y, de esta manera, restablecer la función contráctil del corazón. Además, todas las estrategias experimentales descritas hasta ahora están dirigidas a mejorar el flujo sanguíneo hacia el área isquémica/necrótica estimulando el aumento de la red capilar, muy a menudo por administración directa o indirecta al área afectada de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la forma de proteína o en la forma de cDNA. Ni una sola terapia se dirige a las células madre residentes en el tejido para estimularlas a multiplicarse y diferenciarse con el fin de regenerar juntos el parénquima y la microcirculación perdidas por el accidente vascular.

20 El objetivo de las estrategias terapéuticas para el infarto de miocardio agudo es restaurar el flujo sanguíneo del músculo dañado tan pronto como sea posible para evitar una pérdida muscular adicional. Estas terapias de perfusión incluyen el uso de agentes trombolíticos, angioplastia de balón o cirugía de derivación. En los Estados Unidos en 1998 se realizaron > 500.000 angioplastias y un número similar de derivaciones quirúrgicas. Estas terapias a menudo son satisfactorias para restablecer el flujo sanguíneo al músculo isquémico, pero ninguna puede reemplazar una sola célula muscular ya perdida en el momento de la intervención. Si esta pérdida ha sido sustancial, la consecuencia a largo plazo es una incapacidad de generar el gasto cardíaco requerido lo que evolucionará inexorablemente a insuficiencia cardíaca terminal.

25 Hasta ahora, la única opción para tratar eficazmente la insuficiencia cardíaca terminal ha sido el trasplante de corazón con todos los problemas médicos (terapia inmunodepresora), logísticos y económicos que conlleva. Incluso si se pudieran eludir estos problemas, la escasez de donantes hace que esta terapia esté disponible para > 1 % de los pacientes con insuficiencia cardíaca.

30 Las formulaciones de la presente divulgación permiten que la administración de las moléculas terapéuticamente activas se realice en una forma en la que se puedan dirigir específicamente al tejido u órgano tal como el corazón para regenerar el tejido, por ejemplo, dañado por la obstrucción de una arteria, mediante la estimulación de las células madre ya presentes en el tejido a regenerar.

35 Terapia con células madre para la regeneración tisular.- Recientemente se han desarrollado algunos métodos experimentales como alternativas al trasplante de órganos que se dirigen a reemplazar algunas de las células perdidas por el órgano o tejido de interés. Estos procedimientos se han inspirado en el éxito de los trasplantes de médula ósea llevados a cabo durante más de medio siglo. La capacidad de una pequeña población de células de la médula ósea para generar todos los tipos de células sanguíneas, cuando se trasplanta a un individuo inmunológicamente competente, ha probado convincentemente que los tejidos adultos contenían "células madre" capaces de generar y regenerar un tejido o un órgano completo. Este avance conceptual ha llevado al desarrollo de estrategias experimentales para reparar tejidos dañados utilizando diferentes tipos de células madre aisladas del individuo a tratar (terapia celular autóloga) o aisladas de un individuo diferente del que las recibe (terapia celular heteróloga) . Estas células o se aíslan en masa o se expanden primero en cultivo antes de ser trasplantadas para

producir la reparación deseada del tejido afectado. Estas estrategias de terapia celular aprovechan las propiedades regenerativas naturales de las células madre para la regeneración tisular.

5 El término "célula madre" se utiliza en la presente memoria para identificar una célula que tiene las propiedades de autorrenovación (generar más células como ella), es clonogénica (se puede expandir a partir de una sola célula) y es pluripotente; es decir, puede producir una progenie que se diferenciará en diferentes tipos de células, a menudo presentes en el tejido donde residen. Es decir, las células originadas a partir de una célula madre adquirirán especializaciones celulares particulares características del tejido u órgano del que se originó la célula madre o al que se trasplanta (Stem Cells: A Primer. 2000. National Institutes of Health USA).

10 El término "pluripotente" se refiere a células que son capaces de diferenciarse en varios tipos de células diferentes. En el contexto de esta solicitud, el término "tetrapotente" se refiere a una célula que, aunque podría no ser totipotente (capaz de generar un individuo completo), es capaz de generar cuatro tipos de células diferentes; p.ej. cardiomiocitos, células endoteliales vasculares y células de músculo liso y fibroblastos de tejido conjuntivo.

15 El término "célula progenitora" se refiere a un descendiente de una célula madre que ya se ha comprometido con una ruta de diferenciación particular y, por lo tanto, tiene un potencial de diferenciación más restringido que la célula madre. La célula progenitora tiene una gran capacidad de amplificación y, aunque todavía no expresa marcadores de diferenciación, tiene la capacidad de crear una progenie más diferenciada que ella misma. Por ejemplo, el término se puede referir a una célula indiferenciada o a una célula que se ha diferenciado en una extensión menor que su diferenciación final. Esta célula es capaz de proliferación y de dar lugar a más células progenitoras, por lo tanto, tiene la capacidad de generar un gran número de células madre que a su vez pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. En particular, el término célula progenitora se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializan, a menudo en diferentes direcciones, por ejemplo, adquiriendo caracteres completamente individuales, como ocurre en la diversificación progresiva de células y tejidos embrionarios. Una célula progenitora está más diferenciada que una verdadera célula madre porque ya ha restringido algo la multipotencia de la célula madre de la que se originó.

25 Como se usa en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, las células madre se refieren a células madre, células progenitoras y/o células precursoras.

La diferenciación celular es un proceso complejo que generalmente ocurre a través de muchas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede derivarse de una célula multipotente que se deriva a su vez de una célula multipotente, y así sucesivamente. Aunque cada una de estas células multipotentes se pueden considerar células madre, la variedad de tipos de células que cada una puede generar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas tienen también la capacidad de dar lugar a células de mayor potencial de desarrollo. Dicha capacidad puede ser natural o se puede inducir artificialmente tras el tratamiento con diversos factores como se ha demostrado recientemente con las iESC (células madre embrionarias inducidas) (Takahashi *et al.*, 2007, Cell 131: 1-12).

35 Una "célula precursora" es un descendiente de la célula progenitora que ha ido más abajo en la ruta de diferenciación y se ha comprometido a diferenciarse en un solo tipo de célula, aunque todavía podría no expresar ninguno de los marcadores identificables para este tipo de célula. La célula precursora suele ser la que se somete a la última ronda de amplificación antes de la aparición del fenotipo diferenciado identificable.

40 Las células madre están presentes en la masa celular interna del blastocisto, en las crestas genitales del embrión precoz, en la placenta y en la mayoría de los tejidos de los animales adultos, incluido el ser humano. En contraste con la célula madre derivada de la masa celular interna del blastocisto, en general, las células madre aisladas de tejidos adultos son una mezcla de células madre verdaderas, progenitoras y precursoras junto con células en la etapa más temprana de su diferenciación final. Ahora se han identificado células madre adultas en prácticamente todos los tejidos originados de cada una de las tres capas de células embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), que varían desde la médula ósea, el sistema nervioso central y periférico, todos los tejidos conjuntivos, piel, intestino, hígado, corazón, oído interno, etc.

45 Parece que estas células madre adultas tienen capacidad regenerativa. Sorprendentemente, a pesar de la alta prevalencia, de la gravedad y los altos costos económicos de la cardiopatía isquémica en todos los países desarrollados, hasta hace poco no se habían buscado procedimientos dirigidos a la regeneración del miocardio adulto. Una de las razones de esta anomalía ha sido que hasta hace muy poco el corazón se consideraba un órgano terminalmente diferenciado sin ninguna capacidad regenerativa intrínseca de sus células contráctiles (MacLellan, W.R. & Schneider, M.D. 2000. Annu Rev. Physiol. 62: 289; Reinlib L. and Field, L. 2000. Circulation 101: 182; Pasumarthi, K.R.S. and Field, L.J. 2002. Circ. Res. 90: 1044; MacLellan, WR 2001. J. Mol. Cell Cardiol. 34:87; Perin, E.C. *et al.* 2003. Circulation 107: 935; véase Anversa, P. and Nadal-Ginard, B. 2002. Nature 415: 240; Nadal-Ginard, B. *et al.* 2003 Circ. Res. 92: 139). Este concepto se basó en el hecho experimentalmente bien documentado de que en el corazón adulto la gran mayoría de los cardiomiocitos están terminalmente diferenciados y su capacidad para reingresar en el ciclo celular ha sido bloqueada irreversiblemente. Por lo tanto, no hay duda de que estos miocitos no son capaces de reproducirse para generar nuevos miocitos.

Una consecuencia del concepto prevalente del miocardio como un tejido sin potencial regenerativo ha sido que todas las llamadas "terapias regenerativas" experimentales implementadas hasta ahora se han basado en la introducción dentro del corazón dañado de diferentes tipos de células que o son miocitos fetales o se cree que tienen algún potencial para diferenciarse en este tipo de células o en capilares y microarteriolas con el fin de reemplazar a las células perdidas durante el infarto. De esta manera, se han realizado experimentos en animales trasplantando células precursoras de músculo esquelético fetales y adultas, miocitos cardíacos fetales y células madre embrionarias en su estado indiferenciado o después de su compromiso con la ruta de los cardiomiocitos (Kocher *et al.*, 2001. *Nature Med.* 7 : 430).

Con la excepción del precursor del músculo esquelético (que es incapaz de convertirse en cardiocitos y que no se puede acoplar eléctricamente a las células del miocardio) (Menasche *et al.*, 2001. *Lancet* 357: 279; C Guo *et al.*, 2007, *J Thoracic and Cardiovasc Surgery* 134: 1332) que puede ser autólogo, todos los otros tipos de células listados son por necesidad de origen heterólogo y, por lo tanto, tienen que ir acompañados de terapia inmunodepresora o el trasplante es eliminado rápidamente por el sistema inmunitario. El hecho es que ninguna de estas estrategias ha demostrado ser muy eficaz en ensayos preclínicos y todas tienen muchos riesgos.

Una de las características más intrigantes de algunas de las células madre adultas es su "plasticidad". Esta propiedad se refiere al hecho de que cuando ciertas células madre se colocan dentro de un tejido diferente del que se originaron, se pueden adaptar a este nuevo entorno y diferenciarse en los tipos de células características del tejido del hospedante en lugar del tejido del donante. Aunque la extensión y la naturaleza de esta plasticidad para muchos tipos de células aún siguen siendo controvertidas (Wagers & Weissman, 2004. *Cell* 116: 636-648; Balsam *et al.*, 2004 *Nature* 428, 668-673; Murray *et al.*, 2004. *Nature* 428, 664-668; Chien, 2004. *Nature* 428, 607-608), ha generado innumerables protocolos preclínicos y ensayos clínicos.

Entre las células madre adultas descritas hasta ahora, las de la médula ósea han sido las más estudiadas y las que han demostrado un mayor grado de "plasticidad" (Kocher *et al.*, 2001. *Nature Med.* 7: 430). También se han utilizado ampliamente las denominadas "células madre mesenquimatosas" derivadas de tejido adiposo (Rangappa, S. *et al* 2003. *Ann. Thorac Surg* 75: 775).

La capacidad de las células madre derivadas de la médula ósea y del tejido adiposo para repoblar las áreas dañadas de diferentes tejidos y órganos, la relativa facilidad de su aislamiento, junto con el trabajo anterior de Asahara *et al* (1999; *Circ. Res.*85: 221 -228), han demostrado ser ventajosos para los objetivos de la terapia celular de regenerar el músculo cardíaco en animales de experimentación (Orlic *et al.*, 2001. *Nature* 410: 701; Orlic *et al.*, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10344; Nadal-Ginard *et al.*, 2003. *Circ. Res.* 92: 139;) y en el ser humano (Tse *et al.*, 2003. *Lancet* 361: 47; Perin *et al.*, 2003. *Circulation* 107: 2294) Aunque ha sido cuestionado por algunos (Balsam, L.B. *et al.*, 2004. *Nature* 428: 668; Murry, C.E. *et al.*, 2004. *Nature* 428: 664), está claro que las células madre derivadas de la médula ósea, bajo ciertas condiciones, son capaces de generar cardiomiocitos, capilares y microarteriolas, particularmente cuando se trasplantan al área del borde de un infarto de miocardio experimental. (Quaini, F., *et al.*, 2002. *New Engl. J. Med.* 346: 5; Bayes-Geis, A. *et al.*, 2003. *Cardiovasc. Res.*56: 404; Bayes-Genis, A. *et al.*, 2004. *Eur. J. Heart Fail.*, 6: 399; Thiele, H. *et al.*, 2004. *Transplantation* 77: 1902). No se dispone de información similar procedente de los numerosos ensayos clínicos de terapia celular con células madre derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo porque no hay datos histopatológicos fiables disponibles para la evaluación.

Un inconveniente principal de las técnicas utilizadas para la terapia de células de miocardio es la complejidad e ineficacia del propio procedimiento de trasplante de células. Cuando las células se trasplantan a través del árbol arterial coronario, solo el 3-5 % permanece en el miocardio mientras que el resto se disemina por todo el cuerpo. Si las células se inyectan directamente en el miocardio, se requiere o una toracotomía o el uso de instrumentación compleja y lenta (sistemas tipo Noga) para identificar la zona objetivo. Esta técnica requiere operadores especializados y solo está disponible en centros médicos especializados. Además, las inyecciones intramiocárdicas, ya sea por vía transendocárdica (Noga) o transepicárdica (quirúrgica), todavía administran < 50 % de las células al tejido.

Sin excepción, todas las estrategias de terapia celular utilizadas hasta el momento para producir la regeneración del miocardio después de infarto de miocardio en animales de experimentación o en humanos se han desarrollado ignorando por completo el hecho de que el miocardio tiene una capacidad regenerativa intrínseca representada por sus células madre residentes (Nadal-Ginard, B., *et al.*, 2003. *J. Clin. Invest.* 111: 1457; Beltrami *et al.*, 2003. *Cell* 114: 763-776; Torella, D., *et al.*, 2004. *Circ. Res.* 94: 514; Méndez-Ferrer, S. *et al.*, 2006. *Nature Clin. Prac. Cardiovasc. Med.* 3 Suppl 1: 583; Torella *et al.*, 2007, *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 661).

Como se ha indicado antes, hasta hace poco, el paradigma aceptado consideraba al corazón de los mamíferos adultos como un órgano posmitótico sin capacidad regenerativa. Aunque en los últimos años este concepto ha comenzado a evolucionar, todas las estrategias experimentales y clínicas para la regeneración del miocardio han seguido estando basadas en el viejo dogma. Por esta razón, todos los protocolos de regeneración cardíaca se han basado en el trasplante de células para proporcionar al miocardio células con potencial regenerativo.

Ahora parece que cuando las formulaciones de la presente divulgación se administran en condiciones apropiadas, la capacidad regenerativa intrínseca de las "células madre" residentes en el tejido u órgano (tal como el corazón) se

puede estimular o activar para regenerar el tejido u órgano.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para la regeneración de tejidos sólidos en mamíferos vivos, incluyendo los seres humanos, que incluye la administración local de ligandos para los receptores expresados por las células madre presentes en el tejido posnatal a regenerar. Estas son células que cuando se estimulan fisiológica o farmacológicamente se multiplican *in situ* y se diferencian en células parenquimatosas características del tejido u órgano que las contiene.

Se ha detectado la formación de nuevos cardiomiocitos tanto en el corazón normal como en condiciones patológicas tales como infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca (Beltrami, AP *et al.*, 2001. *New Engl. J. Med.* 344: 1750; Urbanek, K. *et al.*, 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10440; Nadal-Ginard, B. *et al.*, 2003. *J. Clin. Invest.* 111: 1457; Nadal-Ginard, B. *et al.*, 2003. *Circ. Res.* 92: 139). Curiosamente, estos nuevos miocitos son significativamente más abundantes en la zona del borde de los infartos de miocardio, donde están en un orden de magnitud más abundante que en el miocardio de individuos sanos de igual edad. Estas observaciones sugieren que el miocardio humano adulto tiene la capacidad de responder a aumentos agudos y crónicos de la muerte celular con un proceso regenerativo frustrado que intenta reemplazar los miocitos muertos (Anversa, P. & Nadal-Ginard, B. 2002. *Nature* 415: 240; Anversa, P. y Nadal-Ginard, B. 2002. *New Engl. J. Med.* 346: 1410; Nadal-Ginard, B. *et al.*, 2003. *Circ. Res.* 92: 139).

Las células madre cardíacas (CSC) adultas se describieron por primera vez en 2003 (Beltrami *et al.*, 2003, *Cell* 114: 763-776) y se confirmaron por varios autores en la misma y en otras especies (véase Torella, D., *et al.*, 2004. *Circ. Res.* 94: 514; Méndez-Ferrer, S. *et al.*, 2006. *Nature Clin. Prac. Cardiovasc. Med.* 3 Suppl 1: 583; Torella *et al.*, 2007, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 : 661). Estas células madre cardíacas son autorrenovables, clonogénicas y multipotentes porque dan lugar a cardiomiocitos, células vasculares endoteliales y de músculo liso, así como a fibroblastos de tejido conjuntivo. Se identificaron mediante la expresión de marcadores de membrana asociados con las células madre tales como c-kit, el receptor para SCF, Scal, MDR-1 e Isl-1. Está claro ahora que los nuevos miocitos formados en el corazón adulto se derivan de las células madre cardíacas residentes en el miocardio. Estas células madre cardíacas, cuando se inyectan en el borde de un infarto, tienen la capacidad de regenerar las células contráctiles y la microvasculatura perdida como consecuencia de un infarto de miocardio masivo (Beltrami, *et al.*, 2003. *Cell*: 114: 763-776; Laugwitz, *et al.*, 2005; Méndez-Ferrer *et al.*, Torella *et al.*, 2006; Torella *et al.*, 2007).

En el corazón de un individuo sano, casi todas las células madre cardíacas están en estado de reposo (G_0) o continúan su ciclo muy lentamente durante la vida del organismo. En cualquier momento dado, sólo una fracción muy pequeña de estas células está activa, sufriendo la replicación y diferenciación sólo lo suficiente para reemplazar las células que mueren por el desgaste. En contraste, una gran parte de las células madre cardíacas, a veces la mayoría, se activa en respuesta a un estrés fisiológico o patológico. En general, existe una correlación directa entre la magnitud del estrés y el número de células madre cardíacas que se activan como respuesta. Este número de células madre cardíacas activadas está directamente correlacionado también con el número de nuevas células de miocardio generadas. Esta respuesta, que ocurre desde el ratón al ser humano (Nadal-Ginard, B. *et al.*, 2003. *Circ. Res.* 92: 139), revela la existencia de una ruta bioquímica desencadenada por el estrés que da como resultado la activación de las células madre cardíacas.

La comunicación entre las células madre residentes y su entorno, al menos en el miocardio, está regulada por un bucle de retroalimentación entre los cardiomiocitos, que detecta los cambios de estrés en la pared producidos por el aumento de las demandas fisiológicas o patológicas en el gasto cardíaco, y las células madre responsables de producir un aumento en la masa muscular a través de la generación de nuevas células contráctiles y de microcirculación para nutrirlos. Los miocitos tienen una respuesta estereotípica al estrés independientemente de si es fisiológico o patológico (Ellison *et al.*, 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 11397-11409). Esta respuesta consiste en activar rápidamente la expresión y secreción de una gran serie de factores de crecimiento y citocinas, tales como HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), PDGF- β (factor de crecimiento β derivado de plaquetas), una familia de FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento epidérmico (EGF), activina A y TGF β (factor de crecimiento transformante β), WNT3A y neuregulina, entre otros. Esta respuesta secretora, además de estimular la hipertrofia de los propios miocitos a través de un bucle auto/paracrino, desencadena también la activación de las células madre cardíacas en sus alrededores porque estas células expresan receptores para estos factores segregados por los miocitos y responden a ellos. Esta respuesta activa las rutas genéticas aguas abajo del receptor que son responsables de la supervivencia, multiplicación y diferenciación celular. Además, la activación de estos receptores activa también un bucle de retroalimentación en las propias células madre cardíacas (CSC), lo que estimula la producción del ligando respectivo por parte de las CSC, poniendo así en marcha una respuesta autosostenida que, en respuesta a un solo estímulo, puede permanecer activa durante varias semanas o hasta que el aumento de masa producida haya restablecido el estrés de la pared del miocardio a niveles normales. Por lo tanto, las células madre cardíacas responden a un estímulo paracrino con una respuesta auto/paracrina que permite el mantenimiento de una respuesta sostenida a una estimulación de corta duración. De este modo, la homeostasis celular cardíaca normal se mantiene a través de una retroalimentación continua entre los miocitos y las células madre cardíacas para producir y mantener la masa muscular contráctil apropiada requerida para generar el gasto cardíaco necesario. Los miocitos, que no se pueden dividir, dependen de las células madre cardíacas para mantener o aumentar su número de células y la densidad capilar para garantizar

su suministro de oxígeno y nutrientes. Las células madre cardíacas, por otro lado, dependen y responden a las señales bioquímicas producidas por sus miocitos circundantes para regular su estado de reposo frente a su estado activado.

5 Además de las células madre específicas de tejidos descritas anteriormente, se ha encontrado recientemente que el miocardio de los mamíferos, incluido el ser humano, así como la mayoría de los otros tejidos, contiene una pequeña población de células muy indiferenciadas que tienen muchas similitudes con las células madre embrionarias (las ESC) de las hace mucho tiempo que se conoce que son multipotentes; esto es, una sola célula es capaz de generar, cuando se coloca en el entorno apropiado, un organismo completo idéntico a aquel del que se originó. La principal característica de estas células es su expresión de una serie de los llamados "genes de multipotencia" tales como Oct4, Sox2, Nanog, etc. (ver la solicitud provisional US número de serie 61/127.067) que confieren multipotencia a estas células, de tal modo, que independientemente de su tejido de origen, parecen capaces de dar lugar a la mayor parte, si no a todos los tipos de células del cuerpo. En particular, las células que expresan Oct4 aisladas del corazón adulto son capaces de dar lugar a músculo esquelético, neuronas, corazón, hígado, etc. Su capacidad regenerativa parece ser más fuerte y más amplia que la de las células madre específicas de tejidos.

15 Se cree que las células que expresan Oct4 son el origen de la mayoría, si no todas, las células madre de cada órgano y que su estimulación es la fuente principal de la capacidad regenerativa de cada tejido individual. Por lo tanto, la estimulación de estas células es un objetivo principal para las estrategias terapéuticas descritas en esta memoria.

20 Independientemente de su capacidad y/o eficacia para generar células de miocardio, cuando se introduce una gran cantidad de células madre en un tejido, independientemente de su tejido de origen, tienen un efecto paracrino importante cuando se trasplantan al miocardio y a otros tejidos, como ha sido probado experimentalmente. La mezcla compleja de factores de crecimiento y citocinas producida por las células trasplantadas tiene un potente efecto antiapoptótico sobre los cardiomiocitos y otras células en la zona de riesgo y también en la activación de las células madre endógenas que se multiplican y se diferencian en células musculares y microvasculatura. Este efecto paracrino empieza muy pronto después del trasplante celular y se puede documentar *in vitro*.

25 A partir del trabajo realizado en los ejemplos de la presente memoria parece que para estimular las células madre residentes de un tejido (incluidas las células que expresan Oct4), en este caso el miocardio, los factores de crecimiento y las citoquinas producidas por los miocitos estresados y a los que responden las células madre cardíacas podrían ser tanto o más eficaces que el trasplante de células para desencadenar una respuesta regenerativa. Una combinación de factor de crecimiento insulínico tipo 1 y factor de crecimiento de hepatocitos puede ser particularmente efectiva.

30 En una realización, las células madre residentes se activan, por ejemplo, para estimular la regeneración del tejido, para aumentar la densidad muscular y/o la función celular de las células diana.

35 Si las células diana son del músculo cardíaco, entonces el aumento de la función sería, por ejemplo, una función contráctil aumentada o mayor.

Si las células diana son células renales, en un paciente con insuficiencia renal, entonces el aumento de la función puede ser un aumento de la capacidad para generar EPO.

Si las células diana son células pancreáticas, entonces el aumento de la función puede ser un aumento de la capacidad para generar insulina.

40 Parece que las formulaciones de la divulgación son capaces de estimular/activar las células madre residentes en "tejido maduro" evitando así la necesidad de administrar una terapia de "células madre" al paciente ya que se estimulan las células madre residentes para que experimenten mitosis y crezcan.

45 La estimulación de las células madre residentes es distinta de la angiogénesis. La angiogénesis es el proceso de estimular el crecimiento de capilares (que pueden estar en tejido o tumores) (véase Husnain, K.H. *et al.*, 2004. J. Mol. Med. 82: 539; Folkman, J., and D'Amore, P.A. 1996, Cell 87: 1153). En contraste, cuando las formulaciones de la presente divulgación que emplean ligandos apropiados se administran a las células madre residentes en el tejido, tales como células pluripotentes, células progenitoras y/o células precursoras, se activan para generar nuevas/adicionales células de tejido tales como células musculares.

50 Todas las estrategias regenerativas descritas hasta ahora tienen grandes limitaciones ya sea debido a la naturaleza de su objetivo biológico, al agente regenerativo utilizado y/o a la vía y el modo de administración. La gran mayoría de las llamadas terapias regenerativas se han dirigido a regenerar la red capilar del miocardio isquémico utilizando una variedad de factores biológicos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cuya función principal es estimular el crecimiento de las células endoteliales supervivientes en el tejido dañado con el fin de expandir la red capilar y mejorar el suministro de sangre (Isner, J.M. and Losordo, D.W. 1999, Nature Medicine 5: 491; Yamaguchi, J., *et al.*, 2003, Circulation 107: 1322; Henry, T.D., *et al.*, 2003, Circulation 2003. 107: 1359). Estas terapias ni intentan ni logran la regeneración de las células parenquimatosas que realizan la función característica del tejido u órgano; p.ej. cardiomiocitos contráctiles en el corazón, hepatocitos en el hígado, células β productoras de

insulina en el páncreas, etc. En el mejor de los casos, estas terapias han tenido efectos modestos y ninguna de ellas ha llegado a formar parte de la práctica médica estándar. Por otro lado, todas las terapias regenerativas diseñadas para reemplazar las células funcionales del tejido u órgano se han basado hasta ahora en el trasplante de células que se cree que son capaces de asumir las características de las células perdidas en el tejido diana. Estas estrategias todavía están en ensayos clínicos. Un inconveniente principal para todas las estrategias regenerativas utilizadas ha sido administrar el agente regenerador al tejido dañado y limitar su dispersión por todo el resto del cuerpo. Este es un problema serio incluso cuando los agentes regenerativos se administran a través del árbol arterial coronario del tejido a tratar. En los casos de terapia de células de miocardio por administración coronaria, solo una fracción muy pequeña de las células administradas es retenida en el corazón, mientras que la mayor parte (> 95 %) entra rápidamente en la circulación sistémica y se distribuye por todo el cuerpo. Esto ocurre también cuando los agentes regenerativos se inyectan directamente en el miocardio, ya sea trans-epicárdicamente o trans-endocárdicamente, como se ha demostrado repetidamente con la administración de una suspensión celular. Además, la administración trans-epicárdica requiere exponer el corazón a través de una toracotomía, mientras que la administración trans-endocárdica requiere un procedimiento sofisticado, lento y costoso para realizar el mapa del endocardio e identificar las regiones adecuadas para la inyección (un instrumento tipo Noga), un procedimiento disponible en un número muy limitado de centros y que requiere la participación de un manipulador experto. En ambos casos, en el mejor de los casos, el 50 % del compuesto administrado es retenido en lo dañado, mientras que el resto se dispersa a lo largo de la cavidad torácica o a través de la circulación sistémica. Las formulaciones de la divulgación se pueden usar en combinación con la administración de células madre a un tejido u órgano diana y aumentar el número que es retenido localmente en comparación con otros mecanismos de administración.

Sin embargo, esta divulgación describe un nuevo método para regenerar las células parenquimatosas (esto es, las células funcionales "nobles") de un tejido u órgano que no se basa ni en el trasplante celular ni en la estimulación del crecimiento de las células endoteliales supervivientes con el fin de mejorar el suministro de sangre al tejido u órgano de interés. En cambio, los métodos descritos aquí se basan en la estimulación *in situ*, es decir, dentro del tejido, de las células madre residentes de dicho tejido por medio de la administración local de factores de crecimiento y/o citocinas específicos que son capaces de estimular su activación, replicación y diferenciación para generar las células parenquimatosas perdidas así como la microvasculatura necesaria para su crecimiento, supervivencia y función. Esto es posible porque la mayor parte, si no todos los tejidos de mamíferos adultos, incluido el tejido humano, contienen células madre residentes que son capaces, cuando se estimulan adecuadamente, de regenerar los tipos de células que son específicos del tejido u órgano, así como las células de soporte vascular y mesenquimal que las acompañan.

Debido a que algunos de los agentes regeneradores que estimulan las células madre son muy activos y podrían estimular el crecimiento y la translocación de una variedad de células con las que interactúan, entre ellas las células neoplásicas latentes, la aplicación clínica potencial de muchos de estos factores requerirá la administración de las dosis terapéuticas más pequeñas de una manera muy localizada para, en la medida de lo posible, limitar la exposición de las células que se van a regenerar. Por lo tanto, cuanto más localizada sea la administración, menores serán las dosis requeridas y más disminuirá el riesgo de efectos secundarios no deseados debidos a la estimulación de las células estacionarias en el mismo órgano o en otros órganos. Más específicamente, la divulgación describe una nueva estrategia para el uso de dosis terapéuticas de diferentes factores de crecimiento administrados y liberados localmente, en lugar de sistémicamente o en todo el tejido, para producir la regeneración de áreas específicas de un tejido sólido. Debido a que la administración del compuesto activo se localiza en el tejido dañado, la dosis terapéutica requerida es una fracción mínima de la que sería necesaria con otros métodos de administración disponibles. La formulación de la divulgación es capaz, entre otras aplicaciones, de regenerar el músculo cardíaco y su microvasculatura después de un infarto de miocardio y/o en la insuficiencia cardíaca crónica.

En una realización, la formulación se administra en el borde del tejido dañado, por ejemplo en el borde o en una zona isquémica.

Los ligandos adecuados para las células madre incluyen factores de crecimiento tales como los listados en la Tabla 1

TABLA 1: Ejemplos de ligandos de células madre adecuados de la invención

HGF (factor de crecimiento de hepatocitos),
IGF (factor de crecimiento insulínico) tal como IGF-1,
PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) tal como PDGF-β,
FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) tal como FGF (FGF-1) o bFGF (FGF-2) y FGF-4,
SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales),
EGF (factor de crecimiento epidérmico)
VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular),
eritropoyetina (EPO),

TGF β (factor de crecimiento transformante β),
G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos),
GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos),
Proteínas morfogenéticas óseas (BMP, BMP-2, BMP-4)
Activina A,
IL-6,
Neurotrofinas por ejemplo NGF (factor de crecimiento del nervio), neuregulina, BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (neurotrofina-3), NT-4 (neurotrofina-4) y (neurotrofina-1), que estructuralmente no está relacionada con NGF, BDNF, NT-3 y NT-4
TPO (trombopoyetina)
GDF-8 (miostatina), o
GDF9 (factor de diferenciación de crecimiento 9),
Periostina

En una realización, el factor o factores de crecimiento empleados son humanos.

5 En una realización, el factor de crecimiento empleado se selecciona de HGF, IGF (tal como IGF-1 y/o IGF-2) y FGF, en particular HGF e IGF-1. Estos factores parecen ser particularmente eficaces para estimular las células madre residentes.

También se pueden emplear combinaciones de factores de crecimiento y, por ejemplo, se pueden seleccionar de la lista identificada antes, tales como HGF e IGF-1 y opcionalmente VEGF.

10 En una realización, la formulación para regenerar/activar las células madre no consiste en VEGF como el único ingrediente activo sino que, por ejemplo, puede comprender una combinación de ingredientes activos que incluye VEGF.

Sin embargo, la formulación es adecuada para la administración localizada de VEGF como factor de angiogénesis.

En una realización, la formulación del factor de crecimiento se emplea en combinación con un factor de angiogénesis, por ejemplo, administrado concomitante o secuencialmente por la misma vía o una vía diferente.

15 En una realización, la formulación comprende una citocina, por ejemplo, seleccionada de IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18 y/o interferón.

En una realización, la formulación comprende combinaciones de principios activos, por ejemplo, un factor de crecimiento y una citoquina.

En las formulaciones de combinación, entonces la dosis de cada ingrediente activo puede ser, por ejemplo, la misma dosis que se emplea cuando el ingrediente activo se administra solo.

20 Los componentes empleados en las formulaciones y/o métodos de la divulgación, especialmente los ingredientes activos de tipo biológico pueden ser derivados de origen natural.

En una realización, un ingrediente activo de tipo biológico empleado se prepara mediante tecnología de DNA recombinante.

25 En una realización, el ingrediente o ingredientes activos administrados pueden ser fragmentos peptídicos de una molécula biológica, con el efecto terapéutico deseado.

En una o más realizaciones, las moléculas empleadas son mutantes de una molécula biológica (por ejemplo, un ligando de un receptor) con el efecto terapéutico deseado que tienen la misma, mayor o menor afinidad por la molécula biológica correspondiente.

30 En una realización, la sustancia o sustancias/ingrediente activo empleado es un aptómero (una molécula pequeña de RNA que se une a un receptor en lugar del ligando natural).

En una realización, la sustancia/ingrediente activo empleado es un anticuerpo que reconoce y se une a un receptor diana, y en particular tiene una especificidad y/o aidez adecuada por el mismo. Deseablemente, el anticuerpo tiene la actividad requerida para regular al alza el receptor o regular a la baja el receptor, produciendo de este modo activación o bloqueo del mismo, según sea apropiado.

En una realización, el ingrediente activo es una diaquina, que es una molécula de anticuerpo artificial que reconoce y se une a dos de los receptores de interés dando como resultado la activación o bloqueo de uno y/o del otro.

En una realización, la sustancia/ingrediente activo empleado es una molécula pequeña con un peso molecular <5.000 Dalton.

5 En una realización, uno o más ingredientes activos empleados pueden ser de origen sintético.

Para que la formulación descrita en la presente memoria se dirija al órgano o tejido deseado, entonces la formulación debe ser administrada aguas arriba del órgano o tejido. Es decir, debe ser introducida en la circulación de tal manera que el flujo de sangre lleve la formulación al tejido/órgano deseado.

10 La formulación se puede introducir aguas arriba de un órgano tal como el corazón empleando un dispositivo adecuado tal como un catéter. Se puede llegar a otros órganos principales de esta manera. Del mismo modo, aunque es raro, también es posible utilizar catéteres para acceder al hígado.

En otros casos, la formulación se puede introducir por inyección intraarterial estratégica antes del tejido diana.

15 La formulación se puede administrar también por perfusión o con un dispositivo de administración accionado por bomba tal como una bomba de jeringa, por ejemplo del tipo empleado en la administración de heparina o morfina o agentes de contraste durante la cateterización. Un caudal adecuado puede ser, por ejemplo, de 0,5 mL/min.

La formulación se puede administrar también a través de los denominados catéteres de perfusión que permiten ralentizar la velocidad del flujo sanguíneo aguas abajo del sitio de la inyección con un balón intraarterial, a la vez que se mantiene la perfusión del tejido a través de un segundo lumen del catéter.

20 En una realización particularmente adecuada, la formulación se administra en una arteria aguas arriba del tejido u órgano diana.

En una realización, se utiliza un catéter para administrar la formulación de la divulgación en la arteria que abastece al tejido u órgano diana. En particular, la formulación se puede administrar exclusivamente (principalmente o sustancialmente) a la arteria segmentaria que abastece el área del tejido u órgano.

En una realización, el catéter empleado es un catéter de balón.

25 En una realización, el catéter lleva una malla de filtro en su extremo distal con un tamaño de poro suficientemente pequeño para evitar u obstaculizar la liberación de agregados de micropartículas > 50, 25 o 20 μm , según se requiera.

En una realización, las células diana son las células madre cardíacas residentes en el corazón posnatal.

30 En una realización, la regeneración obtenida incluye, conjunta o separadamente, la regeneración de cardiomiocitos y estructuras vasculares compuestas de capilares (células endoteliales) y/o arteriolas (células del endotelio y del músculo liso vascular).

En una realización, la regeneración es inducida en cualquier momento después de un infarto de miocardio (MI) ya sea agudo o crónico, por ejemplo, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11 hasta 24 horas después de un infarto agudo.

35 En una realización, la regeneración es inducida en un individuo con cardiopatía isquémica, con o sin infarto de miocardio.

En una realización, la regeneración es inducida en los corazones de individuos que han desarrollado insuficiencia cardíaca (CF) aguda o crónica.

40 En una realización, la regeneración es inducida en individuos con cardiomiopatía isquémica, infecciosa, degenerativa o idiopática.

En una realización, las células diana son las células madre residentes en el páncreas endocrino (células madre de los islotes de Langerhans).

En una realización, la regeneración es inducida en un individuo con diabetes.

En una realización, las células diana son las células madre neurales del sistema nervioso central (CNS).

45 En una realización, las células madre diana son las células madre neurales de la médula espinal.

En una realización, la regeneración es inducida en un individuo con una lesión de la médula espinal.

En una realización, las células diana son las células madre de la sustancia negra del cerebro, por ejemplo en un

individuo con enfermedad de Parkinson.

En una realización, la regeneración es inducida en un individuo con un accidente vascular cerebral (ictus).

5 Aunque no se desea limitarse a la teoría, se cree que los ligandos empleados en las formulaciones de la divulgación son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica para tratar los ictus y similares. Además, se cree que en los accidentes vasculares cerebrales la barrera hematoencefálica se deteriora y las entidades químicas pueden pasar más fácilmente a través de la barrera.

En una realización, las células diana son las células madre del hígado y, por ejemplo, la regeneración es inducida en un individuo con daño hepático tal como cirrosis.

10 En una realización, las células madre diana son las células madre de los pulmones y, por ejemplo, la regeneración es inducida en un paciente con daño pulmonar, por ejemplo enfisema.

En una realización, las células diana son las células madre del músculo esquelético y, por ejemplo, la regeneración es inducida en un individuo con un déficit particular del músculo esquelético, tal como osteoporosis o enfermedad de Paget.

En una realización, las células diana son las células madre del epitelio.

15 En una realización, las células madre diana son las células madre de los riñones.

Las células diana como se emplean en la presente memoria se refieren a las células que tienen que ser estimuladas y que tienen el potencial de proporcionar la regeneración deseada.

La formulación de la divulgación proporciona parámetros y materiales optimizados para asegurar la dosificación precisa y/o reproducible del ingrediente activo relevante para el tejido u órgano diana.

20 En una realización alternativa, las formulaciones de la divulgación se pueden emplear para tratar tumores sólidos, permitiendo la administración local del antineoplásico al tejido tumoral, por ejemplo mediante inyección intratumoral.

Los ingredientes activos adecuados para el tratamiento de tumores incluyen etopósido, ciclofosfamida, genisteína, cisplatino, andriamicina, vindesina, mitoguazona, fluorouracilo y paclitaxilo.

En una realización, la formulación no es para el tratamiento del cáncer.

25 En una realización, la invención no es la administración directa a un tumor o tejido.

Los métodos según la divulgación pueden emplear combinaciones de ingredientes activos administrados por separado, por ejemplo concomitantemente o secuencialmente, o formulados como una formulación (de recipiente único).

30 Las formulaciones de la divulgación se pueden administrar como soluciones/suspensiones líquidas, por ejemplo en un vehículo isotónico, por ejemplo como una solución tamponada tal como tampón de fosfato, solución salina o de glucosa.

Las formulaciones de la divulgación pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes adicionales. Los excipientes deben ser adecuados para la administración a humanos y/o animales.

35 En una realización, la formulación comprende albúmina en solución, que puede estabilizar, por ejemplo, las pequeñas cantidades de ingrediente activo en las formulaciones, por ejemplo de 1 % a 20 % p/v de albúmina, tal como la albúmina de suero humano, puede ser suficiente para lograr la estabilización requerida.

40 La divulgación también se extiende al uso de una formulación tal como se define en la presente memoria para el tratamiento, particularmente para el tratamiento del infarto de miocardio; enfermedad isquémica del corazón; insuficiencia cardíaca; cardiomiopatía isquémica, infecciosa, degenerativa o idiopática, esclerosis, cirrosis, enfisema, diabetes y similares.

En una realización, la divulgación se refiere a una formulación como se describe en la presente memoria para uso en el tratamiento, particularmente para el tratamiento de una enfermedad descrita anteriormente.

45 La divulgación se extiende también a los métodos de tratamiento que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación descrita en la presente memoria a un paciente que la necesite, particularmente para el tratamiento de una enfermedad descrita anteriormente.

La divulgación se extiende también al uso de un ligando, por ejemplo como se describe en la presente memoria, para estimular una célula madre residente *in vivo* para activar la célula.

La divulgación incluye también el uso de un factor de crecimiento adecuado para la fabricación de un medicamento

para estimular células madre residentes *in vivo*.

La divulgación se ilustrará ahora por referencia a los ejemplos.

Ejemplos

Introducción

5 Se produjeron infartos de miocardio anteriores en cerdas hembras mediante la oclusión temporal con balón de la arteria coronaria descendente anterior, distal a la primera rama septal. Este procedimiento dio como resultado infartos apicales anteriores de tamaño moderado reproducibles. Se probó el potencial de regeneración miocárdica del factor de crecimiento insulínico tipo 1 y del factor de crecimiento de hepatocitos combinados administrando localmente los factores a diferentes dosis en el miocardio de cerdo infartado. Los animales de control fueron tratados con placebo.

10 La viabilidad de producir efectos terapéuticos con la administración local de pequeñas cantidades de agentes terapéuticos se probó primero mediante la administración directa de una solución que contiene una mezcla de IGF-1 y HGF humanos recombinantes en el post-infarto de miocardio agudo producido en un modelo experimental con pechos cerrados por dilatación con balón en la arteria coronaria izquierda descendente anterior justo debajo de la aparición de la primera arteria septal en 23 cerdos que se compararon con 6 controles de placebo tratados de forma idéntica.

Materiales y métodos

Se analizaron los corazones en diferentes puntos de tiempo después del infarto de miocardio, que van desde unos pocos días hasta 1 mes. Los resultados mostraron un aumento extraordinario en el número de células madre y progenitoras activadas en el área isquémica y sus bordes de cerdos tratados con IGF-1 y HGF humanos. Se observó una regeneración notable del músculo en el área isquémica, que también contenía arteriolas y vasos recién formados. La respuesta regenerativa parecía ser proporcional a las dosis de los factores de crecimiento administradas. A partir de estos datos preliminares, la activación terapéutica *in situ* de las células madre cardíacas puede producir una formación extensa de nuevo tejido miocárdico y mejorar significativamente la función del ventrículo izquierdo en corazones de animales que son similares en tamaño y anatomía a los corazones humanos.

Aislamiento de células cardíacas porcinas c-kit^{pos}

Se obtuvieron múltiples muestras cardíacas (cada una de ~2 g) de diferentes regiones cardíacas (aurícula derecha e izquierda, ventrículo derecho e izquierdo y ápice) de cerdas blancas Yorkshire hembras (23 ± 4 kg, n = 3). Algunas muestras se fijaron y se incluyeron en parafina para análisis histoquímico. Las otras piezas se digirieron enzimáticamente y se prepararon suspensiones de células cardíacas mermadas en cardiomiocitos como se ha descrito previamente con modificaciones (Beltrami, A.P. *et al.*, 2003. Cell 114: 763). Brevemente, el tejido cardíaco triturado se digirió con colagenasa al 0,1 % (Worthington Biochemicals), tripsina al 0,1 % (Sigma), DNAsa 1 al 0,1 % en tampón de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) a 37 °C y se recogió por centrifugación la fracción de células cardíacas pequeñas. Las células cardíacas pequeñas se incubaron con anticuerpo anti-CD117 (c-kit) humano (Miltenyi Biotec) y se clasificaron mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS; clasificador de células MoFlo (Dako Cytomation)) o microinmunoperlas activadas magnéticamente (MACS). Se añadió yoduro de propidio (PI; 2 µg/mL) antes de la FACS para excluir las células muertas.

Las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} se analizaron en cuanto a marcadores de células hematopoyéticas, mesenquimatosas y endoteliales utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, BD). Los anticuerpos usados fueron anti CD45 porcino (Serotec, Clon: MCA1447), anti CD34 humano (BD, clon 8G12), anti CD90 humano, (BD, Clon: 5E10, reactividad cruzada de cerdo) y anti CD166 humano (BD, Clon: 3A6, reactividad cruzada de cerdo), anti CD105 humano (Caltag Laboratories, Clon: SN6, reactividad cruzada de cerdo) y anti CD133 humano (Miltenyi Biotec, clon AC133, reactividad cruzada de cerdo). Los anticuerpos antihumanos específicos para PECAM, E-cadherina, CD11b, CD13, CD14, CD29, CD31, CD33, CD36, CD38, CD44, CD49, CD62, CD71, CD73, CD106, se compraron de BD Biosciences. Como controles negativos para todos los procedimientos de FACS se utilizaron controles de los isotipos respectivos (Pharmingen). Los datos se analizaron utilizando el software CellQuest.

Cultivo, clonación y potencial de diferenciación de células cardíacas porcinas C-kit^{pos}

Se sembraron en placas células c-kit^{pos} durante 7-10 días a 2 x 10⁴ células/mL en medio MEM de Dulbecco/modificado de Ham F12 (DMEM/F12) que contenía FBS al 10 %, bFGF (10 ng/mL), insulina-transferrina-selenita (ITS) y EPO (2,5 U). Después de la recuperación, se movieron algunas células a un medio de formación de cardioesferas modificado (mCSFM): DMEM/F12 a relación 1:1, bFGF (10 ng/mL), EGF (20 ng/mL), ITS, 2-β-mercapetanol (0,1 mM) y Medio Neural Basal complementado con complementos B27 y N2 (Gibco), para la generación de cardioesferas. Para analizar la clonogenicidad, se sembraron células individuales c-kit^{pos} individualmente en pocillos de placas Terasaki recubiertas de gelatina de 96 pocillos por citometría de flujo o dilución en serie. Se cultivaron las células c-kit^{pos} individuales en medio modificado DMEM/ F12 durante 1-3 semanas cuando

se identificaron y se expandieron los clones. La clonogenicidad de las células ckit^{pos} se determinó contando el número de clones generados en cada placa de 96 pocillos y se expresó como porcentaje. Se analizaron un total de 10 placas por región cardíaca. Las células clonogénicas y las cardioesferas se transfirieron a un medio de diferenciación cardiogénica específico (modificado a partir de 42) para especificación de miocitos, células del músculo liso vascular y células endoteliales.

El ensayo de migración celular se llevó a cabo utilizando una cámara de Boyden modificada, según las instrucciones del fabricante (Chemicon). Se colocaron 200 ng/mL de HGF o 200 ng/mL de IGF-1 en la cámara inferior de una placa de 24 pocillos durante 24 horas. Para el ensayo de proliferación, se pusieron $2,5 \times 10^4$ pCSC (células madre cardíacas porcinas) en placas de 24 x 35 mm y se privaron de suero durante 36 horas en medio base DMEM/F12 con 0 % de suero. Como control de línea base actuaron 6 placas y se complementaron con BrdU (1 µg/mL) antes de ser fijadas y teñidas 1 hora más tarde. Después se añadió medio base DMEM/F12 complementado con FBS al 3 % y 200 ng/mL de HGF (n = 6 placas) o 200 ng/mL de IGF-1 (n = 6 placas) a las 12 placas restantes. Como controles actuaron 6 placas, sin factores de crecimiento añadidos al medio. Se añadió BrdU, 1 µg/mL cada 6 horas. Se fijaron las células después de 24 horas y se evaluó la incorporación de BrdU utilizando el kit del sistema de detección de BrdU (Roche). Se hizo la tinción de contraste de los núcleos con el colorante de unión a DNA, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a 1 µg/mL. Se evaluaron las células utilizando microscopía de fluorescencia (Nikon E1000M). Se contaron 10 campos aleatorios con un aumento de x20 para cada placa, y los números se expresaron como el porcentaje de las células BrdU positivas con respecto al número total de células contadas.

Inmunocitoquímica

Se cultivaron las células en portaobjetos de vidrio con cámara (BD Falcon) durante 2 días, se fijaron con PFA al 4 % durante 20 min y después se tiñeron. Para la tinción intracelular, se permeabilizaron las células utilizando Triton X-100 al 0,1 %. Se incubaron las células con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C, se lavaron tres veces y después se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a FITC o conjugado a rojo de Texas durante 1 hora a 37 °C. Después, se lavaron las células tres veces y se hizo la tinción de contraste de los núcleos con DAPI. Se visualizó la fluorescencia y se tomaron imágenes con microscopía confocal (Zeiss LSM510). Los siguientes anticuerpos se usaron para la tinción celular: Oct3/4, Nanog, Isl-1, c-kit, Flk-1, y Nkx2,5 (R & D Systems); Bmi-1, c-met e IGF-1r (Santa Cruz Biotechnology), telomerasa (Abcam). Se tiñeron las cardioesferas para c-kit después de 24 horas de cultivo en un portaobjetos de vidrio con cámara. Después de 4-6 días de cultivo para permitir el crecimiento y la diferenciación de las células de la esfera, se tiñeron con anticuerpos frente a la actina del músculo liso, la α -actina sarcomérica (Sigma) y el factor de von Willebrand (DAKO). Todos los anticuerpos secundarios se compraron de Jackson ImmunoResearch.

Análisis de transferencia Western

Las inmunotransferencias para detectar los receptores de IGF-1 (IGF-1R) y de HGF (c-met) se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Ellison *et al.*, 2007, J. Biol. Chem. 282: 11397) utilizando lisados de proteínas obtenidos de las pCSC c-kit^{pos} sometidas a medio de privación de suero durante 24 horas, seguido de una complementación con 200 ng/mL de IGF-1 o 200 ng/mL de HGF durante 10-20 minutos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos a las diluciones sugeridas por los fabricantes: anticuerpos policlonales de conejo Abs IGF-1R, fósforo-IGF1R, Akt, fósforo-Akt, c-met (señalización celular), fósforo-c-met (Abcam), FAK y fósforo-FAK (Upstate).

Histología

Después de la escisión auricular, se dividieron los corazones en 5 cortes coronales desde el ápice hasta la base con cortes perpendiculares al eje largo. Se obtuvieron muestras de miocardio infartado, peri-infartado y distal de cada nivel de cada cerdo. Se lavaron las muestras con PBS, se fijaron en formalina al 10 % y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de 5 µm en un microtomo (Sakura) y se montaron en portaobjetos de microscopio. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), según procedimientos estándar (Ellison *et al.*, 2007, J. Biol. Chem. 282: 11397). El diámetro de los miocitos se midió a través del núcleo en las secciones de H&E (3 portaobjetos por animal) de la región de peri-infarto de los niveles C y D, en un microscopio óptico (Nikon E1000M) utilizando el software Lucia G. Se analizaron un total de 200 miocitos por sección para cada cerdo.

Para determinar la fibrosis del miocardio, se tiñeron las secciones del miocardio infartado con rojo sirio como se ha descrito previamente (Lee, C.G. *et al.*, 2001. J. Exp. Med. 194: 809). Las secciones seriales se fijaron en formalina al 10 % en PBS durante 20 min. Después de lavar en agua destilada durante 5 minutos, se incubaron las secciones a temperatura ambiente durante 30 minutos en azul rápido RR al 0,1 % en tampón de borato de magnesio a pH 9 (Sigma). Después, se lavaron las secciones en agua destilada antes de la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos en rojo sirio al 0,1 % en ácido pícrico saturado (Sigma). Se lavaron las secciones adicionalmente en agua destilada antes de que fueran deshidratadas, separadas y montadas. En este protocolo, el tejido conjuntivo (principalmente colágeno) se tiñe de rojo y el músculo se tiñe de amarillo/naranja. La evaluación semicuantitativa de la cantidad de tejido conjuntivo del miocardio se llevó a cabo utilizando el análisis de imágenes Lucia G con un aumento de x40. Se determinó el tanto por ciento de colágeno (porcentaje de área de tinción positiva) en toda la zona del infarto. Se evaluaron un total de 3 portaobjetos por animal para cada nivel, y se obtuvo la media.

Inmunohistoquímica y microscopía confocal

Para identificar las CSC, se tiñeron secciones transversales del corazón de cerdo con anticuerpos frente al antígeno de células madre, c-kit (policlonal de conejo, Dako). Las CSC c-kit^{pos} se identificaron como linaje negativo (Lin^{neg}), por tinción negativa para marcadores de linajes hematopoyéticos, neurales y de músculo esquelético (21). Para la cuantificación de la distribución de las CSC del miocardio en las diferentes regiones cardíacas de los cerdos control, se contó el número de células c-kit^{pos} (lin^{neg}) y de cardiomiocitos para un total de 5 secciones con un aumento de x63. Después se midió el área de cada sección transversal y se determinó el número de CSC y de cardiomiocitos por unidad de área. Los datos para las aurículas se agruparon, debido a las pocas diferencias encontradas entre el número de CSC c-kit^{pos} en las aurículas izquierda y derecha. El número de las CSC se expresó por 10⁶ miocitos.

Las células en ciclo se identificaron mediante tinción con BrdU (Roche) y Ki67 (Vector labs). Las células progenitoras dieron tinción positiva para c-kit y los factores de transcripción, Nkx2,5 (R & D Systems), Ets-1 y GATA6 (Santa Cruz Biotechnology). Los miocitos recién formados se identificaron con anticuerpos frente a BrdU, Ki67 y α -actina sarcomérica (Sigma), troponina I cardíaca (Santa Cruz Biotechnology) o cadena pesada de miosina lenta (cardíaca) (Sigma). Las estructuras vasculares recién formadas se detectaron por tinción para BrdU y α -actina de músculo liso (monoclonal de ratón, Sigma) o vWF (policlonal de conejo, Dako). Las imágenes se adquirieron utilizando microscopía confocal (Zeiss 510 LSM). Se cuantificó el número de las CSC, de las células progenitoras de miocitos (c-kit^{pos}/Nkx2,5^{pos}) y de los miocitos recién formados (BrdU^{pos} y ki67^{pos}) para las regiones de infarto, peri-infarto y distales en cada nivel. Se contaron un total de 3000 células (~ 20 campos) para cada región con un aumento de x63. Se evaluaron 3 portaobjetos por animal. Los números se expresaron como porcentaje relativo al número total de células contadas. Se midió el tamaño de 50 miocitos BrdU^{pos} recién formados por animal en las regiones de infarto y peri-infarto utilizando el software Lucia G.

La densidad de capilares en la región del infarto se evaluó mediante tinción con un anticuerpo frente a vWF (DAKO). El 2º Ab utilizado fue un anticuerpo anti-conejo de burro, conjugado con HRP (Santa Cruz). La peroxidasa endógena en la sección se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. El cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) (Sigma) se utilizó para visualizar los vasos sanguíneos. Se hizo la tinción de contraste de los portaobjetos con hematoxilina para la identificación de núcleos. Se determinó el número de capilares (definidos como 1 o 2 células endoteliales que abarcan la circunferencia del vaso vWF-positivo) contando 10 campos/sección en la zona del infarto en los niveles C y D a un aumento de x40. Se evaluaron un total de 3 portaobjetos/animal. El número de capilares se expresó por 0,2 mm².

Para detectar la apoptosis celular, se tiñeron las secciones con anticuerpo primario anti-caspasa-3 activada humana de conejo (R & D Systems) y un 2º Ab de burro anti HRP conjugado de conejo. El cromógeno DAB (Sigma) se utilizó para visualizar los cardiomiocitos apoptóticos. Las secciones sometieron a tinción de contraste con hematoxilina y se montaron permanentemente antes de ser examinadas con microscopio óptico. El número de miocitos positivos a caspasa-3 en la zona peri-infarto de los niveles C y D se determinó contando 20 campos aleatorios/sección a 40 aumentos. Se evaluaron un total de 3 portaobjetos/animal. La cantidad de miocitos positivos a caspasa-3 se expresó como porcentaje relativo al número total de miocitos contados.

Análisis estadístico

Los datos se registran como la media \pm SD. La significancia entre 2 grupos se determinó mediante la prueba t de Student y en comparaciones múltiples mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el método post hoc de Bonferroni para localizar las diferencias. La significancia se estableció en P <0,05.

Ejemplo 1

Preparación de microsferas de PLGA

Se prepararon dos conjuntos de microsferas de PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)) y alginato; un conjunto que contenía una mezcla de albúmina de suero humano (HSA) y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), el otro conjunto que contenía una mezcla de HSA y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La HSA se utilizó para proporcionar suficiente volumen para la emulsión dadas las muy pequeñas cantidades que se necesitan de los factores de crecimiento.

Las condiciones utilizadas para formar las microsferas de PLGA son las siguientes:

Se empleó un nebulizador Flow Focussing of Ingeniatics (D = 150 μ m, H = 125) en una configuración líquido-líquido en la que el líquido enfocado es la emulsión de PLGA + HSA + factor de crecimiento y el líquido de enfoque es agua.

La fase lipídica consistió en: PLGA al 5 % en EtOAc (acetato de etilo)

La fase acuosa consistió en: HSA al 5 %, factor de crecimiento al 0,1 %, NaCl al 0,45 %, Tween 20 al 0,25 % en H₂O.

La mezcla de las dos fases se sometió a ultrasonidos durante 30 minutos.

Las microgotitas se producen en un baño de alcohol polivinílico al 2 % (PVA, Fluka Chemica).

El tamaño de las partículas se controla por el volumen de flujo de los fluidos enfocados (Q_d) y de los fluidos de enfoque (Q_t). Para obtener partículas de 15 ± 1 micras, se utilizaron un $Q_d = 3,5$ mL/h y un $Q_t = 3$ mL/h. La eficacia de la encapsulación de la mezcla de HSA + IGF-1 fue del 37 %.

- 5 El tamaño de las partículas se determinó por microscopía óptica y electrónica (véase la Figura 8).

Se utilizaron los mismos procedimientos con modificaciones menores para preparar las partículas de PLGA que contienen HGF.

Ejemplo 2

Optimización de la producción de microesferas de PLGA monodispersas de 15 μ m de diámetro

- 10 Para optimizar la eficacia de la encapsulación a fin de reducir el número de microesferas a ser administradas, se optimizaron las condiciones utilizadas con modificación en los siguientes parámetros:

a.- Incorporación de emulsionantes en la fase lipídica. Se encontró que la combinación óptima era una mezcla de Tween 80 y Span 60 que producía una emulsión estable durante hasta 5 horas.

b.- Optimización de la concentración de proteína (albúmina sérica humana), HSA al 20 % en lugar de al 5 %.

- 15 c.- Optimización de la concentración de NaCl en la fase acuosa a 0,2 % en lugar de 0,45 %.

d.- Optimización de la concentración de PLGA a 5,5 % en lugar de 5 % en EtOAc.

e.- La concentración de HGF-1 en la mezcla inicial era 0,4 %

Por lo tanto, la fase acuosa consistió en HSA al 20 %, IGF-1 al 0,4 %; NaCl 0,2; Tween 20 0,1; Span 60 0,15. La fase orgánica consistió en PLGA al 5,5 % en EtOAc (acetato de etilo).

- 20 Las micropartículas se obtuvieron mediante un enfoque de flujo simple utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo n° 1.

El tamaño de las partículas, determinado por SEM (microscopía electrónica de barrido) fue de 14,36 μ m con una SD de 0,91 y una eficacia de encapsulación de 82,4 con un atrapamiento del 13,1 %. Las determinaciones de proteínas complementadas con ensayos ELISA cuantitativos documentaron que cada 1×10^6 microesferas llevaban 3 μ g de IGF-1 y 348 μ g de HSA. Los ensayos biológicos *in vitro* del IGF-1 contenido en las microesferas analizadas en cuanto a su capacidad de unirse y activar el receptor de IGF-1 de células vivas muestran que después de una ronda de liofilización y resuspensión, el IGF-1 encapsulado mantuvo el 82 % de la actividad biológica original. Por lo tanto, cada millón de microesferas tenía una actividad biológica equivalente a 2,5 μ g del IGF-1 nativo.

- 30 Se utilizaron protocolos similares para encapsular HGF, con un resultado final de 1,7 μ g de HGF encapsulado por 1×10^6 partículas con una actividad biológica del 63 % del original. Por lo tanto, cada millón de microesferas de HGF puede administrar el equivalente a 1 μ g de HGF activo.

La encapsulación de SCF (factor de células madre), el ligando para el receptor c-kit, produjo partículas que contenían 2,3 μ g de SCF por 1×10^6 microesferas con una actividad del 76 % de la solución original determinada mediante la activación del receptor c-kit.

- 35 Conclusión: El procedimiento de enfoque de flujo único utilizado es muy eficiente en la encapsulación de una mezcla de HSA y diferentes factores de crecimiento. Cambiando la relación inicial de HSA a factor de crecimiento es posible alcanzar valores de carga de hasta 350 μ g de la proteína farmacológica deseada por 1×10^6 microesferas de PLGA de 15 μ m de diámetro con un coeficiente de variación ≤ 6 %.

Ejemplo 3

- 40 Producción de microesferas de alginato monodispersas y encapsulación de IGF-1

Los reactivos y equipo utilizados para la producción de las microesferas fueron los siguientes:

– Alginato: Protanal LF 10/60; FMCBioPolymer (G/M $\geq 1,5$); Protanal LF10/60LS; FMCBioPolymer (G/M ≤ 1).

– HSA (albúmina sérica humana, 97-99 %, A9511) de Sigma-Aldrich

– IGF-1 de PreProtect

- 45 – CaCl_2 ; citrato de sodio tribásico

- Nebulizadores FF simples en la configuración de líquido-gas: L2 (D = 100 µm, H = 100) y L3 (D = 100 µm, H = 100).
- Bomba Harvard 11 plus.

Después de más de 120 ensayos para establecer las condiciones apropiadas, se hizo evidente que una mezcla de alginatos dio mejores resultados que un solo alginato. Protanal LF10/60: Protanal LF10/60LS en una relación de 0,7 %:3 % dio los resultados óptimos. Se encontró que la distancia óptima para la nebulización era de 10 cm. La concentración óptima de HAS en la mezcla era 14 % y del IGF-1 0,3 %. Esta mezcla se nebuliza utilizando el FF (D = 100 µm, H = 100) en la configuración líquido-gas ($\Delta P_t = 300$ mbar, $Q_d = 5$ mL/h utilizando gas como fluido de enfoque. El nebulizador se coloca a 10 cm de una solución de CaCl_2 al 3 % en un baño con agitación, se recoge por centrifugación después de 30 min y se lava para eliminar el CaCl_2 . La distribución de tamaño de las partículas se determina por citometría de flujo y SEM. La eficacia de encapsulación de HSA por la cuantificación de proteínas y curvas estándar. La encapsulación de hrHGF-1 se determinó mediante ELISA como se describe en el Ejemplo nº 2.

El tamaño de las partículas, determinado por SEM, fue de 15,87 µm con una SD de 1,83 y una eficacia de encapsulación de 71,4 con un atrapamiento del 11,6 %. Las determinaciones de proteínas complementadas con ensayos ELISA cuantitativos documentaron que cada 1×10^6 microesferas llevaban ~2 µg de IGF-1 y 269 µg de HSA. Los ensayos biológicos *in vitro* del IGF-1 contenido en las microesferas analizadas en cuanto a su capacidad de unirse y activar el receptor de IGF-1 de las células vivas muestran que después de una ronda de liofilización y resuspensión, el IGF-1 encapsulado mantuvo el 67 % de la actividad biológica original. Por lo tanto, cada millón de microesferas tenía una actividad biológica equivalente a ~ 1,5 µg del IGF-1 nativo.

Este protocolo se puede adaptar para ser utilizado con diferentes tipos de polímeros tales como copolímeros de bloque segmentados de poliéter-poliéster de poli(tereftalato de butileno) (PBT) y poli(óxido de etileno) (PEO) PolyActive® utilizando el nebulizador FF así como otros métodos de pulverización.

Conclusión: el alginato es un polímero adecuado para la producción de microesferas monodispersas con un diámetro aproximado de 15 µm y para encapsular grandes cantidades de proteínas. Los protocolos utilizados se pueden modificar para aumentar la relación de IGF-1 a HSA hasta 60:40, lo que aumenta la carga de compuesto activo en más de dos órdenes de magnitud. A partir de los resultados obtenidos, el intervalo de tamaños alrededor del pico de 15 µm es más estrecho cuando se usa PLGA que con la combinación de alginatos analizada aquí. Dado el gran número de diferentes preparaciones de alginato, es probable que la homogeneidad de las micropartículas encontradas aquí se pueda mejorar significativamente.

Ejemplo 4

Para producir microesferas en las que el compuesto activo está localizado en la superficie de la partícula, es posible producir las microesferas mostradas anteriormente utilizando un polielectrolito en lugar de PLGA de carga de signo opuesto al compuesto activo que se va a unir. Ejemplos de tales polielectrolitos son goma arábiga, pectinas, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, ácido hialurónico, heparina, carboximetilcelulosa, quitosano, ácido algínico y una multitud de polímeros sintéticos. Cuando el polielectrolito tiene una carga de signo opuesto al compuesto activo, es posible unirlo a la micropartícula por absorción a partir de una solución del compuesto activo.

Ejemplo 5

Las microesferas de 15 µg de diámetro son óptimas para el atrapamiento capilar después de la administración intracoronaria sin derrames a la circulación sistémica.

Se sedaron cerdos blancos Yorkshire hembras (n = 2) (27 kg) con telazol (100 mg, I.M.), se intubaron y se afeitaron. Se colocó un catéter intravenoso en una vena periférica de la oreja. Los animales se trasladaron a la sala de cirugía, se colocaron en una tabla soporte y se fijaron a la mesa quirúrgica con fijaciones de extremidades. Los animales se mantuvieron anestesiados con isoflurano (a 2,5 % con O_2) y se monitorizó su EKG (electrocardiograma) de forma continua durante todo el procedimiento. Utilizando una fuente radiológica portátil (GE STENOSCOP, GE Medical Systems USA) como guía fluoroscópica, se intubó la arteria coronaria principal izquierda con un catéter guía 6F JR 3,5 de 40 cm de longitud especialmente diseñado para el protocolo (Cordynamic-Iberhospitex S.A. Barcelona, España) Se realizó una angiografía coronaria basal.

En ambos animales, se hizo avanzar un catéter guía coronario de 2 mm de diámetro sobre una guía (Hi-Torque Balance Middle-Weight 0,014") hasta el origen de la arteria coronaria izquierda. A través de este catéter se hizo avanzar un microcatéter de 0,014" (0,3 mm) de diámetro interno y se colocó su punta en la porción proximal de la arteria coronaria anterior izquierda (LAD), justo debajo del origen de la primera arteria perforante. Esta es la misma localización utilizada para producir el infarto de miocardio experimental y para la administración de la solución de los factores de crecimiento descritos anteriormente. Se colocó otro catéter en el seno coronario para recoger muestras de sangre venosa cardíaca durante el procedimiento. Antes de comenzar la administración, se recogió una muestra de sangre periférica, venosa coronaria y arterial coronaria. En el caso de extrasístoles ventriculares abundantes o fibrilación ventricular, se administró lidocaína de 1-3 mg/kg por vía intravenosa. La medicación preoperatoria se administró como 75 mg de clopidogrel (Plavix) y 250 mg de aspirina un día antes del procedimiento quirúrgico. La

medicación posoperatoria consistió en 75 mg de clopidogrel (Plavix) y 125 mg de aspirina diariamente hasta el sacrificio.

Para determinar el tamaño óptimo de las microesferas para que sean atrapadas completamente en la red capilar, una mezcla de microesferas de poliestireno fluorescentes de diámetros 2 µm, 4 µm, 6 µm, 10 µm; 12 µm y 15 µm, cada una marcada con un color diferente (compradas de Invitrogen y de Polysciences Inc., Cat # F8830, F8858; F8824; microesfera de 6,0 µm coloreada Polybead Black, Megabead NIST de 12,0 µm y F8842) se mezclaron en una suspensión de 20 mL de PBS a una concentración de 1×10^6 microesferas de cada uno de los 6 tamaños por mL y se agitaron en vórtex durante 5 minutos para asegurar una suspensión homogénea. Esta suspensión se administró en el origen de la arteria coronaria izquierda de tres cerdos a través del catéter de angiografía mediante una bomba de Harvard a una velocidad de 1 mL/min. Después de la administración de cada mL (1 millón de microesferas), se suspendió la inyección durante 3 min durante cuyo tiempo se tomó una muestra de sangre del seno coronario. Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre, se prepararon portaobjetos de frotis de sangre para verificar la presencia de micropartículas fluorescentes. Después de la administración completa de los 20 mL de suspensión de microesferas, se recogieron muestras de sangre del seno coronario durante 3 horas adicionales a intervalos de 30 minutos. Al final del experimento, se sacrificaron los animales y se extirpó y se fijó el corazón, y se tomaron muestras por secciones seguido de un examen microscópico histológico y fluorescente.

Debido a que se administraron microesferas de diferentes tamaños en igual número, sus proporciones en el flujo venoso del seno coronario y en el miocardio debían ser imágenes especulares entre sí. Las partículas que atraviesan el lecho capilar deben tener una concentración alta en la sangre del seno coronario y baja en el miocardio al final del experimento. Lo contrario debería ser cierto para las partículas que no pasan a través del lecho capilar. Como se muestra a continuación, solo los tamaños ≥ 10 µm son retenidos eficientemente en el miocardio pero incluso microesferas de 10 y 12 µm se filtran a través en gran medida puesto que entre 19 y 8 %, respectivamente, de estas microesferas pasaron a la circulación sistémica. Por otro lado, ≤ 1 % de las partículas de 15 µm pasaron a través del lecho capilar y alcanzaron el seno coronario.

Tabla 2

Tamaño de la microesfera en µm:	2	4	6	10	12	15
Salida hacia la coronaria	95	73	53	19	8	≤ 1
Seno (calculado) en %						
Retenido en el miocardio 3 h después de la administración en %	≤ 3	15	41	77	90	≥ 99

Para determinar si los resultados mostrados arriba eran o no específicos para el miocardio o se podrían extender a otros tejidos, se utilizó el mismo protocolo para administrar una suspensión idéntica de microesferas a través de la arteria femoral de la pierna derecha. Se recogieron muestras de sangre de la vena femoral y se analizaron muestras del músculo cuádriceps para determinar la permanencia de las diferentes microesferas en el músculo esquelético. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Tamaño de la microesfera en µm:	2	4	6	10	12	15
Flujo de salida hacia el retorno venoso (calculado) en %	92	67	59	12	11	< 1
Retenido en el músculo esquelético 3 h después en %	≤ 1	11	27	72	83	≥ 99

Conclusión: El tamaño mínimo de las microesferas que asegura ≥ 99 % de retención en el tejido de interés es de 15 µm de diámetro. Debido a que es importante utilizar el tamaño efectivo mínimo con el fin de minimizar la producción de microfocos de isquemia por obstrucción de las arteriolas precapilares, este tamaño de diámetro es el óptimo para la administración local de sustancias a un tejido particular a través de su lecho capilar.

Ejemplo 6

Administración de las microesferas en la circulación coronaria.

Se preparó una suspensión de 20 mL de microesferas de poliestireno fluorescentes de 15 µm (Invitrogen, Cat #

5 F8842, microesferas de poliestireno FluoSpheres®) a una concentración de 1×10^6 /mL en PBS y se sometió a agitación en vórtex durante 5 minutos. Se administró esta suspensión a través del catéter de angiografía mediante una bomba de Harvard a una velocidad de 1 mL/min en el origen de la arteria coronaria izquierda principal. Después de la administración de cada mL (1 millón de microesferas), se suspendió la inyección durante 3 min, durante cuyo tiempo se hizo un EKG completo y se tomó una muestra de sangre del seno coronario. Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre, se prepararon portaobjetos con frotis de sangre para verificar la presencia de micropartículas fluorescentes. El resto de la muestra se guardó para determinaciones enzimáticas. El procedimiento se continuó hasta que el electrocardiograma presentó alteraciones mínimas coherentes con isquemia de miocardio. Se midió el flujo sanguíneo coronario (TIMI) al comienzo del experimento y después de la administración de la suspensión de partículas. Se dejó que se recuperasen los dos cerdos, se volvieron a examinar a las 24 horas y se sacrificaron después.

Resultados:

15 En el animal nº 1 se detectaron las primeras alteraciones del electrocardiograma después de la administración de 16 mL de la suspensión (16 millones de microesferas). En el segundo animal, las alteraciones del electrocardiograma no aparecieron hasta después de la administración de 18 mL (18 millones de microesferas). En ambos animales, el flujo sanguíneo coronario fue TIMI 3 (normal) al final del procedimiento. El animal nº 1 se sacrificó 24 horas después de la terminación de la perfusión. Se hizo un EKG completo y se recogieron muestras de sangre antes del sacrificio. El corazón fue procesado para examen macroscópico y microscópico.

20 El animal nº 2 a las 24 horas tenía un electrocardiograma y un flujo sanguíneo coronario (TIMI 3) normales. Después de obtener un conjunto de muestras de sangre, se sacrificó el animal y se procesó el corazón para examen macroscópico y microscópico.

25 Todos los frotis de sangre de las muestras tomadas del seno coronario y de la circulación sistémica de los animales nº 1 y nº 2 se examinaron por microscopía de fluorescencia con alto y bajo aumento. No se detectaron perlas fluorescentes en ninguna de las muestras. Esto indica que el atrapamiento en la red capilar de las microesferas de 15 μ m de diámetro es muy eficiente. Además, si hay derivaciones funcionales desde las arterias coronarias al ventrículo derecho con este método de inyección a través de las venas de Tebesio, son menores y no se detectan por los métodos empleados aquí.

30 Las medidas enzimáticas (Tabla 4) muestran que el animal nº 1 desarrolló un pequeño infarto de miocardio como se demuestra por el aumento del nivel de troponina T cardíaca específica (TnT) en sangre (los valores superiores a 0,01 ng/mL son anormales), mientras que los valores del animal nº 2 son normales y sugieren que este animal desarrolló solo isquemia transitoria durante la administración de las partículas y se recuperó sin ningún daño del miocardio permanente. Esta interpretación fue confirmada por la patología como se muestra a continuación. La sección macroscópica del corazón del animal nº 1 muestra microfocos de necrosis (áreas pálidas) mientras que la sección del animal nº 2 es normal. Esta conclusión fue confirmada por la histopatología (no se muestran datos).

35 Tabla 4

	Marcador	PRE INJ CS	PRE INJ	POST CS	POST	POST 14 H	POST 24 H
CERDO 1	CK	574	669	423	567	1920	1982
	MB	521	646	506	498	919	1231
	TrT	0,01	0,01	0,01	0,01	1,72	1,35
CERDO 2	CK	1120	1114	1099	1073	1834	1895
	MB	922	791	920	523	867	739
	TrT	0,02	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01

40 Conclusión: La administración de hasta 15×10^6 microesferas de 15 μ m de diámetro en el área irrigada por la arteria descendente anterior izquierda (LAD) en un corazón es bien tolerada y no produce daño al miocardio. Las dosis superiores a 15×10^6 microesferas tienen un alto riesgo de producir pequeñas áreas isquémicas que pueden dejar una cicatriz permanente. Por lo tanto, con una carga en el intervalo medio de los valores obtenidos con PLGA como el polímero de 1 mg de proteína por 1×10^6 microesferas de 15 μ m de diámetro, es posible administrar hasta 15 mg del agente terapéutico al lecho capilar del miocardio irrigado por la arteria coronaria izquierda.

Ejemplo 7

Administración de microperlas de PLGA cargadas con factores de crecimiento

Una vez que se hubo determinado el intervalo de dosis de seguridad de las microesferas de 15 µm, se utilizó el mismo protocolo para administrar 10x10⁶ microesferas de PLGA (15 µm de diámetro) a la misma región del miocardio. La suspensión de microesferas estaba compuesta por 4x10⁶ microesferas de PLGA cargadas con un total de 2 µg de factor de crecimiento insulínico tipo 1 recombinante humano (IGF-1); 4x10⁶ microesferas de PLGA cargadas con un total de 1 µg de factor de crecimiento de hepatocitos recombinante humano (HGF). Estos dos tipos de microesferas se cargaron también con un colorante verde fluorescente para hacer más fácil su visualización en la sangre y en las secciones histológicas. Además, la suspensión contenía 2x10⁶ de poliestireno fluorescente en la gama naranja de Invitrogen. Las esferas de Invitrogen se incluyeron para servir como control de la estabilidad y distribución de las microesferas de PLGA. La suspensión en 10 mL de PBS fisiológico se administró a los cerdos instrumentados como se ha descrito anteriormente.

La administración de la suspensión a los dos animales transcurrió sin incidentes y no hubo signos electrocardiográficos de isquemia. El flujo sanguíneo capilar fue normal durante y después del procedimiento (TIMI 3). Un animal (cerdo nº 3) se sacrificó 30 minutos después del procedimiento y el otro (cerdo nº 4) a las 24 horas después del procedimiento. Ambos corazones se procesaron para análisis macroscópico y microscópico.

Ni las muestras de sangre del seno periférico ni las del seno coronario de estos dos animales mostraron la presencia de perlas de Invitrogen o de PLGA en los múltiples frotis de sangre. El análisis preliminar de secciones de pulmón, hígado y bazo de estos dos animales tampoco detectó la presencia de ningún tipo de microesferas.

Tabla 5

	Marcador	PRE INJ CS	PRE INJ	POST CS	POST	POST 14 H	POST 24 H
CERDO 3	CK	589	692	432	657		
	MB	527	626	560	418		
	TrT	0,01	0,01	0,01	0,01		
CERDO 4	CK	467	468	441	442		434
	MB	451	505	562	378		411
	TrT	0,01	0,01	0,01	0,01		0,01

Leyenda para las tablas 4 y 5. Marcadores: CK, creatina cinasa; MB, la isoforma MB de creatina cinasa que es específica cardíaca; TrT, Troponina T cardíaca, que es el marcador más específico y sensible para el daño miocárdico. PRE INJ CS, muestra de sangre tomada del seno coronario al inicio del procedimiento; PRE INJ, muestra de sangre sistémica tomada al inicio del procedimiento; POST CS, muestra de sangre tomada del seno coronario al final del procedimiento; POST, muestra de sangre de la circulación sistémica tomada al final del procedimiento; POST 14 H, muestra de sangre sistémica tomada a las 14 horas después del procedimiento; POST 24 H, muestra de sangre sistémica tomada 24 horas después del procedimiento antes de sacrificar al animal.

Las secciones macroscópicas de estos dos animales fueron completamente normales (no se muestran). El análisis de la sección del cerdo nº 3 bajo el microscopio fluorescente mostró la distribución de las perlas de PLGA (verde) y de las perlas de poliestireno (rojo/naranja) en los vasos capilares en la proporción aproximada de 1:4 (Figura 10 más adelante), como se podría esperar de la composición de la mezcla administrada. No hubo evidencia de ningún daño microscópico al tejido en ninguna de las regiones del corazón examinadas. En el cerdo nº 4, el número de perlas de PLGA (verde) ha disminuido ya significativamente y la relación de estas perlas a las de poliestireno (rojo/naranja) es más próxima a 1:1 (véase la Figura 11), lo que indica que las perlas de PLGA se degradan con una semivida de ~16 horas.

Eficacia de IGF-1 y HGF administrados en microesferas para estimular a las células madre cardíacas residentes.

Como se ha descrito anteriormente, la combinación de IGF-1 y HGF administrada a través de las arterias coronarias fue muy eficaz para estimular la activación de las células madre cardíacas residentes. En este ensayo preliminar se monitorizó la activación de las células madre en la región en que se administraron las microesferas y se comparó con una región del ventrículo izquierdo no irrigada por la arteria coronaria izquierda. Como se puede ver en las imágenes de la Figura 11, la mayor parte de las células madre residentes en el miocardio no tratado son quiescentes (resaltadas por flechas/cabezas de flechas) mientras que las de la región tratada han entrado en el ciclo celular, como se demuestra por la expresión del marcador del ciclo celular ki-67 (señal amarilla en el núcleo- en las Figuras, las "manchas" claras en las zonas iluminadas). Por lo tanto, la administración de factores de crecimiento en un

sustrato sólido que los administra a los capilares y los mantiene allí hasta que se descargan en el espacio intersticial circundante, es un método eficaz de administración del factor de crecimiento para la estimulación de la población de células madre endógenas.

- 5 Conclusión: La administración local de IGF-1 y HGF a regiones particulares del miocardio por medio de microperlas biodegradables de un diámetro que no les permite que crucen los capilares y que entren en la circulación sistémica es eficaz en la estimulación de las células madre residentes de regiones particulares del tejido sin afectar a aquellas que no son el objetivo de la terapia.

Ejemplo 8

- 10 Las células madre y progenitoras cardíacas c-kit^{POS} porcinas son multipotentes y fenotípicamente similares a las de otras especies animales

15 Se examinaron secciones histológicas de miocardio de 3 cerdos Yorkshire que pesaban 24 ± 3 kg mediante microscopía confocal para determinar la presencia de células positivas para el marcador común de células madre, c-kit, el receptor del factor de células madre (SCF), que se sabe que es expresado por la mayoría de las CSC. Las células pequeñas positivas para c-kit (c-kit^{POS}) se distribuyeron por todo el miocardio auricular y ventricular (Figura 1A-B) con una mayor densidad en las aurículas (no hay diferencia entre las aurículas izquierda y derecha, no se muestran datos) y el ápice ventricular, en comparación con otras regiones cardíacas (Figura 1C). Este patrón de distribución coincide con la ubicación anatómica de las CSC c-kit^{POS} en los corazones de otras especies animales, incluidos los seres humanos. En consecuencia, la densidad de células c-kit^{POS} en el corazón del cerdo es similar al miocardio humano y al de roedor: 1 célula por ~ 1.000 miocitos o ~ 50.000 células c-kit^{POS} por gramo de tejido.

- 20 Las muestras de tejido miocárdico de diferentes regiones cardíacas porcinas fueron digeridas enzimáticamente para obtener una población celular mermada en miocitos. Las células c-kit^{POS} constituyeron 10 ± 3 %, 3 ± 2 % y 7 ± 3 % de la población inicial de células cardíacas mermadas en miocitos de las aurículas, ventrículos y ápice, respectivamente (Figura 1D).

25 Se separaron las células c-kit^{POS} utilizando tecnología MACS (21) que produjo una preparación de células altamente enriquecidas constituida por > 90 % de células c-kit^{POS} (Figura 1E). El análisis FACS mostró que las células cardíacas enriquecidas c-kit^{POS} eran negativas para el marcador pan-leucocitario CD45 y el marcador progenitor endotelial/hematopoyético CD34 (Figura 1E). Una alta fracción (87 %) de células cardíacas porcinas c-kit^{POS} expresaron CD90, (un marcador mesenquimático no específico común) y CD166 (molécula de adhesión) (Figura 1E). Sólo una pequeña fracción fue positiva para los marcadores de progenitores hematopoyéticos/endoteliales, CD105 y C D133 (Suppl Figura 1). Las células cardíacas c-kit^{POS} fueron negativas cuando se analizaron para un panel de marcadores CD específicos para otros linajes de células hematopoyéticas, mesenquimatosas y endoteliales, que incluyen CD13, CD14, CD31, CD38, CD44, CD33. A partir de estos análisis, se puede sacar la conclusión de que las células cardíacas porcinas clasificadas por c-kit son c-kit^{POS}, CD90^{POS}, CD166^{POS}, CD105^{baja}, CD133^{baja} y CD45^{neg}, CD34^{neg}, CD31^{neg}, CD44^{neg}.

- 35 Células cardíacas c-kit^{POS} recién aisladas de aurículas, ventrículos y ápice se expandieron en cultivo (4 pases) y después se depositaron como células individuales en placas Terasaki de 96 pocillos para generar clones de células individuales (Figura 2A-B). La eficacia clonal de las células porcinas fue similar para todas las localizaciones cardíacas y similar a la eficacia de clonación registrada previamente de las CSC de roedores (Figura 2C) (Beltrami *et al.*, Cell 2003). Se escogieron aleatoriamente 2 clones de las células derivadas de aurículas, ventrículos y ápice, y se expandieron aún más. Estos clones mostraron un tiempo de duplicación de ~ 30 horas y han sido propagados hasta ahora durante más de 65 pases y subclonados en serie cada 10 pases, sin llegar a alcanzar la parada del crecimiento ni la senescencia. Estos clones de células cardíacas c-kit^{POS} han mantenido un cariotipo normal sin alteraciones cromosómicas detectables.

45 Las células cardíacas porcinas c-kit^{POS} clonadas se analizaron en busca de marcadores de estaminalidad y compromiso con linaje cardíaco utilizando inmunocitoquímica. Las células mostraron positividad para c-kit (90 ± 8 %), Flk-1 (86 ± 9 %), Oct3/4 (62 ± 11 %), Nanog (46 ± 5 %), telomerasa (81 ± 10 %), Bmi-1 (70 ± 14 %), Nkx2,5 (52 ± 8 %), Isl-1 (8 ± 6 %) (Figura 2D). Debido a que los clones se originaron a partir de células individuales, la amplia expresión de los genes de multipotencia en su progenie dio a entender que el nivel de expresión de estos genes en la población de células parentales es muy alto. Desafortunadamente, la población primaria de células c-kit^{POS} es una mezcla de las CSC, progenitoras y precursoras, y todavía hay marcadores específicos para las CSC "reales". Por lo tanto, solo es posible inferir el fenotipo de estas células a través del análisis de sus descendientes.

55 Cuando las células cardíacas porcinas c-kit^{POS} clonadas se pusieron en placas en un medio de formación de cardioesferas modificado (mCSFM) en placas bacteriológicas (Corning), crecieron en suspensión y generaron clones esféricos, denominados cardioesferas (Figura 2E) (Beltrami, A.P. *et al.*, 2003. Cell 114: 763; Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100 (21): 12313-12318; Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N *et al.*, Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem 2004; 279 (12): 11384-11391). Cuando las cardioesferas se colocaron en placas de plástico recubiertas de laminina con medio de diferenciación cardiogénica,

se unieron y las células se dispersaron desde la esfera adquiriendo una morfología plana (Figura 2E). Cuatro a seis días después de poner en placas, estas células planas periféricas expresaron proteínas específicas de linajes de miocitos ($27 \pm 4 \%$), endoteliales ($10 \pm 6 \%$) y de células de músculo liso ($34 \pm 5 \%$) (Figura 2E). Estos resultados muestran que las células cardíacas porcinas c-kit^{POS} tienen características de células madre verdaderas, es decir, expresan marcadores de estaminalidad, son clonogénicas, autorrenovables y multipotentes. Por lo tanto, las células madre cardíacas c-kit^{POS} porcinas (en lo sucesivo identificadas como pCSC) tienen un patrón de expresión génica y un fenotipo concordante con las CSC c-kit^{POS} aisladas de otras especies (Ellison *et al.*, 2007, J. Biol. Chem. 282: 11397).

Las CSC porcinas expresan rutas de señalización de IGF-1, HGF y SCF intactas que modulan su activación

- 10 Los resultados muestran la presencia de pCSC verdaderas en el corazón porcino. Las pCSC expresan los receptores IGF-1 y c-met *in vivo* e *in vitro* (Figura 2F). Cuando crecen en cultivo, las pCSC recién aisladas responden a la estimulación por hrIGF-1, hrHGF y hrSCF con proliferación celular (Figura 2G) y migración celular (Figura 2H). Tras la unión del ligando, se activaron las rutas efectoras específicas aguas abajo en las pCSC (Figura 2I). Se obtuvieron resultados similares con las células procedentes de los clones de células individuales expandidas (no se muestran datos). Por lo tanto, las pCSC tienen acoplados funcionalmente sistemas de receptor de factores de crecimiento que pueden ser explotados *in vivo* para ensayar protocolos de regeneración de miocardio.

Ejemplo 9

Producción de infarto de miocardio en cerdos, monitorización de la función ventricular y regeneración miocárdica mediante la estimulación *in situ* de células madre cardíacas residentes con factores de crecimiento

- 20 Todos los estudios con animales fueron aprobados por comités adecuados de la Escuela Veterinaria y Hospital de León, León, España. Se sedaron cerdos blancos Yorkshire hembras (n = 26) (27 ± 3 kg) con telazol (100 mg, I.M.), se intubaron y se afeitaron. Se colocó un catéter intravenoso en una vena periférica de la oreja. Los animales se trasladaron a la sala de cirugía, se colocaron en una tabla soporte y se fijaron a la mesa quirúrgica con fijaciones de extremidades. Los animales se mantuvieron anestesiados con isoflurano (a 2,5 % con O₂). En los 26 animales, se hizo avanzar un catéter con balón coronario sobre una guía y se colocó en la porción proximal de la arteria coronaria anterior izquierda (LAD), debajo del origen de la primera arteria perforante. Los cerdos recibieron 125 UI/kg de heparina antes de ser inducido el infarto y después perfusión de heparina (10 UI/kg/h) durante el procedimiento de infarto. Para inducir el infarto, la arteria coronaria LAD se ocluyó mediante inflado del balón (2,5 mm de diámetro) durante 75 minutos. Para medicación antiarrítmica, los cerdos fueron perfundidos continuamente durante el procedimiento con Amiodarona (Trangorex) (5 mg/kg/h) empezando 15 minutos antes del infarto. En el caso de extrasístoles ventriculares abundantes o fibrilación ventricular, se administró lidocaína a 1-3 mg/kg por vía intravenosa. La medicación preoperatoria se administró como 75 mg de clopidrogel (Plavix) y 250 mg de aspirina un día antes del procedimiento quirúrgico. La medicación posoperatoria consistió en 75 mg de clopidrogel (Plavix) y 125 mg de aspirina diariamente hasta el sacrificio.

- 35 Se administraron IGF-1 y HGF (Peprotech) recombinantes humanos en dosis diferenciales (que varían desde 2 µg hasta 8 µg de IGF-1 y desde 0,5 µg hasta 2 µg de HGF) a 17 cerdos a través de un catéter con balón de perfusión que se hizo avanzar inmediatamente distal al origen de la primera arteria septal 30 minutos después de la reperusión coronaria. Los factores de crecimiento (GF) se administraron en 15 mL de PBS a una velocidad de 2,5 mL por minuto con una reperusión de 2 minutos después de cada administración de 5 mL. Se inyectó solución salina sola en otros 9 cerdos con infarto de miocardio (grupo de control de solución salina-placebo, CTRL) utilizando el mismo protocolo. Cinco (2 del grupo CTRL y 3 de los grupos GF) de los 26 animales murieron durante el infarto de miocardio agudo (AMI) (mortalidad aguda de ~ 30 %). Posteriormente, 3 animales murieron en el período posoperatorio: un animal el día 1 (grupo CTRL), un animal el día 13 (grupo CTRL) y un animal el día 14 (grupo GF). De los 18 cerdos restantes que completan el protocolo de estudio, 13 estaban en los grupos tratados con GF y 5 en el grupo CTRL. Específicamente, de los 18 animales tratados con GF supervivientes, 4 recibieron una dosis 1x de los GF (2 µg de IGF-1 y 0,5 µg de HGF; GF-1x), 5 animales recibieron una dosis 2x (4 µg de IGF-1 y 1 µg de HGF; GF-2x) y 4 animales recibieron una dosis 4x (8 µg de IGF-1 y 2 µg de HGF GF-4x). Directamente después de la administración de los GF o de la solución salina sola, a todos los animales supervivientes se les implantó una bomba osmótica cargada con 10 mL de una solución 0,5 M de BrdU durante todo el estudio. Los cerdos se sacrificaron a los 21 días después del infarto de miocardio y la administración del factor de crecimiento. El grupo al que pertenecía cada cerdo se mantuvo oculto para los investigadores que llevaban a cabo el análisis inmunohistoquímico.

- Medidas de la función cardíaca. Se midió la función cardíaca mediante ecocardiografía en la línea base, inmediatamente después de la oclusión coronaria y antes del sacrificio. Brevemente, se obtuvieron vistas paraesternales del eje largo y del eje corto con imágenes de eco tanto en modo M como bidimensional. Las dimensiones de LV (ventrículo izquierdo) (LVEDD y LVESD) se midieron perpendicularmente al eje largo del ventrículo en el nivel mediocordal. Se calcularon la fracción de eyección del LV y la tensión radial.

La inyección intracoronaria local de IGF-1/HGF protege la organización del tejido infartado y mejora la supervivencia de los cardiomiocitos después de un infarto de miocardio agudo

Se administraron IGF-1 y HGF recombinantes humanos (de aquí en adelante abreviados como IGF-1/HGF o GF) en dosis diferenciales a cerdos mediante inyección intracoronaria 30 minutos después del infarto de miocardio agudo. Se inyectaron cerdos adicionales con el mismo volumen de solución salina sola, constituyendo el grupo de control (CTRL).

- 5 El tamaño del infarto, determinado por planimetría, como un porcentaje del área circunferencial coronal no fue diferente entre el grupo tratado con GF y el grupo CTRL ($28 \pm 5 \%$, $26 \pm 7 \%$, $29 \pm 5 \%$ en GF-1x, GF-2x y GF-4x, respectivamente, frente a $27 \pm 4 \%$ en CTRL). Las secciones transversales teñidas con H&E y rojo sirio del tejido cardíaco en la zona remota, del borde e infartada revelaron islas de tejido miocárdico superviviente distribuidas entre el tejido cicatricial fibrótico en la zona del infarto. Estas islas de miocardio superviviente fueron mucho más abundantes en el área infartada del miocardio tratado con GF que en los animales tratados con CTRL (Figura 3A-B). La tinción de inmunofluorescencia doble para la α -actina sarcomérica y BrdU de las secciones analizadas por microscopía confocal reveló que estas islas consistían principalmente en grandes cardiomiocitos α -actina sarcomérica positivos, BrdU negativos, un fenotipo que confirmaba su supervivencia como miocardio preinfartado y su naturaleza madura, incluso hipertrófica (Figura 3C). Además, los corazones de cerdo tratados con GF tenían significativamente menos tejido fibrótico en la región del infarto, en comparación con los CTRL (Figura 3D-F). Más interesante aún, este descenso presentó una relación lineal positiva con la dosis de GF administrada (Figura 3F).

- El estudio no se orientó específicamente a monitorizar el efecto de la terapia GF sobre la muerte celular temprana. Sin embargo, a partir de los resultados presentados más adelante, está claro que la muerte de los miocitos sigue siendo muy alta en la zona de peri-infarto/borde mucho tiempo después del suceso de oclusión/reperusión coronaria. Esto es debido probablemente a los efectos de la remodelación patológica, que se sabe que establece un círculo vicioso entre la adaptación morfológica y la muerte celular continuada. Como se muestra en la Figura 3G-H, la administración de IGF-1/HGF redujo significativamente la muerte tardía de los miocitos de una manera dependiente de la dosis, como se muestra por una disminución en el número de miocitos positivos para la caspasa-3 activada, en comparación con el grupo CTRL. Concordantes con la preservación de la morfología anatómica, la supervivencia de los miocitos y la disminución de la remodelación, los corazones tratados con GF presentaron una disminución de la respuesta hipertrófica de los miocitos en comparación con los CTRL (Figura 3I). Tomados en conjunto estos hallazgos indican que la administración de IGF-1/HGF después de infarto de miocardio agudo tiene un efecto importante en la preservación del número de cardiomiocitos y de la estructura de la pared miocárdica, reduciendo la carga sobre los miocitos supervivientes, lo que da como resultado una mejor remodelación miocárdica y una disminución del estímulo para la muerte e hipertrofia de miocitos del miocardio superviviente.

La administración intracoronaria de IGF-1/HGF después de un infarto de miocardio agudo activa las pCSC residentes

- En corazones normales (no se muestran) y corazones post-infarto de miocardio, $\sim 90 \%$ de las pCSC c-kit^{pos} expresan *in situ* receptores IGF-1 y c-met (HGF) que se detectan por inmunohistoquímica (Figura 4A-B). Por consiguiente, los corazones de cerdo infartados tratados con GF muestran un aumento significativo en el número de pCSC c-kit^{pos} en la región del borde e incluso más altos en el área infartada, 21 días después del infarto de miocardio (Figura 4C-D). Que este aumento en las pCSC c-kit^{pos} es el resultado de la administración de GF se confirma por su correlación directa con la dosis de GF administrada (Figura 4D). A la dosis más alta de GF, el número de pCSC c-kit^{pos} en el área infartada es > 6 veces mayor que en los corazones del grupo CTRL (Figura 4D, SupplTable). Además, el aumento lineal entre las dosis 1x y 4x indica que no se ha alcanzado una dosis de saturación para producir la máxima respuesta regenerativa. Muchas de las pCSC fueron BrdU positivas, un elemento que documenta su nacimiento después de la producción del infarto de miocardio (Figura 4E). Su naturaleza cíclica fue confirmada por la tinción Ki-67, que marca las células que están o han estado recientemente en el ciclo celular (no se muestran datos). Muchas células c-kit^{pos} expresaron los factores de transcripción Nkx-2,5, Ets-1 o Gata6 indicativos de su diferenciación hacia los linajes cardíacos principales, es decir, miocitos, células endoteliales y de músculo liso (Figura 4F-I). El análisis cuantitativo reveló que el número de células c-kit^{pos}Nkx2,5^{pos} (precursores de miocitos/vasculares comprometidos) aumentó significativamente en las regiones infartada y del borde en los corazones de cerdo tratados con GF de una manera dependiente de la dosis de GF (Figura 4G), alcanzando niveles que fueron > 10 veces más altos que en los corazones del grupo CTRL.

- 50 El tratamiento con IGF-1/HGF produce una regeneración fuerte del miocardio después de un infarto de miocardio agudo

- Los corazones tratados con GF, tanto en las regiones del infarto como en las de peri-infarto/borde, albergaban una gran población de miocitos BrdU^{pos} recién formados muy pequeños que aún no habían alcanzado el estado terminalmente diferenciado (Figura 5). Estos datos fueron confirmados por la expresión de Ki67 en los pequeños miocitos recién formados (Figura 5C y F), algunos de los cuales estaban en mitosis y citocinesis, lo que confirma su naturaleza inmadura (Figura 5I). Los miocitos BrdU^{pos} recientemente formados también estaban presentes en la región peri-infarto/borde de los cerdos CTRL no tratados inyectados con solución salina. Sin embargo, su número era $\sim 1/10$ de los corazones tratados y estaban prácticamente ausentes en la zona del infarto (Figura 5).

- 60 Como ocurrió en el caso de las pCSC, hubo una correlación directa entre el número de pequeños miocitos BrdU^{pos}/Ki67^{pos} recientemente formados con dosis de GF, tanto en las regiones del infarto como en las del borde

(Figura 5G-H). En el miocardio tratado con GF, los pequeños miocitos BrdU^{pos} se organizaron como grupos de bandas de regeneración en la zona del infarto. Estas bandas de regeneración estaban más organizadas en su estructura, y eran más compactas y densas con el aumento de la dosis de GF (Figura 5A-B). Finalmente, ni el número ni la aparición de miocitos recién formados (los BrdU^{pos} o Ki67^{pos}) en la región distal del infarto (el miocardio preservado) no fue significativamente diferente entre los animales tratados con GF y los CTRL (no se muestran datos).

Las estructuras vasculares BrdU positivas recién formadas también fueron evidentes en el borde y en el miocardio infartado (Figura 6A-C). Los corazones tratados con GF mostraron un mayor número de capilares y arteriolas en la zona del infarto, en comparación con los CTRL tratados con solución salina y esta respuesta fue dependiente de la dosis (Figura 6D-F). De modo interesante, los nuevos microvasos fueron más evidentes alrededor de las islas supervivientes de miocardio dentro de la zona infartada mencionadas antes que tenían también una mayor densidad de pequeños miocitos BrdU^{pos} recién formados y de bandas de regeneración (Gandia, C. *et al.*, 2008, *Stem Cells* 26: 638). Esta organización sugiere la producción de factores cardiopoyéticos (Behfar, A. *et al.*, 2007, *J. Exp. Med.* 207: 204: 208) por parte de los miocitos adultos preservados que actúan sobre las pCSC.

Los miocitos regenerados en la zona de infarto a los 21 días después de infarto de miocardio eran inmaduros, como se demuestra por su tamaño medio, así como por el hecho de que muchos de ellos todavía estaban en ciclo como lo demuestra la expresión de Ki-67 (Figura 5I F). De acuerdo con el papel sugerido para el papel cardiopoyético de los miocitos maduros, los miocitos recién formados en contacto o en estrecha proximidad con los maduros (es decir, en la zona del borde) son de un tamaño significativamente mayor que aquellos que están en el medio de la cicatriz sin proximidad a tejido libre (Figura 5). También es evidente que el tratamiento con GF desempeña un papel en la maduración de los miocitos, como se demuestra por el aumento del tamaño medio de los miocitos con el aumento de la dosis de GF.

Dado el tamaño del corazón porcino y el volumen del área infartada, no es posible determinar con exactitud ni el número de miocitos perdidos ni el número de miocitos regenerados por el tratamiento con GF. Sin embargo, el muestreo cuidadoso de la zona infartada y de las zonas de peri-infarto/borde no deja ninguna duda de que a los 28 días el corazón infartado tratado con GF ha regenerado la mayor parte de los miocitos perdidos, si no todos.

Ejemplo 10

La administración intracoronaria de GF preserva y puede mejorar la función ventricular

Las imágenes ecocardiográficas mostraron que la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) estaba significativamente reducida en los cerdos CTRL y en los tratados con GF después de la oclusión coronaria (Figura 6G). Sin embargo, 28 días después del infarto de miocardio agudo, la LVEF empeoró ligeramente en los CTRL, mientras que fue significativamente preservada/mejorada por el tratamiento con GF, en comparación con los CTRL (Figura 6G). Con el fin de obtener una mayor comprensión de la función cardíaca regional, se utilizó la ecocardiografía Doppler tisular para medir la tensión radial anteroseptal que mejoró notablemente en los cerdos tratados con GF, en comparación con los CTRL (Figura 6H-I). La preservación/mejora de la función cardíaca se correlacionó con el aumento de la dosis de GF (Figura 6).

Ejemplo 11

La administración intracoronaria de hasta 50 µg de IGF-1 encapsulados en microesferas de PLGA de 15 µm de diámetro no se vierte en la circulación sistémica.

Como se demuestra en el Ejemplo nº 5, ≥ 99 % de las microesferas de 15 µm de diámetro son atrapadas en la red capilar del tejido diana, y específicamente el miocardio. Sin embargo, estos datos no abordan la cuestión de si cuando la molécula activa se descarga es retenida dentro del tejido o si se filtra o no a la circulación capilar y el retorno venoso. Para explorar esta cuestión, se administraron intracoronariamente 5 x 10⁶ microesferas cargadas con un total de 50 µg de rhIGF-1 en el origen de la arteria descendente anterior izquierda siguiendo el mismo protocolo de administración descrito en los Ejemplos 5-7. La principal diferencia fue que se dejó un catéter en el seno coronario a través de la vena yugular. Durante la administración, tres horas después del procedimiento y después cada 12 horas durante los 3 días siguientes, se tomaron muestras de sangre del seno coronario y de sangre venosa a través de una vena de la oreja. Se preparó suero y se congelaron las muestras en nitrógeno líquido hasta que se terminó la recogida. Todas las muestras se analizaron por ELISA empleando un kit de detección de IGF-1 humano (R & D, Minneapolis, Minnesota, USA) que no presenta reacción cruzada con el IGF-1 porcino. Ninguna de las muestras ni del seno coronario ni del retorno venoso sistémico resultaron positivas. Se encontró que los límites mínimos de detección del ensayo eran de 52,5 ng/mL para IGF-1. Por lo tanto, aunque es posible que exista alguna fuga por debajo de los niveles de detección del ensayo ELISA, está claro que la mayor parte del IGF-1 nunca dejó el miocardio.

Ejemplo 12

La administración local intraarterial de IGF-1/HGF al músculo esquelético dañado induce la activación de las células madre musculares y estimula la regeneración.

5 Para probar si el protocolo utilizado para tratar el miocardio dañado era efectivo en el tratamiento de otros tejidos, se utilizó el mismo protocolo para tratar el músculo esquelético post-isquémico de la pierna derecha de 3 cerdos en la cual se había producido el daño isquémico por una oclusión completa de balón de 45 min de la arteria femoral. Como en el caso del miocardio, después de una reperusión de 30 minutos por deflación del balón, se preparó una suspensión de 20 mL de PBS que contenía microesferas de IGF-1 y HGF de 15 µm de diámetro, como se describe en el ejemplo nº 2 para una dosis total de 8 µg de IGF-1 y de 2 µg de HGF. Los animales se sacrificaron 3 semanas después y las biopsias del músculo cuádriceps se analizaron por inmunohistología para determinar el grado de activación de las células madre en la lesión.

10 Como se ha descrito para el miocardio, después de la oclusión de la arteria femoral, se implantó a los animales una bomba osmótica para administrar de modo continuo una solución de BrdU que se sabe que marca de manera eficiente todas las células replicantes. De esta manera, todas las células nacidas después del inicio de la terapia tienen marca BrdU, lo que permite una comparación de la reacción regenerativa entre los controles y los animales tratados. En cada caso, el cuádriceps de la pierna izquierda sirvió como control no dañado.

15 Como se muestra en la figura 12 y en la tabla 6, la administración local de IGF-1/HGF encapsulados en microesferas de PLGA de 15 µm de diámetro fue muy eficaz en la estimulación de la regeneración del tejido muscular en la pierna tratada pero no en la contralateral en comparación con los controles isquémicos pero tratados con placebo.

Tabla 6
Regeneración del músculo esquelético en respuesta a la administración local de factores de crecimiento

Nº de núcleos de miofibra marcados con BrdU por 1x10 ³ núcleos de miofibra		
Animal nº	Pierna dañada	Pierna contralateral
1	337	17
2	289	22
3	364	13

20 Conclusión: La administración local de factores de crecimiento a tejidos dañados distintos del miocardio tiene un efecto estimulante en la reacción regenerativa del tejido dañado que se localiza en la zona aguas abajo del sitio de administración de las microesferas, como se espera para un sistema de administración que se dirige a la red capilar del tejido/órgano dañado.

Ejemplo 13

25 La inyección intracoronaria de IGF-1/HGF/SCF tiene un efecto más potente en la activación de las CSC y en la preservación de la función ventricular que IGF-1/HGF solos.

30 Para probar si la adición de nuevos factores al protocolo descrito en los ejemplos previos mejoraría la reacción regenerativa del miocardio post infarto, se administraron a un grupo de 3 animales las dosis más altas de IGF-1 (8 µg) y HGF (2 µg) utilizadas en el ejemplo nº 9 junto con 4 µg de SCF. Cada uno de estos factores se encapsuló en microesferas de PLGA de 15 µm de diámetro como se describe en el Ejemplo nº 2. El protocolo para la producción del infarto, la monitorización y la administración de las suspensiones de microesferas fue como se describe en los Ejemplos 5-7. Los animales fueron sacrificados a las 4 semanas después del tratamiento.

35 Como se muestra en la Figura 13A y en la Figura 13B, la regeneración producida por los protocolos de tres factores es significativamente mejor tanto en el nivel de regeneración como también en la maduración de los miocitos regenerados que por la combinación de IGF-1/HGF. Es razonable extrapolar a partir de estos datos que, además de la adición o sustracción de partículas con factores particulares, otras variaciones pueden implicar cambiar la dosis de un factor particular o conjunto de factores, el perfil de liberación/descarga para un factor particular, el grado de carga, etc.

40 Conclusión: La presente invención permite la formulación de un número casi infinito de combinaciones específicas de compuestos terapéuticos a partir de un conjunto limitado de bloques de construcción en los que cada factor se puede usar a diferentes dosis, diferentes patrones de liberación y se puede combinar con un número ilimitado de otros factores. Esto permite en una sola administración dirigirse a un tejido particular con diferentes combinaciones de agentes terapéuticos, cada uno de los cuales podría actuar en un momento diferente, sobre una célula diana diferente, y requerir una dosis efectiva diferente. Estas posibilidades son particularmente ventajosas para tejidos de difícil acceso a los que no se puede acceder repetidamente, tales como el miocardio y la mayor parte de los órganos internos.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Distribución y caracterización de las células cardíacas c-kit^{pos} en el corazón de cerdo adulto.

(A-B) Imágenes confocales representativas de células c-kit positivas (c-kit^{pos}; blancas) en la aurícula derecha (A) y en el ventrículo izquierdo (B) del corazón de cerdo normal. Los cardiomiocitos están teñidos en rojo (se muestra en gris en las figuras) por α -actina sarcomérica (α -sarc act) y los núcleos están teñidos en azul con DAPI. (C) Las células c-kit^{pos} se distribuyen a través del miocardio auricular y ventricular con una densidad más alta en las aurículas y en el ápice, en comparación con el ventrículo derecho y el ventrículo izquierdo (RV, LV). *p <0,05 vs. RV y LV. (D) Análisis FACS representativo de células c-kit^{pos} dentro de la población de células cardíacas mermadas de miocitos para las aurículas, ventrículo (RV) y ápice. (E) Las células c-kit^{pos} obtenidas utilizando MACS muestran > 90 % de enriquecimiento. El análisis FACS de células cardíacas porcinas enriquecidas c-kit^{pos} reveló que son negativas para los marcadores de linaje de células hematopoyéticas CD45 y CD34. Además, una alta fracción de células cardíacas porcinas c-kit^{pos} expresa los marcadores del linaje celular mesenquimatoso, CD90 y CD166.

Figura 2. Las células cardíacas c-kit^{pos} porcinas expresan marcadores de estaminalidad, tienen propiedades de clonogenicidad, autorrenovación, formación de cardioesferas y multipotencia de células madre, y expresan sistemas de IGF-1/HGF de señalización intacta que modulan su activación.

(A) Una imagen de microscopía óptica que muestra células cardíacas porcinas c-kit^{pos} expandidas en el 4^o pase. (B) Una imagen de microscopía óptica de un clon, después de que las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} simples fueron depositadas en los pocillos de las placas Terasaki para generar clones de células individuales. (C) La clonogenicidad de las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} fue similar en todas las cámaras cardíacas, y comparable a las CSC de ratón y de roedores. (D) La tinción inmunofluorescente de las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} clonadas confirmó la expresión de c-kit (blanco), y reveló la expresión de Flk-1, Oct-4, Nanog, Tert, Bmi-1, Nkx2,5 e Isl-1 (todos se muestran en gris), lo que indica que son una mezcla de células madre y progenitoras cardíacas. Las imágenes son de 20 aumentos, con capturas de zoom como recuadro. (E) Las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} clonadas formaron cardioesferas (a). Cuando las cardioesferas c-kit^{pos} (blancas) (b) se colocaron en placas recubiertas de laminina en medio cardiogénico, las células de la cardioesfera se extendieron fuera de la esfera (c). Cuatro a seis días más tarde, las células sobre la periferia de la esfera aumentaron la expresión de marcadores bioquímicos para cardiomiocitos (α -actina sarcomérica, α -Sarc Act; d), células de músculo liso (actina de músculo liso, SMA; e) y células endoteliales (factor de von Willebrand, vWF; f) (se muestran todas con fluorescencia gris). (F) La tinción inmunofluorescente muestra que las CSC porcinas c-kit^{pos} tienen receptores de IGF-1 y HGF (gris, Igf-1R y c-met, respectivamente). (G - H) Cuando crecen en cultivo, las células cardíacas porcinas c-kit^{pos} recién aisladas responden a la estimulación de IGF-1 y HGF, por proliferación celular (G; *p <0,05 vs. base, †p <0,05 vs. CTRL, ‡p <0,05 vs. HGF) y la migración (H; †p <0,05 vs. CTRL, ‡p <0,05 vs. IGF-1). (I) El análisis de transferencia Western reveló que tras la unión del ligando se activan las rutas efectoras específicas de unión aguas abajo en las células cardíacas porcinas c-kit^{pos}. phos = fosforilado, FAK = cinasa de adhesión focal.

Figura 3 La inyección intracoronaria de IGF-1 y HGF mejora la remodelación de las células del miocardio después de un infarto de miocardio agudo.

(A) La tinción de H&E de corazones de cerdo tratados con GF reveló islas de tejido de miocardio superviviente en la zona de infarto (flechas), dispuestas entre las capas de regeneración y fibróticas. (B) Estas islas de miocardio fueron poco frecuentes y menos definidas en estructura en los corazones de cerdo CTRL tratados con solución salina. (C) Estas islas de miocardio estaban compuestas principalmente de cardiomiocitos BrdU negativos (troponina I cardíaca, cTnI, gris con sus núcleos como círculos negros en el medio de la célula), que documentan su fenotipo maduro y superviviente. Las células que nacen después del infarto son BrdU positivas y sus núcleos se muestran como puntos blancos. (D-E) La tinción con rojo sirio identificó el tejido fibrótico (tinción gris) y el músculo (tinción amarilla) en secciones transversales de la zona de infarto, en corazones de cerdo tratados con GF (D) y tratados con solución salina CTRL (E). (F) Los corazones de cerdo tratados con GF (IGF-1/HGF) tenían una reducción del porcentaje de la fracción de área de fibrosis en la zona de infarto, en comparación con los cerdos CTRL tratados con solución salina. *p <0,05 vs. CTRL. †p <0,05 vs.IGF-1/HGF 1x. (G) La tinción para la caspasa-3 activada (marrón, puntas de flecha) reveló miocitos apoptóticos en la zona de peri-infarto/borde del corazón de cerdo CTRL después de AMI. (H) La inyección de IGF-1 y HGF dio como resultado una disminución del número de miocitos apoptóticos, en la zona peri-infarto/borde, en comparación con los CTRL tratados con solución salina. *p <0,05, vs. CTRL, †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x, ‡p <0,05 vs. IGF-1/HGF 2x. (I) El análisis del diámetro de los miocitos mostró que los cerdos tratados con GF tenían una reducción de la respuesta hipertrofica de miocitos después de un AMI, en comparación con los animales CTRL tratados con solución salina. Normal = región remota/distal del área infartada en corazones CTRL. ^p <0,05 vs. normal, *p <0,05 vs. CTRL. †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x.

Figura 4. La administración de IGF-1 y HGF después del AMI activa las CSC endógenas, impulsando su compromiso con el linaje cardíaco

(A-B) La mayoría de las CSC porcinas ckit^{pos} (blanco) expresan los receptores Igf-1 (A, gris) y c-met (B, gris) *in vivo*. El DAPI tiñe los núcleos en azul. (C) Un grupo de CSC c-kit^{pos} (blanco) en el área de infarto de un corazón de cerdo tratado con GF-4x. (D) El número de las CSC c-kit^{pos} aumentó significativamente en el borde pero más en la región

infartada de cerdos tratados con GF, en comparación con los CTRL tratados con solución salina. *p <0,05 vs. CTRL, †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x, ‡p <0,05 vs. IGF-1/HGF 2x. (E) Muchas CSC c-kit^{pos} (blanco) en los corazones de cerdo tratados con GF fueron positivas para BrdU (gris), indicativo de su estado recién formado. (F) Las CSC c-kit^{pos} (blanco) expresaron el factor de transcripción cardíaco, Nkx2,5 (gris), que representa las células progenitoras cardíacas. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (G) El número de células progenitoras cardíacas c-kit^{pos}Nkx2,5^{pos} aumentó en las zonas de infarto y del borde en los corazones de cerdo tratados con GF, *p <0,05 vs. CTRL, †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x, ‡p <0,05 vs. IGF-1/HGF 2x. (H-I) Algunas CSC c-kit^{pos} (blanco) expresaron los factores de transcripción, GATA6 (H; gris) y Ets-1 (I; gris), indicativos de diferenciación de las células del músculo liso y las células endoteliales, respectivamente.

10 Figura 5. La administración intracoronaria de IGF-1/HGF induce una nueva formación sustancial de miocitos después de un AMI.

(A-B) Bandas regeneradoras de pequeños miocitos recién formados BrdU^{pos} (blanco), (gris; α -actina sarcomérica, α -Sarc Act) en las regiones de infarto de corazones de cerdo tratados con GF-1x (A) y GF-4x (B). Obsérvese el aumento del tamaño de la banda de regeneración después de 4x la cantidad de administración de GF. También los miocitos son más densos, compactos y estructurados como miocardio después de 4x la cantidad de administración de GF. (C) Dentro de estas bandas de regeneración en la zona del infarto estaban pequeños miocitos proliferantes Ki67^{pos} (blanco) (gris; α -Sarc Act). (D-E) Miocitos pequeños recién formados BrdU^{pos} (núcleos blancos) (gris, citoplasma de α -Sarc Act) en la zona del borde después de las dosis de GF-1x (D) y GF-4x (E). (F) Pequeños miocitos Ki67^{pos} (blanco) (gris, α -Sarc Act) también estuvieron presentes en la zona del borde después de la inyección de GF. (G-H) La fracción de pequeños miocitos BrdU^{pos} y Ki67^{pos} aumentó significativamente en el borde pero más en la región del infarto después de la inyección de GF. *p <0,05 vs. CTRL, †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x, ‡p <0,05 vs. IGF-1/HGF 2x. (I) Un pequeño miocito mitótico Ki67^{pos} en la zona de infarto de un corazón de cerdo tratado con GF-4x.

25 Figura 6. La administración del factor de crecimiento aumentó la generación de nuevas estructuras vasculares y mejoró la función cardíaca en el corazón de cerdo infartado.

(A) Las estructuras arteriales recién formadas (BrdU, blanco, α -actina de músculo liso, SMA, blanco, cadena pesada de miosina, MHC, gris, DAPI, azul) fueron evidentes en la región infartada de corazones de cerdo tratados con GF. (B-C) Los capilares recién formados también fueron evidentes en las regiones infartadas después de la inyección de IGF-1 y HGF (BrdU, blanco, vWF, gris, DAPI, gris oscuro). (D-F) El número de capilares en cerdos tratados con GF aumentó significativamente en la zona de infarto, en comparación con los CTRL tratados con solución salina (tinción de gris oscuro). *p <0,05 vs. CTRL, †p <0,05 vs. IGF-1/HGF 1x, ‡p <0,05 vs. IGF-1/HGF 2x. Las imágenes (20 aumentos) muestran la tinción de vWF (gris oscuro) en corazones CTRL tratados con solución salina (D) y en corazones tratados con GF-4x (E). Los capilares se definieron como vasos compuestos por 1 o 2 células endoteliales. (G-H) Los corazones tratados con GF mostraron una mejor fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LV) (G) y una mejor tensión radial (H), en comparación con los CTRL tratados con solución salina. *p <0,05 vs. basal, #p <0,05 vs. AMI, †p <0,05 vs. CTRL, ‡p <0,05 vs. GF-1x. (I) Rastreo representativo de la deformación radial por Doppler tisular a partir de cerdos CTRL (a-c) y de cerdos tratados con GF-4x (d-f). Los cerdos CTRL (b) y los cerdos tratados con GF-4x (e) tuvieron la misma desincronización de la contracción anteroseptal después de 90 minutos de oclusión coronaria (AMI). En el sacrificio (Post-MI), la contracción desincronizada empeoró en los cerdos CTRL (c) mientras que se mejoró en los cerdos tratados con GF (f).

Los resultados mostrados arriba demuestran que las dosis de microgramos de estos factores de crecimiento mejoran la remodelación miocárdica, fomentan la activación de las CSC residentes, lo que produce una nueva formación extensa de miocardio, mejorando la función del ventrículo izquierdo de una manera dependiente de la dosis en un corazón animal de tamaño y anatomía similar al ser humano utilizando un protocolo implementable clínicamente. Por lo tanto, la inyección de IGF-1/HGF produjo una amplia variedad de efectos beneficiosos sobre la remodelación cardíaca y la regeneración de células autólogas que fueron proporcionales a la dosis de GF administrada.

Figura 7. Muestra la imagen en microscopio óptico de las partículas de PLGA que contienen IGF-1 obtenidas con la fórmula descrita anteriormente.

50 Figura 8. Muestra una micrografía electrónica del mismo lote de partículas que se muestra en la figura anterior.

Figura 9. Muestra secciones de los corazones del cerdo n° 1 (imagen izquierda) y del cerdo n° 2 (imagen derecha). La pared anterior del ventrículo izquierdo, irrigada por la arteria coronaria izquierda, del cerdo n° 1 muestra una serie de microinfartos (áreas más pálidas), mientras que el miocardio del cerdo n° 2 es normal, como se ve por la coloración uniforme.

55 Figura 10A. Secciones del miocardio del cerdo n° 3, sacrificado 30 minutos después de la administración de una mezcla de perlas de poliestireno (perlas rojas, que se muestran en la figura como grises, de mayor diámetro, círculos lisos) y perlas de PLGA + factores de crecimiento (perlas verdes, que se muestran en la figura como perlas blancas, diámetro más pequeño y forma más irregular). La aparente diferencia de tamaño entre las partículas rojas y verdes

es debida a la mayor fluorescencia del rojo

Figuras 10B y 10C. Muestran secciones del miocardio del cerdo nº 4, sacrificado 24 horas después de la administración de una mezcla de perlas de poliestireno ((perlas rojas, que se muestran en la figura como grises, de mayor diámetro, círculos lisos) y perlas de PLGA + factores de crecimiento (perlas verdes, que se muestran en la figura como perlas blancas, diámetro más pequeño y forma más irregular). La relación de perlas verdes a rojas es significativamente menor en este animal debido a la degradación de las micropartículas de PLGA. En los cuatro paneles de la izquierda solo se detectan las perlas rojas, mientras que en los de la derecha la proporción es más próxima a 1:1.

Figura 11. Muestra secciones microscópicas de dos áreas del cerdo nº 4. Los miocitos están en gris. Los núcleos en gris más oscuro. Las células madre cardíacas (CSC) endógenas se identifican por una punta de flecha (superior) y una flecha (inferior). Sus membranas están marcadas en verde más claro. En la figura superior, los núcleos están limpios porque las células son quiescentes. En la figura inferior, todas las CSC tienen una mancha gris pálido en los núcleos que identifica a la proteína Ki-67 como un marcador de las células que han entrado en el ciclo celular.

Figura 12. La administración local de IGF-1 y HGF encapsulados en microesferas de PLGA de 15 µm mejora la regeneración del músculo esquelético dañado.

Imágenes histológicas de músculo cuádriceps de control y dañado. Panel A: Imagen histológica del músculo izquierdo (control) cinco días después de producir la lesión en el músculo derecho. No se administró ningún tratamiento a esta pierna. Panel B: Sección histológica de un cuádriceps derecho cinco días después de producir el daño sin ningún tratamiento (control dañado). Las puntas de flecha apuntan a dos de las varias áreas extensas de necrosis celular donde una concentración de núcleos parece que inicia una reacción regenerativa. Panel C: biopsia derecha del cuádriceps derecho 3 días después de la lesión tratada con una mezcla de microesferas cargadas con IGF-1 y microesferas cargadas con HGF con un equivalente total administrado de 16 µg de IGF-1 y 4 µg de HGF. Las puntas de flechas apuntan hacia microfibras jóvenes en las áreas dañadas en un proceso de regeneración. Panel D: Biopsia del mismo músculo que se muestra en el Panel C dos días después (5 días después de la lesión). Las fibras oscuras de menor tamaño son fibras regeneradas marcadas con un anticuerpo frente a la cadena pesada de miosina embrionaria, un marcador o fibras regeneradas. La imagen en este panel es el equivalente a la del panel B. La diferencia llamativa entre las dos imágenes muestra la eficacia de la terapia.

Figura 13. Mejora de la capacidad regenerativa del miocardio por la combinación de IGF-1/HGF/SCF administrada intracoronariamente encapsulada en microesferas de PLGA de 15 µm de diámetro

El gráfico de barras de la figura 13A compara el efecto en el número de miocitos cardíacos regenerados en cerdos post-AMI tratados con una combinación de dos tipos de microesferas, barras blancas (un tipo cargado con IGF-1 y el otro con HGF) con los animales tratados con una combinación de tres tipos de microesferas (hrIGF-1, hrHGF y hrSCF), barras negras. Es obvio que a las tres concentraciones diferentes utilizadas, la combinación de 3 tipos de microesferas, cada una cargada con un factor diferente, es superior a la combinación de solo dos. CTRL = animales de control tratados con placebo; Barras blancas: dosis 1X animales que recibieron la administración de microesferas cargadas con el equivalente de 2 µg de IGF-1 y 0,5 µg de HGF biológicamente activo; 2X = 4 µg de IGF-1 y 1 µg de HGF y 4X = 8 µg de IGF-1 y 2 µg de HGF. Barras negras: las mismas cantidades de IGF-1 y HGF que para los animales representados por las barras blancas más microesferas cargadas con SCF equivalente a 2, 4 y 8 µg de hrSCF biológicamente activo

La Figura 13B muestra la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LV) antes, inmediatamente después y 4 semanas después del AMI según se determina por ecocardiografía de los cerdos tratados con diferentes combinaciones de microesferas. Línea base = fracción de eyección del LV justo antes del AMI; AMI = fracción de eyección del LV después del AMI; Post-AMI = Fracción de eyección del LV 4 semanas después del AMI y de tratamiento local con GF. C = animales control tratados con placebo post-AMI; O = animales tratados con dosis 4X de IGF-1 + HGF en solución por vía intracoronaria; ▼ = animales tratados con una dosis 4X de IGF-1 + HGF encapsulada en microesferas de PLGA administradas justo aguas abajo del sitio de oclusión coronaria; Δ = animales tratados con una dosis 4X de IGF-1 + HGF + SCF encapsulados por separado en microesferas de PLGA administradas justo aguas abajo del sitio de oclusión coronaria.

A lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa expuesto o

Las realizaciones de la divulgación se describen aquí como que comprenden números enteros. La descripción se extiende también a realizaciones separadas que consisten en o consisten esencialmente en dichos números enteros.

También se prevé específicamente que la divulgación se extienda a combinaciones de una o más realizaciones descritas en la presente memoria, cuando sea técnicamente factible.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para administración intraarterial aguas arriba de un tejido diana, que comprende partículas esféricas que contienen un ingrediente activo y un excipiente biodegradable, en donde:
- 5 el diámetro medio de las partículas es de 15 micras y el 99 % o más de las partículas tienen un diámetro de 15 ± 1 micras;
- el diámetro de 15 ± 1 micras hace posible la retención de partículas en un tejido diana después de la administración de la formulación farmacéutica aguas arriba del tejido diana; y
- la formulación está sustancialmente libre de partículas con un diámetro mayor que 50 micras y menor que 5 micras;
- 10 de tal manera que cuando la formulación se administra aguas arriba del tejido diana, la capacidad del ingrediente activo de pasar a través del tejido diana y pasar a la circulación sistémica se restringe gracias al atrapamiento de las partículas en los capilares del tejido diana.
2. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, en donde el ingrediente activo es un factor de crecimiento seleccionado de la lista que consiste en: HGF (factor de crecimiento de hepatocitos); IGF (factor de crecimiento insulínico) tal como IGF-1; PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) tal como PDGF- β , FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) tal como aFGF (FGF-1) o bFGF (FGF-2) y FGF-4; SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales); EGF (factor de crecimiento epidérmico); VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular); eritropoyetina (EPO); TGF β (factor de crecimiento transformante β); G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos); GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), proteínas morfogenéticas óseas (BMP, BMP-2, BMP-4); activina A; IL-6; neurotrofinas, por ejemplo, NGF (factor de crecimiento del nervio), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-3 (neurotrofina-3), NT-4 (neurotrofina-4) y neurotrofina-1; TPO (trombopoyetina); GDF-8 (miostatina); GDF9 (factor de diferenciación de crecimiento 9) y periostina.
- 15 20
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende un ingrediente activo seleccionado del grupo que consiste en HGF, IGF-1 y la combinación de los mismos.
4. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración del ingrediente activo está en el intervalo de 1 ng por 1×10^6 partículas hasta 4 mg por 1×10^6 microesferas.
- 25
5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tejido diana es tejido cardíaco.
6. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el excipiente biodegradable se selecciona de la lista que consiste en ácido poliláctico, poli-glicolida, ácido poli(láctico-co-glicólico), policaprolactona, polihidroxibutirato, poliuretanos, polisacáridos, proteínas, poliaminoácidos, carbohidratos, quitosano, heparina y ácido polihialurónico.
- 30
7. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el excipiente biodegradable se selecciona de la lista que consiste en ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y alginato.
8. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, para uso en la regeneración de tejido cardíaco estimulando las células madre cardíacas mediante la administración intraarterial aguas arriba del tejido diana.
- 35
9. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, para el tratamiento de infarto de miocardio (MI) agudo o crónico, cardiopatía isquémica, con o sin infarto de miocardio.
10. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, para uso en la regeneración de un tejido sólido en un mamífero mediante la administración intraarterial aguas arriba del tejido diana.
- 40

FIGURA 1

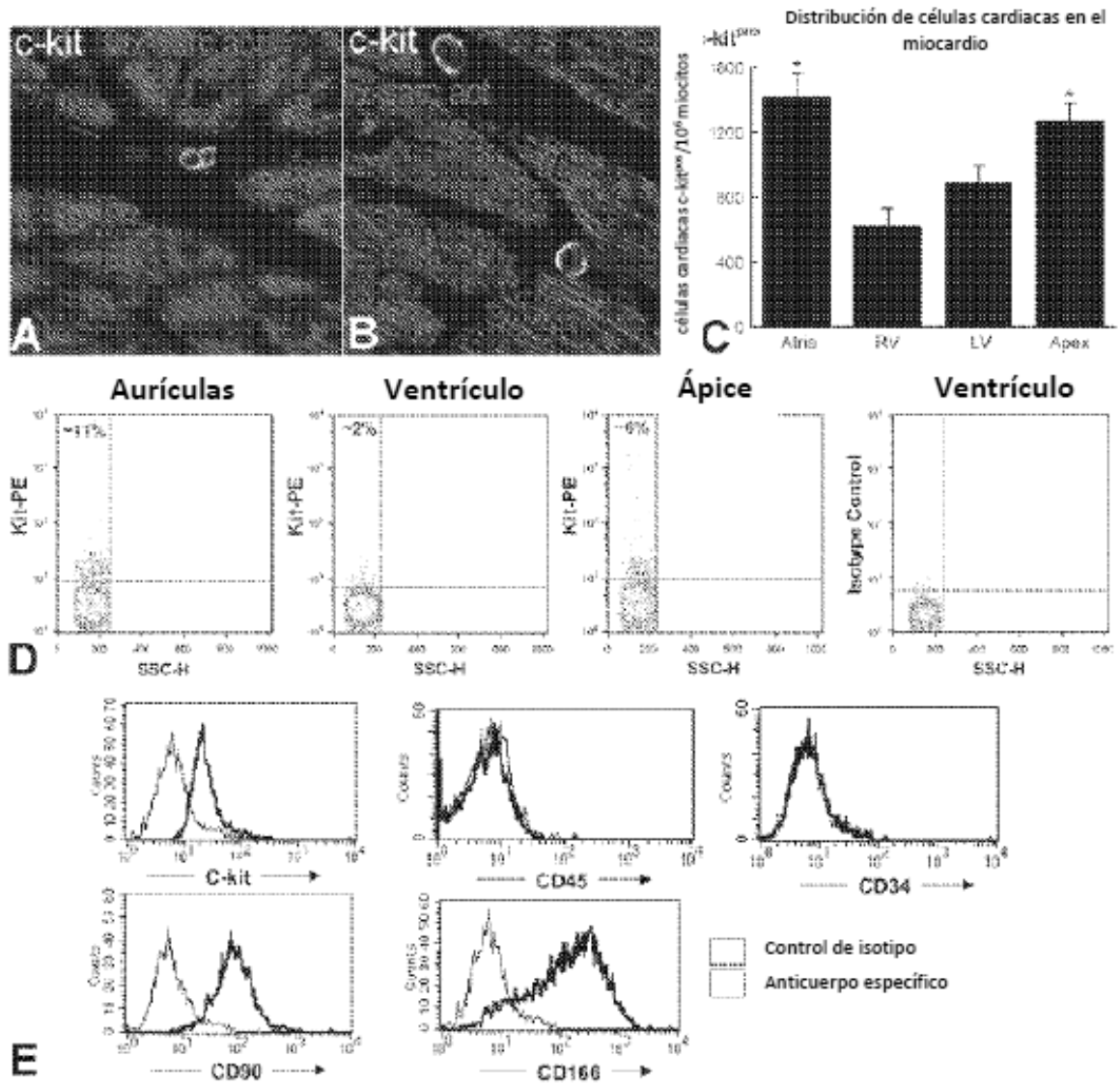


FIGURA 2

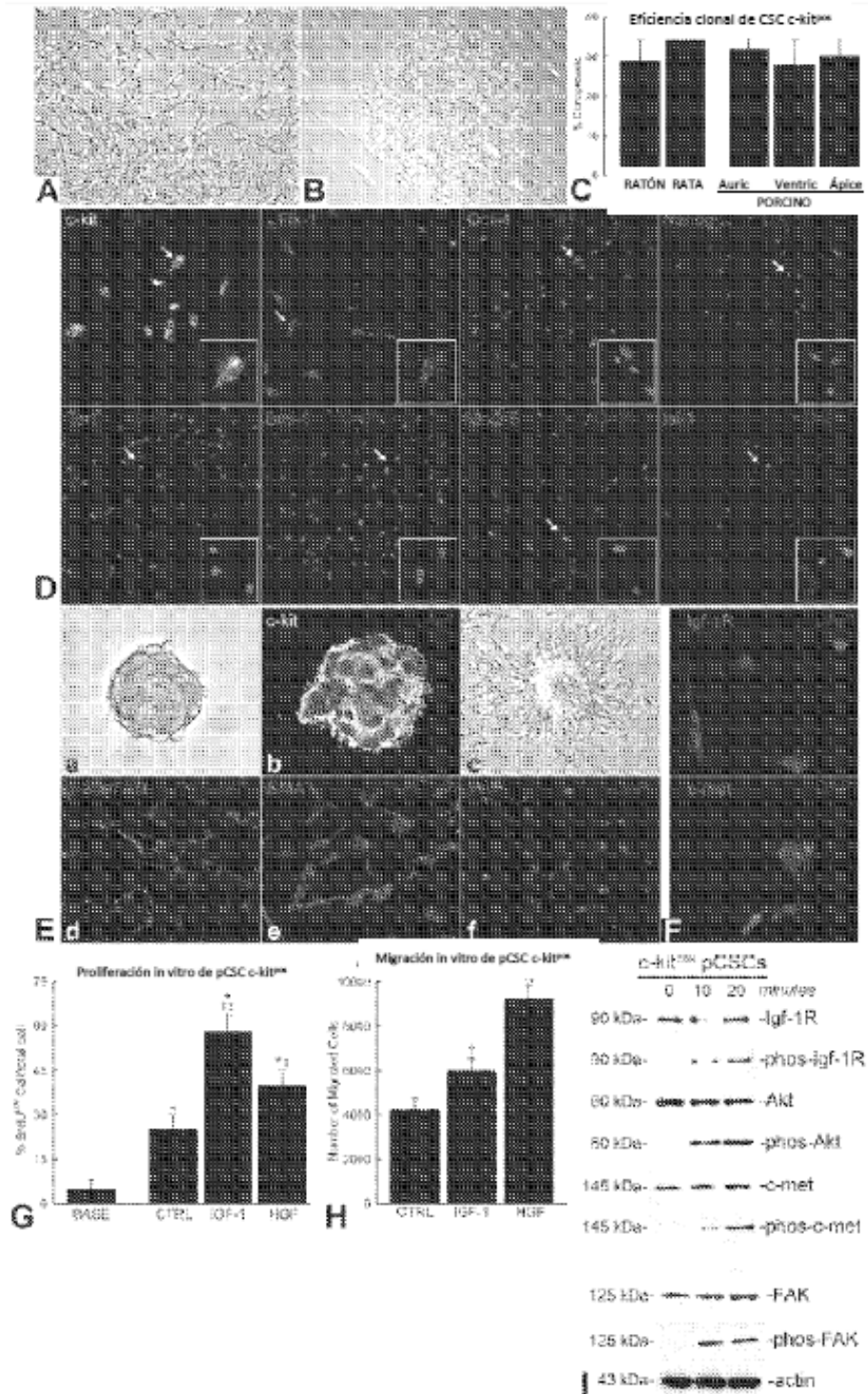


FIGURA 3

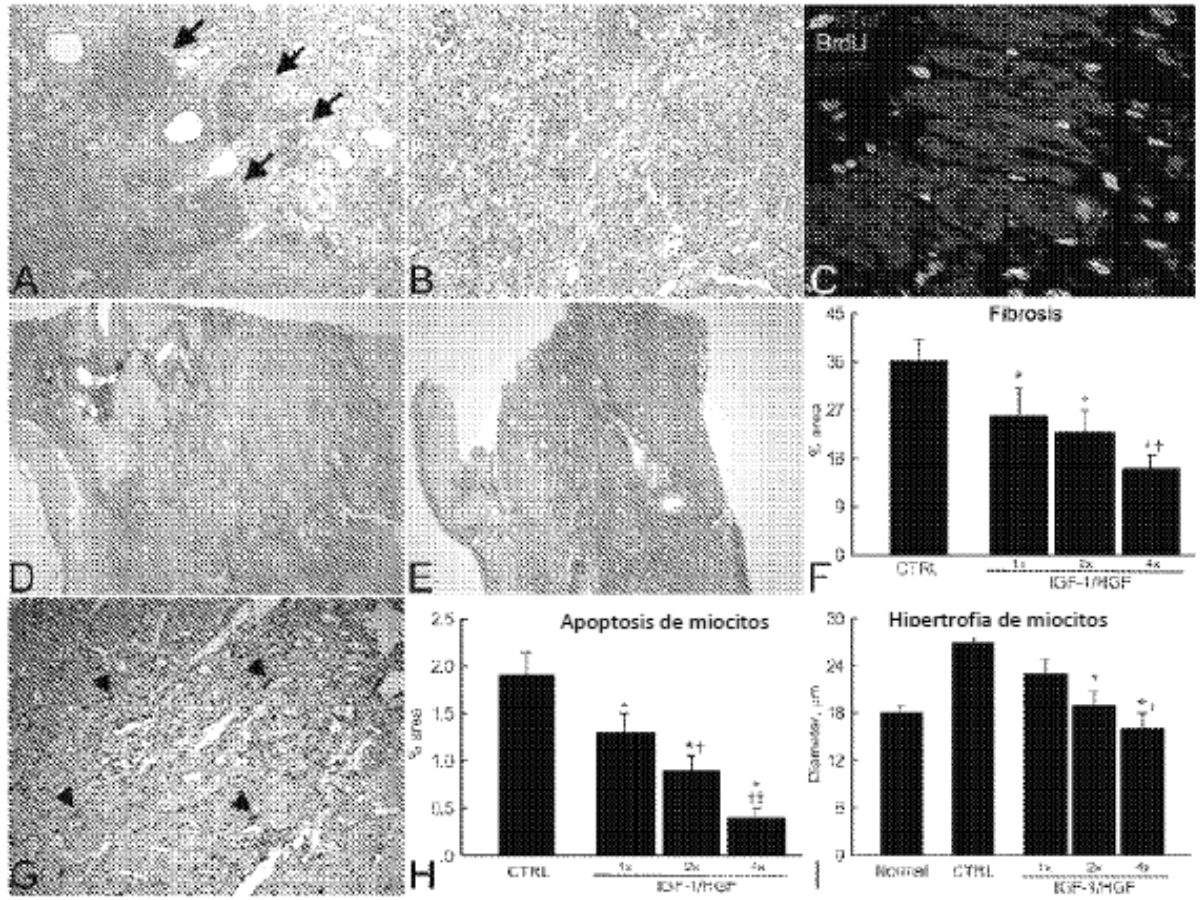


FIGURA 4

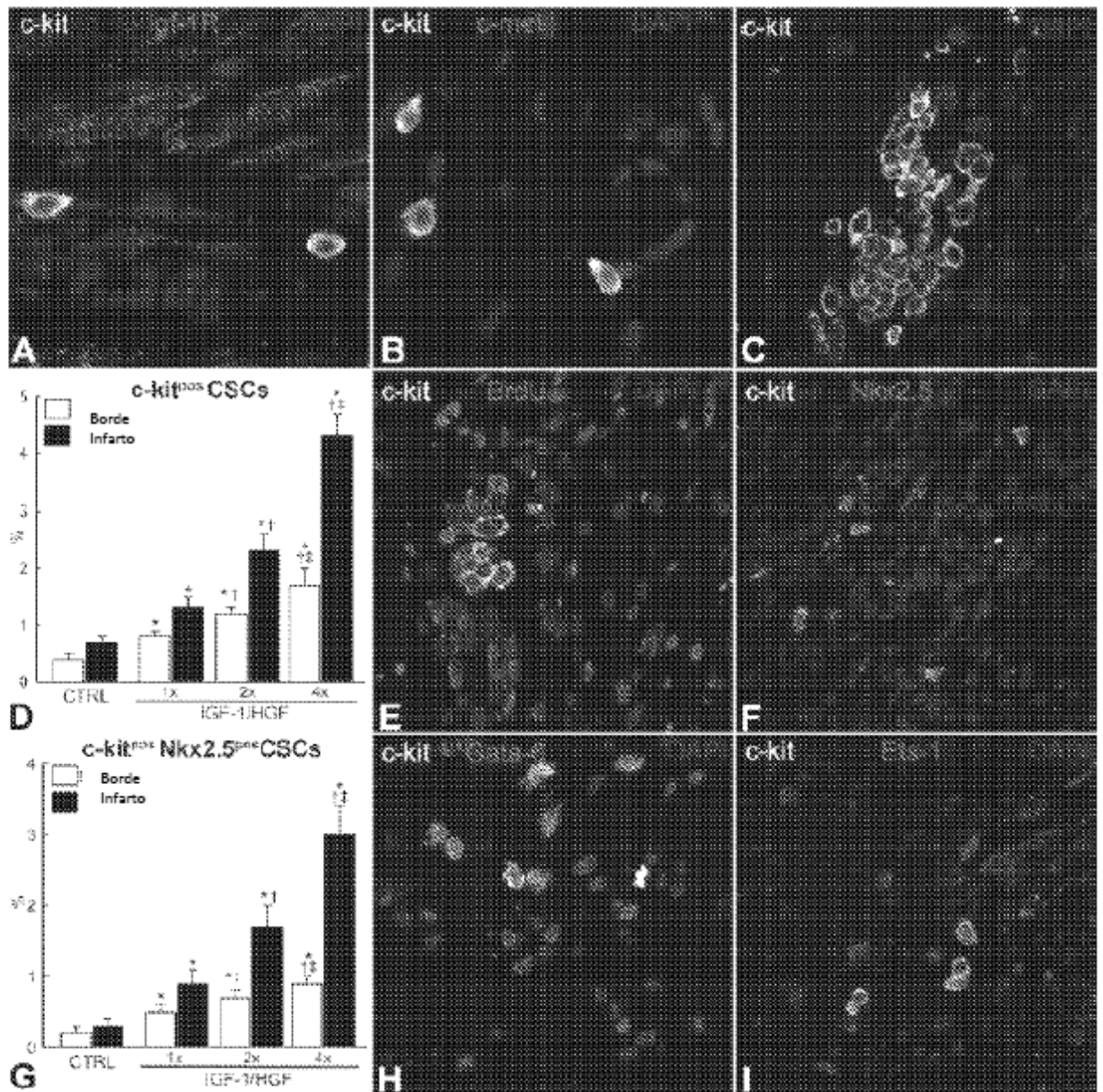


FIGURA 5

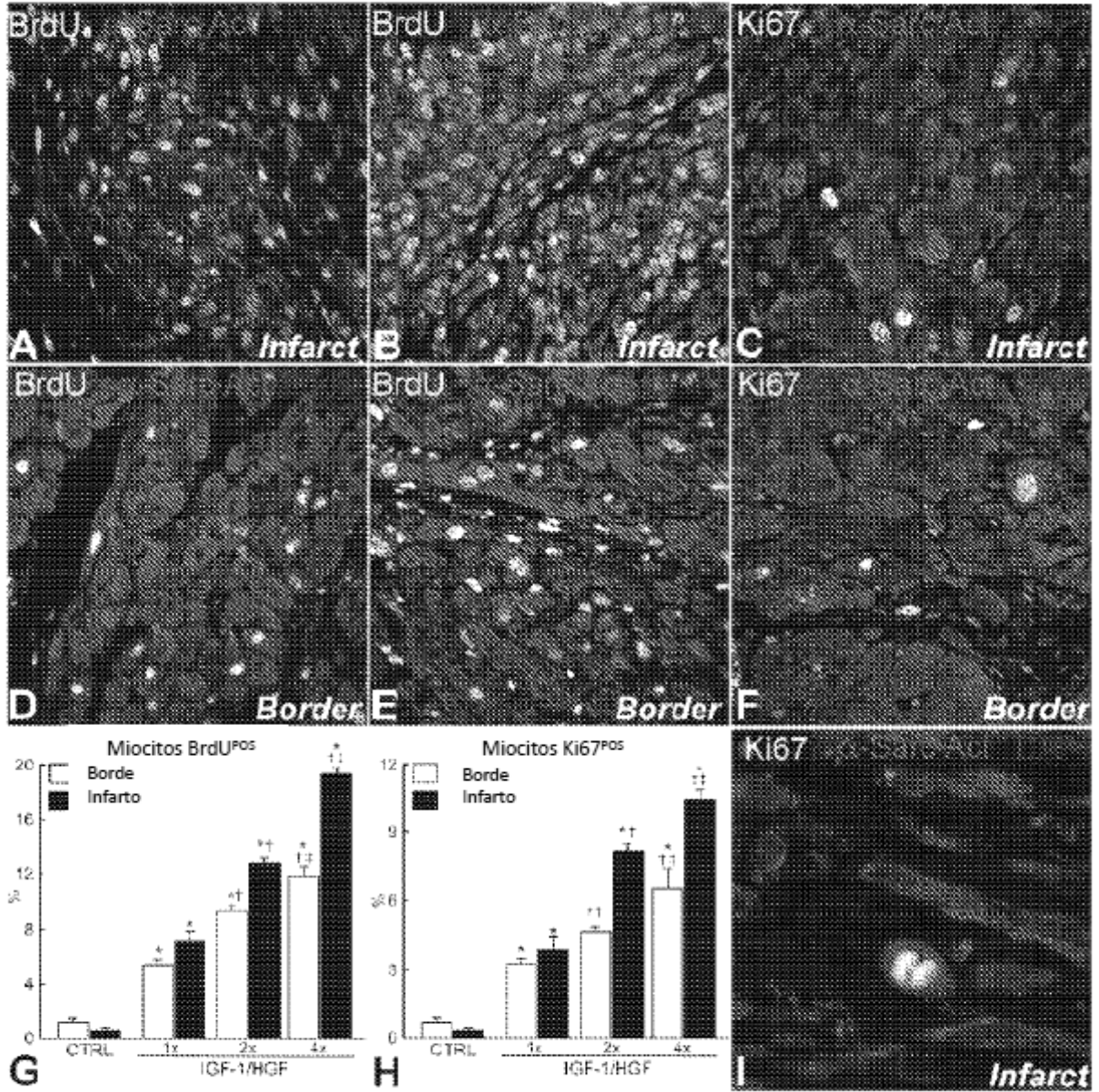
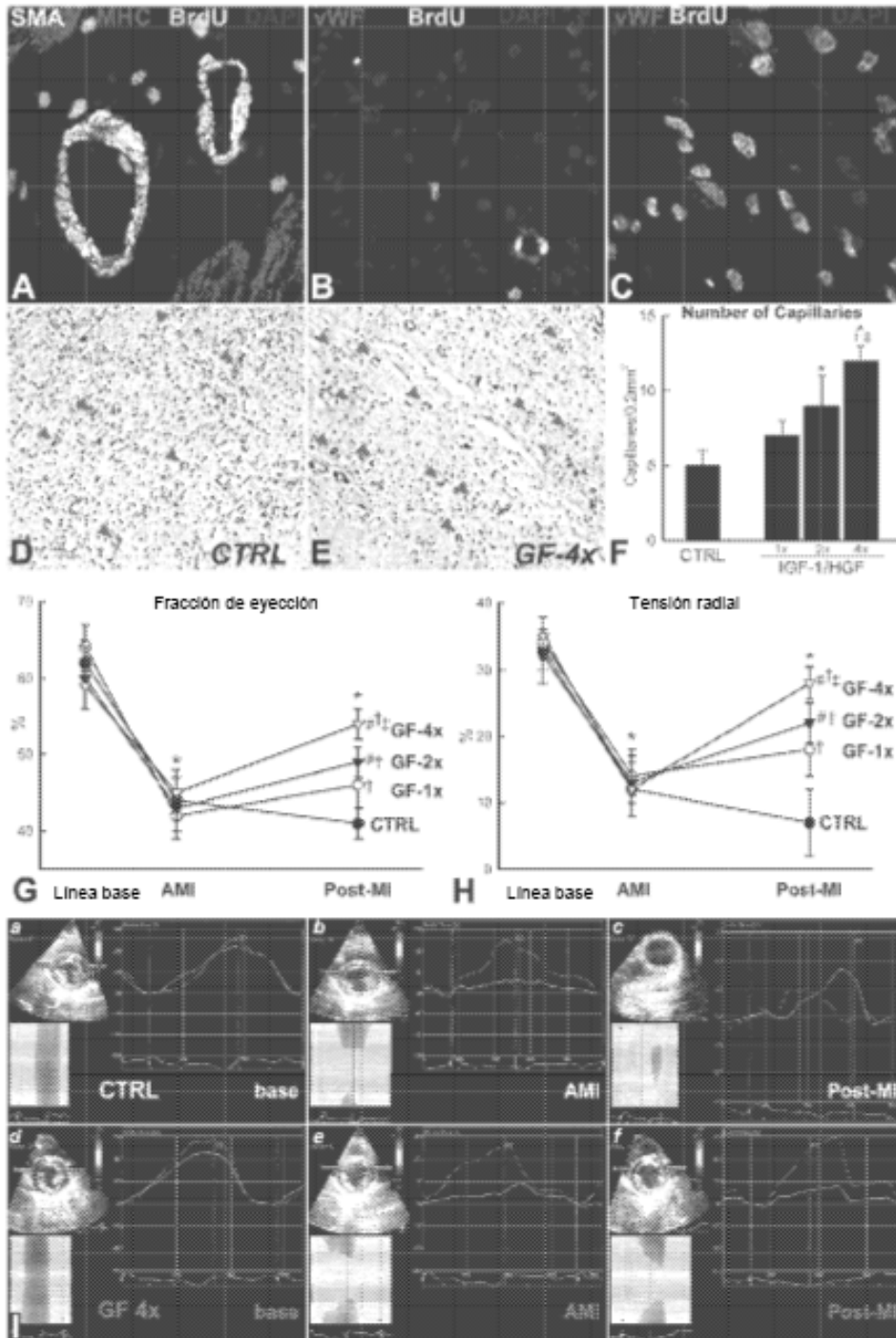


FIGURA 6



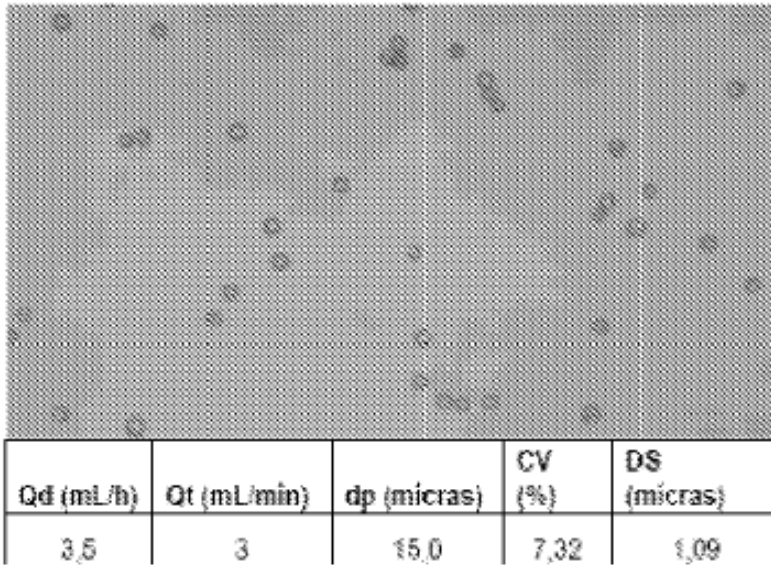


Figura 7. Imagen en microscopio óptico de las partículas de PLGA que contienen IGF-1 obtenidas con la fórmula descrita anteriormente.

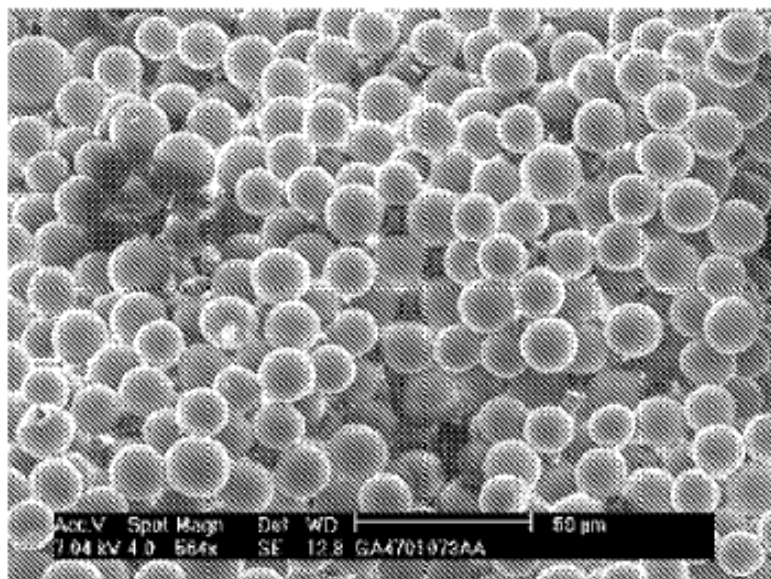


Figura 8. Micrografía electrónica del mismo lote de partículas mostrado en la figura anterior

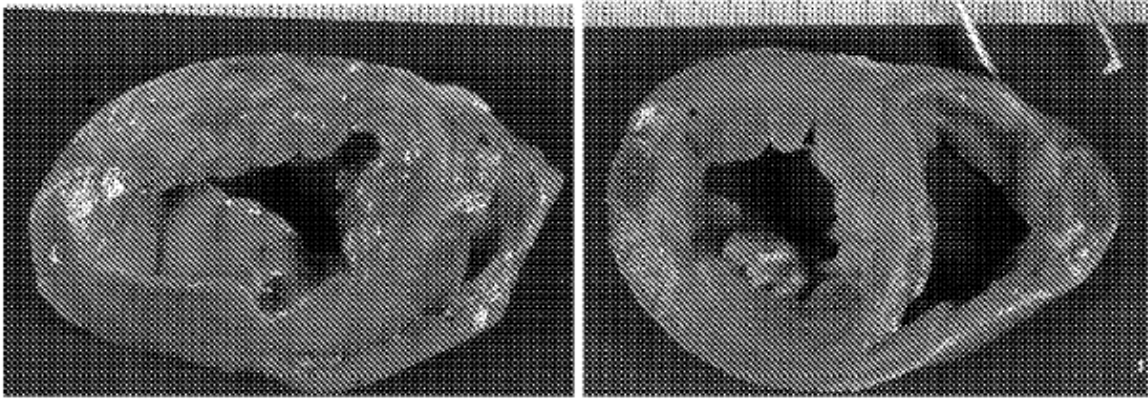


FIGURA 9

Secciones de los corazones del cerdo nº 1 (imagen izquierda) y del cerdo nº 2 (imagen derecha). La pared anterior del ventrículo izquierdo, irrigada por la arteria coronaria izquierda, del cerdo nº 1 muestra una serie de microinfartos (áreas más pálidas), mientras que el miocardio del cerdo nº 2 es normal, como se ve por la coloración uniforme.

Figura 10. Secciones del miocardio del cerdo nº 3, sacrificado 30 minutos después de la administración de una mezcla de perlas de poliestireno (perlas rojas, que se muestran en la figura como grises, de mayor diámetro, círculos lisos) y perlas de PLGA + factores de crecimiento (perlas verdes, que se muestran en la figura como perlas blancas, diámetro más pequeño y forma más irregular). La aparente diferencia de tamaño entre las partículas rojas y verdes es debida a la mayor fluorescencia del rojo

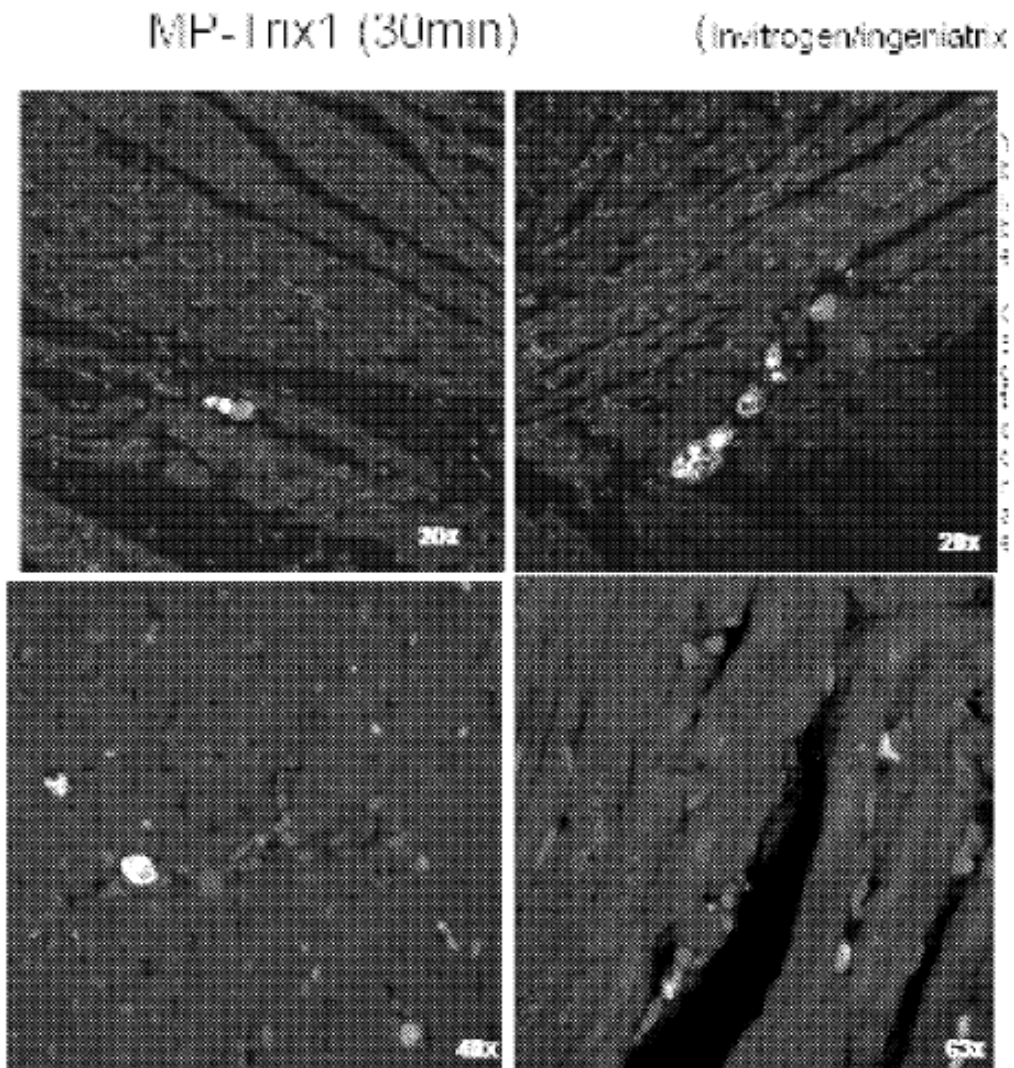


FIGURA 10A

MP-Trix2 (24H)

(in vitro) (in vitro) (in vitro) (in vitro)

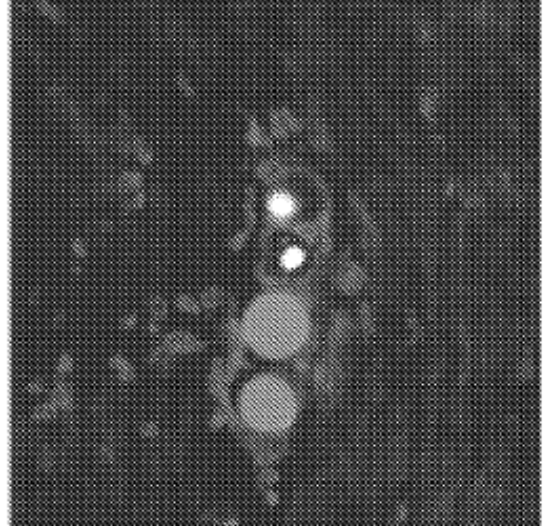
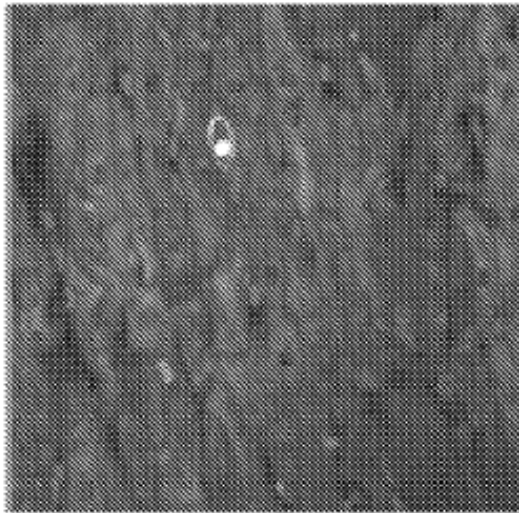
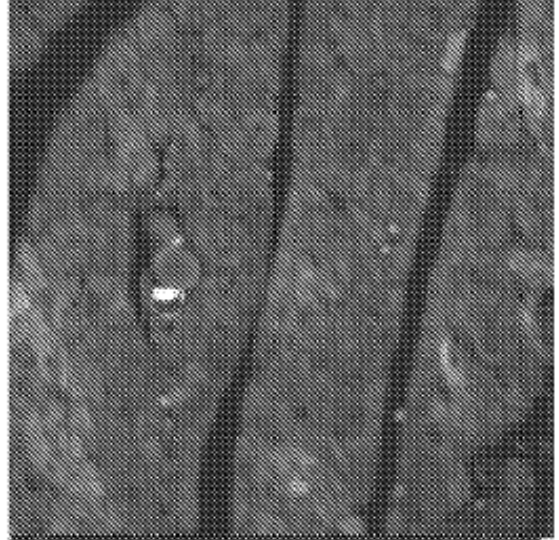
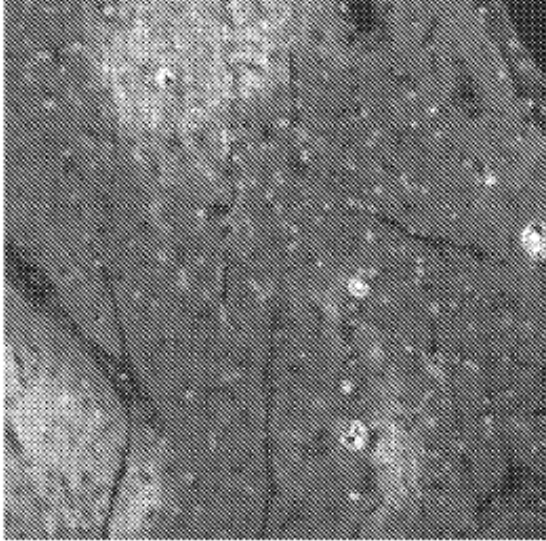


FIGURA 10B

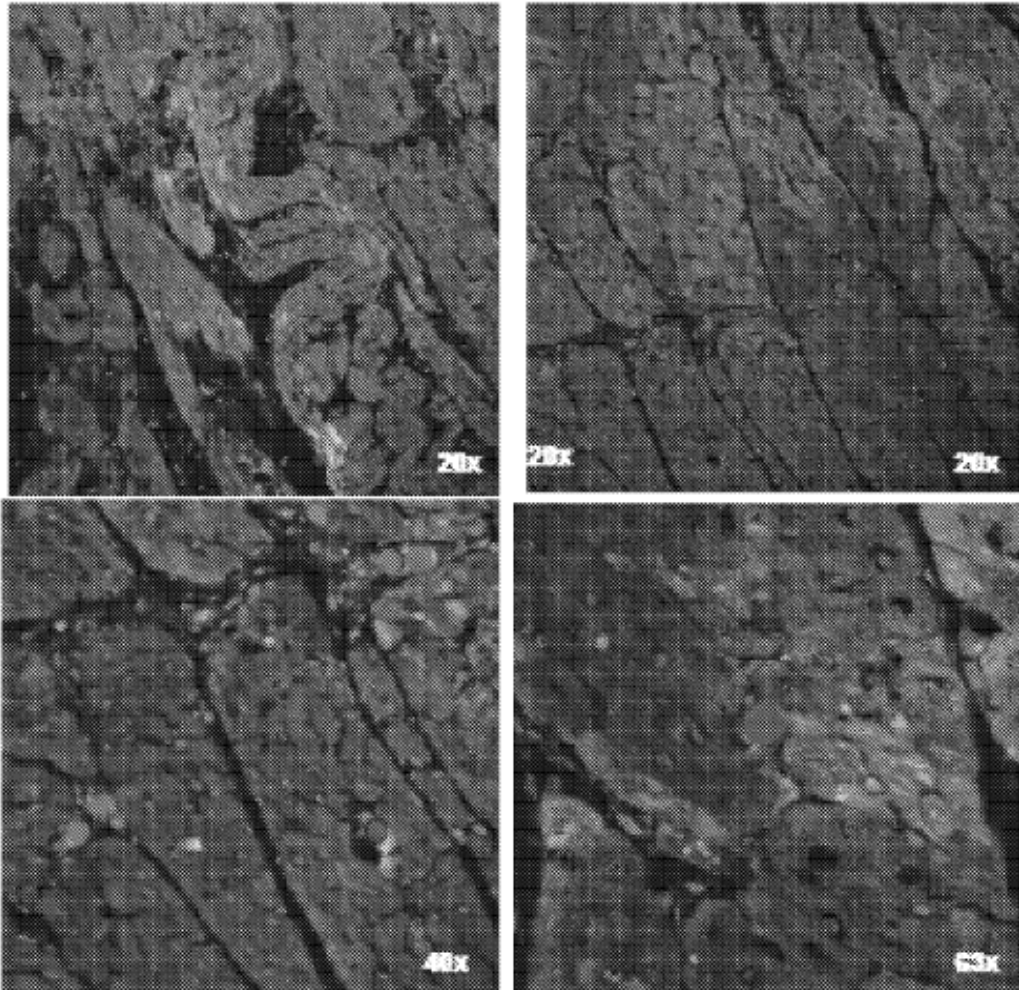
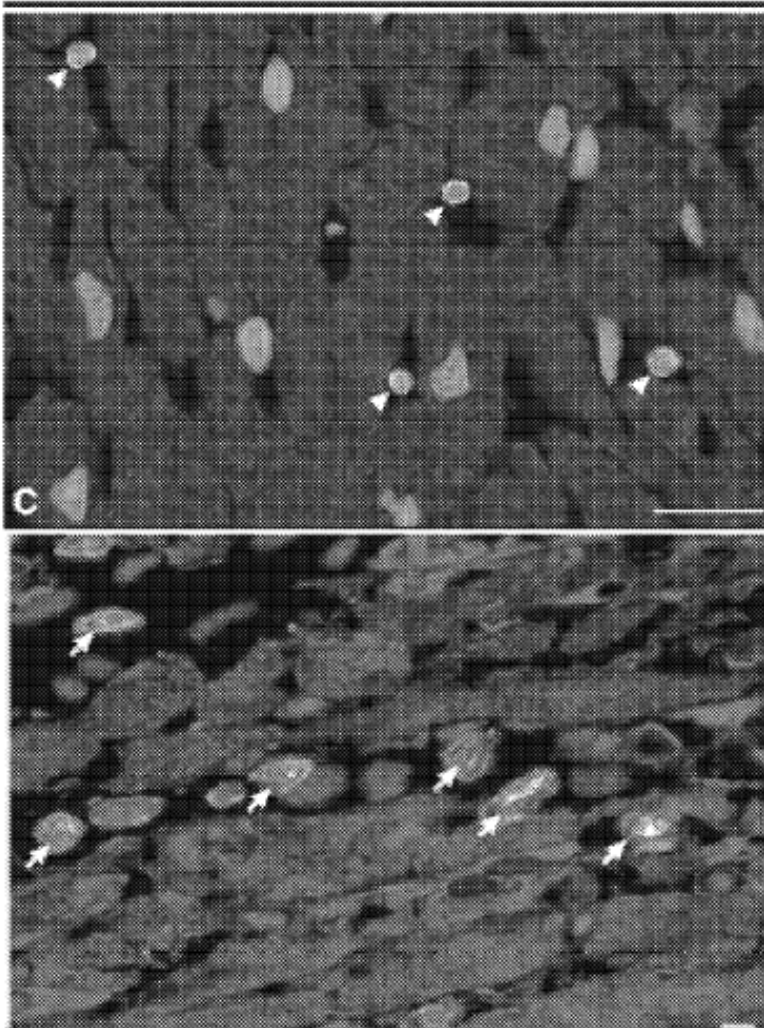


FIGURA 10C

Figura 10B y 10C

Secciones del miocardio del cerdo n° 4, sacrificado 24 horas después de la administración de una mezcla de perlas de poliestireno ((perlas rojas, que se muestran en la figura como grises, de mayor diámetro, círculos lisos) y perlas de PLGA + factores de crecimiento (perlas verdes, que se muestran en la figura como perlas blancas, diámetro más pequeño y forma más irregular). La relación de perlas verdes a rojas es significativamente menor en este animal debido a la degradación de las micropartículas de PLGA. En los cuatro paneles de la izquierda solo se detectan las perlas rojas, mientras que en los de la derecha la proporción es más próxima a 1:1.

FIGURA 11



Secciones microscópicas de dos áreas del cerdo nº 4. Los miocitos están en gris. Los núcleos en gris más oscuro. Las células madre cardíacas (CSC) endógenas se identifican por una punta de flecha (superior) y una flecha (inferior). Sus membranas están marcadas en verde más claro. En la figura superior, los núcleos están limpios porque las células son quiescentes. En la figura inferior, todas las CSC tienen una mancha gris pálido en los núcleos que identifica a la proteína Ki-67 como un marcador de las células que han entrado en el ciclo celular.

FIGURA 12

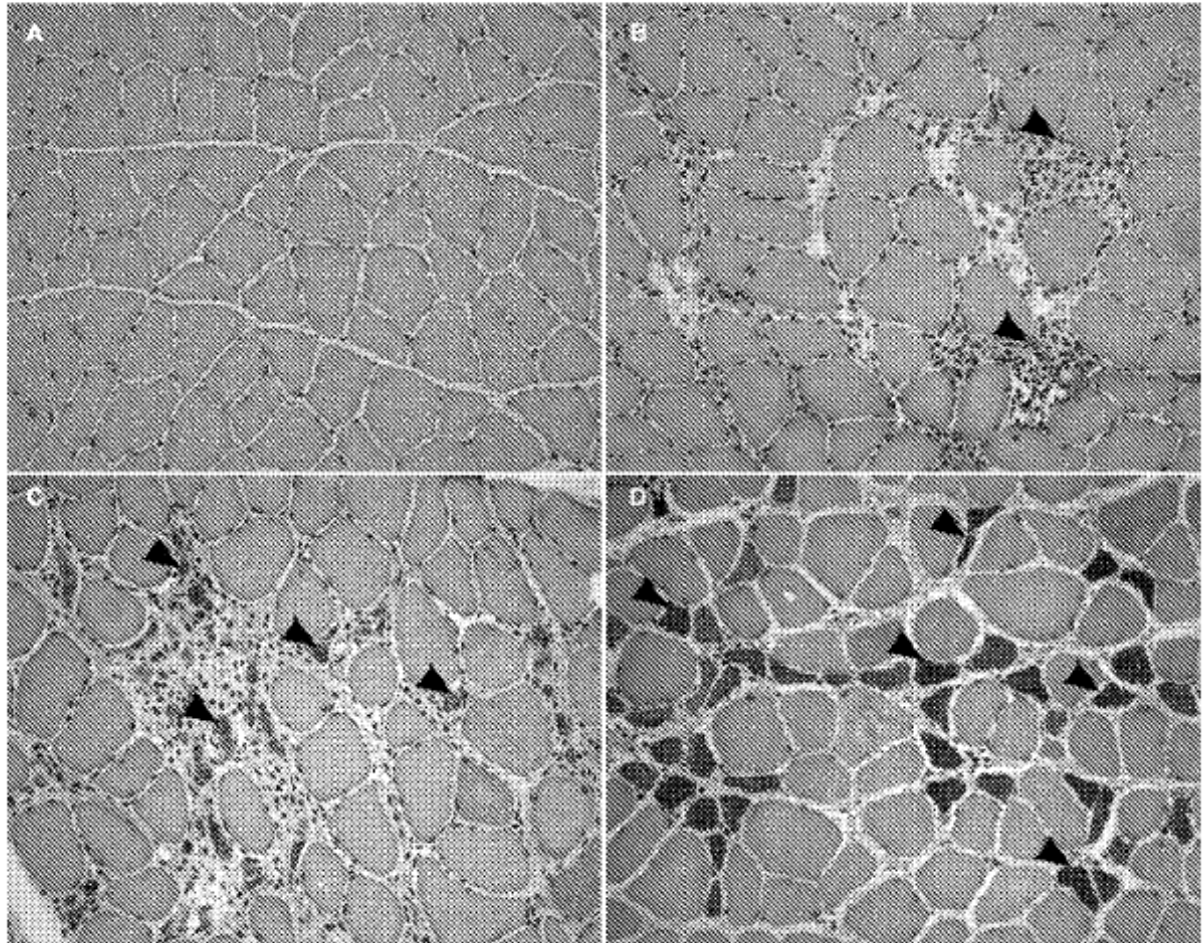


FIGURA 13A

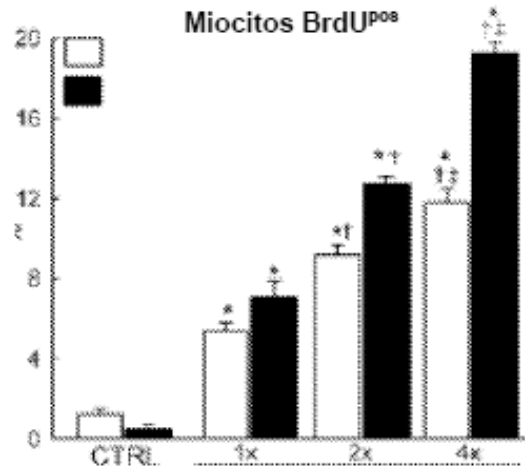


FIGURA 13B

