(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 682 255**

(51) Int. CI.:

A61K 31/5575 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2012 PCT/US2012/066984**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082241**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2012 E 12852924 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2785350**

(54) Título: **Métodos mejorados de tratamiento de isquemia**

(30) Prioridad:

02.12.2011 US 201161566494 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.09.2018

(73) Titular/es:

FATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
Suite 200, 3535 General Atomics Court
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es:

SHOEMAKER, DAN;
MULTANI, PRATIK S.;
MENDLEIN, JOHN D. y
ROBBINS, DAVID

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Métodos mejorados de tratamiento de isquemia

Antecedentes

Campo técnico

La presente invención se refiere generalmente a composiciones y métodos de tratamiento de isquemia. En particular, la presente invención se refiere al uso de células madre y/o progenitoras que tienen propiedades terapéuticas potenciadas para tratar un tejido isquémico y/o el daño de tejido isquémico resultante.

Descripción de la técnica relacionada

La viabilidad de células, tejidos y órganos en el cuerpo humano depende de una circulación sanguínea adecuada. La circulación sanguínea adecuada abastece a las células de oxígeno, glucosa, y muchos nutrientes necesarios que son importantes para la regulación de la fisiología y metabolismo celular. La circulación sanguínea adecuada también permite que célula y tejidos respondan apropiadamente a condiciones medioambientales que plantean un riesgo de daño o estrés al tejido.

La alteración de la circulación sanguínea a tejidos y órganos se conoce como isquemia. La isquemia puede ser aguda o crónica. Formas tanto agudas como crónicas de isquemia producen la pérdida de nutrientes adecuados para las células y, si se prolonga, producirá condiciones hipóxicas y/o anóxicas. Si la isquemia se deja sin tratar, las células pueden experimentar necrosis o apoptosis, arriesgando así la integridad y salud del tejido u órgano.

La isquemia afecta a millones de pacientes en los Estados Unidos cada año. La isquemia se produce por una variedad prácticamente ilimitada de condiciones genéticas, agresiones medioambientales, lesión traumática o intervención quirúrgicas. Los tipos más comunes de pacientes con isquemia padecen incluyen, pero no se limitan a, isquemias cerebrales, lesiones de médula espinal, isquemias cardiovasculares, isquemias de las extremidades, isquemias intestinales, isquemias renales, isquemias dérmicas (por ejemplo, quemaduras y heridas por congelación) e isquemias resultantes de procedimientos médicos y quirúrgicos, que incluyen, pero no se limitan a, trasplantes de órganos e injertos de piel.

La isquemia cerebral, denominada accidente cerebrovascular, es la tercera causa principal de muerte y la principal causa de incapacidad grave a largo plazo en los Estados Unidos (Centros de EE.UU. para el Control y Prevención de Enfermedades). Más de 140.000 personas mueren cada año de accidente cerebrovascular en los Estados Unidos. Ídem. Cada año, aproximadamente 795.000 perdonas sufren un accidente cerebrovascular. Ídem. Aproximadamente 600.000 de éstos son primeros ataques, y 185.000 son ataques recurrentes. Ídem. El accidente cerebrovascular es la interrupción o reducción de la circulación sanguínea en las arterias que alimentan el cerebro. Cuando se priva de sangre, y así, oxígeno y glucosa, el tejido cerebral puede experimentar necrosis isquémica o infarto. Los eventos metabólicos que se cree que subyacen a tal degeneración y muerte celular incluyen: falta de energía mediante agotamiento de ATP; acidosis celular; liberación de glutamato; entrada de ión calcio; estimulación de la degradación de fosfolípidos de la membrana y posterior acumulación de ácidos grasos libres; y generación de radicales libres.

Los infartos de miocardio y la angina producen isquemia miocárdica. Se producen 1,5 millones de infartos de miocardio en los Estados Unidos cada año. *Ídem.* Casi 14 millones de estadounidenses tienen una historia de infarto de miocardio o angina. *Ídem.* Más de 500.000 muertes anualmente pueden atribuirse a infartos de miocardio. *Ídem.* Se produce un infarto de miocardio aproximadamente cada 20 segundos con una muerte por infarto de miocardio aproximadamente cada minuto. *Ídem.* Los costes relacionados con el infarto de miocardio superaron los 60 billones de dólares por año. *Ídem.* La isquemia miocárdica se produce cuando el músculo del corazón no recibe un riego sanguíneo adecuado y así se priva de los niveles necesarios de oxígeno, glucosa y nutrientes, produciendo angina, y en muchos casos, infarto (necrosis) del músculo miocárdico.

Otra causa común de isquemia miocárdica es la aterosclerosis, que es la formación progresiva de placa – depósitos grasos y otras células - en las paredes de nuestras arterias que producen bloqueos en los vasos sanguíneos (arterias coronarias) que abastecen circulación sanguínea al músculo del corazón. Antes de llegar a los 35, dos de cada tres estadounidenses tendrán algún grado de formación de placas en sus arterias. Heart Disease and Stroke Statistics: 2009 Update. American Heart Association. 13 de enero de 2009. La aterosclerosis es normalmente una afección lenta y progresiva que frecuentemente produce enfermedad cardíaca coronaria (CHD) - la principal causa de muerte en los Estados Unidos. El coste directo e indirecto estimado total de la enfermedad cardíaca coronaria y accidente cerebrovascular en 2009 fue de 234,3 billones de dólares. *Ídem.*

La lesión de médula espinal es la complicación más grave de traumatismo de la columna vertebral y también de operaciones en la aorta para el tratamiento de aneurismas torácicas y toracoabdominales (Kouchoukos. Thorac. Cardiovasc. Surg. 99:659-664, (1990)). Como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.648.331, la médula espinal

es el órgano más sensible a la isquemia durante el pinzamiento transversal de la aorta, donde la lesión resultante puede producir paraparesia o paraplejia. La isquemia y paraplejia de la médula espinal se desarrollan en aproximadamente el once por ciento (11 %) de los pacientes que se someten a reparación de aneurisma torácica y toracoabdominal descendente programada y casi el cuarenta por ciento (40 %) que se someten a reparaciones urgentes (Crawford. Vas. Surg. 3:389-402, (1986)).

Los eventos isquémicos que afectan los intestinos desempeñan una función importante de la mortalidad y morbilidad de numerosos pacientes. Como se describe en la patente de EE.UU. N.º 6.191.109, la lesión isquémica al intestino delgado conduce a la destrucción de mucosa, translocación bacteriana y perforación. Las arterias mesentéricas suministran sangre a nuestros intestinos delgados y gruesos. La isquemia se produce cuando nuestra sangre no puede circular a través de nuestras arterias y nuestros intestinos no reciben el oxígeno necesario para la digestión. La isquemia mesentérica puede ser aguda o crónica y normalmente implica al intestino delgado. Si se deja sin tratar, el bloqueo de las arterias mesentéricas puede empeorar y hacer que los tejidos en nuestro intestino mueran debido a que carecen de circulación sanguínea suficiente.

La isquemia crítica de las extremidades o ICE resulta de la obstrucción grave de las arterias, circulación sanguínea inadecuada o enfermedad arterial oclusiva, que disminuye gravemente la circulación sanguínea a las extremidades (manos, pies y piernas) y ha evolucionado hasta el punto de dolor grave e incluso úlceras y llagas de la piel. La ICE se diferencia de la isquemia aguda de extremidades, que generalmente sigue a la trombosis arterial o tromboembolia periférica. Pacientes con ICE frecuentemente padecen dolor grave producido por isquemia, pérdida de tejido, neuropatía isquémica, o una combinación de estos factores. Si se dejan sin tratar, las extremidades con isquemia pueden llegan a gangrenarse y requieren amputación.

La isquemia dérmica resulta de la falta de circulación sanguínea adecuada a la dermis, y es casi siempre el resultado de heridas, quemaduras o congelación. En las heridas por quemadura, la necrosis del tejido superficial de la escara de quemadura inicial es principalmente causada por el calor o agresión química y es esencialmente irreversible. Profunda y periférica a la necrosis de tejido superficial, existe un área considerable de lesión isquémica de tejido donde las células son viables, pero pueden ser fácilmente adicionalmente dañadas, si se dejan sin tratar. El área periférica a y por debajo de la zona isquémica se caracteriza por lesión de células mínima, pero con vasodilatación debido a mediadores inducidos por inflamación vecinos está todavía en riesgo de isquemia.

La congelación, hace tiempo casi exclusivamente un problema militar, está siendo cada vez más prevalente entre la población general. La investigación en la fisiopatología ha revelado similitudes sustanciales en procesos inflamatorios a aquellas observadas en quemaduras térmicas y por lesión de isquemia/reperfusión. Aunque el tratamiento quirúrgico de la congelación implica desbridamiento retardado 1 a 3 meses después de la demarcación, mejoras recientes en la evaluación radiológica de la viabilidad de tejido han conducido a una posibilidad de intervención quirúrgica anterior. Además, son posibles varias terapias complementarias, que incluyen vasodilatadores, trombólisis, oxígeno hiperbárico y simpatectomía.

Actualmente, la resolución de la isquemia aguda y crónica requiere la restauración de la perfusión de tejido y circulación sanguínea frecuentemente usando medios quirúrgicos, que además pone a los pacientes en riesgo de daño de tejido isquémico. La restauración de la circulación sanguínea después de un periodo de isquemia puede realmente ser más dañina que la isquemia. La reintroducción de oxígeno causa una mayor producción de radicales libres dañinos, además de permitir, mediante la eliminación de las condiciones ácidas extracelulares, la entrada de calcio y así sobrecarga de calcio. En general, esto causa lesión por reperfusión que puede producir posiblemente arritmias cardíacas mortales, también la necrosis puede ser enormemente acelerada. Otros tratamientos existentes que tratan el tejido isquémico incluyen oxígeno hiperbárico, trombolíticos intravenosos, agentes antiinflamatorios y administración local de promotores de la angiogénesis. Sin embargo, estos tratamientos se han cumplido generalmente con éxito limitado, si lo han tenido.

Por consiguiente, existe una necesidad sustancial en la materia de terapias de menor riesgo, más eficientes y de mayor duración que tratan daño de tejido resultante de isquemia y para mejorar los síntomas asociados con la misma.

Sumario de la invención

La invención generalmente proporciona composiciones de células madre y progenitoras para su uso en el tratamiento de tejido isquémico, tejido dañado por isquemia, y/o uno o más síntomas de la isquemia en un sujeto. Las composiciones son más eficientes que las terapias existentes y pueden usarse para tratar diversos tipos de isquemia. Debe entenderse que en realizaciones particulares de la invención, se contempla que puedan usarse en combinación dos cualquiera o más realizaciones desveladas en el siguiente sumario.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de aumento de la migración dirigida de células madre o progenitoras a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende tratar células madre o progenitoras *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos dos veces en las células madre o progenitoras

tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas; y administrar una composición que comprende las células madre o progenitoras tratadas a un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia.

En una realización particular, la presente invención contempla, en parte, un método de tratamiento de un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras tratadas *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En cierta realización, la presente invención contempla, en parte, un método de mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras tratadas *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de aumento de la migración dirigida de células madre o progenitoras a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende tratar células madre o progenitoras *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y opcionalmente, un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar el porcentaje (%) de migración en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas; y administrar una composición que comprende las células madre o progenitoras tratadas a un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia.

En otra realización particular, la presente invención contempla, en parte, un método de tratamiento de un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras tratadas *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar el porcentaje (%) de migración en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras tratadas *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar el porcentaje (%) de migración en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares, las células madre o progenitoras han sido tratadas a una temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 37 ºC durante un periodo de tiempo inferior a aproximadamente 24 horas.

En ciertas realizaciones, las células madre o progenitoras han sido tratadas a una temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente una a aproximadamente cuatro horas.

En realizaciones adicionales, las células madre o progenitoras han sido tratadas a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente 4 horas.

En realizaciones adicionales, las células madre o progenitoras son células madre embrionarias.

En otras realizaciones, en las que las células madre o progenitoras son células madre adultas.

En algunas realizaciones, las células madre o progenitoras están seleccionadas del grupo que consiste en: células madre o progenitoras endoteliales, células madre o progenitoras mesodérmicas y células madre o progenitoras ectodérmicas.

En realizaciones particulares, las células madre o progenitoras están seleccionadas del grupo que consiste en: células madre o progenitoras mesenquimatosas, células madre o progenitoras hematopoyéticas, células madre o progenitoras placentarias, células madre o progenitoras del cordón umbilical, células madre de la médula ósea, y células madre o progenitoras de gelatina de Wharton.

En ciertas realizaciones particulares, las células madre o progenitoras son células madre o progenitoras hematopoyéticas.

En realizaciones particulares adicionales, las células se aíslan de sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal.

En otras realizaciones particulares, las células madre o progenitoras son células $CD34^+$.

En realizaciones particulares adicionales, las células madre o progenitoras son, o han sido, desarrolladas *ex vivo* antes del tratamiento de las células.

En algunas realizaciones particulares, las células madre o progenitoras son alógenas o autólogas.

En ciertas realizaciones, las células madre o progenitoras son alógenas y tienen una compatibilidad de HLA completa o parcial con el paciente.

En ciertas realizaciones particulares, las células madre o progenitoras no son compatibles con el paciente.

En ciertas realizaciones adicionales, las células madre o progenitoras son xenógenas.

En ciertas realizaciones adicionales, el agonista de la vía de las prostaglandinas está seleccionado del grupo que consiste en: una prostaglandina, un agonista de receptor de prostaglandina EP_2, un agonista de receptor de prostaglandina EP_4 y un agente que tiene actividad de 16,16-dimetil-PGE_2 ($dmPGE_2$).

En algunas de ciertas realizaciones, el agonista de la vía de las prostaglandinas está seleccionado del grupo que consiste en: prostaglandina E_2 (PGE_2) y $dmPGE_2$.

En otras ciertas realizaciones, el glucocorticoide está seleccionado del grupo que consiste en: alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, fluclorolona acetónido, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, flunisolida hemihidratada, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, medrisona, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona y ulobetasol.

En realizaciones adicionales, el glucocorticoide está seleccionado del grupo que consiste en: medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o cortisol.

En realizaciones adicionales particulares, el agonista de la vía de las prostaglandinas es PGE_2 o $dmPGE_2$ o un análogo de los mismos, y el glucocorticoide es medrisona.

En otras realizaciones adicionales, la expresión de uno o más genes asociados a la elevada migración dirigida de las células madre o progenitoras al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia se eleva al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en las que el uno o más genes está seleccionado del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), elemento modulador sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1) y antígeno 2 regulado por Fos (FOSL2).

En ciertas realizaciones adicionales, la expresión de uno o más genes asociados a la elevada migración dirigida de las células madre o progenitoras al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia se eleva al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en las que el uno o más genes está seleccionado del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), elemento modulador sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 regulado por Fos (FOSL2) y receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4).

En otras realizaciones adicionales, el uno o más genes está seleccionado del grupo que consiste en: elemento modulador sensible a AMPc (CREM) y receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4).

En otras realizaciones adicionales, el uno o más genes comprenden CXCR4.

En algunas realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente cinco veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente veinte veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones adicionales particulares, en las que la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente cincuenta veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En algunas realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente sesenta veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente setenta veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En todavía otras realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente ochenta veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares, la expresión génica de al menos dos de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos dos de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente cinco veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras realizaciones, la expresión génica de al menos dos de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En algunas realizaciones, la expresión génica de al menos dos de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente veinte veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones adicionales, la expresión génica de al menos tres de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones, la expresión génica de al menos tres de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente cinco veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares, la expresión génica de al menos tres de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En algunas realizaciones particulares, la expresión génica de al menos tres de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente veinte veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares adicionales, la expresión génica de al menos cinco de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones particulares, la expresión génica de al menos cinco de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente cinco veces en las células

madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares adicionales, la expresión génica de al menos cinco de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras realizaciones particulares, la expresión génica de al menos cinco de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1, FOSL2 y CXCR4 aumenta al menos aproximadamente veinte veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos tres veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras ciertas realizaciones, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos tres veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras realizaciones particulares, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos cuatro veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En realizaciones particulares adicionales, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos cinco veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En otras realizaciones adicionales, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos diez veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones adicionales, el % de migración de las células tratadas en un ensayo de migración Transwell de SDF-1 aumenta al menos veinte veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

En ciertas realizaciones particulares, la isquemia está asociada a síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome disneico agudo (SDA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto de cartílago auricular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura de hueso, fractura de hueso, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger, quemaduras, cáncer, enfermedad cardiovascular, daño de cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño de tejido conjuntivo, contusión, enfermedad de las arterias coronarias (EAC), isquemia crítica de las extremidades (ICE), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, curación retardada de úlceras, cicatrización retardada, diabetes (tipo I y tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, congelación, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad vascular isquémica por telangiectasia hemorrágica hereditaria, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión por reperfusión isquémica, laceración, enfermedad de las arterias coronarias principales izquierdas, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia de órganos, osteoartritis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad de las arterias periféricas, isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, pre-cáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, septicemia, úlceras de la piel, trasplante de órgano sólido, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, quiste óseo subcondral, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia de tejido, ataque isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular del riñón, afecciones vasculares inflamatorias, síndrome de von Hippel-Lindau, o heridas a tejidos u órganos.

En realizaciones particulares adicionales, el sujeto tiene isquemia cerebrovascular, isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades (ICE), isquemia miocárdica (especialmente isquemia miocárdica crónica), cardiomiopatía isquémica, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia intestinal.

En otras realizaciones particulares, el sujeto ha tenido cirugía, quimioterapia, radioterapia, o un trasplante de células, tejidos u órganos.

En ciertas otras realizaciones, el tejido isquémico o tejido dañado por isquemia está seleccionado del grupo que consiste en: tejido de piel, tejido de músculo esquelético, tejido de músculo cardíaco, tejido de músculo liso, tejido de cartílago, tejido de tendón, tejido cerebral, tejido de médula espinal, tejido retiniano, tejido de córnea, tejido de pulmón, tejido de hígado, tejido de riñón, tejido pancreático, tejido de ovario, tejido de testículos, tejido intestinal, tejido de estómago y tejido de vejiga.

En ciertas realizaciones adicionales, el tejido isquémico o tejido dañado por isquemia tiene circulación sanguínea reducida, hipoxia, anoxia, hipoglucemia, metabolismo reducido, elevada necrosis, o elevada apoptosis en comparación con tejido no isquémico.

En otras realizaciones adicionales, el uno o más síntomas asociados al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia está seleccionado del grupo que consiste en: calambres, claudicación, entumecimiento, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, cambio de color de la piel y gangrena.

En realizaciones adicionales particulares, las células madre o progenitoras tratadas se lavan para eliminar sustancialmente el agonista de la vía de las prostaglandinas o glucocorticoide en la composición, antes de la administración de la composición al sujeto.

En diversas realizaciones particulares, la composición comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas, en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas es 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$, en las que la expresión génica de CXCR4 aumenta al menos cinco veces en las células tratadas en comparación con células no tratadas, y en las que las células madre o progenitoras hematopoyéticas han sido puestas en contacto con 16,16-dmPGE$_2$ a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas.

En otras diversas realizaciones, la composición comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas, en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas es 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$, en las que el glucocorticoide está seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o cortisol, en las que la expresión génica de CXCR4 aumenta al menos cinco veces en las células tratadas en comparación con células no tratadas, y en las que las células madre o progenitoras hematopoyéticas han sido puestas en contacto con 16,16-dmPGE$_2$ a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas.

En otras realizaciones particulares, la composición se administra por vía parenteral al sujeto.

En ciertas realizaciones particulares, la administración parenteral está seleccionada del grupo que consiste en: intravascular, intramuscular y subcutánea.

En ciertas realizaciones adicionales, la composición se administra por vía intramuscular en o cerca de un sitio del tejido isquémico o tejido dañado por isquemia.

En otras realizaciones adicionales, el sujeto se administra con más de una dosis de la composición, en las que la dosis se separan un intervalo de tiempo de al menos aproximadamente 24 horas.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de mejora de al menos un síntoma asociado a isquemia en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas que han sido puestas en contacto *ex vivo* con 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$ a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas; en las que la expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) aumenta al menos cinco veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en contacto en comparación con la expresión de los genes en células madre o progenitoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de mejora de al menos un síntoma asociado a isquemia en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas que han sido puestas en contacto *ex vivo* con (i) 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$ y (ii) un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o cortisol, a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas; en la que la expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) aumenta al menos cinco veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en

contacto en comparación con la expresión de los genes en células madre o progenitoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

En realizaciones particulares, el uno o más síntomas asociados al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia está seleccionado del grupo que consiste en: calambres, claudicación, entumecimiento, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, cambio de color de la piel y gangrena.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de tratamiento de un tejido isquémico en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas que han sido puestas en contacto *ex vivo* con 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$ a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas; en la que la expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) aumenta al menos cinco veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en contacto en comparación con la expresión de los genes en células madre o progenitoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

En una realización, la presente invención contempla, en parte, un método de tratamiento de un tejido isquémico en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre y progenitoras hematopoyéticas que han sido puestas en contacto *ex vivo* con (i) 16,16-dmPGE$_2$ o PGE$_2$, y (ii) un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o cortisol, a una temperatura de aproximadamente 37 ºC durante un tiempo de aproximadamente dos horas; en la que la expresión génica de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) o receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) aumenta al menos cincuenta veces en las células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en contacto en comparación con la expresión de los genes en células madre o progenitoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

En diversas realizaciones, el glucocorticoide es medrisona.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La **Figura 1** muestra los resultados de un ensayo de migración Transwell de SDF1 representativo. Los resultados muestran el efecto de tratar células CD34$^+$ con control de DMSO, dmPGE$_2$, o dmPGE$_2$ y medrisona sobre la eficiencia de la migración de células hacia SDF1.

La **Figura 2** muestra los resultados de un ensayo de migración Transwell de SDF1 representativo. Los resultados muestran el efecto de tratar células CD34$^+$ con control de DMSO, dmPGE$_2$, o dmPGE$_2$ y diversos glucocorticoides sobre la eficiencia de la migración de células hacia SDF1.

La **Figura 3** muestra los resultados de un ensayo de migración Transwell de SDF1 representativo. Los resultados muestran la duración del potenciado efecto de migración por dmPGE$_2$ y medrisona sobre la migración de células hacia SDF 1.

La **Figura 4** muestra los resultados de la puntuación de gravedad neurológica (mNSS) de un modelo de rata con isquemia representativo el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Los resultados muestran el efecto de tratar CMPH con dmPGE$_2$ y medrisona sobre la capacidad de las células para reducir los déficits neurológicos en el modelo de accidente cerebrovascular de MCAO.

La **Figura 5** muestra los resultados del ensayo de fallos de las patas de un modelo de rata con isquemia representativo el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). Los resultados muestran el efecto de tratar CMPH con dmPGE$_2$ y medrisona sobre la capacidad de las células para reducir los déficits locomotores en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO.

Descripción detallada

A. Visión general

Generalmente, la invención proporciona métodos de reducción del daño de tejido isquémico en un sujeto. La isquemia prolongada produce una falta de oxígeno o una condición "hipóxica" o "anóxica" en una célula, tejido, órgano, o parte del cuerpo, y si las condiciones hipóxicas/anóxicas persisten tiempo suficiente, la isquemia puede producir necrosis de tejido y/o muerte celular programada.

En diversas realizaciones, la invención contempla, en parte, administrar una cantidad eficaz de una composición terapéutica a un sujeto para reducir el daño de células de tejido.

Los inventores han desarrollado células madre y progenitoras novedosas que expresan altos niveles de CXCR4 en comparación con las células terapéuticas existentes en la materia. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, la presente invención contempla, en parte, que el tratamiento de células madre y/o progenitoras con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide, aumenta la expresión del gen CXCR4 a altos niveles y confiere a las células propiedades terapéuticas mejoradas útiles para tratar isquemia, tal como elevada migración dirigida al tejido dañado por isquemia, reduciendo además el daño a tejido isquémico y/o reparando el daño a tejido isquémico mediante el reclutamiento de células, mejorando la vascularización en el tejido isquémico, mejorando la regeneración de tejido en el sitio de tejido isquémico, disminuyendo la necrosis o apoptosis de tejido isquémico y/o aumento de la supervivencia celular en el sitio isquémico. En diversas realizaciones, las células terapéuticas son células $CD34^+$.

La invención contempla, en parte, administrar novedosas composiciones terapéuticas que comprenden células madre y progenitoras que tienen propiedades terapéuticas mejoradas útiles para tratar isquemia a un sujeto en necesidad de las mismas. Así, la invención proporciona una solución muy necesaria a los problemas a los que se enfrentan los profesionales clínicos que tratan a pacientes que tienen isquemia.

La práctica de la invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, química orgánica, biología molecular, microbiología, técnicas de ADN recombinante, genética, inmunología y biología celular que están dentro de la experiencia de la materia, muchos de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustración. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Edición, 2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, actualizado en Julio de 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); y Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998).

B. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por aquellos expertos habituales en la materia a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, realizaciones preferidas de composiciones, métodos y materiales se describen en el presente documento. Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación.

Como se usa en el presente documento, los términos "isquemia", "afección isquémica" o "evento isquémico" significan cualquier disminución o parada en el riego sanguíneo a cualquier célula, tejido, órgano, o parte del cuerpo, producida por cualquier constricción, daño u obstrucción de la vasculatura. La isquemia resulta algunas veces de vasoconstricción o trombosis o embolia. La isquemia puede conducir a lesión isquémica directa, daño de tejido debido a muerte celular producida por suministro reducido de oxígeno (hipoxia, anoxia), glucosa y nutrientes. "Hipoxia" o una "afección hipóxica" tiene la intención de una afección bajo la que una célula, órgano o tejido recibe un suministro inadecuado de oxígeno. "Anoxia" se refiere a una ausencia prácticamente completa de oxígeno en el órgano o tejido, que, si es prolongada, puede producir muerte de la célula, órgano o tejido.

"Síntomas asociados a isquemia", "síntomas resultantes de isquemia" o "síntomas producidos por isquemia" se refiere a síntomas que incluyen alteración, o pérdida de, la función de un órgano (que incluyen, sin limitación, alteraciones o pérdida de la función del cerebro, riñón o corazón), calambres, claudicación, entumecimiento, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, cambio de color de la piel y gangrena.

La isquemia puede ser aguda o crónica. "Isquemia aguda" significa una isquemia que causa que los síntomas empiecen bruscamente. La isquemia aguda puede ser debida a daño vascular sustancial y/o evolucionar de isquemia crónica. La isquemia aguda puede plantear un riesgo muy grave a la pérdida de vida o extremidad en un corto periodo de tiempo. "Isquemia crónica" significa que la afección isquémica y síntomas se han desarrollado durante un periodo relativamente largo de tiempo. La isquemia crónica está frecuentemente asociada a enfermedades genéticas, afecciones de mala salud, por ejemplo, enfermedad vascular periférica, tromboangeítis obliterante, vasculitis, enfermedad cardíaca coronaria e insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, y diabetes.

La isquemia también puede ser focal o global. La "isquemia focal" resulta de la pérdida de circulación sanguínea a una región vascular particular de un tejido u órgano. La "isquemia global" resulta de la pérdida de circulación sanguínea a un tejido u órgano entero y está asociada a alteración vascular más generalizada.

Como se usa en el presente documento, los términos "tejido isquémico" u "órgano isquémico" y equivalentes de los

mismos se refieren a un tejido u órgano que tiene un riego sanguíneo reducido producido por cualquier constricción, daño u obstrucción de la vasculatura que suministra el tejido u órgano.

"Lesión isquémica de tejido", "daño de tejido isquémico", "daño de tejido debido a isquemia", "daño de tejido asociado a isquemia", "daño de tejido como resultado de isquemia", "tejido dañado producido por isquemia" y "tejido dañado isquémico" se refieren a daño morfológico, fisiológico y/o molecular a un órgano o tejido o célula como resultado de un periodo de isquemia.

"Lesión hipóxica" se refiere a daño a una célula, órgano o tejido debido a un periodo de suministro de oxígeno inadecuado. La lesión hipóxica frecuentemente resulta de una afección isquémica.

Una "lesión por reperfusión" es una lesión en la que el tejido es dañado tras el retorno del riego sanguíneo a un tejido u órgano después de un periodo de isquemia.

Una enfermedad que puede producir isquemia es "enfermedad vascular periférica (EVP)". EVP se refiere a una afección en la que las arterias y/o venas que llevan sangre hacia y desde los brazos, piernas, tejidos blandos y órganos vitales del cuerpo, que incluyen el corazón y cerebro, llegan a estrecharse u ocluirse. Esto interfiere con el flujo normal de sangre, causando algunas veces dolor pero frecuentemente causando síntomas no fácilmente detectables. Con la progresión de EVP, la pérdida significativa de la circulación sanguínea a tejido y órganos puede conducir a isquemia, hipoxia, anoxia, muerte de tejido, necrosis y muerte de órganos. Las personas con EVP también tienen un riesgo más alto de enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular. Normalmente, la mayor parte de la EVP sintomática se atribuye a "enfermedad de las arterias periféricas" (PAD), que indica la patología anteriormente descrita predominantemente en arterias. El término EVP incluye esta sintomatología y patología en todas las clases de vasos sanguíneos.

En realizaciones particulares, las composiciones de la invención tienen propiedades terapéuticas elevadas útiles para tratar isquemia. Como se usa en el presente documento, el término "propiedad terapéutica útil para tratar isquemia" se refiere a aumentar la migración dirigida a tejido dañado por isquemia; reducir el daño adicional a tejido isquémico y/o reparar el daño a tejido isquémico mediante el reclutamiento de células, por ejemplo, reclutamiento de células madre y/o progenitoras endógenas, y/o células progenitoras endoteliales; elevada vascularización en el tejido isquémico; regeneración de tejido en el sitio de tejido isquémico; disminución de la necrosis o apoptosis de tejido isquémico; y/o elevada supervivencia celular en el sitio isquémico.

"Vascularización" se refiere al proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido mediante neovascularización o angiogénesis. "Neovascularización" se refiere a la formación *de novo* de redes microvasculares funcionales en tejidos para restaurar la perfusión a un tejido. La neovascularización se diferencia de la angiogénesis. La "angiogénesis" se caracteriza principalmente por la protuberancia y crecimiento hacia afuera de yemas y brotes capilares de los vasos sanguíneos preexistentes.

Como se usa en el presente documento, los términos "potenciar", "mejorar", "promover", "aumentar" o "activar" generalmente se refieren a la capacidad de un agonista de la vía de las prostaglandinas, opcionalmente en combinación con un glucocorticoide, para producir o causar una mayor respuesta fisiológica en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquier vehículo o una molécula/composición de control, y conferir a la célula propiedades terapéuticas mejoradas, por ejemplo, elevada migración dirigida a tejido dañado por isquemia; reducir el daño adicional a tejido isquémico y/o reparar el daño a tejido isquémico mediante reclutamiento de células; elevada vascularización en el tejido isquémico; regeneración de tejido en el sitio de tejido isquémico; disminución de la necrosis o apoptosis de tejido isquémico; y/o elevada supervivencia celular en el sitio isquémico. Una cantidad "elevada", "mejorada" o "potenciada" normalmente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control.

Como se usa en el presente documento, los términos "disminuir", "bajar", "menguar", "reducir" o "calmar" generalmente se refieren a la capacidad de un agonista de la vía de las prostaglandinas, opcionalmente en combinación con un glucocorticoide, para producir o causar una menor respuesta fisiológica en una célula, en comparación con la respuesta producida por cualquier vehículo o una molécula/composición de control. En una realización, la disminución puede ser una disminución en la expresión génica o una disminución en la señalización de células que normalmente está asociada a una reducción de la viabilidad celular. Una cantidad "disminuida" o "reducida" normalmente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control.

Como se usa en el presente documento, los términos "mantener", "conservar", "mantenimiento", "sin cambio", "sin cambio sustancial" o "sin disminución sustancial" generalmente se refieren a la capacidad de un agonista de la vía de las prostaglandinas, opcionalmente en combinación con un glucocorticoide, para producir o causar una respuesta

fisiológica comparable (es decir, efectos aguas abajo) en una célula, en comparación con la respuesta producida por cualquier vehículo o una molécula/composición de control (respuesta de referencia). Una respuesta comparable es una que no es significativamente diferente o mediblemente diferente de la respuesta de referencia.

En realizaciones particulares, las células terapéuticas de la invención se preparan por tratamiento *ex vivo* o *in vitro* de las células.

El término *"ex vivo"* se refiere generalmente a actividades o procedimientos que implican células vivas o tejidos tomados de un organismo y cultivados en un aparato de laboratorio, normalmente en condiciones estériles, y normalmente durante algunas horas o hasta aproximadamente 24 horas, pero que incluyen hasta 48 o 72 horas, dependiendo de las circunstancias. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejido que duran más de algunos días usando células vivas o tejido normalmente se consideran que son *"in vitro",* aunque en ciertas realizaciones, este término puede usarse indistintamente con *ex vivo.*

El término "tratamiento", "tratamiento *in vitro*" o "tratamiento *ex vivo*" generalmente se refiere a cultivar, poner en contacto o incubar células con uno o más agentes *in vitro* o *ex vivo* (es decir, tratar las células). Así, en realizaciones particulares, el término "tratamiento" se usa indistintamente con "cultivar", "poner en contacto" o "incubar" células cuando se refiere a protocolos de cultivo celular *in vitro* o *ex vivo*. Las células tratadas *ex vivo* se administran a un sujeto para producir terapia *in vivo*.

El término "*in vivo*" se refiere generalmente a actividades que tienen lugar dentro de un organismo, tal como incorporación de injerto de células, migración dirigida de células, auto-renovación de células y expansión de células. En una realización, el término "expansión *in vivo*" se refiere a la capacidad de una población de células para aumentar en número *in vivo.* En realizaciones particulares, la expansión *in vivo* incluye auto-renovación y/o proliferación de células madre.

Como se usa en el presente documento, el término "población de células" se refiere a una población heterogénea u homogénea de células que comprenden células madre y/o progenitoras. El término "conjunto de células" también se refiere a una población de células, y en algunas realizaciones es sinónimo de "población de células". Sin embargo, un conjunto de células no necesita referirse a cualquier población de células particular. Puede aislarse una población de células.

Por "aislado" se indica material que se saca de su entorno original. Se aísla una célula si se separa de algunos o todos de los componentes que normalmente la acompañan en su estado nativo.

Por ejemplo, una "población de células aislada", una "fuente de células aislada" o "células madre y progenitoras hematopoyéticas aisladas y similares, como se usa en el presente documento, se refieren a separación *in vitro* o *ex vivo* de una o más células de su entorno natural celular, y de la asociación con otros componentes del tejido u órgano, es decir, no está significativamente asociado a sustancias *in vivo*.

Células en la composición terapéutica de la invención pueden ser autólogas/autógenas ("auto') o no autólogas ("no auto", por ejemplo, alógenas, singénicas o xenógenas). "Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. "Alógenas", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que se diferencian genéticamente en la célula en comparación. "Singénicas", como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. "Xenógenas", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En realizaciones particulares, las células de la invención son alógenas. En ciertas realizaciones, las células son autólogas.

Una "célula madre" se refiere a una célula que es una célula no diferenciada capaz de (1) auto-renovación a largo plazo, o la capacidad de generar al menos una copia idéntica de la célula original, (2) diferenciación al nivel de células individuales en múltiples, y en algunos caso solo un, tipo especializado de célula y (3) de regeneración funcional *in vivo* de tejidos. Las células madre se subclasifican según su potencial de desarrollo como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y oligo/unipotentes.

Una "célula progenitora" también tiene la capacidad de auto-renovación y de diferenciarse en células más maduras, pero se compromete a un linaje (por ejemplo, los progenitores hematopoyéticos se comprometen al linaje de sangre; los progenitores mieloides se comprometen al linaje mieloide; los progenitores linfoides se comprometen al linaje linfoide), mientras que las células madre no están necesariamente así limitadas.

Las células madre hematopoyéticas (CMH) dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas (CPH) comprometidas que son capaces de generar el repertorio completo de glóbulos sanguíneos maduros durante la vida de un organismo. El término "célula madre hematopoyética" o "CMH" se refiere a células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas de un organismo, que incluyen linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK). Cuando se trasplantan en animales o seres humanos

letalmente irradiados, las células madre hematopoyéticas pueden repoblar el conjunto de células hematopoyéticas eritroides, de neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y linfoides.

Como se usa en el presente documento, el término "célula madre y progenitora hematopoyética" o "CMPH" se refiere a una célula identificada por la presencia del marcador antigénico CD34 y los marcadores de ausencia de linaje (lin). Las CMPH se caracterizan, por tanto, como células $CD34^+$/Lin(-), y poblaciones de tales células. Se reconoce que la población de células que comprenden células $CD34^+$ y Lin(-) también incluyen células progenitoras hematopoyéticas, y así para los fines de la presente solicitud el término "CMPH" incluye células progenitoras hematopoyéticas.

En realizaciones particulares, células de la invención que tienen sorprendentemente altos niveles de expresión de CXCR4 tienen propiedades terapéuticas potenciadas, que incluyen elevada migración dirigida a tejido dañado por isquemia; reducir el daño adicional a tejido isquémico y/o reparar el daño a tejido isquémico mediante el reclutamiento de células; elevada vascularización en el tejido isquémico; regeneración de tejido en el sitio de tejido isquémico; disminuir la necrosis o apoptosis de tejido isquémico; y/o elevada supervivencia celular en el sitio isquémico.

"Migración dirigida" se refiere a la capacidad de células madre o progenitoras para localizarse en, es decir, desplazarse a, un área o tejido particular. En realizaciones particulares, las propiedades de migración dirigida de las células madre y progenitoras tratadas con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide, son elevadas en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En una realización, las células usan un mecanismo quimioatrayente para migrar de forma dirigida a un tejido particular: células que tienen elevada expresión de CXCR4 tienen migración dirigida mejorada a tejidos isquémicos que secretan factor 1 derivado de células del estroma (SDF1), el ligando relacionado de CXCR4.

En ciertas realizaciones, las células terapéuticas de la invención comprenden un distintivo génico único o sustancialmente único. Como se usa en el presente documento, el término "perfil de expresión génica", "distintivo de expresión génica" o "distintivo génico" se refieren a los niveles de expresión de múltiples genes diferentes medidos parar la misma muestra, es decir, una población de células. Puede definirse un distintivo de expresión génica para identificar un grupo de genes "genes distintivos" que sirve para distinguir las células terapéuticas de las células existentes en la materia y/o células de control, portadoras o no tratadas.

Un "gen distintivo", como se usa en el presente documento, significa cualquier gen en un conjunto de genes distintivos. Por ejemplo, genes distintivo incluyen hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) y receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4). Para claridad, los genes distintivos no incluyen genes de mantenimiento.

"Expresión génica", como se usa en el presente documento, se refiere a los niveles relativos de expresión y/o patrón de expresión de un gen en una muestra biológica, tal como las células madre y progenitoras, o población de células que comprenden células madre o progenitoras. En realizaciones particulares, las células madre o progenitoras son células madre y progenitoras hematopoyéticas.

Cualquier método disponible en la materia para detectar la expresión de los genes que caracterizan las células que comprenden la composición terapéutica de la invención está englobado en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "detectar la expresión" significa determinar la cantidad o presencia de un transcrito de ARN o su producto de expresión de un gen. Métodos de detección de la expresión de genes, es decir, pauta de expresión génica, incluyen métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en secuenciación de polinucleótidos, métodos inmunohistoquímicos y métodos basados en proteómica. Los métodos generalmente detectan productos de expresión (por ejemplo, ARNm) de los genes de interés. En algunas realizaciones, se usan métodos basados en PCR, tales como PCR con transcripción inversa (RT-PCR) (Weis et al., TIG 8:263-64, 1992) y métodos basados en matriz, tales como micromatriz (Schena et al., Science 270:467-70, 1995).

En diversas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, administrar una cantidad eficaz de una composición terapéutica a un sujeto para reducir el daño de células de tejido. Un "sujeto" o "sujeto en necesidad", como se usa en el presente documento, incluye cualquier mamífero que presente al menos un síntoma de un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia, por ejemplo, reducción o bloqueo de la circulación sanguínea al tejido, tejido hipóxico, necrosis o apoptosis tejido, que puede tratarse o mejorarse administrando una composición basada en células de la presente invención. Un "sujeto" también incluye un ser humano que ha estado o que está en riesgo de tener un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia, por ejemplo, un sujeto que tiene diabetes, enfermedad vascular periférica, enfermedad cardiovascular o enfermedad cerebrovascular. Los sujetos también pueden incluir individuos o animales que han recibido un tratamiento quirúrgico, por ejemplo, un trasplante de órganos o injerto de tejido. En realizaciones particulares, un sujeto recibe CMPH genéticamente modificadas como terapia génica basada en células. En ciertas realizaciones, un sujeto puede haber recibido terapia de irradiación mieloablativa o

quimioterapia, o puede haber recibido una radiación aguda o agresión química que produce mieloablación. En ciertas realizaciones, un sujeto puede haber recibido terapia de irradiación o quimioterapia, tal como durante diversos tratamientos del cáncer. Sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (por ejemplo, un gato o perro). Están incluidas primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "tratando", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que incluye, sin limitación, lograr la recuperación, mejora o eliminación de síntomas de isquemia. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente el daño de tejido isquémico y/o puede ser terapéutico en términos de recuperar, mejorar o eliminar uno o más síntomas de un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una afección isquémica en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que se produzca la isquemia en un sujeto que puede tener predisposición a la isquemia pero todavía no ha sido diagnosticado con que la tiene; (b) inhibir la isquemia o prevenir además daño de tejido isquémico, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar la isquemia, por ejemplo, causando la revascularización del tejido, por ejemplo, para eliminar completamente o parcialmente los síntomas de la isquemia; y (d) restaurar el individuo a un estado previo de enfermedad, por ejemplo, revascularización completa del tejido previamente isquémico. "Tratamiento" puede no indicar, o requerir, la erradicación o cura completa de la isquemia, o síntomas asociados de la misma. En métodos particulares de la invención, el tratamiento o tratar proporciona circulación sanguínea mejorada a un tejido isquémico, oxigenación mejorada de un tejido isquémico, vascularización mejorada de un tejido isquémico y supervivencia mejorada de tejido isquémico.

Los artículos "un", "una", "el" y "la" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "o" se usa en el presente documento para significar, y se usa indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que nada menos que el 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o el 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En realizaciones particulares, el término "aproximadamente" cuando preceden a un valor numérico indica el valor más o menos un intervalo del 15 %, 10 %, 5 % o 1 %.

"Sustancialmente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que es casi equivalente a una cantidad de referencia, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud. En realizaciones particulares, casi equivalente puede ser el valor de referencia más o menos el 15 %, 10 %, 5 % o el 1 %.

Referencia en toda esta memoria descriptiva a "una realización", "una realización particular", "una realización relacionada", "una cierta realización", "una realización adicional" o "una realización adicional" o combinaciones de las mismas significa que un rasgo particular, estructura o característica descrito a propósito de la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Así, las apariciones de las frases anteriores en diversos sitios en toda esta memoria descriptiva no son todas necesariamente con referencia a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier modo adecuado en una o más realizaciones.

C. Composiciones

En numerosas realizaciones, los métodos de la invención comprenden la administración de las composiciones a un sujeto con el fin de tratar daño de tejido isquémico en el sujeto. En diversas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden la administración de composiciones a un sujeto con el fin de tratar o mejorar al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico.

Para este fin, los inventores han desarrollado novedosas células madre y progenitoras que expresan altos niveles de CXCR4, produciendo así células terapéuticas con propiedades mejoradas útiles para tratar isquemia, tales como elevada migración dirigida a tejido dañado por isquemia, reduciendo el daño adicional a tejido isquémico y/o reparando el daño a tejido isquémico mediante reclutamiento de células, mejorando la vascularización en el tejido isquémico, mejorando la regeneración de tejido en el sitio de tejido isquémico, disminuyendo la necrosis o apoptosis de tejido isquémico y/o aumentando la supervivencia celular en el sitio isquémico.

Así, la invención contempla, en parte, composiciones, por ejemplo, composiciones terapéuticas, que comprenden células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, que han sido tratadas, por ejemplo, cultivadas, puestas en contacto o incubadas, *ex vivo* con un agonista de la vía de las prostaglandinas o un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide. Las células se tratan con los agentes en una

cantidad eficaz y durante un tiempo suficiente para producir un aumento en la expresión de CXCR4 en las células en comparación con células no puestas en contacto o células puestas en contacto con un control o vehículo (por ejemplo, DMSO). En realizaciones preferidas, el aumento en la expresión de CXCR4 en las células tratadas identifica las células como aquellas que tienen propiedades terapéuticas mejoradas útiles para tratar tejido isquémico o tratar y/o mejorar al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico.

En realizaciones particulares, las composiciones comprenden además uno o más vehículos, diluyentes o componentes farmacéuticamente aceptables como se describe en cualquier parte, abajo.

1. Células madre o progenitoras

En realizaciones particulares, métodos de la presente invención comprenden administrar una composición terapéutica que comprende células madre o progenitoras a un sujeto, en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas con uno o más agonistas de la vía de las prostaglandinas y/o uno o más glucocorticoides. Las células tratadas tienen las propiedades de elevada migración dirigida a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico y reducción de necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada. Las células madre o progenitoras tratadas pueden ser células adultas o células embrionarias.

En diversas realizaciones, las células madre y/o progenitoras administradas al sujeto son de HLA compatible con el sujeto. Existe seis antígenos HLA principales (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ). Cada antígeno HLA tiene múltiples isoformas en la población humana, y cada individuo puede tener dos isoformas diferentes para cada HLA debido a la naturaleza diploide de nuestro genoma. Por tanto, una compatibilidad completa compatibilizaría doce de las doce isoformas.

El tipo HLA puede determinarse usando los llamados métodos de baja resolución, por ejemplo por serotipificación, o usando métodos basados en anticuerpos. La serotipificación se basa en el reconocimiento por anticuerpo de tipos de HLA. La serotipificación puede distinguir entre 28 genes de HLA-A diferentes, 59 genes de HLA-B y 21 genes de HLA-C. Una compatibilización perfecta por métodos de serotipificación sería una llamada compatibilización de seis de los seis con referencia a los dos alelos para cada HLA (A, B y C) presente en cada individuo. En ciertos casos, una compatibilización de cinco de los seis o menos puede considerarse una buena compatibilización como se ha determinado por un experto en la materia. En algunas realizaciones, la población de células de haplotipo HLA tiene 3/6, 4/6, 5/6 o 6/6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico. La compatibilidad de HLA puede basarse en alelos o antígenos, y combinaciones de los mismos.

La composición terapéutica de la invención es capaz de obtener licencia de producto de la FDA (es decir, autorización de la FDA) y otras autoridades sanitarias en otros países y territorios normativos, además de etiquetado de producto con información caracterizadora referente a la indicación de producto, eficacia de producto, seguridad y pureza.

a. Tipos de células madre y progenitoras

Diversos tipos de células madre y progenitoras son adecuados para su uso en los métodos particulares de la presente invención, que incluyen, pero no se limitan a, células madre embrionarias, células madre o progenitoras mesodérmicas, células madre o progenitoras endodérmicas y células madre o progenitoras ectodérmicas. Otras células madre o progenitoras adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células mesodérmicas tales como células madre o progenitoras mesenquimatosas, células madre o progenitoras hematopoyéticas, células madre o progenitoras placentarias, células madre o progenitoras del cordón umbilical, células madre de la médula ósea y células madre o progenitoras de la gelatina de Wharton.

En realizaciones preferidas, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se usan en los métodos de la presente invención. En otras realizaciones preferidas, se usan células $CD34^+$ en los métodos de la presente invención.

En diversas realizaciones, una población heterogénea de células que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas o células $CD34^+$ se trata con un agonista de la vía de las prostaglandinas y/o uno o más glucocorticoides, como se describe en cualquier parte en el presente documento, y posteriormente se administra a un sujeto. Poblaciones heterogéneas de células a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, médula ósea completa, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, células madre hematopoyéticas, placenta, sangre placentaria y gelatina de Wharton.

En una realización, la composición terapéutica comprende una población de células que es aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 % de células madre y progenitoras hematopoyéticas o células $CD34^+$. En algunas realizaciones, la población de células en la composición terapéutica es inferior a aproximadamente el 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % de células madre y progenitoras hematopoyéticas o células $CD34^+$.

Las CMH pueden identificarse según ciertos marcadores fenotípicos o genotípicos. La mayoría de las CMH humanas pueden caracterizarse como $CD34^+$, $CD59^+$, $Thy1/CD90^+$, $CD381^{o/-}$, C-kit/$CD117^+$ y Lin(-). Sin embargo, no todas las células madre están cubiertas por estas combinaciones, ya que ciertas CMH son $CD34^-/CD38^-$. Algunos estudios sugieren también que las células madre más tempranas pueden carecer de c-kit sobre la superficie celular. Para CMH humanas, CD133 puede representar un marcador temprano, ya que tanto las CMH $CD34^+$ como $CD34^-$ han mostrado ser $CD133^+$. Se conoce en la técnica que las células $CD34^+$ y Lin(-) también incluyen células progenitoras hematopoyéticas y CMPH.

Están comercialmente disponibles kits para purificar células madre y progenitoras de diversas fuentes de células y en realizaciones particulares estos kits son adecuados para su uso con los métodos de la presente invención. Kits comercialmente disponibles a modo de ejemplo para purificar células madre y progenitoras incluyen, pero no se limitan a, Lineage (Lin) Depletion Kit (Miltenyi Biotec); kit de enriquecimiento de $CD34^+$ (Miltenyi Biotec); RosettaSep (Stem Cell Technologies).

En realizaciones particulares, la población de células comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas o células $CD34^+$ y está sustancialmente libre de células madre mesenquimatosas y/o células progenitoras endoteliales. En ciertas realizaciones, la población de células comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas o células $CD34^+$ menos de aproximadamente el 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o el 5 % de células madre mesenquimatosas y menos de aproximadamente el 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de células progenitoras endoteliales.

Las poblaciones de células pueden alternativamente ser agotadas de células madre mesenquimatosas y/o células progenitoras endoteliales usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando técnicas de selección inmunomagnética, citometría de flujo activada por fluorescencia, o una combinación de ellas, las células $CD34^+$ pueden ser purificadas a partir de cualquier número de fuentes de células desveladas en el presente documento y adecuadas para su uso en la presente invención.

b. Fuente de células madre y progenitoras

Fuentes de células madre y progenitoras adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células aisladas u obtenidas de un órgano o tejido del cuerpo que contiene células de origen mesodérmico, endodérmico o ectodérmico. Las células madre y progenitoras usadas en la invención pueden obtenerse mediante medios convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia. En algunas realizaciones, pueden usarse líneas de células madre y progenitoras comercialmente disponibles en los métodos de la invención.

En una realización, pueden obtenerse células madre y progenitoras para su uso en las composiciones terapéuticas y métodos de la invención a partir de fuentes de células madre pluripotentes, por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas (CMPi) y células madre embrionarias (CME). Como se usa en el presente documento, el término "célula madre pluripotente inducida" o "CMPi" se refiere a una célula no pluripotente que ha sido reprogramada a un estado pluripotente. Una vez las células de un sujeto han sido reprogramadas a un estado pluripotente, las células pueden entonces programarse a un tipo de célula deseado, tal como una célula madre o progenitora hematopoyética. Como se usa en el presente documento, el término "reprogramar" se refiere a un método de aumento de la potencia de una célula a un estado menos diferenciado. Como se usa en el presente documento, el término "programar" se refiere a un método de disminución de la potencia de una célula o diferenciación de la célula a un estado más diferenciado.

Pueden aislarse células madre y progenitoras hematopoyéticas de una variedad de fuentes que incluyen, pero no se limitan a, sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta, sangre fetal, hígado fetal o bazo fetal. En realizaciones particulares, las células madre o progenitoras hematopoyéticas se recogen o movilizan de una fuente hematopoyética. "Recolección" se refiere a sacar o separar células madre y progenitoras hematopoyéticas de la matriz usando, por ejemplo, tratamiento enzimático, métodos centrífugos, eléctricos o basados en tamaño, o preferentemente, lavando las células usando medios (por ejemplo, medios en los que se incuban las células). "Movilización de células madre hematopoyéticas" se refiere a la liberación de células madre de la médula ósea en la circulación de la sangre periférica con el fin de leucaféresis, antes del trasplante de células madre. Frecuentemente se usan factores de crecimiento hepatopoyéticos, por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), Mozobil™ (Genzyme Corporation) o agentes quimioterapéuticos para estimular la movilización.

c. Cultivo de células madre o progenitoras

Pueden cultivarse células madre y/o progenitoras, por ejemplo, células madre y/o progenitoras hematopoyéticas, tratarse o desarrollarse en cualquier medio adecuado, comercialmente disponible o definido por el cliente, con o sin suero, según se desee (véase, por ejemplo, Hartshorn et al., Cell Technology for Cell Products, páginas 221-224, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad).

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el medio libre de suero puede utilizar albúmina y/o transferrina, que se ha

mostrado que son útiles para el crecimiento y la expansión de células $CD34^+$ en medio libre de suero. Por tanto, pueden incluirse citocinas, tales como ligando Flt-3, factor de células madre (FCM) y trombopoyetina (TPO), entre otros. También pueden cultivarse células madre y progenitoras hematopoyéticas en recipientes tales como biorreactores (véase, por ejemplo, Liu et al., Journal of Biotechnology 124:592-601, 2006). Un medio adecuado para la expansión *ex vivo* de CMPH también pueden comprender células portadoras de CMPH, tales como células del estroma (por ejemplo, células del estroma linforreticular), que pueden derivar, por ejemplo, de la desagregación de tejido linfoide, y que se ha mostrado que soportan el mantenimiento, crecimiento y diferenciación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de CMPH, además de su progenie.

d. Tratamiento de células madre o progenitoras

Las células madre y progenitoras de la invención se tratan, por ejemplo, se ponen en contacto, cultivan o incuban, con un agonista de la vía de las prostaglandinas o un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, las células tratadas de este modo son conferidas con propiedades terapéuticas mejoradas en comparación con células de control, portadoras o no tratadas.

Las células pueden tratarse con los agentes desvelados en el presente documento después del aislamiento de un sujeto. En otra realización, las células se aíslan de un sujeto y se desarrollan antes del tratamiento con los agentes desvelados en el presente documento. En una realización, las células se aíslan de un sujeto y se crioconservan antes del tratamiento con los agentes desvelados en el presente documento.

En realizaciones preferidas, se tratan células madre y progenitoras con uno o más agentes, por ejemplo, un agonista de la vía de las prostaglandinas o un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide en una cantidad eficaz y durante un tiempo suficiente (es decir, en condiciones suficientes) para potenciar las propiedades terapéuticas de las células, por ejemplo, elevada migración dirigida a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, y reduciendo la necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada. Como se ha mencionado en cualquier parte en el presente documento, las células tratadas con propiedades terapéuticas potenciadas pueden identificarse, por ejemplo, por expresión génica, por ejemplo, elevada expresión de CXCR4 y/o un grupo particular de distintivos génicos; elevada expresión de proteína CXCR4 y/o un grupo particular de distintivos génicos; señalización de AMPc intracelular, por ejemplo, fosforilación de CREB, o como se ha determinado por un ensayo bioquímico; o por ensayo funcional, por ejemplo, ensayo de migración Transwell.

Como se usa en el presente documento, los términos "condiciones suficientes" o "en condiciones suficientes" se refieren a las condiciones para tratar las células madre y/o progenitoras, por ejemplo, células madre y progenitoras hematopoyéticas, con uno o más agentes, por ejemplo, agonista de la vía de las prostaglandinas, opcionalmente en combinación con un glucocorticoide para aumentar la expresión del gen CXCR4 y/o expresión de un grupo de distintivos génicos en las células hasta niveles sorprendentemente inesperados en comparación con células de control, portadoras o no tratadas.

En una realización, las condiciones son suficientes para aumentar las propiedades terapéuticas de las células *in vivo*, tal como, por ejemplo, para aumentar la migración dirigida de células madre y progenitoras a sitios de daño de tejido isquémico, para aumentar el reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales a sitios de daño de tejido isquémico, para aumentar la vascularización en el sitio de tejido isquémico y para reducir la necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada, y/o aumentar la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

Condiciones incluyen, pero no se limitan una fuente de las células, concentración de agente(s), el tiempo que las células se exponen al (a los) agente(s) y la temperatura. En realizaciones particulares, las células se ponen en contacto con uno o más agente(s): un agonista de la vía de las prostaglandinas, por ejemplo, PGE_2, $dmPGE_2$, 15(S)-15-metil-PGE_2, 20-etil-PGE_2, 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE_2 y análogos de PGE_2; o un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide. En una realización, el uno o más agentes son PGE_2 o 16,16-dimetil-PGE_2. En otra realización, el uno o más agentes incluyen (i) PGE_2 o 16,16-dimetil-PGE_2 y (ii) medrisona, hidrocortisona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona.

En diversas realizaciones, condiciones de temperatura suficientes incluyen incubación a una temperatura fisiológicamente relevante, tal como un intervalo de temperatura de aproximadamente 39 ºC (aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente temperatura corporal), que incluye, pero no se limita a, temperaturas de aproximadamente 22 ºC, 23 ºC, 24 ºC, 25 ºC, 26 ºC, 27 ºC, 28 ºC, 29 ºC, 30 ºC, 31 ºC, 32 ºC, 33 ºC, 34 ºC, 35 ºC, 36 ºC, 37 ºC, 38 ºC y 39 ºC. En una realización particular, la condición de temperatura suficiente es entre aproximadamente 35 ºC y 39 ºC. En una realización, la condición de temperatura suficiente es aproximadamente 37 ºC.

En diversas realizaciones, la concentración suficiente de agente(s) es una concentración final de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 µM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 1 µM,

aproximadamente 10 µM, aproximadamente 20 µM, aproximadamente 30 µM, aproximadamente 40 µM, aproximadamente 50 µM, aproximadamente 60 µM, aproximadamente 70 µM, aproximadamente 80 µM, aproximadamente 90 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 110 µM, o aproximadamente 120 µM, o cualquier otra concentración intermedia de 16,16-dimetil-PGE_2 (por ejemplo, 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM). En una realización particular, la concentración suficiente de agente(s) es una concentración final de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM. En una realización, la concentración suficiente de agente(s) es una concentración final de aproximadamente 10 µM.

En diversas realizaciones, el periodo de tiempo suficiente para tratar las células es una duración de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente doce horas, 60 minutos a aproximadamente 6 horas, aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, que incluye, pero no se limita a, tratamiento durante una duración de aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5 horas o aproximadamente 4 horas o cualquier otra duración intermedia. En una realización particular, la duración de tiempo suficiente para tratar las células es aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas. En una realización, la duración suficiente para tratar las células es aproximadamente cuatro horas.

En realizaciones particulares, condiciones suficientes para aumentar una o más propiedades terapéuticas de las células tratadas *in vivo* incluyen incubación en un intervalo de temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 39 ºC; una concentración final de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM de un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide; e incubación durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

En otra realización, condiciones suficientes para aumentar una o más propiedades terapéuticas de las células tratadas *in vivo* incluyen incubación a una temperatura de aproximadamente 37 ºC (aproximadamente temperatura corporal); una concentración final de PGE_2 o 16,16-dimetil-PGE_2 aproximadamente 10 µM, opcionalmente en combinación con una concentración final de medrisona aproximadamente 10 µM; e incubación durante aproximadamente cuatro horas.

En realizaciones particulares, se tratan células madre y/o progenitoras (por ejemplo, se ponen en contacto con uno o más agentes) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces. Las células pueden ser puestas en contacto intermitentemente, episódicamente o secuencialmente con uno o más agentes dentro del mismo recipiente (por ejemplo, poniendo en contacto la población de células con un fármaco durante un periodo de tiempo, intercambiando el medio de cultivo y/o lavando la población de células, luego repitiendo el ciclo con la misma combinación de agentes farmacéuticos o una diferente durante el mismo periodo de tiempo predeterminado o un periodo de tiempo predeterminado diferente).

2. Expresión de CXCR4/perfil de expresión génica de células madre o progenitoras

Las composiciones terapéuticas comprenden una población de células madre o progenitoras tratadas que tiene elevadas propiedades terapéuticas relacionadas con el tratamiento de tejido isquémico. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, el tratamiento de las células con un agonista de la vía de las prostaglandinas y/o un glucocorticoide confiere a las células las elevadas propiedades terapéuticas útiles para tratar tejido isquémico o cada vez más síntomas asociados a un tejido isquémico. Células que tienen las elevadas propiedades terapéuticas se caracterizan por elevada expresión del gen CXCR4 y elevada expresión de la superficie celular del polipéptido CXCR4. En una realización particular, la composición terapéutica comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas caracterizadas por elevados niveles de expresión del gen CXCR4 y de la superficie celular.

Células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, tratadas con un agonista de la vía de las prostaglandinas pueden caracterizarse por al menos un aumento de 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 veces en la expresión del gen CXCR4 en comparación con la expresión de CXCR4 en células sin tratar.

Células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, tratadas con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide pueden caracterizarse por al menos un aumento de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80 veces en la expresión del gen CXCR4 en comparación con la expresión de CXCR4 en células sin tratar.

Células que tienen elevadas propiedades terapéuticas relacionadas con el tratamiento de tejido isquémico pueden caracterizarse además por un distintivo de expresión génica único en las que aumenta la expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o los 10 de los distintivos génicos seleccionados del grupo que consiste en: CXCR4, hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), en comparación con

las células sin tratar.

En realizaciones particulares, células madre o progenitoras hematopoyéticas tratadas con un agonista de la vía de las prostaglandinas tienen un distintivo de expresión génica, en las que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los distintivos génicos aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15 o 20 veces en comparación con las células sin tratar. En algunas realizaciones, el cambio promedio de veces de todos los distintivos génicos es al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o 6 veces. En algunas realizaciones, el cambio promedio de veces de todos los distintivos génicos es al menos aproximadamente 6.

En otras realizaciones particulares, células madre o progenitoras hematopoyéticas tratadas con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide tienen un distintivo de expresión génica, en las que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los distintivos génicos aumenta al menos 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 veces en comparación con las células sin tratar. En algunas realizaciones, el cambio promedio de veces de todos los distintivos génicos es al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30 o 35 veces. En algunas realizaciones, el cambio promedio de veces de todos los distintivos génicos es al menos aproximadamente 25.

La expresión génica o distintivo de expresión génica de las células madre o progenitoras tratadas puede determinarse después de que las células se traten con un agente, o las células pueden incubarse durante cierto periodo de tiempo después del tratamiento antes de determinar el distintivo de expresión génica de las células. Por ejemplo, pueden tratarse células *ex vivo* con un agente, lavarse para eliminar el agente, y analizarse la expresión génica sin incubación adicional de las células. Alternativamente, en algunas realizaciones, se tratan células con un agente, se lavan para eliminar el agente de la población de células, y entonces las células se incuban *ex vivo* durante un cierto periodo de tiempo antes de analizar el distintivo de expresión génica de las células.

D. Agentes

En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende células madre o progenitoras puestas en contacto con uno o más agentes capaces de aumentar la expresión del gen CXCR4 en las células, que incluye agentes que estimulan la vía de las prostaglandinas, por ejemplo, la vía de señalización celular de PGE_2R_2/R_4, opcionalmente en combinación con uno o más glucocorticoides. En realizaciones preferidas, las células son células madre y progenitoras hematopoyéticas.

Como se usa en el presente documento, "agente" se refiere a un compuesto capaz de estimular la vía de las prostaglandinas, por ejemplo, agonista de la vía de las prostaglandinas. Agente también se refiere a un glucocorticoide, descrito más abajo. En realizaciones particulares, un agente aumenta la expresión de CXCR4 en las células tratadas. En ciertas realizaciones, se ponen en contacto células madre o progenitoras con 1, 2, 3, 4, 5 o más agentes en cualquier combinación, simultáneamente o secuencialmente en condiciones suficientes para aumentar la expresión de CXCR4 y/o aumentar una o más propiedades terapéuticas de las células *in vivo*, por ejemplo, elevada migración dirigida a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada, y aumentando la supervivencia celular en el sitio de daño de tejido isquémico.

Se preparan agentes usando prácticas de GMPc, pueden formularse en un disolvente orgánico, tal como acetato de metilo, para su uso en poner en contacto las células de la invención, y pueden suministrarse en un recipiente libre de endotoxinas.

1. Agonistas de la vía de las prostaglandinas

La prostaglandina E_2 (PGE_2) ejerce su función actuando sobre varios receptores de prostaglandina diferentes en diversos tipos de células, activando diversas vías de señalización que incluyen, sin limitación, la vía de PI3-cinasa (PI3-K o PI3K). Estos receptores de prostaglandina representan una subfamilia de los receptores de siete dominios transmembranarios de la superficie celular denominados receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Existen cuatro subtipos de receptores de prostaglandina E_2, PGE_2R_1, PGE_2R_2, PGE_2R_3 y PGE_2R_4. Cuando se activan por un ligando adecuado, o agonista, tal como una prostaglandina o análogo de la misma, por ejemplo, un agonista de PGE_2R_2 o PGE_2R_4, estos receptores de prostaglandina inician una variedad de funciones biológicas aguas abajo. Por ejemplo, la estimulación/activación de la señalización por PGE_2R_2 y/o PGE_2R_4 de células en células madre y progenitoras se acopla, en parte, a la activación de proteína G alfa-s (Gα-s o Gα-s) y estimulación de adenilato ciclasa y a la vía de Wnt (North et al., Nature 447(7147): 1007-11 (2007)).

En diversas realizaciones, la invención contempla una composición terapéutica que comprende células madre o progenitoras puestas en contacto con uno o más agonistas de la vía de las prostaglandinas.

Como se usa en el presente documento, el término "agonista de la vía de las prostaglandinas" se refiere a un agente que estimula las vías de señalización de células de prostaglandina, que incluye un agente que estimula las vías de señalización de células de PGE_2R_2 y/o PGE_2R_4, y aumenta la expresión del gen CXCR4 en las células y mejora una

o más propiedades terapéuticas de la célula *in vivo*, por ejemplo, elevada migración dirigida a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales, elevada vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada, y aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico. Ejemplos ilustrativos de agonistas de la vía de las prostaglandinas que son adecuados para su uso en el tratamiento de células de la invención incluyen, pero no se limitan a, PGE_2, $dmPGE_2$, 15(S)-15-metil-PGE_2, 20-etil-PGE_2, 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE_2 y análogos de PGE_2. En ciertas realizaciones, los agonistas de PGE_2R_2 y PGE_2R_4 y análogos de los mismos son de particular interés, y en algunas realizaciones, el agente se une y activa preferencialmente un receptor de PGE_2 EP_2 o PGE_2 EP_4.

Ejemplos ilustrativos de agonistas de la vía de las prostaglandinas que son adecuados para su uso en el tratamiento de células de la invención también incluyen, pero no se limitan a, PGE_2, $dmPGE_2$ y análogos de PGE_2. En ciertas realizaciones, agonistas de PGE_2R_4 y análogos de los mismos son de particular interés, y en algunas realizaciones, el agente se une y activa preferencialmente un receptor de PGE_2 EP_4.

Como se usa en el presente documento, los términos "prostaglandina E_2" o "PGE_2" incluyen, sin limitación, cualquier molécula de PGE_2 que existe de forma natural o químicamente sintetizada, además de "análogos" de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "análogo" se refiere a una molécula química que es similar a otra sustancia química, por ejemplo, PGE_2, en estructura y función, que se diferencia frecuentemente estructuralmente por un único elemento o grupo, pero puede diferenciarse por modificación de más de un grupo (por ejemplo, 2, 3 o 4 grupos) si retiene la misma función que los productos químicos parentales.

Ejemplos ilustrativos de "análogos" de PGE_2 incluyen, sin limitación, 16,16-dimetil-PGE_2 ($dmPGE_2$), éster p-(p-acetamidobenzamido)fenílico de 16,16-dimetil-PGE_2, 11-desoxi-16,16-dimetil-PGE_2, 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil-PGE_2, 9-desoxi-9-metilen-PGE_2, 9-ceto-fluprostenol, 5-trans-PGE_2, 17-fenil-omega-trinor PGE_2, amida de PGE_2-serinol, éster metílico de PGE_2, 16-fenil-tetranor PGE_2, 15(S)-15-metil-PGE_2, 15(R)-15-metil-PGE_2, 8-iso-15-ceto-PGE_2, éster isopropílico de 8-iso-PGE_2, 20-hidroxi-PGE_2, 11-desoxi-PGE_1, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto-PGE_2 y 19(R)hidroxi-PGE_2.

Los agentes selectivos para el receptor de PGE_2 EP_4 que se unen preferencialmente al receptor de PGE_2 EP_4 tienen una afinidad más alta por el receptor de EP_4 que por cualquiera de los otros tres receptores de EP, concretamente EP_1, EP_2 y EP_3. Agentes ilustrativos que se unen selectivamente al receptor de PGE_2 EP_4 incluyen, pero no se limitan a, agentes seleccionados del grupo que consiste en: 5-[(1E,3R)-4,4-difluoro-3-hidroxi-4-fenil-1-buten-1-il]-1-[6-(2H-tetrazol-5R-il)hexil]-2-pirrolidinona; ácido 2-[3-[(1R,2S,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-5-[2-(metoximetil)fenil]pent-1-enil]-5-oxociclopentiljsulfanilpropilsulfanil]acético; 4-[2-[(1R,2R,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-4-[3-(metoximetil)fenil]but-1-enil]-5-oxociclopentil]etilsulfanil]butanoato de metilo; 16-(3-metoximetil)fenil-ro-tetranor-5-tiaPGE; 5-{3-[(2S)-2-{(3R)-3-hidroxi-4-[3-(trifluorometil)fenil]butil}-5-oxopirrolidin-1-il]propil]tiofeno-2-carboxilato; (3-metil-tiofeno-2-carbonil)-amida] de ácido [4'-[3-butil-5-oxo-1-(2-trifluorometil-fenil)-1,5-dihidro-[1,2,4]triazol-4-ilmetil]-bifenil-2-sulfónico; y ácido ((Z)-7-{(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil}-hept-5-enoico).

En realizaciones particulares, el agonista de la vía de las prostaglandinas es PGE_2, $dmPGE_2$, 15(S)-15-metil-PGE_2, 20-etil-PGE_2 o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE_2.

En una realización preferida, las células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, se tratan (se ponen en contacto) con un agonista de la vía de las prostaglandinas seleccionado del grupo que consiste en: PGE_2 o $dmPGE_2$, opcionalmente en combinación con un glucocorticoide.

2. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son esenciales para la vida y después de extirpar ambas glándulas suprarrenales, los mamíferos no sobrevivirán por mucho tiempo sin sustitución de glucocorticoides. Los receptores para glucocorticoides (GR) son normalmente intracelulares y existen en el citoplasma, no el núcleo, y están asociados a proteínas de choque térmico (HSP). Las HSP son desplazadas cuando los glucocorticoides difunden a través de la membrana celular, y se unen a GR. La posterior fosforilación del complejo glucocorticoide-GR facilita la translocación del complejo en el núcleo donde forma un homo- o heterodímero con otro complejo de hormona-receptor. Los dedos de cinc en el dominio de unión a ADN de los receptores dimerizados interaccionan con el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) para estimular o suprimir la transcripción génica que es normalmente iniciada aguas abajo del GRE.

Los presentes inventores han descubierto inesperadamente que tratar células madre y/o progenitoras con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide produce sorprendentemente un alto aumento en las propiedades terapéuticas de las células tratadas en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En particular, el tratamiento de células madre y/o progenitoras con un agonista de prostaglandina y un glucocorticoide aumenta la expresión de CXCR4, aumenta la expresión de uno o más distintivos génicos y aumenta una o más propiedades terapéuticas de las células *in vivo*, por ejemplo, elevada migración dirigida a sitios de daño

de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico y/o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

Ejemplos ilustrativos de glucocorticoides y agonistas de receptores de glucocorticoides adecuados para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, flunisolida hemihidratada, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, medrisona, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetónido y ulobetasol.

En una realización particular, las células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, se tratan (se ponen en contacto) con un agonista de la vía de las prostaglandinas, en combinación con un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en: cortisol, acetato de cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, fludroacetato de cortisona, acetato de desoxicorticosterona y aldosterona.

En una realización, las células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, se tratan (se ponen en contacto) con un agonista de la vía de las prostaglandinas seleccionado del grupo que consiste en: PGE_2 o $dmPGE_2$, en combinación con un glucocorticoide seleccionado del grupo que consiste en: medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona o triamcinolona.

En una realización preferida, las células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, se tratan (se ponen en contacto) con PGE_2 o $dmPGE_2$, opcionalmente en combinación con medrisona.

E. Administración

Las composiciones de la invención son estériles, y son adecuadas y están listas para administración (es decir, pueden administrarse sin ningún procesamiento adicional) a sujetos humanos. En algunas realizaciones, la composición está lista para infusión en un sujeto. Como se usa en el presente documento, los términos "listo para administración" o "listo para infusión" se refieren a una composición basada en células de la invención que no requiere ningún tratamiento adicional o manipulaciones antes de la administración a un sujeto.

Métodos adecuados para administrar las poblaciones de células usadas en los métodos descritos en el presente documento incluyen administración parenteral, que incluyen, pero no se limita a, métodos de administración intravascular, tales como administración intravenosa e intrarterial. Métodos ilustrativos adicionales para administrar las células de la invención incluyen inyección intramuscular, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, e infusión.

En una realización particular, la composición puede administrarse apicalmente a un sitio de daño de tejido isquémico tal como, por ejemplo, la superficie de una herida, por ejemplo, una herida no cicatrizante, una úlcera, una quemadura o congelación.

Más preferentemente, el sitio de administración está próximo a o cerca del sitio de actividad previsto, es decir, cerca del sitio de isquemia de tejido. En casos cuando un sujeto padece isquemia global, se prefiere una administración sistémica, tal como administración intravenosa. Sin pretender quedar ligado por mecanismo, cuando las composiciones terapéuticas se administran, las células madre y progenitoras migran o migran de forma dirigida al tejido isquémico en respuesta a factores quimiotácticos producidos debido a la lesión para efectuar el tratamiento de tejido isquémico o tratamiento y mejora de al menos un síntoma asociado al tejido isquémico.

Las células madre pueden inyectarse directamente en el área de isquemia, o las células madre pueden ser infundidas en una arteria que suministra al área de isquemia de tejido. Donde el sujeto tiene un vaso totalmente ocluido que normalmente no suministraría al área del tejido isquémico, la arteria seleccionada para infusión es preferentemente un vaso que proporciona flujo colateral al tejido isquémico en la distribución del vaso totalmente ocluido.

Realizaciones ilustrativas particulares de los métodos descritos en el presente documento para tratar o mejorar la isquemia en al menos un síntoma de isquemia comprenden administrar por vía intravenosa o inyectar directamente CMPH a un sujeto.

Las células pueden insertarse en un dispositivo de administración que facilita la introducción por inyección o implantación en los sujetos. Tales dispositivos de administración pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y líquidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En una realización, los tubos tienen además una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de la que las células de la invención pueden introducirse en el sujeto en una localización deseada. En una realización particular, las células se formulan para administración en un vaso sanguíneo mediante un catéter (donde el término "catéter" pretende incluir cualquiera de los diversos sistemas de tipo tubo para la administración de sustancias a un vaso sanguíneo).

F. Dosis y formulación

En diversas realizaciones, la invención contempla la administración de la composición terapéutica a un paciente humano, o un sujeto en necesidad de terapia para un tejido isquémico o un paciente que presenta al menos un síntoma de isquemia de tejido. La cantidad de células madre o progenitoras contenida en la composición terapéutica y administrada a un paciente variará con la fuente de las células, estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo.

1. Dosis

Administración de una "cantidad" de células madre y progenitoras a un sujeto se refiere a la administración de "una cantidad eficaz" para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado, que incluye sin limitación el tratamiento del sujeto.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de células madre y progenitoras que es eficaz para "tratar" un sujeto (por ejemplo, un paciente). Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales de las células madre o progenitoras hematopoyéticas son compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de células madre o progenitoras eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

En una realización, la cantidad de células madre o progenitoras (por ejemplo, células CD34+) en la composición administrada a un sujeto es al menos $0{,}1 \times 10^5$ células, al menos $0{,}5 \times 10^5$ células, al menos 1×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 10×10^5 células, al menos $0{,}5 \times 10^6$ células, al menos $0{,}7^5 \times 10^6$células, al menos 1×10^6 células, al menos $1{,}25 \times 10^6$ células, al menos $1{,}5 \times 10^6$células, al menos $1{,}75 \times 10^6$ células, al menos 2×10^6 células, al menos $2{,}5 \times 10^6$células, al menos 3×10^6 células, al menos 4×10^6 células, al menos 5×10^6 células, al menos 10×10^6 células, al menos 15×10^6 células, al menos 20×10^6 células, al menos 25×10^6 células, o al menos 30×10^6 células.

En una realización, la cantidad de células madre o progenitoras en la composición administrada a un sujeto es al menos $0{,}1 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos $0{,}5 \times 10^5$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^5 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^5 células/kg de peso corporal, al menos $0{,}5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $0{,}75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 1×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $1{,}25 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1{,}5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos $1{,}75 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 2×10^6 células/kg de peso corporal, al menos $2{,}5 \times 10^6$ células/kg de peso corporal, al menos 3×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 4×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 5×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 10×10^6células/kg de peso corporal, al menos 15×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 20×10^6 células/kg de peso corporal, al menos 25×10^6 células/kg de peso corporal, o al menos 30×10^6 células/kg de peso corporal.

Un experto habitual en la materia reconocería que pueden requerirse múltiples administraciones de las composiciones de la invención para efectuar la terapia deseada. Por ejemplo, puede administrarse una composición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces durante un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5, años, 10 años, o más.

En realizaciones preferidas, las células madre o progenitoras son células madre y progenitoras hematopoyéticas.

2. Formulación

Las composiciones de la presente invención pueden ser especialmente formuladas para administración en forma sólida o líquida, que incluyen aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida o injertos de células, biomateriales, armazones, etc.

En diversas realizaciones, se proporciona un armazón biocompatible o injerto para promover la reparación, sustitución y/o regeneración de un tejido u órgano dañado, lesionado o enfermo, por ejemplo, un tejido isquémico.

En ciertas realizaciones ilustrativas, un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de CMPH de la invención comprende proporcionar un armazón biocompatible o injerto de células que comprende CMPH de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "armazón biocompatible" o "injerto de células" se refiere a una estructura natural y/o sintética biocompatible que comprende una o más composiciones basadas en células, células, tejidos, polímeros, polinucleótidos, estructuras reticulares y/o matrices que se inyectan, aplican a la superficie de o injertan dentro de un paciente o sujeto que es adecuado para dirigir o atraer una composición basada en células para reparar, regenerar o sustituir una célula, tejido u órgano *in vivo.*

En realizaciones ilustrativas particulares, un implante comprende una matriz biocompatible que puede moldearse en cualquier forma adecuada y tiene funciones especialmente importantes para preparar tejidos en una forma tridimensional que tiene una cierta profundidad o altura o una forma de tipo hoja plana para aplicación a heridas dérmicas. La ciencia de biomateriales es un campo establecido y en desarrollo (Takayama et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, pag. 209-218; Saltmann et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 221-236; Hubbell et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 237-250; Thomson et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 251-262; Pachence et al., Principles of Tissue Engineering, segunda edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 263-278).

Los químicos han desarrollado métodos de síntesis de un armazón biocompatible que comprende polímeros para dirigir y modular el crecimiento celular *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo.* Las propiedades físicas de los polímeros pueden modularse para crear matrices sólidas y líquidas de concentraciones y viscosidades específicas. Algunos polímeros son estables *in vivo* y seguirán en el cuerpo de un paciente durante hasta 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o más años. Otros polímeros también son biodegradables, resorbiéndose a una tasa fija con el tiempo para permitir la sustitución por proteínas de la matriz extracelular recientemente sintetizadas. La resorción puede producirse en el plazo de días a semanas o meses tras la implantación (Pachence et al, Principles of Tissue Engineering, Segunda Edición, edit Lanza RP, Langer R, Vacanti J., Academic Press, San Diego, 2000, p 263-278).

En otras realizaciones ilustrativas, un armazón biocompatible comprende un material bioabsorbible. Se produce un vehículo poroso preferentemente a partir de un componente o una combinación de múltiples componentes seleccionados del grupo que consiste en colágeno, derivados de colágeno, ácido hialurónico, hialuronatos, quitosano, derivados de quitosano, polirrotaxano, derivados de polirrotaxano, quitina, derivados de quitina, gelatina, fibronectina, heparina, laminina y alginato de calcio; en las que se produce un miembro de soporte a partir de un componente o una combinación de múltiples componentes seleccionados del grupo que consiste en ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, copolímero de ácido poliláctico-policaprolactona y copolímero de ácido poliglicólico-policaprolactona (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.077.049 y 5.42.033, y publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0121085, de las que las formulaciones de polímero y métodos de producción de los mismos de cada patente y solicitud se incorporan en el presente documento en su totalidad).

En realizaciones ilustrativas particulares de la presente invención, el armazón biocompatible o injerto de células comprende un material líquido biocompatible viscoso. El líquido biocompatible es capaz de gelificar a temperatura corporal y está seleccionado del grupo que consiste en alginato, colágeno, fibrina, hialina o plasma. El material líquido biocompatible viscoso también puede combinarse con una matriz tridimensional maleable capaz de llenar un defecto de tejido irregular. La matriz es un material que incluye, pero no se limita a, ácido poliglicólico-poliláctico, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, o material de tipo sutura.

En realizaciones ilustrativas adicionales, los armazones biocompatibles o injertos de células que comprenden matrices pueden moldearse en formas deseadas (por ejemplo, estructuras bidimensionales o tridimensionales) propicias para o que facilitan el desarrollo de células, tejidos y/u órganos. El implante puede formarse a partir de material polimérico, que tiene fibras tales como una malla o esponja. Una estructura tal proporciona área suficiente sobre la que las células pueden crecer y proliferar. Deseablemente, las matrices de los armazones o injertos de células son biodegradables con el tiempo, de manera que serán absorbidos en la materia del animal a medida que se desarrolla. Polímeros adecuados pueden ser homopolímeros o heteropolímeros y pueden formarse a partir de monómeros que incluyen, pero no se limitan a, ácido glicólico, ácido láctico, fumarato de propilo, caprolactona, y

similares. Otro material polimérico adecuado puede incluir una proteína, polisacárido, polihidroxiácido, poliortoéster, polianhídrido, polifosfaceno, o un polímero sintético, particularmente un polímero biodegradable, o cualquier combinación de los mismos.

Los armazones de tipo hoja e injertos proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para tejidos dérmicos, membranas para procedimientos de cobertura de raíces dentales, tejidos membranosos (por ejemplo, duramadre), huesos planos (por ejemplo, cráneo, hueso de mama) y similares. Implantes e injertos tubulares proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para arterias, venas, uréteres, uretras, nervios, huesos largos (por ejemplo, fémur, fíbula, tibia, húmero, radio, cúbito, metacarpianos, metatarsiano, etc.) y similares. Otros implantes e injertos tridimensionales proporcionan terapia reparadora, de sustitución y/o regenerativa para trasplantes de órganos (por ejemplo, hígado, pulmón, piel, corazón, páncreas, etc.), remodelación de hueso o reparación de todos los tipos de huesos, implantes dentales, o para injertos de músculo, tendón, ligamento y cartílago.

En una realización, un método de tratamiento o mejora de un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia o al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia comprende la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende CMPH de la invención.

Realizaciones ilustrativas particulares de los métodos descritos en el presente documento para tratar o mejorar un tejido isquémico o tejido dañado por isquemia o al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia comprenden la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende CMPH tratadas con una combinación de uno o más agentes que incluyen (i) PGE_2, $dmPGE_2$, 15(S)-15-metil-PGE_2, 20-etil-PGE_2 o 8-iso-16-ciclohexil-tetranor PGE_2 y (ii) un glucocorticoide. En realizaciones más particulares, los métodos comprenden la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende CMPH tratadas con (i) PGE_2 o 16,16-dimetil-PGE_2 y (ii) medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o alclometasona. En realizaciones más particulares, el método comprende la administración directa, a un tejido isquémico, de un armazón biocompatible o injerto de células que comprende CMPH tratadas con (i) PGE_2 o 16,16-dimetil-PGE_2 y (ii) medrisona.

Composiciones terapéuticamente aceptables estériles adecuadas para administración a un sujeto pueden comprender uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, medio de cultivo celular), u otros componentes farmacéuticamente aceptables. Vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son determinados en parte por la composición particular que se administra, además de por el método particular usado para administrar la composición terapéutica. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones terapéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed. 2005).

En realizaciones particulares, las composiciones que comprenden células madre y/o progenitoras comprenden un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Una composición que comprende células madre y/o progenitoras de la presente invención puede administrarse por separado por métodos de administración enteral o parenteral o en combinación con otros compuestos adecuados para efectuar los objetivos de tratamiento deseados.

El vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable debe ser de pureza suficientemente alta y de toxicidad suficientemente baja para hacer que sea adecuado para administración al sujeto humano que está tratándose. Además, debe mantener o aumentar la estabilidad de la composición terapéutica. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, con el modo planeado de administración en mente, para proporcionar la masa deseada, consistencia, etc., cuando se combina con otros componentes de la composición terapéutica de la invención. Por ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitación, un aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.), una carga (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos, hidrógeno fosfato de calcio, etc.), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato sódico, etc.), un disgregante (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.), o un agente humectante (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares.

Tales soluciones de vehículo también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a una solución o líquido cuya constitución química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Ejemplos de tampones previstos por la invención incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, solución de Ringer, 5 % de dextrosa en agua (D5W) y solución salina normal/fisiológico (0,9 % de NaCl).

Estos vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la composición terapéutica de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10. Como tal, el agente de tamponamiento puede ser tanto como aproximadamente el 5 % en una base en peso de la composición total. También pueden incluirse electrolitos tales como, pero no se limitan a, cloruro sódico y cloruro de potasio en la composición terapéutica.

El vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyentes y otros componentes que comprenden la composición lista para administración de la invención derivan de los reactivos de calidad farmacéutica estadounidenses que permitirán que la composición se use en regímenes clínicos. Normalmente, estos reactivos acabados, que incluyen cualquier medio, solución, u otros vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se esterilizan de un modo convencional en la materia, tal como se esterilizan por filtración, y se prueban para diversos contaminantes no deseados, tales como contaminación por micoplasmas, endotoxinas o por virus, antes de uso. El vehículo farmacéuticamente aceptable en una realización está sustancialmente libre de proteínas naturales de origen humano o animal, y es adecuado para guardar la población de células de la composición, que incluye células madre y progenitoras hematopoyéticas.

La invención también contempla, en parte, el uso de un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable en composiciones particulares y/o cultivos de la presente invención. Tales composiciones son adecuadas para administración a sujetos humanos. En términos generales, cualquier medio que soporte el mantenimiento, crecimiento y/o salud de las células madre y/o progenitoras de la invención es adecuado para su uso como un medio de cultivo celular farmacéutico. En realizaciones particulares, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio sin suero.

La composición terapéutica puede comprender medio sin suero adecuado para guardar la población de células que comprende la composición. El medio sin suero tiene varias ventajas con respecto al medio que contiene suero, que incluye una composición simplificada y mejor definida, un grado reducido de contaminantes, eliminación de una posible fuente de agentes infecciosos y coste más bajo. En diversas realizaciones, el medio sin suero es libre de animal, y puede opcionalmente ser libre de proteína. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. Medio "libre de animal" se refiere a medio en el que los componentes derivan de fuentes distintas de animal. Las proteínas recombinantes sustituyen a las proteínas de animal nativas en medio libre de animal y los nutrientes se obtienen de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. El medio libre de proteína, a diferencia, se define como sustancialmente libre de proteína.

Ejemplos ilustrativos de medio sin suero empleado en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies), AIM V (Life Technologies) y X-VIVO 10 (BioWhittaker Catalogue).

En diversas realizaciones, la composición de la invención comprende una solución estéril de albúmina de suero humano (HSA), tal como 5 % de HSA, y dextrano de bajo peso molecular (LMW) y está sustancialmente libre de contaminación por micoplasma, endotoxina y microbiana. En realizaciones particulares, la composición terapéutica contiene menos de aproximadamente 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,05 µg/ml de albúmina de suero bovino.

Un experto habitual en la materia apreciaría que el ejemplo anterior de medio es ilustrativo y de ninguna forma limita la formulación de medios adecuados para su uso en la presente invención y que se conocen muchos de tales medios y están disponibles para los expertos en la materia.

G. Métodos de tratamiento

La presente invención contempla, en parte, métodos de terapia basada en células para tratar tejido isquémico o tratar o mejorar uno o más síntomas asociados a isquemia de tejido, que incluyen, pero no se limitan a, calambres, claudicación, entumecimiento, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, cambio de color de la piel y gangrena.

El tejido isquémico puede tratarse por elevada migración dirigida de células madre y/o progenitoras a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico. Por consiguiente, la presente invención contempla, en parte, que células que tienen estas propiedades terapéuticas serían útiles en el tratamiento de tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia o el tratamiento o mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico.

Los presentes inventores han desarrollado células madre y progenitoras que tienen sorprendentemente altos niveles de expresión de CXCR4 poniéndolas en contacto con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide. Estas novedosas células pueden identificarse usando distintivos de expresión génica particulares o por ensayos funcionales, por ejemplo, ensayos de migración Transwell. Los inventores también han determinado que estas células novedosas tienen propiedades terapéuticas que serían útiles en el tratamiento de tejido isquémico.

Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, la presente invención contempla, en parte, que poner en contacto células madre o progenitoras, por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas, con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide, en condiciones suficientes para aumentar la expresión de CXCR4 en las células madre o progenitoras puestas en contacto a los niveles desvelados en el presente documento, y a niveles no informados en células terapéuticas que existen en la materia, confiere a las células madre y progenitoras puestas en contacto elevadas propiedades terapéuticas que son útiles en el tratamiento o mejora de una lesión isquémica de tejido o un síntoma asociado a una lesión isquémica de tejido.

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia o al menos un síntoma asociado al mismo, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras puestas en contacto con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide, y que tiene elevada expresión de CXCR4, en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En una realización, las células proporcionan terapia al sujeto por elevada migración dirigida de células madre y/o progenitoras a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

En diversas otras realizaciones, la presente invención proporciona un método de tratamiento o mejora de una lesión isquémica de tejido que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en contacto con un agonista de la vía de las prostaglandinas, y opcionalmente un glucocorticoide, y que tiene elevadas propiedades terapéuticas, por ejemplo, la expresión de CXCR4, en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En una realización, las células madre o progenitoras hematopoyéticas proporcionan terapia al sujeto por elevada migración dirigida de hematopoyético células madre y/o progenitoras a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

En diversas otras realizaciones, la presente invención proporciona un método de tratamiento o mejora de un síntoma asociado a una lesión isquémica de tejido que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras puestas en contacto con a PGE_2 o $dmPGE_2$, y opcionalmente un glucocorticoide, por ejemplo, medrisona, y que tiene elevadas propiedades terapéuticas, por ejemplo, la expresión de CXCR4, en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En una realización, las células proporcionan terapia al sujeto por elevada migración dirigida de células madre y/o progenitoras a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

En aún diversas otras realizaciones, la presente invención proporciona un método de tratamiento o mejora de un síntoma asociado a una lesión isquémica de tejido que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas puestas en contacto con PGE_2 o $dmPGE_2$, y opcionalmente un glucocorticoide, por ejemplo, medrisona, y que tiene elevadas propiedades terapéuticas, por ejemplo, la expresión de CXCR4, en comparación con células de control, portadoras o no tratadas. En una realización, las células madre o progenitoras hematopoyéticas proporcionan terapia al sujeto por elevada migración dirigida de células madre o progenitoras hematopoyéticas a sitios de daño de tejido isquémico, elevado reclutamiento de células madre endógenas y células progenitoras endoteliales en el sitio de tejido isquémico, elevada estimulación de la vascularización en el sitio de tejido isquémico, reduciendo la necrosis de tejido isquémico o muerte celular programada, o aumentando la supervivencia celular en el sitio de tejido isquémico.

Los métodos de la invención son adecuados para tratar daño isquémico a cualquier tipo de tejido o un síntoma de isquemia asociado a cualquier tipo de tejido. Además, los métodos de la presente invención son adecuados para tratar ya sea isquemias focales y globales e isquemias que son agudas o crónicas o cualquier combinación adecuada de las mismas.

Ejemplos ilustrativos de tejidos que son adecuados para el tratamiento con las composiciones de la presente invención incluyen tejido mesodérmico, tejido endodérmico o tejido ectodérmico. Otros tejidos adecuados para el tratamiento con las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tejido de piel, tejido de músculo esquelético, tejido de músculo cardíaco, tejido de músculo liso, tejido de cartílago, tejido de tendón, tejido de hueso, tejido cerebral, tejido de médula espinal, tejido retiniano, tejido de córnea, tejido de pulmón, tejido de hígado, tejido de riñón, tejido pancreático, tejido de ovario, tejido testicular, tejido intestinal, tejido de estómago y tejido de vejiga.

En realizaciones particulares, cualquier tejido que tenga un riego sanguíneo comprometido y sea isquémico o en

riesgo de llegar a ser isquémico puede tratarse usando los métodos de la invención.

Los métodos de la invención también son adecuados para tratar órganos isquémicos o un síntoma asociado a un órgano isquémico. Ejemplos ilustrativos de órganos que son adecuados para el tratamiento con las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, piel, hueso, corazón, cerebro, médula espinal, ojo, pulmón, hígado, vesícula biliar, riñón, páncreas, ovario, testículos, intestino, estómago y vejiga.

En diversas realizaciones, los métodos de la invención son adecuados para tratar isquemia que resulta de o está asociada a cualquier trastorno genético, afección sindrómica, lesión traumática, afección crónica, intervención médica, o cualquier otra causa de isquemia conocida para aquellos que expertos habituales en la materia.

Ejemplos ilustrativos de trastornos genéticos, afecciones sindrómicas, lesiones traumáticas, afecciones crónicas, intervenciones médicas, u otras afecciones que causan o están asociadas a isquemia, o aumentan el riesgo de isquemia en un sujeto, o causan que un sujeto presente cada vez más síntomas de isquemia, y así, adecuados para el tratamiento o mejora usando los métodos de la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome disneico agudo (SDA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto de cartílago auricular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura de hueso, fractura de hueso, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger (tromboangeítis obliterante), quemaduras, cáncer, enfermedad cardiovascular, daño de cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño de tejido conjuntivo, contusión, enfermedad de las arterias coronarias (EAC), isquemia crítica de las extremidades (ICE), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, curación retardada de úlceras, cicatrización retardada, diabetes (tipo I y tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, enfermedad injerto contra huésped, congelación, enfermedad vascular isquémica por telangiectasia hemorrágica hereditaria, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión por reperfusión isquémica, laceración, enfermedad de las arterias coronarias principales izquierdas, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia de órganos, osteoartritis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad de las arterias periféricas, isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, pre-cáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, septicemia, úlceras de la piel, trasplante de órgano sólido, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, quiste óseo subcondral, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia de tejido, ataque isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular del riñón, afecciones vasculares inflamatorias, síndrome de von Hippel-Lindau, y heridas a tejidos u órganos.

Otros ejemplos ilustrativos de trastornos genéticos, afecciones sindrómicas, lesiones traumáticas, afecciones crónicas, intervenciones médicas, u otras afecciones que causan o están asociadas a isquemia, o aumentan el riesgo de isquemia en un sujeto, o causan que sujeto presente cada vez más síntomas de isquemia adecuados para el tratamiento o mejora usando los métodos de la presente invención, incluyen, isquemia resultante de cirugía, quimioterapia, radioterapia, o trasplante o injerto de células, tejidos o de órganos.

En diversas realizaciones, los métodos de la presente invención son adecuados para tratar isquemia cerebrovascular, isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades (ICE), isquemia miocárdica (especialmente isquemia miocárdica crónica), cardiomiopatía isquémica, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia intestinal, y similares.

En diversas realizaciones, la presente invención contempla que las composiciones de células terapéuticas desveladas en el presente documento pueden usarse para tratar un tejido isquémico en el que se desea aumentar la circulación sanguínea, suministro de oxígeno, suministro de glucosa, o suministro de nutrientes al tejido.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solo y no a modo de limitación. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para dar resultados esencialmente similares.

Ejemplos

Ejemplo 1

Ensayos de migración Transwell de SDF-1

Métodos

Se realizaron ensayos de migración Transwell usando cámaras de quimiotaxia de 96 pocillos, membrana de policarbonato de 5 µM de tamaño de poro (Corning Inc., Corning, NY) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, entonces se trataron células $CD34^+$ durante 4 horas a 37 ºC con 16,16-dimetil-PGE_2 ($dmPGE_2$), $dmPGE_2$ y glucocorticoide, o control de DMSO a una concentración de 10 µM en medio StemSpan® (StemCell Technology, Vancouver, Canadá). Las células se lavaron entonces por centrifugación (300 g durante 10 minutos) y se resuspendieron en tampón de ensayo Transwell (medio RPMI libre de rojo de fenol (Mediatech), 0,5 % de BSA libre de lípidos (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40.000-60.000 células/75 µl.

Para probar la duración de los efectos del tratamiento, se lavó una porción de células tratadas por centrifugación (300 g durante 10 minutos) y se resuspendió en medio StemSpan® durante 4 horas a 37 ºC sin $dmPGE_2$, glucocorticoides o DMSO y luego se lavó otra vez por centrifugación (300 g durante 10 minutos) y se resuspendió en tampón de ensayo Transwell (medio RPMI libre de rojo de fenol (Mediatech), 0,5 % de BSA libre de lípidos (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40.000-60.000 células/75 µl.

Se añadieron setenta y cinco µl de suspensión de células a la cámara superior de la placa, mientras que se añadieron 235 µl de medio de ensayo Transwell que contenía 0 o 50 ng/ml de SDF1α (R&D System, Mineápolis, MN) al pocillo inferior. Se obtuvo el número total de células en el pocillo inferior por citometría de flujo después de 2,5 horas de incubación a 37 ºC, 5 % de CO_2.

Resultados

Se trataron células $CD34^+$ con control de DMSO, $dmPGE_2$, o $dmPGE_2$ y medrisona como se ha descrito anteriormente. Las células tratadas se dispusieron en las cámaras superiores de una placa de cultivo Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadidas a la cámara superior. El tratamiento con $dmPGE_2$ aumentó la migración conducida por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 1). El tratamiento de combinación de $dmPGE_2$ y medrisona aumentó la migración de células conducida por SDF1 más que $dmPGE_2$ solo o control de DMSO (véase la Figura 1). Así, las células $CD34^+$ tratadas con $dmPGE_2$, o $dmPGE_2$ y medrisona migraron más eficientemente hacia SDF1 en comparación con las células tratadas con control de DMSO.

Se trataron células $CD34^+$ con control de DMSO, $dmPGE_2$, o $dmPGE_2$ y un glucocorticoide (medrisona, hidrocortisona, triamcinolona, alclometasona, dipropionato de alclometasona o dexametasona) como se ha descrito anteriormente. Las células tratadas se dispusieron en las cámaras superiores de una placa de cultivo Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadidas a la cámara superior. El tratamiento con $dmPGE_2$ aumentó la migración de células conducida por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 2). Además, el tratamiento con dmPGE2 combinado con ya fuera medrisona, hidrocortisona, triamcinolona, alclometasona, dipropionato de alclometasona o dexametasona aumentó la migración de células conducida por SDF1 más eficazmente que dmPGE2 solo o control de DMSO (véase la Figura 2). Así, las células $CD34^+$ tratadas con $dmPGE_2$, o $dmPGE_2$ y diversos glucocorticoides migraron más eficientemente hacia SDF1 en comparación con células tratadas con control de DMSO y mostró que la potenciada propiedad de migración de las células tratadas con agonista de la vía de las prostaglandinas/glucocorticoide no se limita a un glucocorticoide particular.

Se probó la duración del efecto de migración potenciado de células tratadas con $dmPGE_2$/glucocorticoide hacia SDF1. Se trataron células $CD34^+$ con DMSO o $dmPGE_2$ y medrisona. Se dispusieron células recién tratadas o células tratadas incubadas durante 4 adicionales sin tratamiento adicional (como se ha descrito anteriormente) en las cámaras superiores de una placa de cultivo Transwell con 0 ng/ml de SDF1 o 50 ng/ml de SDF1 en las cámaras inferiores. La migración se expresó como el % de células añadidas, es decir, el número de células en la cámara inferior normalizado al número de células inicialmente añadido a la cámara superior. El tratamiento con $dmPGE_2$ y medrisona aumentó la migración de células conducida por SDF1 en comparación con el control de DMSO (véase la Figura 3). Además, migraron células tratadas con $dmPGE_2$ y medrisona incubadas durante 4 horas adicionales sin tratamiento adicional, además de las células recién tratadas. Así, el potenciado efecto de migración de las células tratadas con agonista de la vía de las prostaglandinas/glucocorticoide hacia SDF1 es estable durante al menos cuatro horas, que indicó que el efecto también estaría presente en la administración de las células tratadas a un sujeto.

Ejemplo 2

CMPH tratadas con PGE_2 y PGE_2/glucocorticoide mejoran la función neurológica y locomotora en un modelo de isquemia de rata

Métodos

Se sometieron ratas Wistar macho adultas a una isquemia focal transitoria por el modelo de bloqueo de la arteria cerebral media derecha MCAO (oclusión de la arteria cerebral media). Se empujó una sutura de nailon quirúrgica con una punta redondeada desde la arteria carótida externa en la luz de la arteria carótida interna hasta que bloqueó el origen de la arteria cerebral media. Después de 2 horas, se sacó la sutura para permitir la reperfusión. Un día después de la reperfusión, las ratas se inyectaron por la vena de la cola con o bien soluciones salina equilibrada de Hanks (HBSS), CMPH tratadas con DMSO, o CMPH tratadas con $dmPGE_2$ y medrisona. También se incluyó un inhibidor de tipo 4 de fosfodiesterasa (YM976) para aumentar la durabilidad del potenciado efecto celular. El trabajo de los presentes inventores demuestra que los inhibidores de PDE4 no cambian significativamente las propiedades de la célula potenciada. Las células se incubaron con compuesto o DMSO en medio de cultivo durante 4 horas a 37 ºC. Antes de la inyección, se centrifugaron las células pretratadas; el sobrenadante resultante se aspiró; y el sedimento de células se resuspendió en HBSS.

Un día y 1, 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inyección, las ratas se evaluaron para déficits neurológicos con prueba de comportamiento realizada por un investigador que se cegó a los grupos experimentales. Se calculó una puntuación de gravedad neurológica modificada (mNSS) basada en un panel publicado de pruebas motoras, sensoriales, de equilibrio y de reflejos (Chen et al., Stroke 32:2682-2688 (2001)).

Además, 1 día y 1, 2, 3, 4 y 5 semanas después de la inyección, se evaluó la función locomotora en las ratas tratadas con una prueba de fallos de las patas en la que el animal cruzó una pasarela perforada. Se midieron el número total de pasos de las extremidades anteriores y el número de pasos en falso, en los que la extremidad anterior izquierda se cayó a través de una perforación.

Resultados

Las ratas se administraron con CMPH tratadas, y se probó la capacidad del efecto de tratamiento para reducir el déficit neurológico en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO. Se inyectaron por vía intravenosa CMPH tratadas 24 horas después de la lesión isquémica cerebral unilateral. Se evaluó la función neurológica con una batería de pruebas de comportamiento y se informó como mNSS. Células tratadas con $dmPGE_2$ y medrisona mejoraron significativamente mNSS 7, 14 y 35 días en comparación con el control de vehículo, mientras que las células tratadas con DMSO no afectaron significativamente mNSS (véase la Figura 4). *$p < 0,05$ (n=6/grupo).

Las ratas se administraron con CMPH tratadas con $dmPGE_2$ y medrisona, y se probó la capacidad del efecto de tratamiento para reducir el déficit locomotor en el modelo de accidente cerebrovascular MCAO. Se inyectaron por vía intravenosa CMPH tratadas 24 horas después de la lesión isquémica cerebral unilateral. Se evaluó la función locomotora como el % de fallos de las patas cuando cruzaron una pasarela perforada. Células tratadas con $dmPGE_2$ y medrisona disminuyeron significativamente el % de fallos de las patas 7 y 35 días en comparación con control de vehículo, mientras que las células tratadas con DMSO no afectaron significativamente el % de fallos de las patas (véase la Figura 5). *$p < 0,05$ (n=6/grupo).

Así, las CMPH tratadas con un antagonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide trataron eficazmente la isquemia y los síntomas asociados a la misma, en el modelo MCAO de rata.

Ejemplo 3

Métodos

Aislamiento de células Lin (-)$CD34^+$ de sangre completa de cordón tratada

Se obtuvieron células mononucleares de sangre completa de cordón humano de Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá). Tras la descongelación, las células se trataron con 16,16-dimetil-PGE_2 o controles apropiados, por ejemplo, DMSO, en LMD/5 % de medio HSA.

REIVINDICACIONES

1. Células madre o progenitoras para su uso en migración dirigida de células madre o progenitoras a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto,
en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas *ex vivo* en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos 2 veces en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en las que dichas condiciones comprenden tratamiento con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide durante un periodo inferior a 24 horas y a una temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 37 ºC para producir células madre o progenitoras tratadas.

2. Células madre o progenitoras para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto,
en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas *ex vivo* en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos 2 veces en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en las que dichas condiciones comprenden tratamiento con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide durante un periodo inferior a 24 horas y a una temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 37 ºC para producir células madre o progenitoras tratadas.

3. Células madre o progenitoras para su uso en mejorar al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto,
en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas *ex vivo* en condiciones suficientes para aumentar la expresión del gen CXCR4 al menos 2 veces en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en las que dichas condiciones comprenden tratamiento con un agonista de la vía de las prostaglandinas y un glucocorticoide durante un periodo inferior a 24 horas y a una temperatura de aproximadamente 22 ºC a aproximadamente 37 ºC para producir células madre o progenitoras tratadas.

4. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas durante un periodo de aproximadamente una a aproximadamente cuatro horas, y preferentemente durante aproximadamente dos horas.

5. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en las que las células madre o progenitoras han sido tratadas a aproximadamente 37 ºC.

6. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas está seleccionado del grupo que consiste en: una prostaglandina, un agonista de receptor de la prostaglandina EP2, un agonista de receptor de la prostaglandina EP4 y un agente que tiene actividad de 16,16-dimetil-PGE2 (dmPGE2), en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas es preferentemente la prostaglandina E_2 (PGE_2) o $dmPGE_2$.

7. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el glucocorticoide está seleccionado del grupo que consiste en: alclometasona, dipropionato de alclometasona, amcinonida, beclometasona, dipropionato de beclometasona, betametasona, benzoato de betametasona, valerato de betametasona, budesonida, ciclesonida, clobetasol, butirato de clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, cortisol, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, desoxicortona, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diacetato de diflorasona, diflucortolona, valerato de diflucortolona, difluorocortolona, difluprednato, fluclorolona, acetónido de fluclorolona, fludroxicortida, flumetasona, flumetasona, pivalato de flumetasona, flunisolida, flunisolida hemihidratada, fluocinolona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortina, fluocortina butilo, fluocortolona, fluorocortisona, fluorometolona, fluperolona, fluprednideno, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, fluticasona, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, halometasona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, aceponato de hidrocortisona, buteprato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, loteprednol, medrisona, meprednisona, 6a-metilprednisolona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, aceponato de metilprednisolona, mometasona, furoato de mometasona, furoato de mometasona monohidratado, parametasona, prednicarbato, prednisolona, prednisona, prednilideno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetónido y ulobetasol, en las que el glucocorticoide está seleccionado preferentemente del grupo que consiste en: medrisona, hidrocortisona, alclometasona, dexametasona, metilprednisolona, triamcinolona o cortisol.

8. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas es PGE_2 o $dmPGE_2$ o un análogo del mismo, y el glucocorticoide es medrisona o dexametasona.

9. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en las que el agonista de la vía de las prostaglandinas es $dmPGE_2$ y el glucocorticoide es dexametasona.

10. Una composición que comprende células madre o progenitoras que tienen al menos un aumento de 20 veces en la expresión del gen CXCR4 en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, para su uso en

(a) un método de aumento de la migración dirigida de células madre o progenitoras a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende administrar dicha composición a un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia;
(b) un método de tratamiento de un sujeto que tiene un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición; y/o
(c) un método de mejora de al menos un síntoma asociado a un tejido isquémico o un tejido dañado por isquemia en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.

11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en la que la expresión de uno o más genes asociados a elevada migración dirigida de las células madre o progenitoras al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia aumenta al menos dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en la que el uno o más genes está seleccionado del grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de especificidad doble (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador del elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo 1, alfa 1 (COL1A1) y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2).

12. La composición para su uso según la reivindicación 11, en la que la expresión génica de al menos dos, tres o cinco de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1 y FOSL2 aumenta al menos aproximadamente dos veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas, en la que la expresión génica de al menos uno de HAS1, GEM, DUSP4, AREG, NR4A2, REN, CREM, COL1A1 y FOSL2 es preferentemente elevada al menos aproximadamente cinco, diez, veinte, cincuenta, sesenta, setenta u ochenta veces en las células madre o progenitoras tratadas en comparación con las células madre o progenitoras no tratadas.

13. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en las que

(a) las células madre o progenitoras son células madre embrionarias o células madre adultas;
(b) las células madre o progenitoras están seleccionadas del grupo que consiste en: células madre o progenitoras endoteliales, células madre o progenitoras mesodérmicas y células madre o progenitoras ectodérmicas;
(c) las células madre o progenitoras están seleccionadas del grupo que consiste en: células madre o progenitoras mesenquimatosas, células madre o progenitoras hematopoyéticas, células madre o progenitoras placentarias, células madre o progenitoras del cordón umbilical, células madre de médula ósea y células madre o progenitoras de gelatina de Wharton;
(d) las células madre o progenitoras son células madre o progenitoras hematopoyéticas, en las que las células son opcionalmente aisladas de sangre periférica, médula ósea, sangre del cordón umbilical, gelatina de Wharton, placenta o sangre fetal;
(e) las células madre o progenitoras son células CD34+;
(f) las células madre o progenitoras son, o han sido, desarrolladas *ex vivo* antes del tratamiento de las células;
(g) las células madre o progenitoras son alógenas, autólogas o xenógenas; o
(h) las células madre o progenitoras son alógenas y tienen una compatibilidad de HLA completa o parcial con el sujeto o no son compatibles con el sujeto.

14. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en las que

(a) la isquemia es un resultado de síndrome coronario agudo, lesión pulmonar aguda (LPA), infarto agudo de miocardio (IAM), síndrome disneico agudo (SDA), enfermedad oclusiva arterial, arteriosclerosis, defecto de cartílago auricular, inflamación sistémica aséptica, enfermedad cardiovascular aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria, fractura de hueso, fractura de hueso, edema cerebral, hipoperfusión cerebral, enfermedad de Buerger, quemaduras, cáncer, enfermedad cardiovascular, daño de cartílago, infarto cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular cerebral, enfermedad cerebrovascular, neuropatía inducida por quimioterapia, infección crónica, isquemia mesentérica crónica, claudicación, insuficiencia cardíaca congestiva, daño de tejido conjuntivo, contusión, enfermedad de las arterias coronarias (EAC), isquemia crítica de las extremidades (ICE), enfermedad de Crohn, trombosis venosa profunda, herida profunda, curación retardada de úlceras, cicatrización retardada, diabetes (tipo I y tipo II), neuropatía diabética, isquemia inducida por diabetes, coagulación intravascular diseminada (CID), isquemia cerebral embólica, congelación, enfermedad injerto contra huésped, enfermedad vascular isquémica por telangiectasia hemorrágica hereditaria, lesión hiperóxica, hipoxia, inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad inflamatoria, tendones lesionados, claudicación intermitente, isquemia intestinal, isquemia, enfermedad cerebral isquémica, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad vascular periférica isquémica, placenta isquémica, enfermedad renal isquémica, enfermedad vascular isquémica, lesión por reperfusión isquémica, laceración, enfermedad de las arterias coronarias principales izquierdas, isquemia de las extremidades, isquemia de las extremidades inferiores, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, isquemia de órganos, osteoartritis, osteoporosis, osteosarcoma, enfermedad de Parkinson, enfermedad arterial periférica (EAP), enfermedad de las arterias periféricas,

isquemia periférica, neuropatía periférica, enfermedad vascular periférica, pre-cáncer, edema pulmonar, embolia pulmonar, trastorno de remodelación, isquemia renal, isquemia retiniana, retinopatía, septicemia, úlceras de la piel, trasplante de órgano sólido, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, quiste óseo subcondral, trombosis, isquemia cerebral trombótica, isquemia de tejido, ataque isquémico transitorio (AIT), lesión cerebral traumática, colitis ulcerosa, enfermedad vascular del riñón, afecciones vasculares inflamatorias, síndrome de von Hippel-Lindau, o heridas a tejidos u órganos;
(b) el sujeto tiene isquemia cerebrovascular, isquemia miocárdica, isquemia de las extremidades (ICE), isquemia miocárdica (especialmente isquemia miocárdica crónica), cardiomiopatía isquémica, isquemia cerebrovascular, isquemia renal, isquemia pulmonar, isquemia intestinal;
(c) el sujeto ha tenido cirugía, quimioterapia, radioterapia, o un trasplante de células, tejidos u órganos;
(d) el tejido isquémico o tejido dañado por isquemia está seleccionado del grupo que consiste en: tejido de piel, tejido de músculo esquelético, tejido de músculo cardíaco, tejido de músculo liso, tejido de cartílago, tejido de tendón, tejido cerebral, tejido de médula espinal, tejido retiniano, tejido de córnea, tejido de pulmón, tejido de hígado, tejido de riñón, tejido pancreático, tejido de ovario, tejido de testículos, tejido intestinal, tejido de estómago y tejido de vejiga; y/o
(e) el tejido isquémico o tejido dañado por isquemia tiene circulación sanguínea reducida, hipoxia, anoxia, hipoglucemia, metabolismo reducido, elevada necrosis, o elevada apoptosis en comparación con tejido no isquémico.

15. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 y 13 a 14, o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en las que el al menos uno de los síntomas asociados al tejido isquémico o tejido dañado por isquemia está seleccionado del grupo que consiste en: calambres, claudicación, entumecimiento, hormigueo, debilidad, dolor, cicatrización reducida, inflamación, cambio de color de la piel y gangrena.

16. Las células madre o progenitoras para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11-13, o la composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en las que

(a) las células madre o progenitoras tratadas se lavan hasta eliminar sustancialmente el agonista de la vía de las prostaglandinas o glucocorticoide en la composición, antes de la administración de la composición al sujeto;
(b) la composición se administra por vía parenteral al sujeto, en la que opcionalmente

(i) la administración parenteral está seleccionada del grupo que consiste en: intravascular, intramuscular y subcutánea; o
(ii) la composición se administra por vía intramuscular en o cerca de un sitio del tejido isquémico o tejido dañado por isquemia; y/o

(c) el sujeto se administra con más de una dosis de la composición, en las que la dosis se separan un intervalo de tiempo de al menos aproximadamente 24 horas.

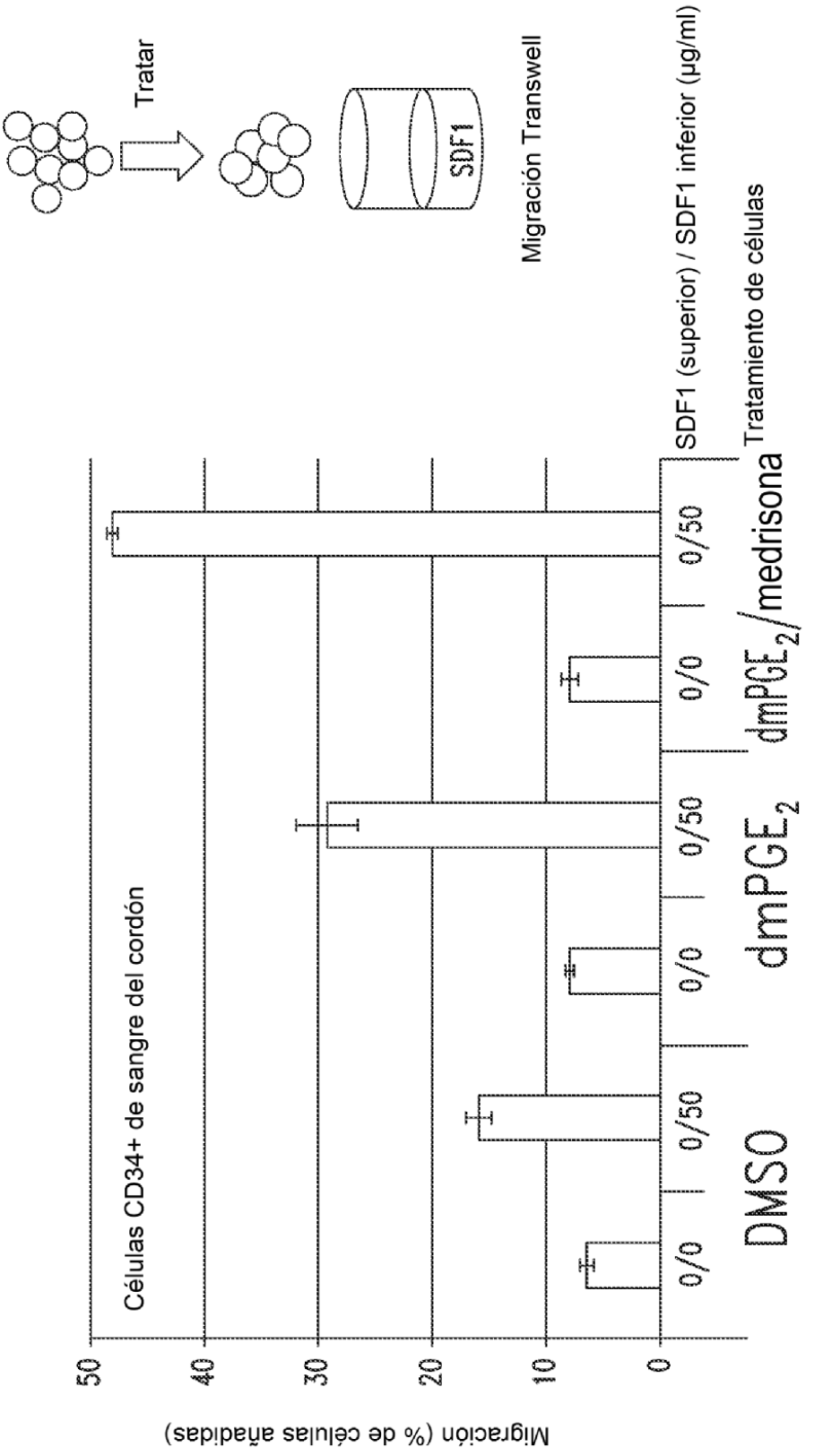

Tratar
SDF1
Migración Transwell
SDF1 (superior) / SDF1 inferior (µg/ml)
Tratamiento de células
DMSO
dmPGE2
dmPGE2/medrisona
0/0
0/50
0/0
0/50
0/0
0/50
Células CD34+ de sangre del cordón
Migración (% de células añadidas)
0
10
20
30
40
50

FIG. 1

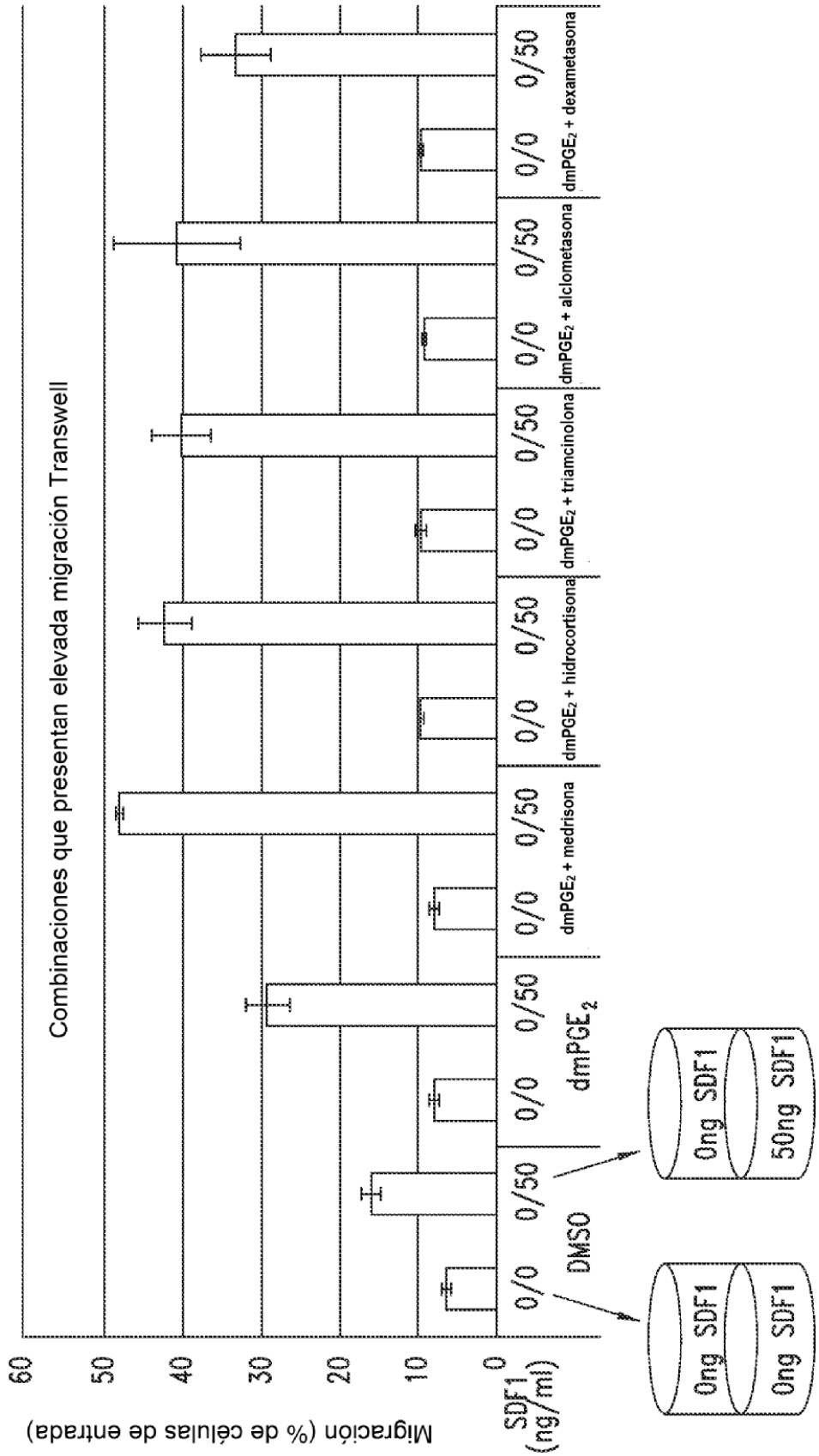

Combinaciones que presentan elevada migración Transwell
Migración (% de células de entrada)
60
50
40
30
20
10
0
SDF1 (ng/ml)
0/0
0/50
DMSO
dmPGE2
dmPGE2 + medrisona
dmPGE2 + hidrocortisona
dmPGE2 + triamcinolona
dmPGE2 + alclometasona
dmPGE2 + dexametasona
0ng SDF1
0ng SDF1
0ng SDF1
50ng SDF1

FIG. 2

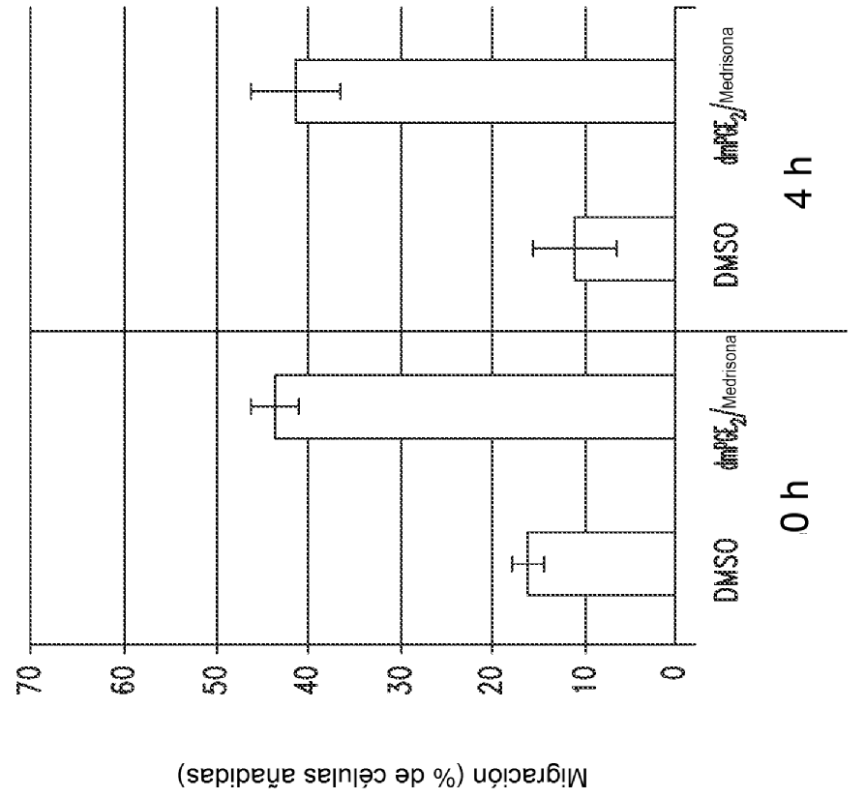
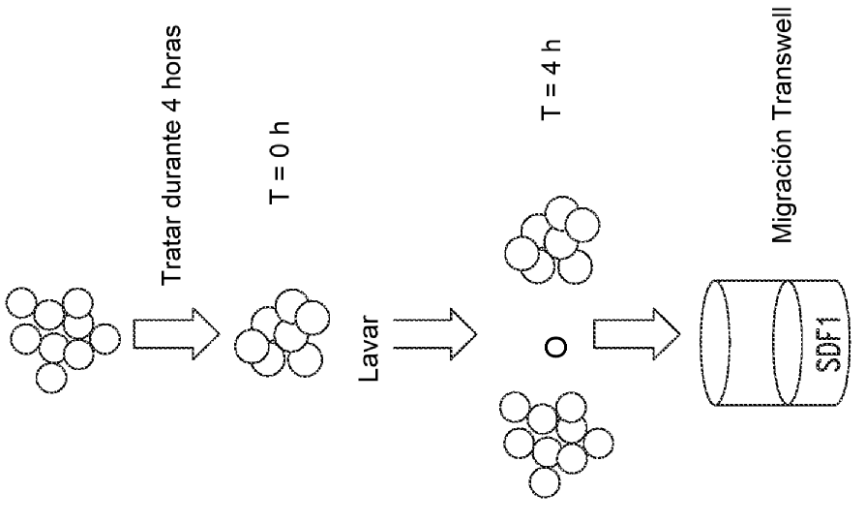

Migración (% de células añadidas)
70
60
50
40
30
20
10
0
DMSO
Medrisona
DMSO
Medrisona
0 h
4 h
Tiempo *in vivo*

FIG. 3


Tratar durante 4 horas
T = 0 h
Lavar
T = 4 h
o
Migración Transwell
SDF1

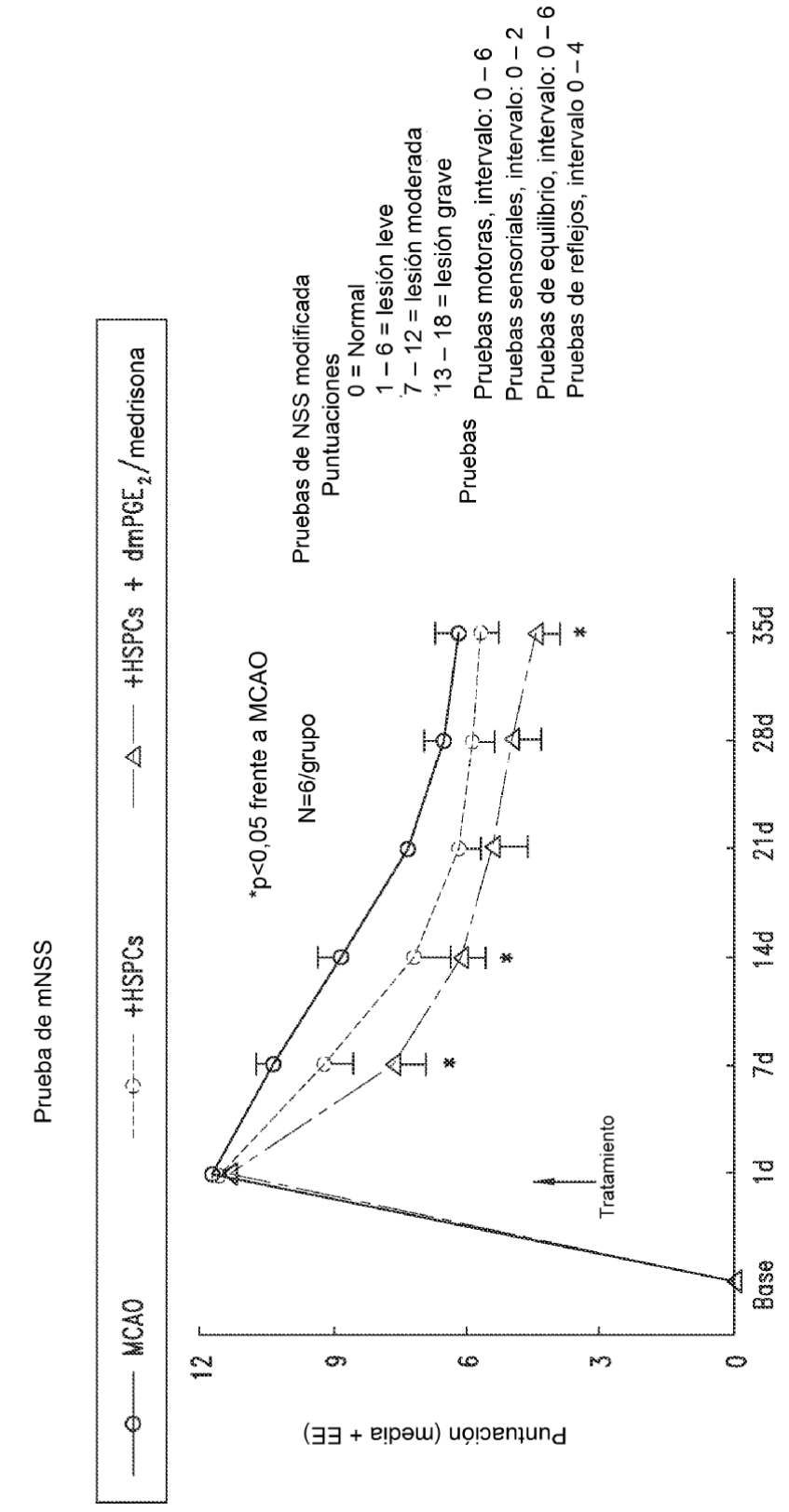

Prueba de mNSS
MCAO
+HSPCs
+HSPCs + dmPGE2/medrisona
*p<0,05 frente a MCAO
N=6/grupo
Pruebas de NSS modificada
Puntuaciones
0 = Normal
1 – 6 = lesión leve
7 – 12 = lesión moderada
13 – 18 = lesión grave
Pruebas
Pruebas motoras, intervalo: 0 – 6
Pruebas sensoriales, intervalo: 0 – 2
Pruebas de equilibrio, intervalo: 0 – 6
Pruebas de reflejos, intervalo 0 – 4
Puntuación (media + EE)
12
9
6
3
0
Tratamiento
Base
1d
7d
14d
21d
28d
35d
Tiempo (después de MCAO)

FIG. 4

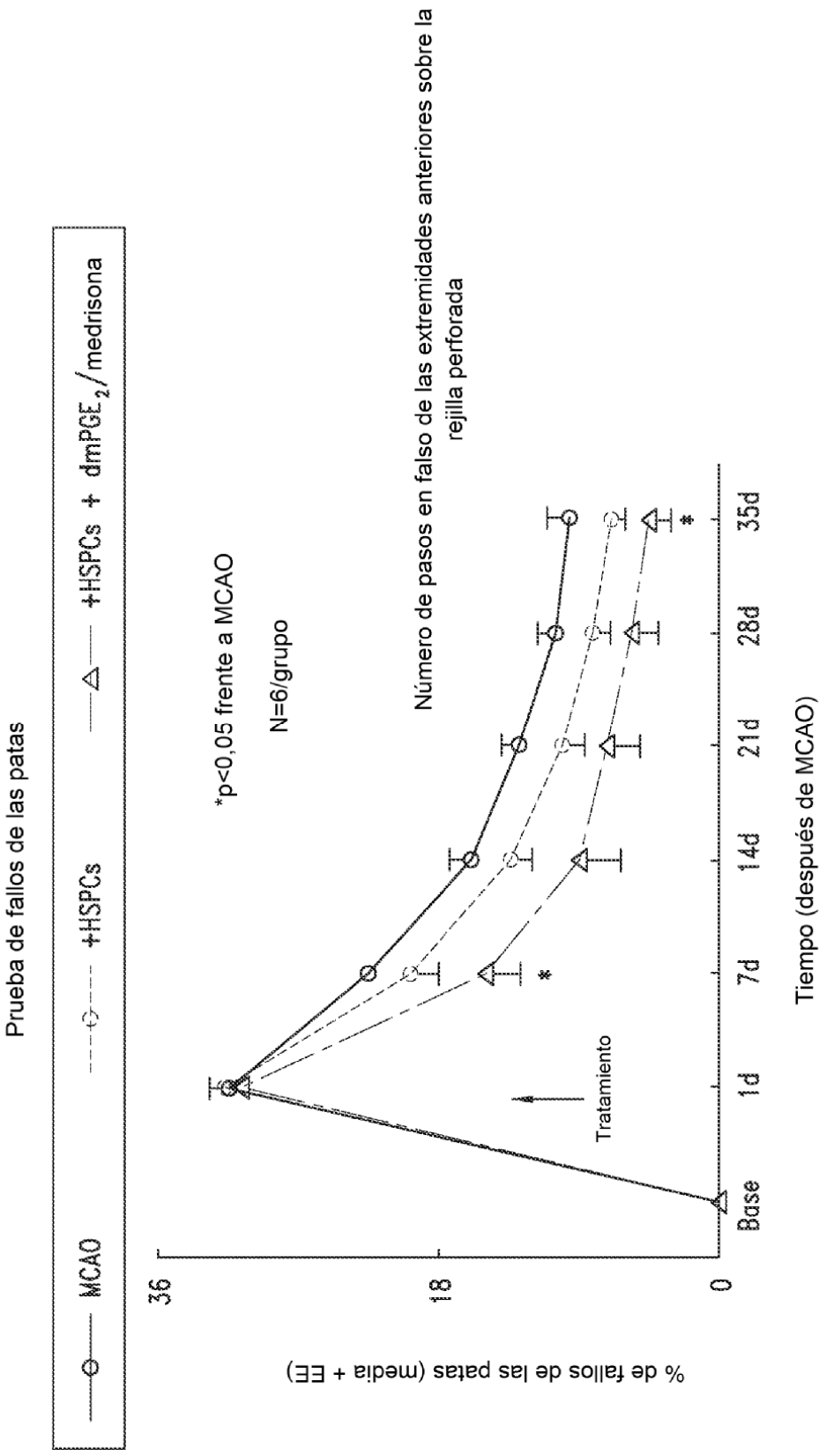

Prueba de fallos de las patas
MCAO
+HSPCs
+HSPCs + dmPGE2/medrisona
*p<0,05 frente a MCAO
N=6/grupo
Número de pasos en falso de las extremidades anteriores sobre la rejilla perforada
% de fallos de las patas (media + EE)
36
18
0
Base
1d
7d
14d
21d
28d
35d
Tratamiento
Tiempo (después de MCAO)

FIG. 5