

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 573**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/5585** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2014 PCT/US2014/010623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110094**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2014 E 14737912 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2943069**

54 Título: **Tratamiento de la vasculopatía con prostaciclina y células madre mesenquimatosas**

30 Prioridad:

**09.01.2013 US 201361750458 P**

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

**25.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 697 573 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la vasculopatía con prostaciclina y células madre mesenquimatosas

5 **Antecedentes**

La presente solicitud se refiere al uso de células madre mesenquimatosas en el tratamiento de la vasculopatía, incluyendo hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otros tipos de hipertensión pulmonar, enfermedad vascular periférica (PVD), isquemia crítica de las extremidades (CLI), arteriopatía coronaria, vasculopatía diabética, etc.

10 La hipertensión arterial pulmonar es un trastorno pulmonar progresivo que, si no se trata, conduce a muerte en un plazo promedio de 2,8 años tras diagnosticarse. Una constricción creciente de la circulación pulmonar conduce a un aumento de la tensión en el hemicardio derecho, que puede desarrollarse para dar insuficiencia del hemicardio derecho. Por definición, la tensión arterial pulmonar media (mPAP) en un caso de hipertensión pulmonar crónica es >25 mmHg en reposo o >30 mmHg durante esfuerzo (valor normal <20 mmHg). La fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar se caracteriza por vasoconstricción y remodelado de los vasos pulmonares. En la PAH crónica hay neomusculación de vasos pulmonares inicialmente no musculados, y aumenta la circunferencia de los músculos vasculares de los vasos ya musculados. Esta obliteración creciente de la circulación pulmonar da como resultado tensión progresiva sobre el hemicardio derecho, lo cual conduce a una producción reducida del hemicardio derecho y eventualmente termina en insuficiencia del hemicardio derecho (M. Humbert *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 43, 13S-24S). PAH es un trastorno extremadamente poco frecuente, con una prevalencia de 1-2 por millón. Se ha estimado que la edad promedio de los pacientes es de 36 años, y sólo el 10% de los pacientes tenían más de 60 años de edad. Se ven afectadas claramente más mujeres que hombres (G. E. D'Alonzo *et al.*, Ann. Intern. Med. 1991, 115, 343-349).

25 Las terapias convencionales disponibles en el mercado (por ejemplo análogos de prostaciclina, antagonistas de receptor de endotelina, inhibidores de fosfodiesterasa) son capaces de mejorar la calidad de vida, la tolerancia al ejercicio y el pronóstico de los pacientes. Los principios de estas terapias son principalmente hemodinámicos, que influyen en el tono de los vasos pero no tienen ninguna influencia directa sobre los procesos de remodelado patógenos. Además, la posibilidad de usar estos medicamentos se ve restringida por los efectos secundarios algunas veces graves y/o tipos complicados de administración. El periodo a lo largo del cual puede mejorar o estabilizarse la situación clínica de los pacientes mediante monoterapia específica es limitado. Eventualmente, la terapia se intensifica y por tanto se aplica una terapia de combinación, en la que deben administrarse de manera concurrente una pluralidad de medicamentos. A pesar de todos los avances en la terapia de hipertensión arterial pulmonar hasta ahora no hay ninguna perspectiva de cura de este trastorno grave.

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

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

60 La arteriopatía coronaria (aterosclerosis) es una enfermedad progresiva en humanos en la que una o más arterias coronarias se ocluyen gradualmente mediante la acumulación de placa. Las arterias coronarias de pacientes que tienen esta enfermedad se tratan con frecuencia mediante angioplastia con balón o la inserción de endoprótesis para abrir las arterias parcialmente ocluidas. En última instancia, se requiere que estos pacientes se sometan a cirugía de revascularización coronaria con un gran gasto y riesgo.

**Sumario**

65 La presente invención se expone en las reivindicaciones.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 Como realizaciones de esta divulgación se proporcionan dibujos que ilustran únicamente a modo de ejemplo, y no de limitación.
- La figura 1 muestra los resultados de análisis de inmunofenotipo de MSC derivadas de médula ósea humanas.
- 10 La figura 2 es un gráfico que muestra la secreción de VEGF mediante MSC de médula ósea humanas tras 24 horas de exposición a treprostínil.
- Las figuras 3A-B presentan un gráfico de secreción de MSC (A) y un gráfico de expresión génica (B) de VEGF tras 24 horas de exposición a treprostínil.
- 15 La figura 4 presenta imágenes representativas de MSC expuestas a concentraciones crecientes de treprostínil.
- La figura 5 es un gráfico que muestra la viabilidad celular de MSC expuestas a treprostínil.
- La figura 6 ilustra un modelo para los efectos de treprostínil sobre la señalización celular, expresión génica y la liberación de factores paracrinos.
- 20 Las figuras 7A-B presentan imágenes y un gráfico que muestra MSC tratadas con o sin treprostínil 250 µg/ml.
- La figura 8 presenta dos gráficos que muestran la expresión alterada en genes seleccionados en MSC tratadas con treprostínil.
- 25 Las figuras 9A-B presentan dos mapas de calor que agrupan MSC tratadas con treprostínil de controles con genes expresados de manera muy significativamente diferencial (figura 9A) u otras secuencias genómicas o etiquetas de expresión (figura 9B).
- 30 La figura 10 presenta gráficos que muestran que el contenido de ARN en exosomas derivados de MSC se ve alterado con el tratamiento con treprostínil.
- Las figuras 11A-B muestran la distribución por tamaños de exosomas derivados de MSC tratadas con treprostínil y sin tratar.
- 35

**Descripciones detalladas**

- 40 A menos que se especifique lo contrario, “un” o “una” significa “uno o más”.
- A menos que se defina específicamente lo contrario, se interpretará que todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto habitual en la técnica (por ejemplo, en biología de células madre, cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).
- 45 A menos que se indique lo contrario, las técnicas de proteína recombinante, cultivo celular e inmunológicas usadas en la presente divulgación son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como, J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D. M. Glover y B. D. Hames (editores), *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F. M. Ausubel *et al.* (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad), Ed Harlow and David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J. E. Coligan *et al.* (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).
- 50
- 55 En el presente documento se descubre que tanto la prostaciclina como las células madre mesenquimatosas (MSC) presentan actividades terapéuticas para vasculopatía. Además, la combinación de prostaciclina y MSC produce efectos sinérgicos. Tal combinación puede ser o bien administración conjunta, que puede ser concurrente o separada, de prostaciclina y MSC a un paciente, o bien administración al paciente de una composición de MSC que se ha tratado previamente con una prostaciclina.
- 60 Se muestra que las MSC pueden mejorar la vasculopatía en pacientes, y se contempla que se logra un efecto terapéutico de este tipo debido a la capacidad de las MSC para mejorar el microentorno local suministrando factores antiinflamatorios y proangiogénicos a la zona enfermada. Sin embargo, las MSC tienen una vida corta en el
- 65

organismo y no son regenerativas.

Se ha usado prostaciclina, tal como treprostinil (TP), para tratar a pacientes con hipertensión arterial pulmonar (PAH). Con respecto a esto, se ha mostrado que la prostaciclina presenta actividades vasodiladoras y anti-agregación plaquetaria.

Un descubrimiento inesperado es que la prostaciclina puede potenciar la actividad de las MSC para el tratamiento de la vasculopatía, mostrando sinergismo para tal tratamiento. Con respecto a esto, se observa que la prostaciclina potencia el efecto beneficioso de las MSC sobre el crecimiento de vasos sanguíneos. Por ejemplo, la prostaciclina aumenta la expresión de VEGF a niveles tanto de proteína como de gen. También se observan cambios en las citocinas secretadas como resultado de la exposición a prostaciclina. Por ejemplo, IL-6 se aumenta ~50 veces mientras que MCP-1 se disminuye ~6-7 veces.

Tal sinergismo también resulta evidente cuando al paciente se le administra además una célula progenitora endotelial (EPC). Por tanto, se contempla que la prostaciclina puede potenciar la actividad de las EPC a través de las MSC. Por tanto, gracias a tal sinergismo, el uso combinatorio de prostaciclina y MSC, opcionalmente junto con EPC, puede conducir a un desenlace terapéutico mejorado y/o necesidad reducida de cada agente solo lo que, a su vez, puede dar como resultado efectos adversos reducidos posiblemente provocados por cada agente solo, a una dosis superior.

Se muestra adicionalmente que tal sinergismo es aplicable a medio de cultivo condicionado con MSC. Para ello, se observa que los exosomas de MSC tratada con prostaciclina tienen niveles superiores de VEGF-A, lo cual puede fomentar una producción de VEGF aumentada en células diana mediante un mecanismo de transferencia génica horizontal. Además, la exposición a prostaciclina proporciona una población más uniforme de exosomas.

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

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

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

En un aspecto, la prostaciclina y la composición de MSC se administran de manera concurrente. En otro aspecto, la prostaciclina y la composición de MSC se administran de manera separada. Cuando se administran de manera separada, la prostaciclina puede administrarse antes o después de la administración de la composición de MSC.

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

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

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

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

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

A. Prostaciclina

El término “prostaciclina” usado en el presente documento comprende de manera explícita cualquier prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), cualquier análogo de prostaciclina y cualquier agonista de receptor de PGI<sub>2</sub>. Los ejemplos no limitativos de prostaciclina adecuados para la presente tecnología incluyen epoprostenol de sodio (por ejemplo Flolan®), treprostinil (por ejemplo TYVASO®, Remodulin®), ilprost (por ejemplo Ventavis®), y agonista de receptor de PGI<sub>2</sub> (por ejemplo Selexipag). En un aspecto, la prostaciclina es treprostinil o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

#### B. Células madre mesenquimatosas (MSC)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cuando se usa en el presente documento se pretende que el término “TNAP” abarque todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específicas de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En una realización preferida, la TNAP es BAP. En una realización

particularmente preferida, TNAP tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que puede unirse al anticuerpo frente a STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en el ATCC el 19 de diciembre de 2005 con las disposiciones del tratado de Budapest con el número de registro de depósito PTA-7282.

5 Pueden derivarse células madre útiles para los métodos a partir de tejido de adulto, un embrión, tejido extraembrionario o un feto. El término "adulto" se usa en su sentido más amplio para incluir un sujeto posnatal. En una realización preferida, el término "adulto" se refiere a un sujeto que es pospuberal. El término, "adulto" tal como se usa en el presente documento también puede incluir sangre de cordón umbilical tomada de una hembra.

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

20 Las células de progenie pueden obtenerse mediante cultivo en cualquier medio adecuado. El término "medio", tal como se usa con referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquidos así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. El término "medio" también se refiere a material que está destinado a su uso en un cultivo celular, aunque aún no se haya puesto en contacto con células. Dicho de otro modo, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio.

25 En una realización, las células de progenie se obtienen aislando células TNAP<sup>+</sup> a partir de médula ósea usando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo frente a STRO-3, y sembrando en placa en un  $\alpha$ -MEM suplementado con suero de ternero fetal al 20%, L-glutamina 2 mM y L-ascorbato-2-fosfato 100  $\mu$ m.

30 En una realización, tales células expandidas (al menos tras 5 pases) pueden ser TNAP<sup>-</sup>, CC9<sup>+</sup>, HLA clase 1<sup>+</sup>, HLA clase II<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>; CD3<sup>+</sup>, CD11a-c<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup> y/o CD80<sup>-</sup>. Sin embargo, es posible que en condiciones de cultivo diferentes de las descritas en el presente documento la expresión de diferentes marcadores pueda variar. Además, aunque células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida, esto no significa que no haya una proporción minoritaria de las células que no tienen este/estos fenotipo(s) (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas pueden ser CC9<sup>-</sup>). En una realización preferida, las células expandidas de la divulgación todavía tienen la capacidad para diferenciarse para dar diferentes tipos de células.

35 En una realización, una población celular expandida usada en los métodos de la divulgación comprende células en las que al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50%, de las células son CC9<sup>+</sup>.

40 En otra realización, una población celular expandida usada en la divulgación comprende células en las que al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 45%, de las células son STRO-1<sup>+</sup>.

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

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

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

60 La población de partida de MSC puede derivarse de uno cualquiera o más tipos de tejidos expuestos en los

documentos WO 01/04268 o WO 2004/085630, concretamente médula ósea, células de pulpa dentaria, tejido adiposo y piel, o quizás de manera más amplia de tejido adiposo, dientes, pulpa dentaria, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

5 Pueden distinguirse MEMP de MSC recién recogidas por que son positivas para el marcador STRO-1<sup>bri</sup> y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las MSC recién aisladas son positivas tanto para STRO-1<sup>bri</sup> como para ALP. En una realización preferida de la presente divulgación, al menos el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 10 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1<sup>bri</sup>, ALP<sup>-</sup>. En una realización adicional preferida las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1. En aún una realización adicional preferida las MEMP no muestran actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD 18.

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

20 La presente tecnología puede ponerse en práctica usando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo, pero sin limitarse a, células de primates no humanos, células de ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, roedores, aves y peces. Las células de primates con las que puede realizarse la divulgación incluyen, pero no se limitan a, células de chimpancés, babuinos, macacos cangrejeros, y cualquier otro cébido o cercopitécido. Las células de ungulados con las que puede realizarse la divulgación incluyen, pero no se limitan a, células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalo y bisonte. Las células de roedores con las que puede realizarse la divulgación incluyen, pero no se limitan a, células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo. Los ejemplos de especies de lagomorfos con las que puede realizarse la divulgación incluyen conejos domesticados, liebres norteamericanas, liebres, conejos de cola de algodón, liebres americanas y picas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la que puede realizarse la divulgación.

30 Pueden almacenarse las células antes de su uso. En la técnica se conocen bien métodos y protocolos para conservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamífero (véase, por ejemplo, Pollard, J. W. y Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). En relación con la presente divulgación puede usarse cualquier método que mantenga la actividad biológica de las células madre aisladas tales como 35 células progenitoras/madre mesenquimatosas, o la progenie de las mismas. En una realización preferida, las células se mantienen y almacenan usando criopreservación.

Pueden obtenerse células usando una variedad de técnicas. Por ejemplo, pueden usarse varias técnicas de clasificación celular mediante las cuales se separan físicamente las células mediante referencia a una propiedad 40 asociada con el complejo célula-anticuerpo, o un marcador unido al anticuerpo. Este marcador puede ser una partícula magnética o una molécula fluorescente. Los anticuerpos pueden reticularse de tal manera que forman agregados de múltiples células, que pueden separarse por su densidad. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a una matriz estacionaria, a la que se adhieren las células deseadas.

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

50 Se conocen diversos métodos de separación de células unidas a anticuerpo a partir de células no unidas. Por ejemplo, puede marcarse el anticuerpo unido a la célula (o un anticuerpo anti-isotipo) y después separarse las células mediante un clasificador celular mecánico que detecta la presencia del marcador. En la técnica se conocen clasificadores celulares activados por fluorescencia. En una realización, se unen anticuerpos anti-TNAP y/o anticuerpos frente a STRO-1 a un soporte sólido. Los expertos en la técnica conocen diversos soportes sólidos, incluyendo, pero sin limitarse a, perlas de agarosa, perlas de poliestireno, membranas de fibras huecas, polímeros y 55 placas de Petri de plástico. Las células a las que se une el anticuerpo pueden retirarse de la suspensión celular simplemente separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular.

Pueden usarse micropartículas superparamagnéticas para separaciones celulares. Por ejemplo, las micropartículas pueden recubrirse con anticuerpos anti-TNAP y/o anticuerpos frente a STRO-1. Después pueden incubarse las 60 micropartículas superparamagnéticas, etiquetadas con anticuerpo, con una disolución que contiene las células de interés. Las micropartículas se unen a las superficies de las células madre deseadas, y después pueden recogerse estas células en un campo magnético.

65 En otro ejemplo, se deja que la muestra de células entre en contacto físico, por ejemplo, con anticuerpos monoclonales anti-TNAP y/o anticuerpos monoclonales anti-STRO-1 unidos a fase sólida. La unión a fase sólida puede comprender, por ejemplo, adsorber los anticuerpos a una superficie de plástico, nitrocelulosa u otra. Los

anticuerpos también pueden adsorberse sobre las paredes de los poros grandes (suficientemente grandes como para permitir el flujo a través de células) de una membrana de fibras huecas. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse de manera covalente a una superficie o perla, tal como macroperlas Pharmacia Sepharose 6 MB. Las condiciones y duración de incubación exactas para los anticuerpos unidos a fase sólida con la suspensión que contiene células madre dependerán de varios factores específicos del sistema empleado. Sin embargo, la selección de condiciones apropiadas se encuentra dentro de las habilidades en la técnica.

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

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

#### C. Medios de cultivo condicionados con MSC

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

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

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

#### D. Tratamiento previo de MSC con prostaciclina

En algunas realizaciones, antes de la administración conjunta de una MSC o un medio de cultivo de condicionado con MSC con prostaciclina a un paciente, opcionalmente puede tratarse previamente la MSC o el medio de cultivo de condicionado con MSC con prostaciclina. Por consiguiente, también se divulga un método para preparar una célula madre mesenquimatosa (MSC) o medio de cultivo condicionado con MSC para su administración *in vivo*, que comprende poner en contacto la MSC o medio de cultivo condicionado con MSC con una prostaciclina. Aún otra divulgación es una MSC o medio de cultivo condicionado con MSC tratado que puede obtenerse mediante un método de este tipo.

El tratamiento previo de una célula o un medio con un compuesto químico abarca técnicas conocidas. En un aspecto, la prostaciclina puede añadirse a, e incubarse conjuntamente con, un medio de cultivo que contiene una MSC. Sin embargo, opcionalmente, tal incubación conjunta puede implicar además la adición de un factor de crecimiento (por ejemplo, VEGF y angiopoyetina 1 ó 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas) y/o hipoxia.

Las MSC o los medios de cultivo condicionados con MSC pueden tratarse con prostaciclina de diversas maneras. Por ejemplo, puede usarse prostaciclina para tratar MSC *ex vivo* durante la expansión de las MSC; también puede usarse prostaciclina para tratar MSC tras la administración. En algunos aspectos, la concentración de prostaciclina es de al menos aproximadamente 100 µg/ml, o al menos aproximadamente 150 µg/ml, 200 µg/ml o 250 µg/ml. En algunos aspectos, la concentración de prostaciclina es de no más de aproximadamente 400 µg/ml, o no más de aproximadamente 350 µg/ml, 300 µg/ml o 250 µg/ml.

Según una realización de la presente divulgación, pueden prepararse MSC a partir de la sangre o médula ósea del propio receptor. En ese caso, también puede usarse prostaciclina para tratar MSC antes de aislarse de los receptores.

#### E. Célula progenitora endotelial (EPC)

Tal como se proporciona, el sinergismo entre prostaciclina y MSC para el tratamiento de la vasculopatía también es evidente cuando a un paciente se le administra adicionalmente una célula progenitora endotelial (EPC). Por tanto, para cualquier realización del método actualmente divulgado, al paciente se le administra adicionalmente una célula progenitora endotelial (EPC).

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

Pueden tratarse EPC con prostaciclina de diversas maneras. Por ejemplo, puede usarse prostaciclina para tratar EPC *ex vivo* durante la expansión de las EPC; puede administrarse conjuntamente prostaciclina con EPC al receptor; también puede usarse prostaciclina para tratar EPC tras el trasplante. Según una realización de la presente divulgación, se preparan EPC a partir de la sangre o médula ósea del propio receptor. En ese caso, también puede usarse prostaciclina para tratar EPC antes de aislarse de los receptores.

Una EPC es una célula no diferenciada que puede inducirse para que prolifere. Las EPC son capaces de automantenimiento, de manera que con cada división celular, al menos una célula hija también será una célula EPC. Las EPC son capaces de expandirse 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más veces.

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

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

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

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

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

Las células VEGFR-1<sup>+</sup>, VEGFR-2<sup>+</sup> y Tie-2<sup>+</sup> constituyen aproximadamente el 3,0 +/- 0,2%, el 0,8 +/- 0,5%, el 2,0 +/- 0,3% de la población total de células mononucleares en la sangre, respectivamente. Las células CD14<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> constituyen aproximadamente el 2,0 +/- 0,5% de la población total de monocitos y el 0,08 +/- 0,04% de las células mononucleares en la sangre.

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

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

El aislamiento, purificación, cultivo *ex vivo* y caracterización de EPC se describen en Hill *et al.*, *N. Engl. J. Med.*

348:593-600 (2003), Assmus *et al.*, *Circulation* 106:3009-16 (2002), Wang *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 49:1566-71 (2007), y Kalka *et al.*, *P.N.A.S.* 97:3422-7 (2000). Además, el aislamiento, purificación, cultivo *ex vivo* y caracterización de células formadoras de colonias endoteliales se describen en Yoder *et al.*, *Blood* 109:1801-1809 (2007), Ingram *et al.*, *Blood* 104:2752-2760 (2004), y Swardja *et al.*, *Angiogenesis* 14(1):17-27 (2011).

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

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

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

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

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

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

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

40 Las células unidas pueden separarse de la fase sólida mediante cualquier método apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y la molécula de unión. Por ejemplo, pueden eluirse células unidas de una placa de Petri de plástico mediante agitación vigorosa. Alternativamente, pueden eluirse células unidas mediante "mellado" enzimático o digestión de una secuencia "espaciadora" sensible a enzimas entre la fase sólida y un anticuerpo. Hay secuencias espaciadoras adecuadas unidas a perlas de agarosa disponibles comercialmente, por ejemplo, de Pharmacia.

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

50 Las que permanecen unidas al soporte sólido son las células que contienen un marcador que se reconoce por el anticuerpo usado. Por tanto, si se usa el anticuerpo anti-CD45, entonces la población resultante estará enormemente enriquecida en células CD45<sup>+</sup>. Si el anticuerpo usado es frente a VEGFR, entonces la población resultante estará enormemente enriquecida en células VEGFR<sup>+</sup>. Entonces puede enriquecerse esa población en el otro marcador repitiendo las etapas usando una fase sólida que tiene unido a la misma un anticuerpo frente al otro

marcador.

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

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

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

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

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

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

En una realización, se extrae sangre directamente de la sangre periférica circulante de un donante. Se somete la sangre a percolación continua a través de una columna que contiene la molécula de unión unida a fase sólida, tal como un anticuerpo frente a VEGFR-2, para capturar las EPC. Se devuelve inmediatamente la sangre con agotamiento de células progenitoras al sistema circulatorio del donante mediante métodos conocidos en la técnica, tales como hemaféresis. Se procesa la sangre de esta manera hasta que se une un número suficiente de células progenitoras a la columna. Después se aíslan las células madre de la columna mediante métodos conocidos en la técnica. Este método permite recoger células progenitoras de sangre periférica poco frecuentes a partir de un volumen muy grande de sangre, evitándole al donante el gasto y dolor de extraer médula ósea y los riesgos asociados de anestesia, analgesia, transfusión de sangre e infección.

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

Se siembran suspensiones celulares en cualquier receptáculo capaz de sostener células, particularmente frascos de cultivo, placas de cultivo o botellas rotatorias, y más particularmente en frascos de cultivo pequeños tales como

frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Vuelven a suspenderse células cultivadas en suspensión a de aproximadamente 5x10<sup>4</sup> a 2x10<sup>5</sup> células/ml (por ejemplo, 1x10<sup>5</sup> células/ml). Se siembran en placa células sembradas en placa sobre un sustrato fijo a aproximadamente 2-3x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>. Opcionalmente, se recubren las placas de cultivo con una proteína de matriz tal como colágeno. Las células pueden colocarse en cualquier medio de cultivo conocido capaz de soportar el crecimiento celular, incluyendo HEM, DMEM, RPMI, F-12 y similares, que contenga suplementos que se requieren para el metabolismo celular tales como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas tales como transferrina y similares. El medio de cultivo también puede contener antibióticos para prevenir la contaminación con levadura, bacterias y hongos, tales como penicilina, estreptomina, gentamicina y similares. El medio de cultivo puede contener suero derivado de animales bovinos, equinos, pollos y similares.

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

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

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

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

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

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

#### F. Modificación genética de las células

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

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

5 En algunos aspectos, las células se modifican genéticamente para producir una proteína heteróloga. Algunas veces, las células se modificarán genéticamente de tal manera que la proteína heteróloga se secreta a partir de las células. Sin embargo, en una realización las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido funcional que no codifica para proteína tal como ARNbc (normalmente para silenciamiento de ARN), un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico catalítico (tal como una ribozima o enzima del ADN).

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

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

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

Los vectores pueden incluir, pero no se limitan a, vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados y virus del herpes simple; cósmidos; vectores de plásmidos; vectores sintéticos; y otros vehículos de recombinación usados normalmente en la técnica. En la técnica se conocen bien vectores que contienen tanto un promotor como un sitio de clonación en el que puede unirse operativamente un polinucleótido. Tales vectores son capaces de transcribir ARN *in vitro* o *in vivo*, y están comercialmente disponibles de fuentes tales como Stratagene (La Jolla, Calif.) y Promega Biotech (Madison, Wis.). Los ejemplos específicos incluyen, pSG, pSV2CAT, pXtl de Stratagene; y pMSG, pSVL, pBPV y pSVK3 de Pharmacia.

40 Los vectores pueden incluir vectores retrovirales (véase, Coffin *et al.*, "Retroviruses", capítulo 9, págs. 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997). Pueden producirse vectores útiles en la divulgación de manera recombinante mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los documentos WO94/29438, WO97/21824 y WO97/21825 describen la construcción de plásmidos de empaquetamiento retroviral y líneas celulares de empaquetamiento. Los vectores a modo de ejemplo incluyen los vectores de expresión en mamíferos de pCMV, tales como pCMV6b y pCMV6c (Chiron Corp.), pSFFV-Neo, y pBluescript-Sk+. Los ejemplos no limitativos de vectores retrovirales útiles son los derivados de retrovirus murinos, aviares o de primates. Los vectores retrovirales comunes incluyen los basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (vector VLMMo). Otros vectores derivados de VLMMo incluyen Lmily, LINGFER, MINGFR y MINT. Los vectores adicionales incluyen los basados en el virus de la leucemia del gibón (GAIN) y virus del sarcoma murino de Moloney (VSMMo) y virus formador de focos esplénicos (VFFE). Los vectores derivados del virus de células madre murino (VCCM) incluyen MESV-MiLy. Los vectores retrovirales también incluyen vectores basados en lentivirus, y los ejemplos no limitativos incluyen vectores basados en virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

55 En la producción de constructos de vectores retrovirales, las secuencias gag, pol y env virales pueden retirarse del virus, creando espacio para la inserción de secuencias de ADN foráneo. Los genes codificados por ADN foráneo se expresan habitualmente bajo el control de un fuerte promotor viral en la repetición terminal larga (LTR). La selección de secuencias reguladoras de control apropiadas depende de la célula huésped usada y la selección se encuentra dentro de las habilidades de un experto en la técnica. Se conocen numerosos promotores además del promotor de la LTR. Los ejemplos no limitativos incluyen el promotor del fago lambda PL, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV); el promotor de la región U3 del virus del sarcoma murino de Moloney (VSMMo), virus del sarcoma de Rous (VSR), o virus formador de focos esplénicos (VFFE); promotor de granzima A; y el promotor de granzima B. Adicionalmente, pueden usarse elementos de control inducibles o múltiples. La selección de un promotor adecuado resultará evidente para los expertos en la técnica.

65 Un constructo de este tipo puede empaquetarse dentro de partículas virales de manera eficaz si las funciones de

gag, pol y env se proporcionan en trans mediante una línea celular de empaquetamiento. Por tanto, cuando se introduce el constructo de vector en la célula de empaquetamiento, las proteínas gag-pol y env producidas por la célula se ensamblan con el ARN de vector para producir viriones infecciosos que se secretan en el medio de cultivo. El virus así producido puede infectar e integrarse en el ADN de la célula diana, pero no produce partículas virales infecciosas ya que carece de secuencias de empaquetamiento esenciales. La mayoría de las líneas celulares de empaquetamiento actualmente en uso se han transfectado con plásmidos independientes, que contienen cada uno una de las secuencias codificantes necesarias, de modo que se necesitan múltiples acontecimientos de recombinación antes de poder producir un virus competente para la replicación. Alternativamente, la línea celular de empaquetamiento alberga un provirus. El provirus se ha limitado de modo que aunque puede producir todas las proteínas requeridas para ensamblar virus infecciosos, su propio ARN no puede empaquetarse en un virus. En vez de eso, se empaqueta el ARN producido a partir del virus recombinante. Por tanto, la reserva de virus liberada a partir de las células de empaquetamiento sólo contiene virus recombinante. Los ejemplos no limitativos de líneas de empaquetamiento retroviral incluyen PA12, PA317, PE501, PG13, PSI.CRIP, RDI 14, GP7C-tTA-G10, ProPak-A (PPA-6) y PT67.

Otros vectores adecuados incluyen vectores adenovirales (véase el documento WO 95/27071) y vectores virales adenoasociados. Todos estos vectores se conocen bien en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en *Stem Cell Biology and Gene Therapy*, eds. Quesenberry *et al.*, John Wiley & Sons, 1998; y patentes estadounidenses n.ºs 5.693.531 y 5.691.176. El uso de vectores derivados de adenovirus puede ser ventajoso en determinada situación porque no son capaces de infectar células que no se dividen. A diferencia del ADN retroviral, el ADN adenoviral no se integra en el genoma de la célula diana. Además, la capacidad para transportar ADN foráneo es mucho mayor en vectores adenovirales que en vectores retrovirales. Los vectores virales adenoasociados son otro sistema de suministro útil. El ADN de este virus puede integrarse en células que no se dividen, y se han introducido satisfactoriamente varios polinucleótidos en diferentes tipos de células usando vectores virales adenoasociados.

En algunas realizaciones, el constructo o vector incluirá dos o más secuencias de polinucleótido heterólogas. Preferiblemente la secuencia de ácido nucleico adicional es un polinucleótido que codifica para un marcador selectivo, un gen estructural, un gen terapéutico o un gen de citocina/quimiocina.

Puede incluirse un marcador selectivo en el constructo o vector con los propósitos de monitorizar la modificación genética satisfactoria y para la selección de células en las que se ha integrado ADN. Los ejemplos no limitativos incluyen marcadores de resistencia a fármacos, tales como G148 o higromicina. Adicionalmente puede usarse selección negativa, por ejemplo en la que el marcador es el gen de HSV-tk. Este gen hará que las células sean sensibles a agentes tales como aciclovir y ganciclovir. Habitualmente se usa el gen de NeoR (resistencia a neomicina/G148), pero puede usarse cualquier gen de marcador conveniente cuyas secuencias génicas no estén ya presentes en la célula diana. Los ejemplos no limitativos adicionales incluyen factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR), proteína verde fluorescente potenciada (EGFP), gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen bacteriano hisD, CD24 murino (HSA), CD8a(lyt) murino, genes bacterianos que confieren resistencia a puromicina o fleomicina, y beta-galactosidasa.

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

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

#### G. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

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

En un aspecto, la composición farmacéutica comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del criterio médico razonable, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, de manera proporcional a una razón de riesgo/beneficio razonable. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un material que encapsula carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o disolvente.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, disoluciones acuosas de tampón, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de tales portadores se conoce bien en la técnica. La disolución es

preferiblemente estéril y fluida en la medida en que existe una fácil jeringabilidad. Preferiblemente, la disolución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso, por ejemplo, de parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares.

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

Las composiciones farmacéuticas útiles para los métodos de la divulgación pueden comprender un portador polimérico o matriz extracelular.

Una variedad de materiales de matriz sólida biológica o sintética (es decir, matrices sólidas de soporte, apósitos o adhesivos biológicos, y estructuras biológicas/médicas) son adecuados para su uso en esta divulgación. Preferiblemente el material de matriz es médicamente aceptable para su uso en aplicaciones *in vivo*. Los ejemplos no limitativos de tales materiales médicamente aceptables y/o biológica o fisiológicamente aceptables o compatibles incluyen, pero no se limitan a, materiales de matriz sólida que pueden absorberse y/o no pueden absorberse, tales como submucosa del intestino delgado (SIS), por ejemplo, derivada de origen porcino (y otras fuentes de SIS); alginato reticulado o no reticulado, hidrocoloide, espumas, gel de colágeno, esponja de colágeno, malla de poli(ácido glicólico) (PGA), malla de poliglactina (PGL), lana, apósito de espuma, bioadhesivos (por ejemplo, adhesivo de fibrina y gel de fibrina) y equivalentes a piel desepidermizada muerta en una o más capas.

Los adhesivos de fibrina son una clase de sellantes quirúrgicos que se han usado en diversos entornos clínicos. Tal como conocerá el experto, numerosos sellantes son útiles en composiciones para su uso en los métodos de la divulgación. Sin embargo, una realización preferida de la divulgación se refiere al uso de adhesivos de fibrina con las células descritas en el presente documento.

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

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

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

El uso de adhesivo de fibrina y métodos para su preparación y uso se describen en la patente estadounidense n.º 5.643.192. La patente estadounidense n.º 5.643.192 divulga la extracción de componentes de fibrinógeno y trombina a partir de un único donante, y la combinación de sólo estos componentes para su uso como adhesivo de fibrina. La patente estadounidense n.º 5.651.982 describe otra preparación y método de uso para adhesivo de fibrina. La patente estadounidense n.º 5.651.982 proporciona un adhesivo de fibrina con liposomas para su uso como sellante tópico en mamíferos.

Varias publicaciones describen el uso de adhesivo de fibrina para el suministro de agentes terapéuticos. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.983.393 divulga una composición para su uso como inserto intravaginal que comprende agarosa, agar, solución salina, glucosaminoglucanos, colágeno, fibrina y una enzima. Además, la

patente estadounidense n.º 3.089.815 divulga una preparación farmacéutica inyectable compuesta por fibrinógeno y trombina y la patente estadounidense n.º 6.468.527 divulga un adhesivo de fibrina que facilita el suministro de diversos agentes biológicos y no biológicos a sitios específicos dentro del organismo. Tales procedimientos pueden usarse en los métodos de la divulgación.

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

15 Se usan polímeros que pueden formar hidrogeles reticulados de forma covalente o iónicos que son maleables para encapsular células. Un hidrogel es una sustancia formada cuando se reticula un polímero orgánico (natural o sintético) mediante enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura reticular abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que pueden usarse  
20 para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato, polifosfacinas y poliacrilatos, que están iónicamente reticulados, o copolímeros en bloque tales como Pluronic<sup>TM</sup> o Tetronics<sup>TM</sup>, copolímeros en bloque de poli(óxido de etileno)-polipropilenglicol que se reticulan por temperatura o pH, respectivamente. Otros materiales incluyen proteínas tales como fibrina, polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido hialurónico y colágeno.

25 En general, estos polímeros son al menos parcialmente solubles en disoluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas, o disoluciones acuosas de alcohol, que tienen grupos laterales cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros con grupos laterales ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son polifosfacenos, poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, poli(acetato de vinilo) y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado.  
30 También pueden usarse copolímeros que tienen grupos laterales ácidos formados mediante reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de vinilo. Ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferiblemente fluorado), grupos OH fenólico, y grupos OH ácido. Ejemplos de polímeros con grupos laterales básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son polivinilaminas, polivinilpiridina, polivinilimidazol, y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros también puede formarse a partir de los nitrógenos de la estructura principal o grupos imino colgantes. Ejemplos de grupos laterales básicos son grupos amino e imino.

Además, una composición usada para un método de la divulgación puede comprender al menos un agente terapéutico. Por ejemplo, la composición puede contener un analgésico para ayudar en el tratamiento de inflamación o dolor, o un agente antiinfeccioso para prevenir la infección del sitio tratado con la composición. Más específicamente, los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos útiles incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agonistas opiáceos y salicilatos; agentes antiinfecciosos, tales como antihelmínticos, antianaerobios, antibióticos, antibióticos de aminoglicósido, antibióticos antifúngicos, antibióticos de cefalosporina, antibióticos de macrólidos, diversos antibióticos de beta-lactama, antibióticos de penicilina, antibióticos de quinolona, antibióticos de sulfonamida, antibióticos de tetraciclina, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosis, antiprotozoarios, antiprotozoarios antimalaria, agentes antivirales, agentes anti-retrovirales, escabidas, agentes antiinflamatorios, agentes antiinflamatorios corticosteroides, antipruriginosos/anestésicos locales, antiinfecciosos tópicos, antiinfecciosos tópicos antifúngicos, antiinfecciosos tópicos antivirales; agentes electrolíticos y renales, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, diuréticos inhibidores de anhidrasa carbónica, diuréticos del asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos de tiazida, reponedores de electrolitos, y agentes uricosúricos; enzimas, tales como enzimas pancreáticas y enzimas trombolíticas; agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agentes antiulcerosos antiácidos, agentes antiulcerosos inhibidores de la bomba de ácido gástrico, agentes antiulcerosos de la mucosa gástrica, agentes antiulcerosos bloqueadores H<sub>2</sub>, agentes coledolíticos, digestivos, eméticos, laxantes y laxantes emolientes, y agentes procinéticos; anestésicos generales, tales como anestésicos por inhalación, anestésicos por inhalación halogenados, anestésicos intravenosos, anestésicos intravenosos de barbiturato, anestésicos intravenosos de benzodiazepina, y anestésicos intravenosos de agonistas opiáceos; hormonas y modificadores de hormonas, tales como abortivos, agentes suprarrenales, agentes suprarrenales corticosteroides, andrógenos, antiandrógenos, agentes inmunobiológicos, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides y vacunas; anestésicos locales, tales como anestésicos locales de amida y anestésicos locales de éster; agentes musculoesqueléticos, tales como agentes antiinflamatorios antigota, agentes antiinflamatorios corticosteroides, agentes antiinflamatorios de compuestos de oro, agentes antiinflamatorios inmunosupresores, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), agentes antiinflamatorios de salicilato, minerales; y vitaminas, tales como  
55 vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.  
60  
65

Las composiciones útiles para los métodos de la presente divulgación pueden incluir componentes de cultivo celular, por ejemplo, medios de cultivo que incluyen aminoácidos, metales, factores coenzimáticos, así como pequeñas poblaciones de otras células, por ejemplo, algunas de las cuales pueden surgir mediante posterior diferenciación de las células madre.

5 Pueden prepararse composiciones útiles para los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, separando por sedimentación las células objeto a partir del medio de cultivo y volviendo a suspenderlas en la disolución o material deseado. Las células pueden sedimentarse y/o cambiarse fuera del medio de cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración, ultrafiltración, etc.

10 El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y portador(es) opcional(es) en composiciones y que van a administrarse en métodos de la divulgación. En una realización, cualquier aditivo (además de la(s) célula(s) activa(s)) está presente en una cantidad de disolución a del 0,001 al 50% (peso) en solución salina tamponada con fosfato, y el principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, 15 tal como de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 5% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1% en peso, todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05% en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10% en peso, y todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5% en peso. Evidentemente, para cualquier composición que va a 20 administrarse a un animal o humano, y para cualquier método de administración particular, se prefiere determinar por tanto: toxicidad, tal como determinando la dosis letal (DL) y DL50 en un modelo animal adecuado, por ejemplo, roedor tal como ratón; y, la dosificación de la(s) composición/composiciones, concentración de componentes en la(s) misma(s) y momento de administración de la(s) composición/composiciones, que provocan una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva a partir del conocimiento del experto en la 25 técnica, esta divulgación y los documentos citados en el presente documento. Y el tiempo para las administraciones secuenciales puede determinarse sin experimentación excesiva.

Las composiciones útiles para los métodos de la presente divulgación pueden administrarse, entre otras cosas, mediante inyección localizada, incluyendo administración con catéter, inyección sistémica, inyección localizada, 30 inyección intravenosa, inyección intrauterina o administración parenteral. Cuando se administra una composición terapéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición farmacéutica), generalmente se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión, emulsión).

Según una realización de la presente divulgación, las composiciones pueden administrarse conjuntamente con al menos otro medicamento para vasculopatía, que comprende prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), análogos de prostaciclina, 35 inhibidor de la fosfodiesterasa-5 (PDE-5), antagonista de receptor de endotelina (ETRA), inhibidores de tirosina cinasa y estimulante de la guanilato ciclasa soluble.

Según una realización de la presente divulgación, el método para tratar vasculopatía puede comprender además 40 reducir la trombosis en arterias pulmonares; reducir la inflamación en arterias pulmonares; reducir la proliferación de músculo liso de la íntima en arterias pulmonares; reducir la formación de lesiones plexiformes en arterias pulmonares; aumentar la cantidad de óxido nítrico en arterias pulmonares; aumentar la cantidad de PGI<sub>2</sub> en arterias pulmonares; reducir el nivel de endotelina-1 en arterias pulmonares; reducir la cantidad de factores de crecimiento en arterias pulmonares; o fomentar una morfología endotelial apropiada en arterias pulmonares.

45 En Wang *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 49:1566-71 (2007), Zhao *et al.* Circ. Res. 96:442-450 (2005), y Nagaya *et al.*, Circulation 108:889-895(2003) se describe tratar la vasculopatía mediante administración/trasplante de células progenitoras.

50 La administración/trasplante de células en los vasos sanguíneos dañados tiene el potencial de reparar tejido vascular dañado, por ejemplo, venas, arterias, capilares, restaurando así la función vascular. Sin embargo, la ausencia de células adecuadas para propósitos de trasplante ha impedido desarrollar todo el potencial de este procedimiento. Las células "adecuadas" son células que cumplen uno o más de los siguientes criterios: (1) pueden obtenerse en grandes números; (2) pueden hacerse proliferar *in vitro* para permitir la inserción de material genético, 55 si es necesario; (3) son capaces de sobrevivir indefinidamente y facilitar la reparación vascular en el trasplante; y (4) no son inmunogénicas, preferiblemente se obtienen del tejido del propio paciente o de un donante compatible. Las células adecuadas pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas.

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

65 Las células pueden prepararse a partir de tejido de donante que es xenogénico con respecto al huésped. Para que los xenoinjertos sean satisfactorios, habitualmente se emplea algún método de reducción o eliminación de la

5 respuesta inmunitaria al tejido implantado. Por tanto, puede inmunosuprimirse a los receptores, o bien mediante el uso de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina, o bien mediante estrategias de inmunosupresión local que emplean inmunosupresores aplicados de manera local. La inmunosupresión local se divulga por Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992). La patente estadounidense n.º 5.026.365 divulga métodos de encapsulación adecuados para la inmunosupresión local.

10 Como alternativa a emplear técnicas de inmunosupresión, métodos de sustitución génica o noqueado génico usando recombinación homóloga en células madre embrionarias, enseñados por Smithies *et al.*, 317 Nature 230-234 (1985), y extendidos a sustitución o noqueado génico en líneas celulares (Zheng *et al.*, 88 Proc. Natl. Acad. Sci. 8067-8071 (1991)), pueden aplicarse a EPC para la ablación de genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las EPC que carecen de expresión de MHC permiten el injerto de poblaciones de células endoteliales enriquecidas a través de barreras de histocompatibilidad alogénica, y quizás incluso xenogénica, sin la necesidad de inmunosuprimir al receptor. Gruber, 54 Transplantation 1-11 (1992) también divulga revisiones generales y citas para el uso de métodos recombinantes para reducir la antigenicidad de células de donante. La solicitud de patente internacional PCT WO 92/04033 y el documento PCT/US99/24630 divulgan enfoques a modo de ejemplo a la reducción de la inmunogenicidad de trasplantes mediante modificación de la superficie. Alternativamente, la inmunogenicidad del injerto puede reducirse preparando las EPC a partir de un animal transgénico que tiene antígenos de MHC alterados o delecionados.

20 Las células pueden encapsularse y usarse para administrar factores al huésped, según tecnologías de encapsulación conocidas, incluyendo microencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350) y macroencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/19195 y WO 25 95/05452). La macroencapsulación se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 5.284.761; 5.158.881; 4.976.859; 4.968.733; 5.800.828 y la solicitud de patente internacional PCT WO 95/05452. Pueden implantarse múltiples dispositivos de macroencapsulación en el huésped.

30 Células preparadas a partir de tejido que es alogénico con respecto al del receptor pueden someterse a prueba para determinar su uso mediante los métodos bien conocidos de tipado tisular, para hacer coincidir estrechamente el tipo de histocompatibilidad del receptor.

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

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

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

### Ejemplos

45 Ejemplo 1. Optimización de la concentración de treprostínil para la respuesta celular en BM-MSc

Este ejemplo identifica concentraciones mínimas de treprostínil requeridas para potenciar el potencial angiogénico de células madre mesenquimatosas de médula ósea (BM-MSc) humanas.

50 Se expandió un único vial de MSC derivadas de médula ósea humanas y se sembró en veinte (20) pocillos de placas de 6 pocillos usando medio de crecimiento convencional. A una confluencia del 95-99%, se lavaron exhaustivamente las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después se expusieron las células a medios que contenían 0, 0,1, 1,0, 10 ó 100 µg/ml de treprostínil (n=4 pocillos para cada concentración).

55 Tras 24 horas de cultivo, se recogieron los medios condicionados de cada repetición y se analizaron para determinar la proteína factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El objetivo de este experimento era determinar la concentración óptima de treprostínil necesaria para provocar una respuesta celular en MSC (usando VEGF como lectura).

60 El análisis de citometría de flujo (figura 1) demostró que las MSC de médula ósea usadas en este estudio eran positivas para marcadores de MSC CD73, CD105, CD90 y HLA-ABC. Las células eran negativas o bajas para CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR. La definición de MSC se estableció por la Sociedad internacional de terapia celular (Dominici *et al.*, *Cytotherapy* 8(4):315-7, 2006).

65 La figura 2 es un gráfico que muestra la secreción de VEGF mediante MSC de médula ósea humanas tras 24 horas de exposición a treprostínil. Se sometió a ensayo el sobrenadante de cultivo celular para determinar VEGF mediante

ELISA (n=4 por grupo). Tal como se muestra en la figura 2, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de dosificación (las barras de error representan la desviación estándar del grupo de prueba).

5 Este experimento sugiere que concentraciones de treprostínil de 100 µg/ml o menos pueden no potenciar significativamente el potencial angiogénico de MSC de médula ósea humanas. Sin embargo, existe una ligera tendencia al aumento de la secreción de VEGF a medida que se aumenta el treprostínil. Ejemplos posteriores investigaron concentraciones superiores de treprostínil.

10 Ejemplo 2. Optimización de la concentración de treprostínil para la respuesta celular en BM-MS

Este ejemplo identifica 250 µg/ml como una buena concentración de treprostínil para potenciar el potencial angiogénico de BM-MS humanas.

15 Se llevó a cabo un experimento de seguimiento con respecto al ejemplo 1 para determinar si concentraciones de treprostínil por encima de 100 µg/ml afectaban a la secreción de MSC de VEGF. Como antes, se expandió un único vial (mismo lote/serie) de MSC derivadas de médula ósea hasta treinta (30) pocillos de placas de 6 pocillos usando medio de crecimiento convencional. A una confluencia del 95-99%, se lavaron exhaustivamente las células con PBS. Después se expusieron las células a medios que contenían 0, 100, 200, 300 ó 400 µg/ml de treprostínil (n=6 pocillos para cada concentración).

20 Se sometieron a ensayo los medios condicionados para determinar VEGF mediante ELISA tras 24 horas de exposición a treprostínil (n=4 repeticiones). Se sometieron a lisis las células de esas repeticiones y se extrajo el ARN para determinar la expresión génica de VEGF-A mediante qRT-PCR. Se sometieron a tripsinización células de las dos (2) repeticiones restantes, y se sometieron a ensayo para determinar la viabilidad celular mediante exclusión con azul trípano.

25 Se sometió a ensayo el sobrenadante de cultivo celular para determinar la proteína VEGF mediante ELISA (figura 3A, n=4). Se sometieron a ensayo lisados celulares de esos cultivos para determinar la expresión génica de VEGF-A mediante qRT-PCR, y se normalizaron con respecto al valor del control (figura 3B, n=4). En ambas figuras, las barras de error representan la desviación estándar en cada grupo de prueba.

30 La figura 4 incluye imágenes representativas de MSC expuestas a concentraciones crecientes de treprostínil. A la dosis más alta (400 µg/ml), el aumento de los números de células desprendidas agrupadas sugirieron un efecto citotóxico de treprostínil sobre MSC.

35 Se tiñeron MSC con azul trípano para determinar el número total de células vivas y muertas en cada pocillo (figura 5, n=2 pocillos por grupo). Se calculó la viabilidad en porcentaje como la razón entre células negativas para azul trípano y la población total (100 x vivas/total). Aunque hubo demasiadas pocas repeticiones como para realizar un análisis estadístico, hubo una tendencia a la disminución de la viabilidad a medida que aumentó la concentración de treprostínil por encima de 100 µg/ml. Sin embargo, la viabilidad celular no disminuyó por debajo del 85% a ningún nivel de dosis sometido a prueba en este experimento.

40 Este ejemplo demuestra que niveles altos de treprostínil tuvieron un impacto negativo sobre la viabilidad celular de MSC. A 100 µg/ml, la secreción de VEGF aumentó ~2 veces, pero la expresión génica de VEGF-A no fue significativamente diferente de los controles sin tratar tras 24 horas de exposición. La expresión génica de VEGF-A aumentó más de 5 veces al nivel de 200 µg/ml de treprostínil, y se observó secreción de VEGF a ~3 veces los valores de control. La secreción de VEGF no aumentó por encima de este valor, ni siquiera con concentraciones superiores de treprostínil, lo que sugiere que se saturó el efecto. Por tanto, se seleccionó 250 µg/ml como la concentración óptima de treprostínil para usar en estudios posteriores.

45 Ejemplo 3. Análisis exhaustivo de MSC expuestas a treprostínil 250 µg/ml

50 Basándose en los ejemplos anteriores, este ejemplo seleccionó 250 µg/ml como dosis de treprostínil para provocar una respuesta celular en MSC. Esta concentración se basó en la producción de VEGF aumentada en comparación con células de control sin tratar y efectos citotóxicos mínimos.

55 Se expandieron MSC de médula ósea humanas y se sembraron en seis (6) frascos T225 usando medio de crecimiento convencional (tabla 1). A una confluencia del 95-99%, se lavaron exhaustivamente las células con PBS. Se rellenaron tres (3) frascos con medios basales que contenían treprostínil 250 µg/ml, (+)Tre, y se rellenaron los tres (3) frascos restantes con medios basales sin suplementar, (-)Tre.

Tabla 1. Diseño de estudio para evaluar los efectos de treprostínil sobre la actividad de MSC.

N.º de muestra	Medios	Análisis de células	Análisis de medios
----------------	--------	---------------------	--------------------

n = 3	(+)Tre	Aislamiento de ARN para micromatriz génica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas secretadas</li> <li>• Contenido de ARN en exosoma</li> </ul>
n = 3	(-)Tre	ARN aislado para micromatriz génica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteínas secretadas</li> <li>• Contenido de ARN en exosoma</li> </ul>

Tras 24 horas de cultivo, se captaron imágenes representativas de cultivos (+) Tre y (-) Tre. Se recogieron medios condicionados de cada repetición, se dividieron en dos muestras de volúmenes apropiados, y se analizaron por separado para determinar: 1) proteínas secretadas (Myriad RBM InflammationMAP® 1.0) y 2) contenido de ARN en exosoma. Se sometieron las células a lisis directamente a partir de frascos de cultivo, se procesaron para el aislamiento de ARN total y se analizaron para determinar la expresión génica mediante micromatriz (Illumina Human HT12 Expression BeadChip).

La figura 6 ilustra un modelo para los efectos de treprostínil sobre la señalización celular, expresión génica y la liberación de factores paracrinos, y mostrando la siguiente tabla ensayos útiles para someter a prueba los efectos.

Función celular	Ensayo
1. Señalización intracelular	
2. Liberación de citocinas	Inmunoensayo
3. Señalización nuclear	
4. Expresión de ARN	RT-PCR, micromatriz
5. Traducción de proteínas	
6. Empaquetamiento del ARN	
7. Liberación de vesículas	RT-PCR, análisis de partículas

Para caracterizar el efecto de treprostínil sobre MSC, se analizaron las células mediante qRT-PCR y micromatriz para identificar cambios en la expresión génica (4). Se sometieron a ensayo medios de sobrenadante de cultivo celular para detectar citocinas inflamatorias seleccionadas mediante inmunoensayos basados en perlas (2). Se aislaron vesículas secretadas a partir de sobrenadante de cultivo celular, y se sometieron a ensayo para determinar el contenido de ARN mediante qRT-PCR (7). También se sometieron a ensayo vesículas para determinar el tamaño y la concentración mediante detección de pulso resistivo sintonizable, o TRPS (7) (véase el ejemplo 4).

Las células que se expusieron a 250 µg/ml de treprostínil durante 24 horas (figura 7A, panel derecho) no mostraron ningún cambio evidente en la morfología en comparación con células sin tratar (figura 7A, panel izquierdo). Se evaluó la viabilidad celular en células sometidas a tripsinización en cultivos tanto tratados con treprostínil como sin tratar. No se observó muerte celular significativa como resultado de la exposición a treprostínil, véase la figura 7B (>95% de viabilidad en todas las repeticiones y condiciones).

Se confirmó la expresión génica de VEGF-A en MSC mediante qRT-PCR. Treprostínil aumentó la expresión de VEGF-A ~3,5 veces con respecto a controles sin tratar (figura 8, panel superior). Adicionalmente, *miR-21* era más abundante en exosomas derivados de MSC expuestas a treprostínil, mientras que *let-7b* era menos prevalente en comparación con controles (figura 8, panel inferior; los asteriscos indican significación estadística ( $p < 0,05$ )).

También se realizó el análisis de expresión génica con micromatriz en MSC de cultivos sin (-) o con (+) treprostínil 250 µg/ml. Se analizaron tres (3) repeticiones biológicas de cada condición. De las 77.612 secuencias identificadas entre todas las repeticiones, sólo se detectaron 24.273 por encima del fondo arbitrario de 50 cuentas. 2.984 secuencias de ARN eran únicas para cultivos Tre(-), mientras que 1.781 secuencias de ARN eran únicas para cultivos Tre(+) (panel A). Se analizaron adicionalmente genes detectados en ambas condiciones para determinar la expresión diferencial (panel). De los 19.508 genes expresados habitualmente, sólo 1.690 difirieron significativamente ( $p < 0,01$ ). Se encontró que 268 genes eran al menos 4 veces superiores en MSC sin tratar, y se encontró que 171 eran al menos 4 veces superiores en cultivos de MSC Tre(+).

Tal como se muestra en las figuras 9A y 9B, los genes expresados de manera diferencial separaron claramente (en cuanto a la agrupación) los cultivos de MSC Tre(+) de los controles, sugiriendo que treprostínil mostró un impacto significativo sobre la función o actividad de las células MSC.

Las tablas 2-3 indican genes que se regulan por incremento en respuesta a treprostínil. En la tabla 2 se muestran genes que sólo se expresan en cultivos Tre(+) con un valor promedio de al menos 500 cuentas. En la tabla 3 se muestran genes que se expresan al menos 10 veces más en Tre(+) en comparación con células sin tratar.

Las tablas 4-5 indican genes que se regulan por disminución en respuesta a treprostínil. En la tabla 4 se muestran genes que se regulan por disminución al menos 10 veces en cultivos Tre(+). En la tabla 5 se muestran genes que sólo se expresan en cultivos Tre(-) (es decir, completamente desactivados en los cultivos Tre(+)).

Tabla 2. Gen expresado en Tre(+) solo con > 500 recuentos

Gen	Sec. de ref.	Descripción	Treprostinil (-)				Treprostinil (+)				Promedio	Veces de cambio
			Rep 1	Rep2	Rep 3	Promedio	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Promedio		
PTGS2	NM_000963	Prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa)	0	81	56	46	10216	14673	7776	10888	N/A	
ANGPTL4	NM_139314	Similar a angiopoyetina 4, variante de transcrito 1	0	8	5	4	1570	2337	1371	1759	N/A	
HAS1	NM_001523	Hialuronano sintasa 1	0	0	69	23	1149	2571	1465	1728	N/A	
PED4D	NM_001197222	Fosfodiesterasa 4D, específica de AMPc, variante de transcrito 8	49	0	0	16	1417	2044	1570	1677	N/A	
STC1	NM_003155	Estaniocalcina 1	29	54	26	36	1313	2344	1095	1584	N/A	
PDK4	NM_002612	Piruvato deshidrogenasa cinasa, isozima 4, gen nuclear que codifica para proteína mitocondrial	27	47	26	33	1296	1726	1173	1399	N/A	
NGFR	NM_002507	Receptor de factor de crecimiento nervioso	18	10	19	16	1217	1818	1074	1370	N/A	
BMP6	NM_001718	Proteína morfogenética ósea 6	37	43	37	39	1210	1581	1181	1324	N/A	
PLOD2	NM_000935	Procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2, variante de transcrito 2	68	29	27	42	1169	1679	925	1258	N/A	
ATF3	NM_001030287	Factor de transcripción activante 3, variante de transcrito 3	0	46	31	26	1001	1579	1041	1207	N/A	
PDE4B	NM_001037339	Fosfodiesterasa 4B, específica de AMPc, variante de transcrito b	0	36	7	14	1160	1371	1056	1196	N/A	
PDE4D	NM_001197221	Fosfodiesterasa 4D, específica de AMPc, variante de transcrito b	0	74	33	36	1130	1170	1071	1124	N/A	
SLC16A6	NM_004694	Familia de portadores de soluto 16, miembro 6 (transportador de ácido monocarboxílico 7), variante de transcrito 2	7	11	11	10	975	1342	784	1034	N/A	
HAS1	NM_001523	Hialuronano sintasa 2	0	0	0	0	1355	730	789	958	N/A	
SMOX	NM_175840	Espermina oxidasa, variante de transcrito 2	65	0	3	22	835	1372	658	955	N/A	
IL11	NM_000641	Interleucina 11	18	66	65	50	851	1237	700	929	N/A	
KYNU	NM_003937	Quinurenina, variante de transcrito 1	33	33	33	27	867	922	797	862	N/A	
GDNF	NM_000514	Factor neurotrófico derivado de células de la glia, variante de transcrito 1	64	65	65	43	689	845	824	786	N/A	

GDNF	NM_199231	Factor neurotrófico derivado de células de la glía, variante de transcrito 2	0	0	0	0	0	0	0	775	1013	464	751	N/A
SEC31A	NM_001077207	Homólogo A de SEC31 (S. <i>cerevisiae</i> ), variante de transcrito 5	121	0	0	40	40	737	887	573	732	573	732	N/A
PAQR5	NM_017705	Miembro V de familia de receptores de adipo Q y prostaglandina, variante de transcrito 2	35	60	48	48	48	703	745	664	704	664	704	N/A
ATF3	NM_001674	Factor de transcripción activante 3, variante de transcrito 1	48	24	40	37	37	668	920	442	676	442	676	N/A
ATP6V0D2	NM_152565	ATPasa, transporte de H <sup>+</sup> , lisosómica 38kDa, V0 subunidad d2	9	15	6	10	10	547	893	499	646	499	646	N/A
KTN1	NM_001079522	Quinesina 1 (receptor de quinesina), variante de transcrito 3	47	0	73	40	40	531	612	596	579	596	579	N/A
SLC4A2	NM_001199693	Familia de portadores de soluto 4, intercambiador de aniones, miembro 2, variante de transcrito 3	47	0	0	16	16	821	176	574	524	574	524	N/A
TRH	NM_007117	Hormona de liberación de tiroxina (TRH), ARNm	12	13	7	11	11	419	697	428	515	428	515	N/A
ST6GALNAC6	NM_013443	ST6 galactosil-N-acetilgalactosaminida-sialiltransferasa 6	7	0	0	2	2	424	651	445	506	445	506	N/A

Tabla 3. Genes con un aumento de 10 veces en Tre(+) en comparación con Tre(-)

Gen	Sec. de ref.	Descripción	Treprostinil (-)					Treprostinil (+)					Veces de cambio
			Rep 1	Rep 2	Rep 3	Promedio	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Promedio			
IGFBP1	NM_000596	Proteína de unión a factor de crecimiento similar a insulina 1	40	78	42	53	5468	8123	5321	6304	118,2		
IL6	NM_000600	Interleucina 6 (interferón, beta 2)	49	86	53	63	6490	8445	5640	6859	109,5		
PRKAG2	NM_024429	Proteína cinasa, activada por AMP, subunidad no catalítica gamma 2, variante de transcrito b	75	112	85	91	7233	8152	6080	7155	78,6		
PLIN2	NM_001122	Perilipina 2, variante de transcrito 1	1608	2409	1910	1976	82301	124225	72254	92927	47,0		
GDF15	NM_004864	Factor de diferenciación de crecimiento 15	321	583	358	421	11450	18978	10088	13505	32,1		
SLC6A15	NM_182767	Familia de portadores de soluto 6, (transportador de aminoácidos neutros), miembro 15, variante de transcrito 1	36	89	36	54	1201	1568	1062	1277	23,7		

IER3	NM_003897	Respuesta temprana inmediata 3	108	152	136	132	2769	3595	2558	2974	22.5
CD55	NM_000574	Molécula de CD55, factor de aceleración de la desintegración para complemento, variante de transcrito 1	258	452	367	359	7472	9108	6555	7715	21,5
SCG2	NM_003469	Secretorinina II	49	56	49	51	1014	1187	1069	1090	21,3
C13orf33	NM_032849	Marco de lectura abierto 33 de cromosoma 13	737	1129	889	918	17304	24329	16255	19296	21,0
SIK1	NM_173354	Cinasa inducible por sal 1	34	79	62	58	1144	1320	1086	1183	20,3
PITPNC1	NM_181671	Proteína de transferencia de fosfatidilinositol, citoplasmática 1, variante de transcrito 2	33	65	57	52	702	1007	764	824	16,0
HSD11B1	NM_005525	Hidroxiesteroide (11-beta) deshidrogenasa 1, variante de transcrito 1	54	87	24	55	822	966	758	849	15,4
SAT1		Espermidina/espermina acetiltransferasa 1, variante de transcrito 2, ARN no codificante	68	138	62	89	1141	1529	954	1208	13,5
VEGFA	NM_001025370	Factor de crecimiento endotelial vascular A, variante de transcrito 6	389	510	260	386	4761	6614	4293	5223	13,5
PALLD	NM_001166110	Paladina, proteína asociada con el citoesqueleto, variante de transcrito 4	0	126	108	78	1158	885	1055	1033	13,3
GPRC5A	NM_003979	Receptor acoplado a proteínas G, familia C, grupo 5, miembro A	279	415	370	355	4151	5981	3920	4684	13,2
CD55	NM_001114752	Molécula de CD55, factor de aceleración de la desintegración para complemento, variante de transcrito 2	161	214	230	202	2497	3119	2372	2663	13,2
LIPG	NM_006033	Lipasa, endotelial	95	171	121	129	1552	1946	1607	1702	13,2
IDH1	NM_005896	Isocitrato deshidrogenasa 1 (NADP+), soluble	129	223	114	155	1920	2406	1792	2039	13,1
RND3	NM_005168	Familia Rho, GTPasa 3, variante de transcrito 2	3542	4708	3790	4013	48372	65016	41881	51756	12,9
DUSP1	NM_004417	Fosfatasa de especificidad doble 1	66	98	91	85	825	1489	963	1092	12,9
NR4A2	NM_006186	Subfamilia de receptores nucleares 4, grupo A, miembro 2	39	66	59	55	635	810	592	679	12,5
C11orf96	NM_001145033	Marco de lectura abierto 96 de cromosoma 11	148	203	177	176	2050	2381	1885	2105	12,0
PTP4A1	NM_003463	Proteína tirosina fosfatasa de tipo IVA, miembro 1	0	174	0	58	849	696	510	685	11,8
SREBF1	NM_004176	Factor de transcripción de unión de elemento regulador de esteroles 1, variante de transcrito 2	0	1	444	148	1709	1842	1577	1709	11,5
VEGFA	NM_001171626	Factor de crecimiento endotelial vascular	470	756	765	664	6586	9874	6349	7603	11,5

RCAN1	NM_203418	A, variante de transcrito 4	511	863	1068	814	7766	11997	6962	8908	10,9
SLC3A2	NM_001013251	Regulador de calcineurina 1, variante de transcrito 3 Familia de portadores de soluto 3, miembro 2, variante de transcrito 6	2478	4147	2946	3190	31831	39703	29042	33526	10,5

Tabla 4. Genes con un aumento de 10 veces en Tre(+) en comparación con Tre(-)

Gen	Sec. de ref.	Descripción	Treprostnil (-)			Treprostnil (+)			Promedio	Rep 3	Promedio	Veces de cambio
			Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3				
ISLR	NM_005545	Superfamilia de inmunoglobulinas que contiene repeticiones ricas en leucina, variante de transcrito 1	4070	7084	5446	612	543	490	548	548	10,1	
S100A4	NM_002961	Proteína A4 de unión a calcio S100, variante de transcrito 1	1057	1585	1294	149	114	113	125	125	10,5	
CELF1	NM_001172640	CUGBP, miembro de la familia similar a Elav 1, variante de transcrito 5	648	628	658	80	66	31	59	59	10,9	
EPB41L2	NM_001199389	Banda 4.1 de proteína de membrana de eritrocitos, de tipo 2 (EPB41L2), variante de transcrito 5	935	1631	1251	146	63	131	113	113	11,2	
RCAN2	NM_001251974	Regulador de calcineurina 2, variante de transcrito 2	989	1346	1318	129	109	76	105	105	11,6	
ANLN	NM_018685	Anilina, proteína de unión a actina	595	885	528	67	68	37	57	57	11,7	
COL6A3	NM_004369	Colágeno, tipo VI, alfa 3, variante de transcrito 1	41492	68881	52605	5033	4570	4303	4635	4635	11,7	
MEST	NM_177525	Homólogo de transcrito específico de mesodermo (ratón), variante de transcrito 3	2666	4031	3958	367	268	258	298	298	11,9	
METTL7A	NM_014033	Metiltransferasa, tipo 7A	1075	1603	1220	146	95	85	109	109	11,9	
CPA4	NM_016352	Carboxipeptidasa A4, variante de transcrito 1	461	740	693	51	62	45	53	53	12,0	
SLC2A12	NM_145176	Familia de portadores de soluto 2, (transportador de glucosa mediante difusión facilitada), miembro 12	1049	1525	1269	110	114	92	105	105	12,2	
OLFML1	NM_198474	Olfactomedina, tipo 1	1204	2191	1808	177	128	114	140	140	12,4	
GDF5	NM_000557	Factor de diferenciación de crecimiento 5	721	1190	739	83	64	65	71	71	12,5	
DDAH1	NM_001134445	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1, variante de transcrito 2	1369	2058	1626	136	155	107	133	133	12,7	
ACTN1	NM_001130005	Actinina, alfa 1, variante de transcrito 3	1104	1891	1381	165	115	64	115	115	12,7	
PRELP	NM_002725	Proteína con repetición rica en leucina con extremo rico en prolina/arginina, variante de transcrito 1	1166	1673	1582	159	104	80	114	114	12,9	
PALLD	NM_001166109	Paladina, proteína asociada con el citoesqueleto, variante de transcrito 3	7556	11050	10821	1116	638	503	753	753	13,0	
DKFZb547J0510		ADNC, FLJ42650 fis., clon	1345	2491	1958	183	135	125	148	148	13,0	

ACTN1	NM_001130005	Actinina, alfa 1, variante de transcrito 3	1104	1891	1381	1459	165	115	64	115	12,7
PRELP	NM_002725	Proteína con repetición rica en leucina con extremo rico en prolina/arginina, variante de transcrito 1	1166	1673	1582	1474	159	104	80	114	12,9
PALLD	NM_001166109	Paladina, proteína asociada con el citoesqueleto, variante de transcrito 3	7556	11050	10821	9809	1116	638	503	753	13,0
DKFZp547J0510	FLJ42650	ADNc, FLJ42650 fis, clon BRACE3027478	1345	2491	1958	1932	183	135	125	148	13,0
ANK3	NM_001204403	Anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G), variante de transcrito 3	573	1098	762	811	86	59	27	57	14,2
ANGPT1	NM_001146	Angiopoyetina 1, variante de transcrito 1	518	1017	804	780	80	73	7	53	14,6
MEST	NM_002402	Homólogo de transcrito específico de mesodermo (ratón), variante de transcrito 1	866	1719	1264	1283	98	138	20	85	15,1
PDE5A	NM_033430	Fosfodiesterasa 5A, específica de GMPc, variante de transcrito 2	2547	3986	3551	3361	174	286	206	222	15,2
CXCL12	NM_199168	Quimiocina (motivo C-X-C), ligando 12, variante de transcrito 1	8468	12501	10752	10574	853	627	534	671	15,8
SLC14A1	NM_015865	Familia de portadores de soluto 14, (transportador de urea), miembro 1, variante de transcrito 2	1328	2174	1360	1621	95	102	67	88	18,5
OLFML2B	NM_015441	Olfactomedina, tipo 2B	1147	1802	1447	1465	115	60	36	70	20,8
SYNPO2	NM_001128933	Sinaptopodina 2, variante de transcrito 2	1812	2822	3020	2551	142	104	65	104	24,6
LMOD1	NM_012134	Leiomodina 2 (músculo liso)	1235	1960	1972	1722	107	51	38	65	26,4
COL21A1	NM_030820	Colágeno, tipo XXI, alfa 1	1125	1991	1590	1569	78	57	37	57	27,4
CTGF	NM_001901	Factor de crecimiento de tejido conjuntivo	16535	26281	26219	23012	1125	603	494	741	31,1
MXRA5	NM_015419	Asociado a remodelación de matriz 5	1333	2083	1861	1759	97	28	37	54	32,6



KIAA0930	NM_015264	KIAA0930, variante de transcrito 1	504	577	453	511	99	9	36	48	N/A
CALD1	NM_033140	Caldesmona 1, variante de transcrito 5	605	370	594	523	0	0	0	0	N/A
MBNL1	NM_207297	De tipo muscblind ( <i>Drosophila</i> ), variante de transcrito 7	293	719	565	526	138	0	0	46	N/A
NAP1L3	NM_004538	Proteína de ensamblaje de nucleosoma 1, de tipo 3	449	655	510	538	68	35	42	48	N/A
CLDN11	NM_005602	Claudina 11, variante de transcrito 1	446	786	398	543	2	38	0	13	N/A
FAM198B	NM_001128424	Familia con similitud de secuencia, 198, miembro B, variante de transcrito 3	543	811	323	559	0	0	46	15	N/A
SLC7A8	NM_182728	Familia de portadores de soluto 7, miembro 8, variante de transcrito 2	427	815	598	613	91	0	39	43	N/A
ASPM	NM_018136	Homólogo de Asp (huso anómalo), asociado con microcefalia ( <i>Drosophila</i> ), variante de transcrito 1	538	826	510	625	20	27	30	26	N/A
TCF12	NM_207040	Factor de transcripción 12, variante de transcrito 5	593	803	549	648	0	119	0	40	N/A
SCN2A	NM_021007	Canal de sodio, dependiente de voltaje, tipo II, subunidad alfa, variante de transcrito 1	488	848	621	652	0	23	38	20	N/A
ASPH	NM_001164754	Aspartato beta-hidroxilasa, variante de transcrito 10	591	1048	335	658	111	0	0	37	N/A
CIT	NM_001206999	Citron (serina/treonina cinasa 21, de interacción con rho), variante de transcrito 1	548	862	575	661	0	27	0	9	N/A
TPM1	NM_001018007	Tropomiosina 1 (alfa), variante de transcrito 2	816	267	1109	731	107	0	0	36	N/A
ST8SIA1	NM_003034	ST8 alfa-N-acetil-neuraminida alfa-2,8-sialiltransferasa 1	590	912	691	731	81	0	054	45	N/A
FAM84A	NM_145175	Familia con similitud de secuencia, 84, miembro A	564	923	712	733	63	40	32	45	N/A
SPATA20	NM_022827	Asociada con espermatogénesis 20	707	925	568	733	45	0	0	15	N/A
PRRT2	NM_145239	Proteína transmembrana rica en prolina 2, variante de transcrito 1	587	955	691	744	65	19	24	36	N/A
LRRIC17	NM_001031692	Que contiene repeticiones ricas en leucina 18, variante de transcrito 1	608	896	733	746	43	11	13	22	N/A
SNX14	NM_153816	Nexina de clasificación 14, variante de transcrito 1	602	1135	702	813	55	0	0	18	N/A
OLFML1	NM_198474	Olfactomedina, tipo 1	742	900	806	816	54	16	56	42	N/A
RASA4	NM_006989	Activador de proteína RAS-p21 4, variante de transcrito 1	459	1209	902	857	34	0	0	11	N/A

MAP1B	NM_005909	Proteína asociada a microtúbulos 1B	556	915	1188	886	47	0	80	42	N/A
MEOX2	NM_005924	Homeosecuencia de mesénquima 2	727	1124	1093	982	57	10	25	31	N/A
MYLK	NM_053025	Cinasa de cadena ligera de miosina, variante de transcrito 1	602	1519	852	991	0	0	0	0	N/A
SLC14A1	NM_015865	Familia de portadores de soluto 14 (transportador de urea), miembro 1, variante de transcrito 2	732	1312	1065	1036	38	13	7	19	N/A
FLG	NM_002016	Filagrina	751	1239	1165	1052	45	17	22	28	N/A
ARPC4	NM_001024960	Complejo 2/3 de proteína relacionada con actina, subunidad 4, 20 kDa, variante de transcrito 3	1236	924	1289	1150	35	0	0	12	N/A
RBFOX2	NM_001031695	Proteína de unión a ARN, homólogo de fox-1 ( <i>C. elegans</i> ) 2, variante de transcrito 1	1529	1132	1289	1316	26	4	0	10	N/A
ASPH	NM_004318	Aspartato beta-hidrolasa, variante de transcrito 1	3340	3680	1137	2719	3	1	0	1	N/A
SREBF1	NM_001005291	Elemento regulador de esterol que se une al factor de transcripción 1, variante de transcrito 1	2304	4238	2265	2936	36	0	0	12	N/A

Se realizaron inmunoensayos basados en perlas (Luminex) para evaluar la concentración de 46 citocinas en

sobrenadantes de cultivo celular (Myriad RBM Human InflammationMAP® 1.0). De las 46 evaluadas, 6 se secretaron de manera diferencial en cultivos de MSC tratadas con treprostínil y sin tratar (véase la tabla 6, n=3 por grupo). Los asteriscos indican significación estadística entre los grupos basándose en una prueba de la T de Student (\*p<0,001, o \*\*p<0,0001).

5

Tabla 6. La secreción de citocinas inflamatorias se altera en MSC tratadas con treprostínil

Nombre de proteína	Abreviatura	(+) Treprostínil	(-) Treprostínil
Ferritina	FRTN	0,96 +/- 0,01 ng/ml (AUMENTADO)	0,70 +/- 0,11 ng/ml
Interleucina 6	IL-6	3580 +/- 384 pg/ml** (AUMENTADO)	62 +/- 6 pg/ml
Interleucina 8	IL-8	Por debajo de la detección (DISMINUIDO)	2,4 +/- 1,0 pg/ml
Proteína quimiotáctica de monocitos 1	MCP-1	47 +/- 9 pg/ml** (DISMINUIDO)	379 +/- 35 pg/ml
Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1	TIMP-1	12 +/- 1 ng/ml* (DISMINUIDO)	29 +/- 3 ng/ml
Factor de crecimiento endotelial vascular	VEGF	612 +/- 37 pg/ml** (AUMENTADO)	235 +/- 16 pg/ml

Se extrajo ARN total a partir de preparaciones de exosomas y se realizó qRT-PCR con los mismos conjuntos de cebador/sonda usados en experimentos con las células originales (véase la figura 8). Los transcritos génicos de VEGF-A presentes en exosomas derivados de MSC aumentaron ~4 veces como resultado de la exposición a treprostínil (figura 10). Adicionalmente, *miR-21* y *miR-199-3p* eran significativamente más abundantes en exosomas derivados de células tratadas con treprostínil (p<0,05).

10

Este ejemplo muestra que la expresión génica y los perfiles de secreción de MSC se alteraron tras 24 horas de exposición a treprostínil *in vitro*. Treprostínil aumentó el potencial angiogénico de MSC basándose en la observación de que tanto la proteína como el gen de VEGF estaban aumentados. Además, los exosomas de MSC tratadas con treprostínil tenían niveles superiores de VEGF-A, lo cual puede fomentar la producción de VEGF aumentada en células diana mediante un mecanismo de transferencia génica horizontal.

15

20

Además, se observaron *miR-21* y *miR-199a-3p*, que también pueden influir en la actividad en células diana (Lee *et al.*, Circulation 126(22):2601-11, 2012). También se observaron cambios en citocinas secretadas como resultado de la exposición a treprostínil. En particular, se produjo IL-6 ~50 veces más en comparación con MSC de control, mientras que MCP-1 se secretó ~6-7 veces menos.

25

Ejemplo 4. Análisis físico de exosomas derivados de MSC expuestas a treprostínil 250 µg/ml.

Se repitió el procedimiento experimental descrito en el ejemplo 3 para generar suficientes exosomas para un análisis adicional. Se analizaron medios condicionados a partir de cultivos de MSC tratadas con treprostínil y sin tratar mediante detección de pulso resistivo sintonizable (TRPS). Este método cuantifica el número de partículas suspendidas en una muestra, así como el tamaño de cada partícula, basándose en cambios en la corriente eléctrica a través de la muestra.

30

En las figuras 11A-B se presenta la distribución por tamaños de exosomas derivados de MSC tratadas con treprostínil y sin tratar. Se analizaron las preparaciones de exosomas de MSC tratadas con treprostínil (figura 11A) y MSC sin tratar (figura 11B) para detectar partículas con un tamaño de 50-600 nm mediante detección de pulso resistivo sintonizable (TRPS). Estos histogramas representativos para cada población de exosomas demostraron que la mayoría de las partículas tenían 150-200 nm de tamaño en ambos grupos. Las MSC tratadas con treprostínil proporcionaron una población de exosomas más uniforme, encontrándose casi el 60% de la población en la categoría de tamaño de ~200 nm. El recuento de partículas totales para cada condición fue de >500 cuentas.

35

40

Se determinó la concentración de partículas de preparaciones de exosomas mediante TRPS. Se observaron menos partículas en la preparación de (+) treprostínil en comparación con el control (n=1). El tamaño medio, moda del tamaño e intervalo de tamaño fueron comparables entre los dos grupos y se incluyen en la tabla 7.

45

Tabla 7. Tamaño y concentración de exosomas en preparaciones (+) treprostínil y (-) treprostínil

Parámetro	(+) Treprostínil	(-) Treprostínil
Concentración	8,9 E6 por ml	1,5 E7 por ml
Diámetro medio	213,3 nm	210,0 nm
Moda del diámetro	164,4 nm	147,1 nm
Diámetro máx.	503,0 nm	482,8 nm
Diámetro mín.	139,2 nm	128,3 nm

Este ejemplo sugiere que treprostínil puede proporcionar una población más uniforme de exosomas.

50

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende una célula madre mesenquimatosa (MSC) o un exosoma derivado de MSC para su uso en un método para tratar o prevenir vasculopatía en un sujeto que lo necesita, en la que la MSC o el exosoma derivado de MSC se obtiene tratando un cultivo de MSC con una prostaciclina a una concentración de al menos aproximadamente 100 µg/ml, en la que la MSC o el exosoma derivado de MSC tiene una producción de VEGF aumentada en comparación con una MSC o exosoma derivado de MSC sin tratar, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una prostaciclina y dicha composición.
- 10 2. Composición para su uso en el método según la reivindicación 1, en la que la prostaciclina y la composición se administran de manera concurrente o separada.
3. Composición para su uso en el método según la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto una célula progenitora endotelial (EPC).
- 15 4. Composición para su uso en el método según la reivindicación 3, en la que la EPC se obtiene a partir del sujeto.
- 20 5. Composición para su uso en el método según la reivindicación 3, en la que la EPC se transforma con un ácido nucleico que aumenta la expresión de actividad biológica de una proteína seleccionada del grupo que consiste en óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), hemo oxigenasa (HMOX1) y prostaciclina sintasa (PTGIS).
- 25 6. Composición para su uso en el método según la reivindicación 5, en la que el ácido nucleico codifica para la proteína.
7. Composición para su uso en el método según la reivindicación 1, en la que la prostaciclina se selecciona del grupo que consiste en epoprostenol, treprostínil, beraprost, ilprost, un agonista de receptor de PGI<sub>2</sub>, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 30 8. Composición para su uso en el método según la reivindicación 1, en la que la MSC es una célula precursora mesenquimatosa (MPC) o se obtiene a partir de médula ósea.
- 35 9. Composición para su uso en el método según la reivindicación 1, en la que la vasculopatía se selecciona del grupo que consiste en hipertensión arterial pulmonar (PAH), enfermedad vascular periférica (PVD), isquemia crítica de las extremidades (CLI), arteriopatía coronaria y vasculopatía diabética.
- 40 10. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una prostaciclina y una composición que comprende una célula madre mesenquimatosa (MSC) o un exosoma derivado de MSC, y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que la MSC o el exosoma derivado de MSC se obtiene tratando un cultivo de MSC con una prostaciclina a una concentración de al menos aproximadamente 100 µg/ml, en la que la MSC o el exosoma derivado de MSC tiene una producción de VEGF aumentada en comparación con una MSC o exosoma derivado de MSC sin tratar.
- 45 11. Composición según la reivindicación 10, que comprende además una célula progenitora endotelial (EPC).

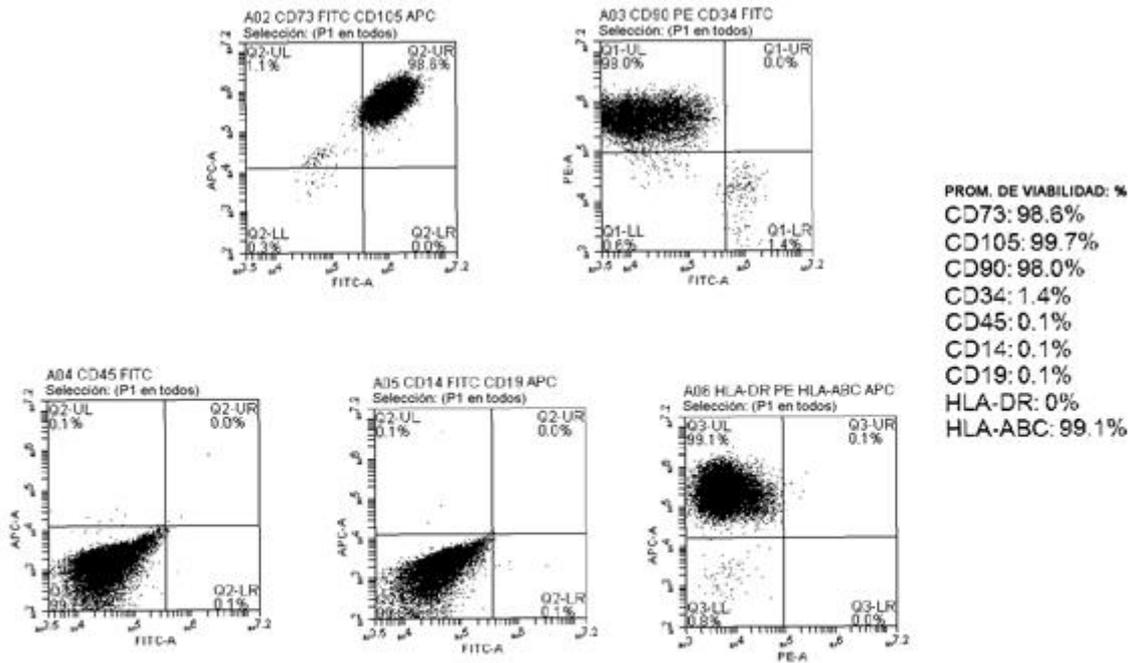


FIG. 1

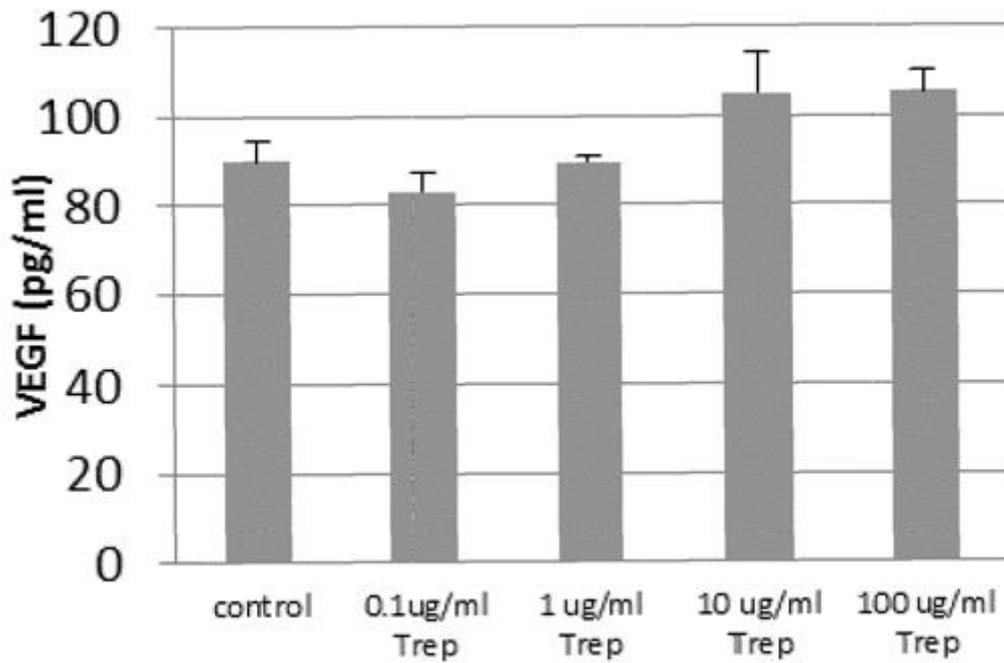
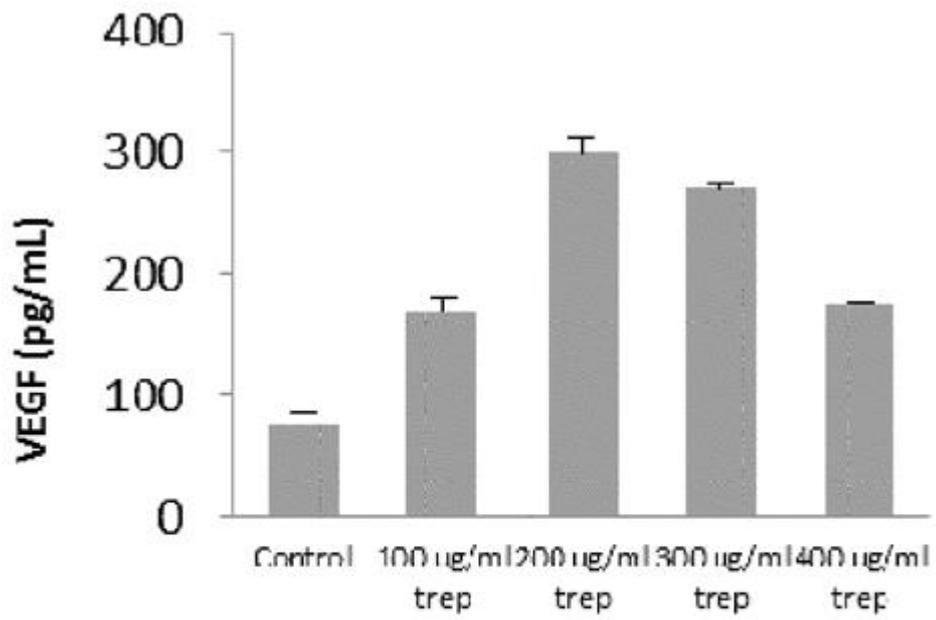
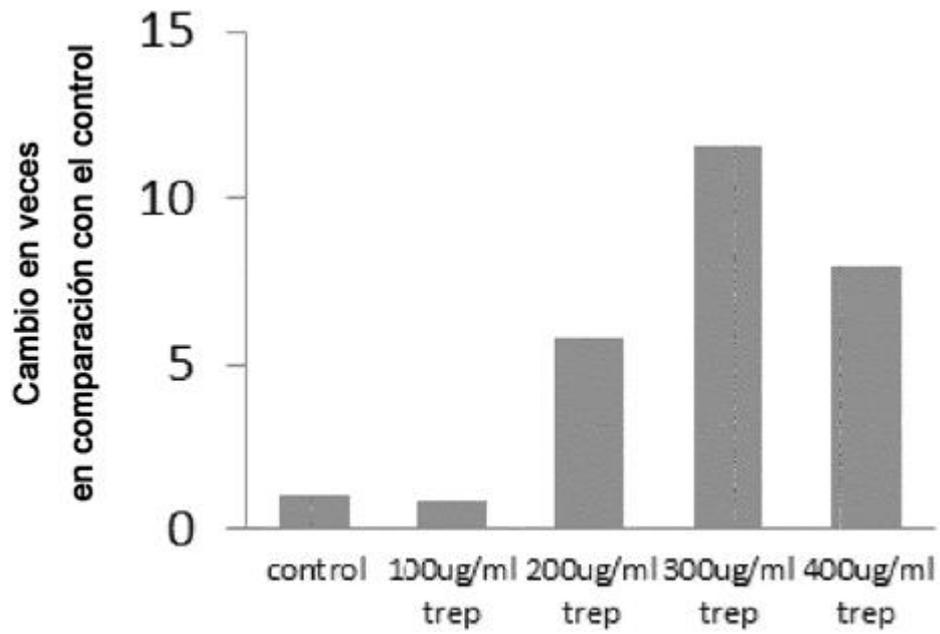


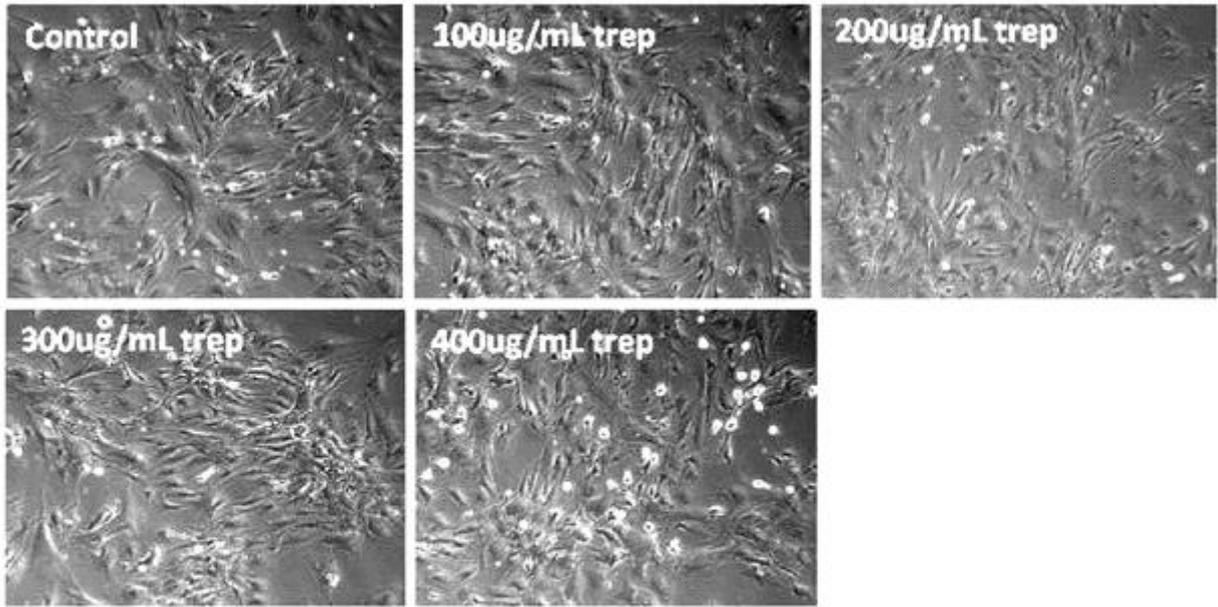
FIG. 2



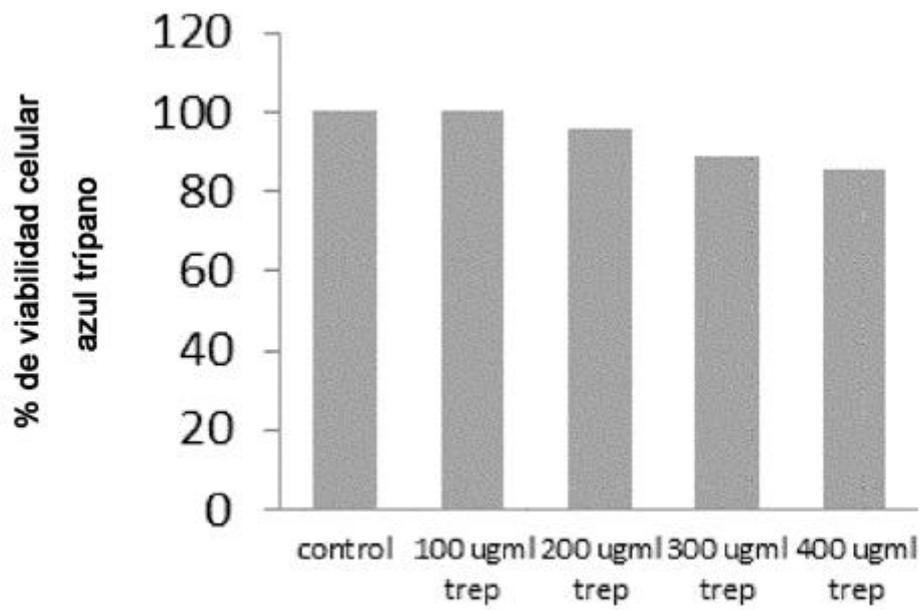
**FIG. 3A**



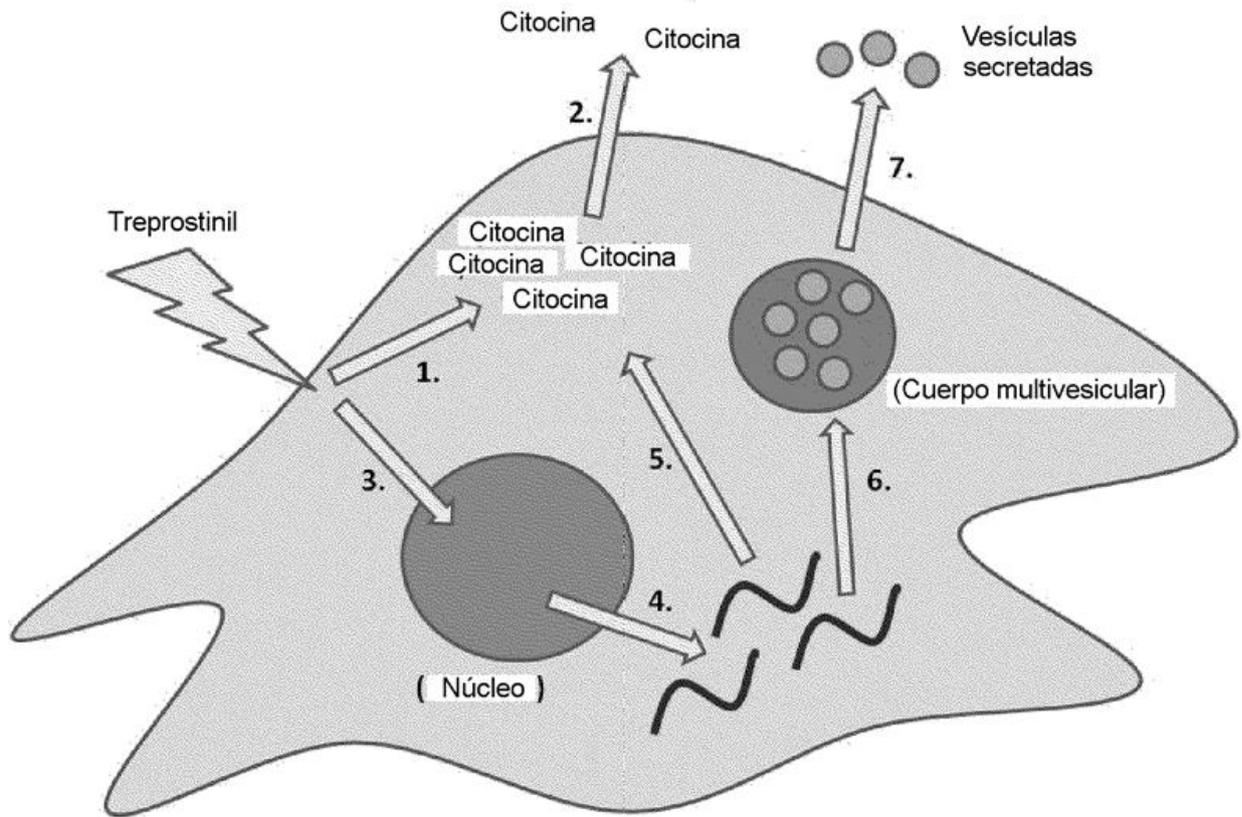
**FIG. 3B**



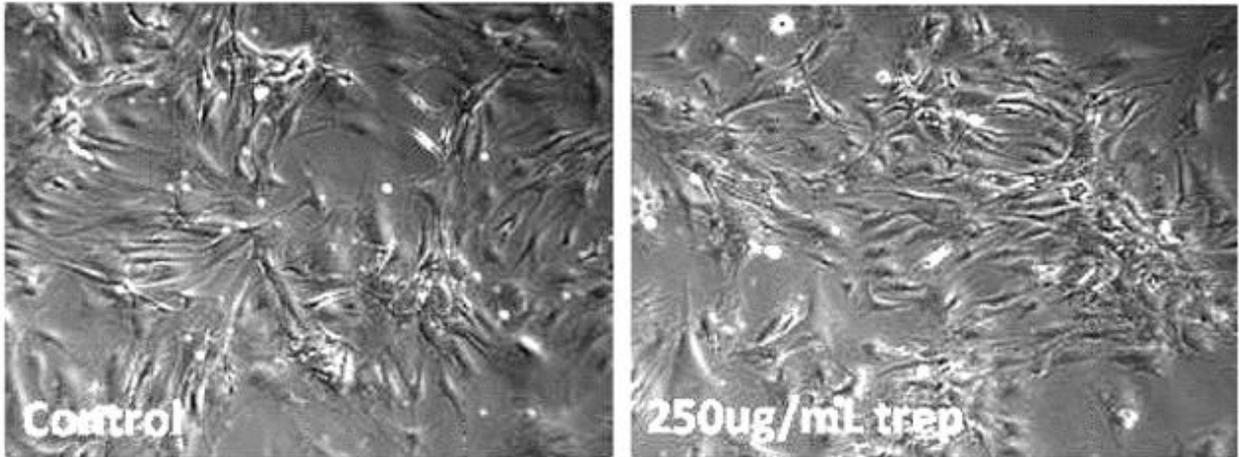
**FIG. 4**



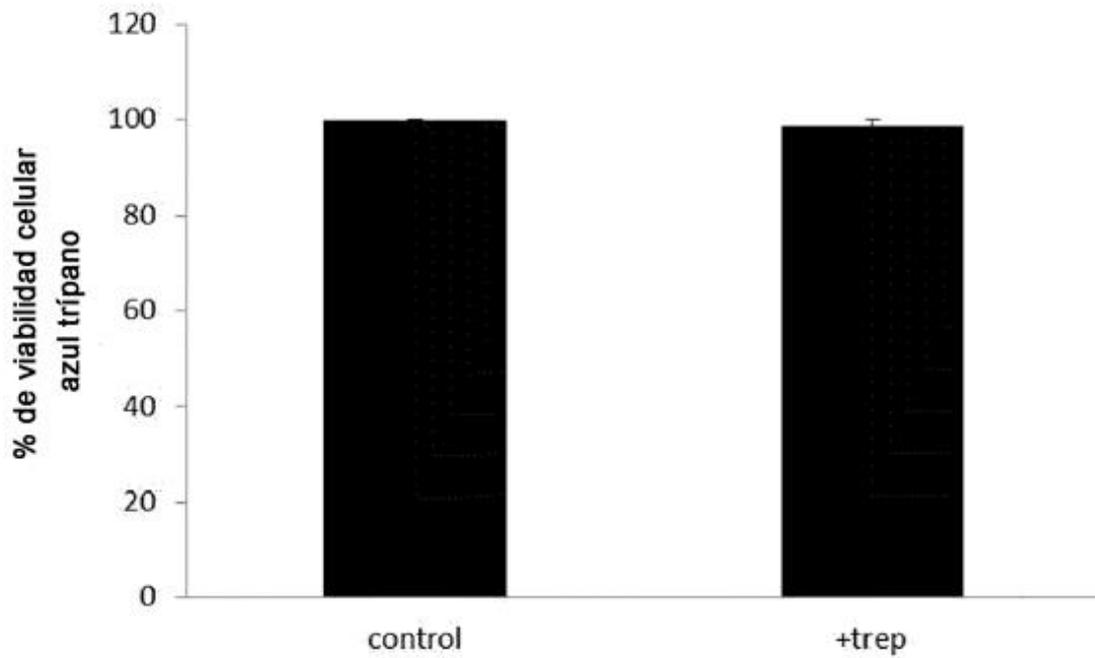
**FIG. 5**



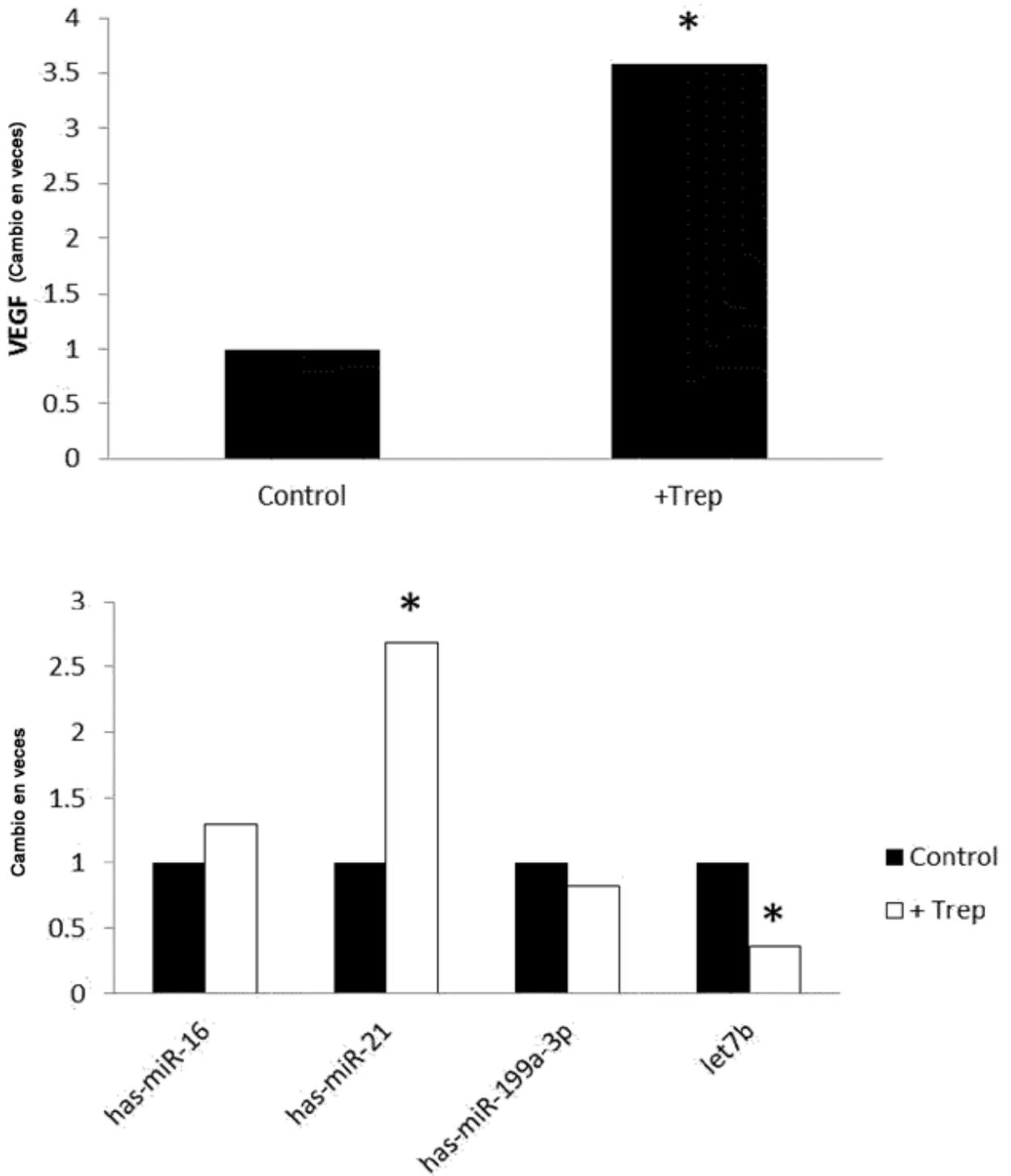
**FIG. 6**



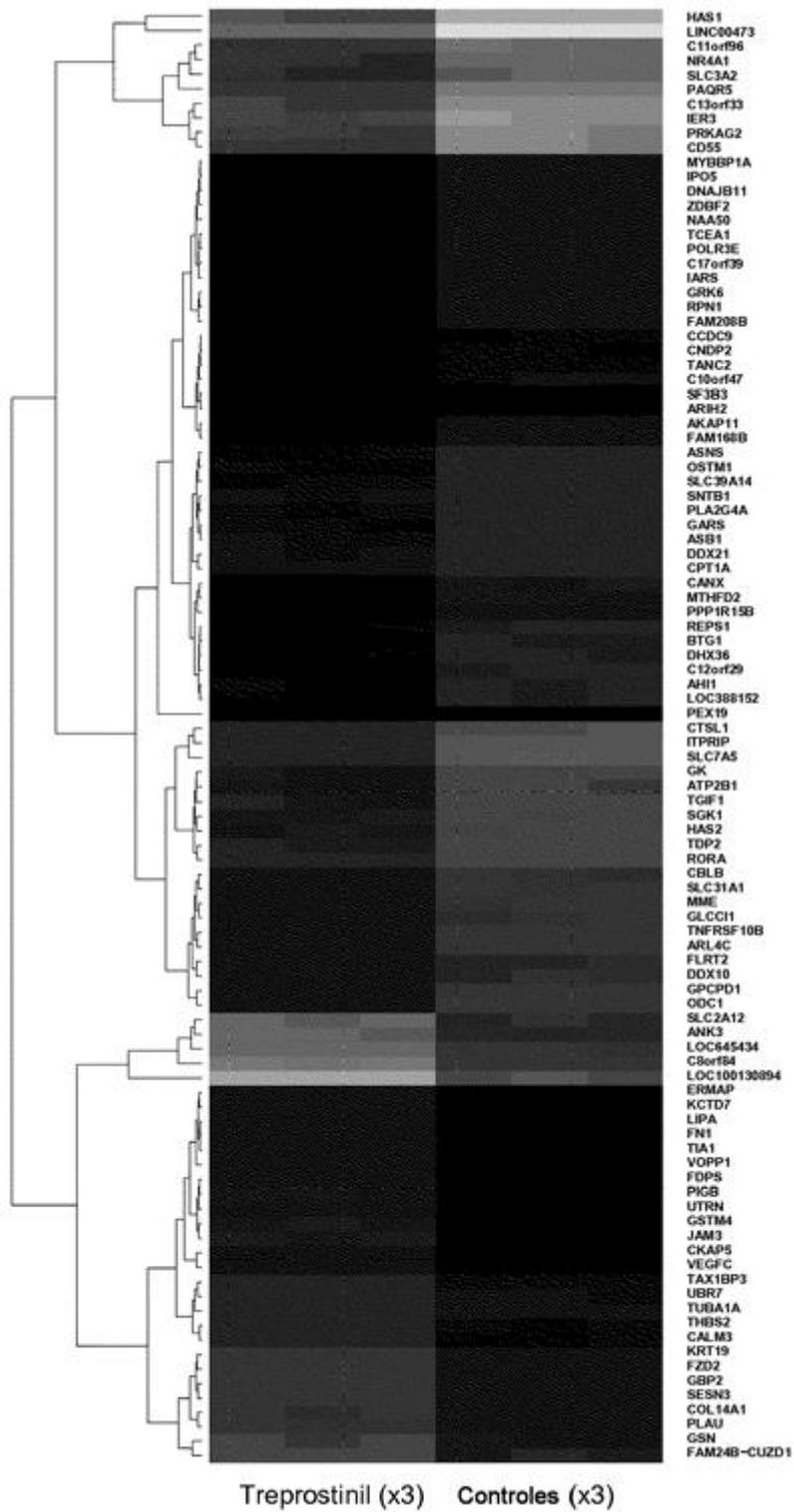
**FIG. 7A**

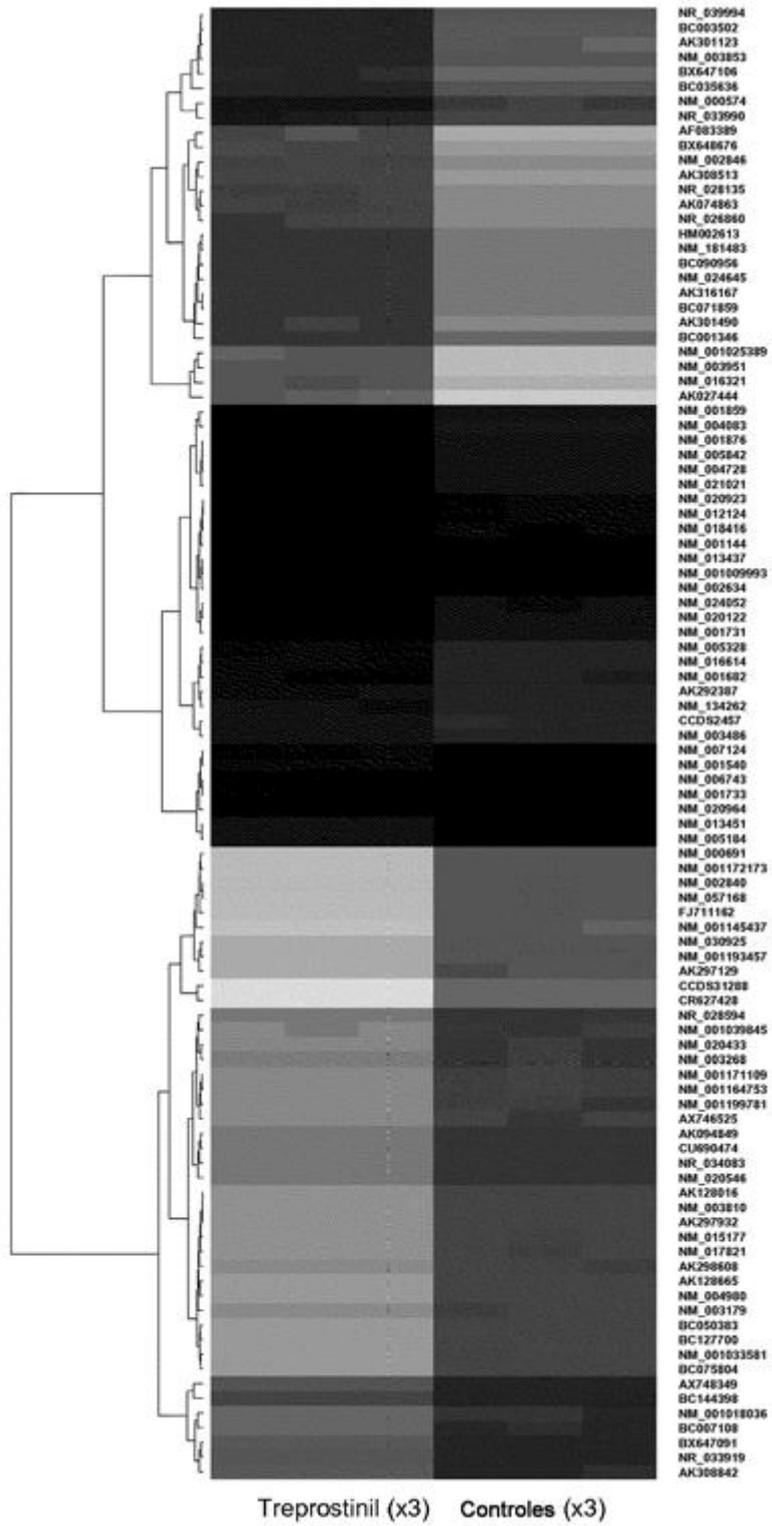


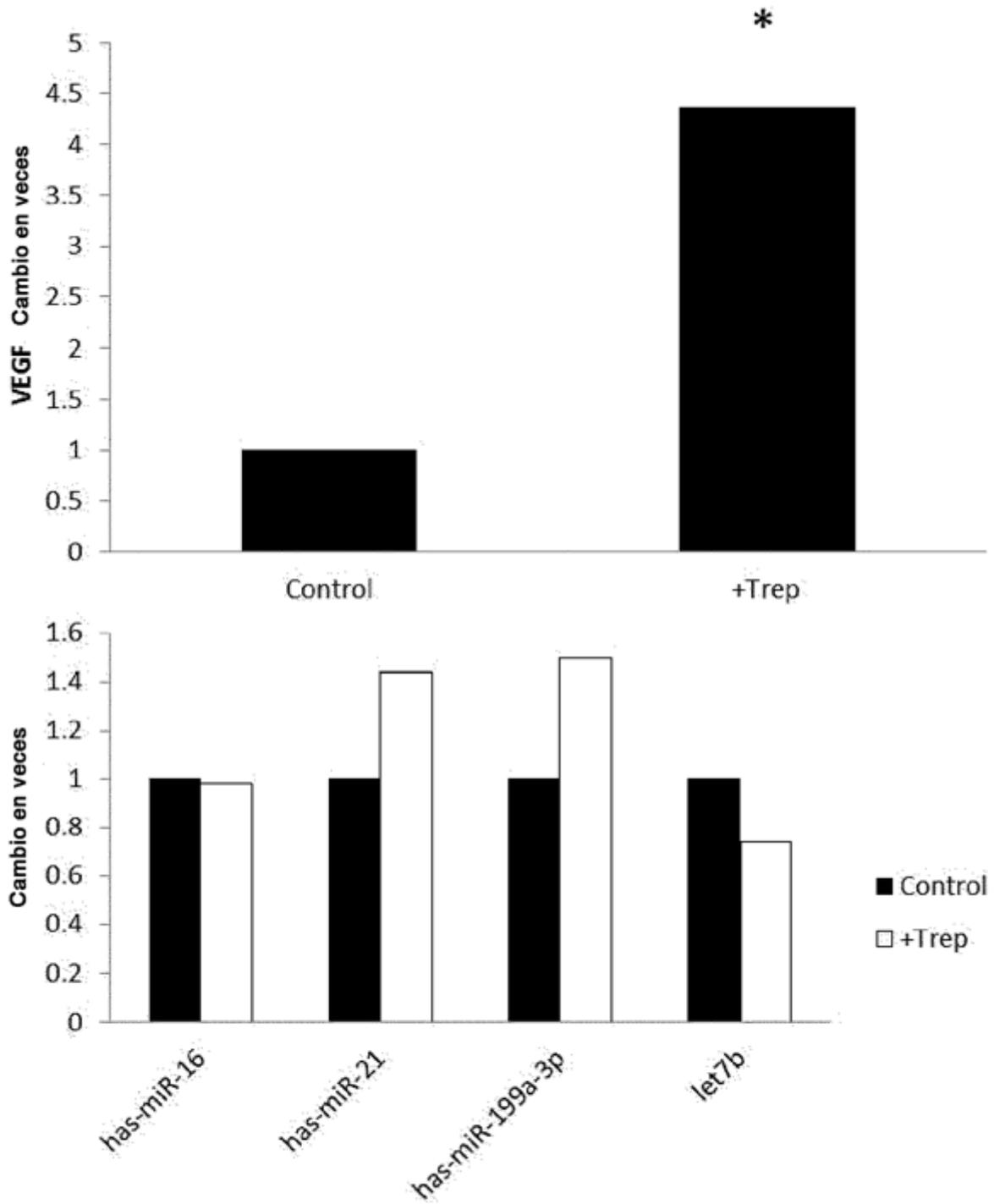
**FIG. 7B**



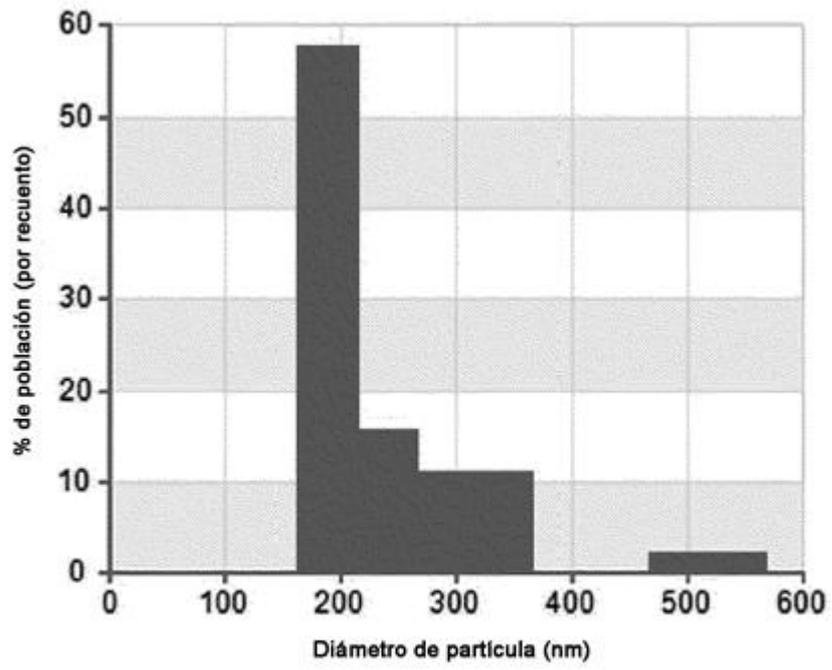
**FIG. 8**



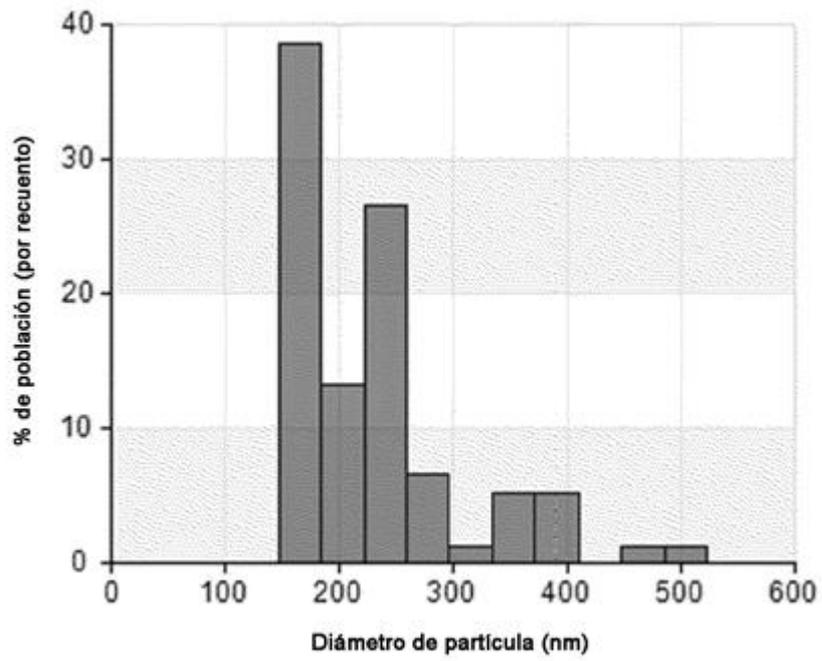




**FIG. 10**



**FIG. 11A**



**FIG. 11B**