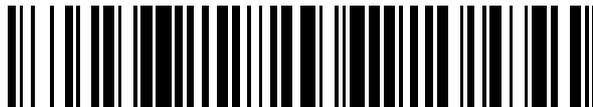


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 988**

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: **30.07.2013 PCT/US2013/052700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14022376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13824807 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2879684**

54 Título: **Tratamiento de hipertensión arterial pulmonar con células progenitoras endoteliales tratadas con prostaciclina**

30 Prioridad:

01.08.2012 US 201261678208 P

09.01.2013 US 201361750458 P

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

24.05.2019

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 2 713 988 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de hipertensión arterial pulmonar con células progenitoras endoteliales tratadas con prostaciclina

5 **Antecedentes de la invención**

La presente solicitud se refiere al uso de células progenitoras endoteliales (EPC) en el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otros tipos de hipertensión pulmonar.

10 La hipertensión arterial pulmonar es un trastorno pulmonar progresivo que, si no se trata, conduce a la muerte en promedio en el plazo de 2,8 años después de diagnosticarse. Una constricción creciente de la circulación pulmonar conduce a una mayor sobrecarga de las cavidades derechas, que puede convertirse en insuficiencia cardíaca derecha. Por definición, la presión arterial pulmonar principal media (mPAP) en un caso de hipertensión pulmonar crónica es >25 mmHg en reposo o >30 mmHg durante el ejercicio (valor normal <20 mmHg). La fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar se caracteriza por vasoconstricción y remodelación de los vasos pulmonares. En la PAH crónica hay neomuscularización de vasos pulmonares inicialmente sin muscularizar, y aumenta la circunferencia de los músculos vasculares de los vasos ya muscularizados. Esta obliteración creciente de la circulación pulmonar da como resultado una sobrecarga progresiva en las cavidades derechas, que conduce a un gasto cardíaco reducido de las cavidades derechas y en última instancia termina en insuficiencia cardíaca derecha (M. Humbert *et al.*, J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 43, 13S-24S). PAH es un trastorno extremadamente raro, 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. Claramente hay más mujeres afectadas 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 receptores de endotelina, inhibidores de fosfodiesterasas) pueden mejorar la calidad de vida, la tolerancia al ejercicio y el pronóstico de los pacientes. Los principios de estas terapias son principalmente hemodinámicos, influyendo en el tono de los vasos pero no teniendo influencia directa sobre los procesos de remodelación patogénica. Además, la posibilidad de usar estos medicamentos está restringida por los efectos secundarios a veces graves y/o tipos de administración complicados. El periodo a lo largo del que puede mejorarse o estabilizarse la situación clínica de los pacientes mediante monoterapia específica es limitado. En última instancia, la terapia se intensifica y por tanto se aplica una terapia de combinación, donde deben administrarse simultáneamente una pluralidad de medicamentos. A pesar de todos los avances en la terapia de hipertensión arterial pulmonar hasta la fecha no hay perspectivas de cura de este trastorno grave.

35 Se han identificado células progenitoras endoteliales en médula ósea de adulto así como en sangre periférica y sangre de cordón umbilical humano, y se ha mostrado que mantienen su potencia para proliferar y para diferenciarse en células endoteliales maduras (Ashara *et al.*, Science 275:964 (1997); Murohara *et al.*, J. Clin. Invest. 105(11):1527-36(2000)). La vasculogénesis, el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos durante la embriogénesis, comienza con la formación de islotes sanguíneos que comprenden células progenitoras endoteliales (EPC) y células madre hematopoyéticas (Risau, Nature 386(6626):671-4 (1997); Risau, FASEB J. 9(10):926-33 (1995); Risau *et al.*, Development 102(3):471-8 (1988); Flamme *et al.*, Development 116(2):435-9 (1992); Hatzopoulos *et al.*, Development 125(8):1457-68 (1998); Doile *et al.*, Endothelium 13(6):403-10 (2006); Ribatti, Leuk Res. (4):439-44 (2007)).

45 Se ha mostrado que las EPC participan en la neovascularización posnatal (Takahashi *et al.*, Nat Med. 5(4):434-8 (1999); Isner y Asahara, J Clin Invest. 103(9):1231-6 (1999)). Además, se ha encontrado que las EPC participan en angiogénesis, reparación vascular y vasculoprotección (Doile *et al.*, Endothelium 13(6):403-10 (2006)).

50 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las EPC tratadas con prostaciclina son útiles en el tratamiento de PAH.

Sumario de la invención

55 La presente invención se expone en las reivindicaciones.

Un aspecto de la presente divulgación es un método para tratar hipertensión arterial pulmonar (PAH), que comprende: proporcionar células progenitoras endoteliales (EPC) aisladas; tratar las EPC con prostaciclina, en el que las EPC tratadas muestran un fenotipo hiperproliferativo con actividad angiogénica potenciada, y administrar una composición que comprende las EPC tratadas a un sujeto que padece PAH. En otro aspecto, la prostaciclina puede seleccionarse del grupo que consiste en epoprostenol sódico, treprostínilo, iloprost y agonista del receptor PGI₂. En otro aspecto, el sujeto es un ser humano. En otro aspecto, las EPC son autólogas, se aíslan de la sangre del sujeto que padece PAH, son células que forman colonias endoteliales, están modificadas genéticamente, se administran conjuntamente con al menos un factor de crecimiento, se administran conjuntamente con células madre mesenquimatosas o un medio de cultivo que ha estado en contacto con células madre mesenquimatosas y contiene uno o más componentes de los mismos, y/o se administran conjuntamente con prostaciclina. En otro aspecto, las

EPC se administran conjuntamente tanto con prostaciclina como con células madre mesenquimatosas o un medio de cultivo que ha estado en contacto con células madre mesenquimatosas y contiene uno o más componentes de los mismos. En otro aspecto, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4 y TGF-Beta. En otro aspecto la composición es una composición farmacéutica que comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable o al menos un agente terapéutico distinto de EPC. En otro aspecto, la composición favorece la reparación vascular pulmonar. En otro aspecto, el sujeto se trata previamente con prostaciclina antes del aislamiento de las EPC.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para favorecer el crecimiento de EPC, que comprende: proporcionar EPC aisladas; tratar las EPC con prostaciclina, en el que la prostaciclina potencia el crecimiento de las EPC. Las EPC pueden aislarse de un ser humano o de un cultivo celular o tisular. Además, las EPC tratadas pueden mostrar un fenotipo hiperproliferativo con propiedad angiogénica potenciada. En otro aspecto, la prostaciclina es treprostínilo.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para tratar PAH, que comprende: proporcionar EPC aisladas; y administrar conjuntamente prostaciclina y las EPC a un sujeto que padece PAH.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para tratar PAH, que comprende: proporcionar EPC aisladas; administrar las EPC a un sujeto que padece PAH; y administrar prostaciclina al sujeto.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para tratar PAH, que comprende: proporcionar EPC aisladas; administrar prostaciclina al sujeto que padece PAH; y administrar las EPC al sujeto.

Descripciones detalladas

A menos que se especifique de otro modo, “un” o “una” significa “un/a o más.”

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

A menos que se indique de otro modo, las técnicas inmunológicas, de cultivos celulares y de proteínas recombinantes utilizadas 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), *ADN Cloning: A Practical Approach*, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F. M. Ausubel *et al.* (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora), Ed Harlow y David Lane (editores) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J. E. Coligan *et al.* (editores) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora).

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula madre” se refiere a células autorrenovables que son capaces de dar lugar a hijas idénticas genotípica y fenotípicamente así como al menos otro tipo de célula final (por ejemplo, células diferenciadas de manera terminal). El término “células madre” incluye células totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales, así como células precursoras y/o progenitoras 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 puede formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocisto).

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula pluripotente” o “célula pluripotencial” se refiere a una

célula que tiene versatilidad de diferenciación completa, es decir, la capacidad para transformarse en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de un mamífero. Una célula pluripotente puede ser autorrenovable, y puede permanecer inactiva o latente dentro de un tejido.

- 5 Por “célula multipotencial” o “célula multipotente” quiere decirse una célula que es capaz de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. Tal como se usa en el presente documento, esta frase abarca células progenitoras y células madre embrionarias o adultas, y 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.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “célula progenitora” se refiere a una célula que está destinada a diferenciarse en un tipo específico de célula o a formar un tipo específico de tejido.

Células progenitoras endoteliales

- 15 La divulgación proporciona EPC. Una EPC es una célula no diferenciada que puede inducirse a que prolifere. Las EPC son capaces de automantenimiento, de modo que con cada división celular, al menos una célula hija será también una célula EPC. Las EPC son capaces de multiplicarse por 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o más veces.

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

- 25 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) actúa a través de receptores de 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. Mientras que VEGF se une a los tres receptores, la mayoría de las funciones biológicas están mediadas por VEGFR-2 y el papel de VEGFR-1 actualmente se desconoce. 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 transmiten
30 señales para procesos esenciales en la estimulación de crecimiento de vasos, vasorelajación, inducción de permeabilidad vascular, migración, proliferación y supervivencia de células endoteliales. Las células endoteliales expresan todos los diferentes VEGF-R. Durante la embriogénesis, se ha notificado que una única célula progenitora, el hemangioblasto puede dar lugar a los sistemas tanto hematopoyético como vascular.

- 35 Tie-2 es una tirosina cinasa receptora específica endotelial y un receptor para angiopoyetina 1. Es una proteína de membrana de tipo I que se expresa predominantemente en el endotelio de vasos sanguíneos que crecen activamente y puede representar el marcador de linaje de células endoteliales de mamíferos más temprano. Tie-2 está implicado probablemente 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.

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

- El antígeno CD45 es una tirosina fosfatasa, también conocido 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 B y células T y se expresa en al menos
50 5 isoformas, dependiendo del estado de activación de la célula.

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

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

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

- 65 Aislamiento y cultivo de EPC

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 que forman colonias endoteliales se describen en Yoder *et al.*, Blood 109:1801-1809 (2007), Ingram *et al.*, Blood 104:2752-2760 (2004) y Smardja *et al.*, Angiogenesis 14(1):17-27 (2011).

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

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 en EPC con respecto a la población total. La población purificada de EPC debe incluir al menos el 15 %, preferiblemente al menos el 20 %, más preferiblemente al menos el 25 %, lo más preferiblemente al menos el 35 % y de manera óptima al menos el 50 % de EPC.

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 mayores de EPC que los que existen en la naturaleza, tal como se describió anteriormente.

La población purificada de EPC puede aislarse poniendo en contacto una mezcla en bruto de células que contienen una población de células madre que expresan una característica de antígeno de las EPC con una molécula que se une específicamente a la porción extracelular del antígeno. Una técnica de este tipo se conoce como selección positiva. La unión de las EPC a la molécula permite que las EPC se distingan suficientemente 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.

La molécula usada para separar células progenitoras de las células contaminantes puede ser cualquier molécula que se une específicamente al antígeno que caracteriza 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.

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

Las células que están unidas a la molécula de unión pueden eliminarse de la suspensión celular separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular restante. Por ejemplo, las células no unidas pueden eluirse o eliminarse por lavado con tampón fisiológico después de dejar el tiempo suficiente para que las células madre se unan al soporte sólido.

Las células unidas pueden separarse de la fase sólida mediante cualquier método apropiado, dependiendo principalmente de la naturaleza de la fase sólida y la molécula de unión. Por ejemplo, las células unidas pueden eluirse de una placa de Petri de plástico mediante agitación vigorosa. Alternativamente, las células unidas pueden eluirse digiriendo o "mellando" enzimáticamente una secuencia de "espaciador" sensible a enzimas entre la fase sólida y un anticuerpo. Secuencias de espaciador adecuadas unidas a perlas de agarosa están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Pharmacia.

Entonces, la fracción de células enriquecida y eluida se puede lavar con un tampón por centrifugación y preservarse en un estado viable a bajas temperaturas para su uso posterior según la tecnología convencional. Las células también pueden usarse inmediatamente, por ejemplo por perfusión por vía intravenosa en un receptor.

Las que permanecen unidas al soporte sólido son las células que contienen un marcador que el anticuerpo usado reconoce. Por tanto, si se usa el anticuerpo anti-CD45, entonces la población resultante se enriquecerá enormemente en células CD45+. Si el anticuerpo usado es VEGFR, entonces la población resultante se enriquecerá

enormemente en células VEGFR+. Entonces, esa población puede enriquecerse en el otro marcador repitiendo las etapas usando una fase sólida que tienen unida a ella un anticuerpo frente al otro marcador.

5 Otra manera de clasificar células CD45+ VEGFR+ es mediante citometría de flujo, lo más preferiblemente mediante un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), tal como los fabricados por Becton-Dickinson con los nombres FACScan o FACSCalibur. Mediante esta técnica, las células que tienen un marcador CD45 en ellas se etiquetan con un colorante fluorescente particular mediante un anticuerpo anti-CD45 que se ha conjugado con un colorante de este tipo. De manera similar, el marcador VEGFR de las células se etiqueta con un colorante fluorescente diferente mediante un anticuerpo anti-VEGFR que se conjuga con el otro colorante. Cuando las células teñidas se colocan en el instrumento, una corriente de células se dirige a través de un haz de láser de argón que excita al fluorocromo para que emita luz. Esta luz emitida se detecta mediante un tubo fotomultiplicador (PMT) específico para la longitud de onda de emisión del fluorocromo por un conjunto de filtros ópticos. La señal detectada mediante 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 del contorno). Por tanto, las células fluorescentes que emiten a una longitud de onda expresan una molécula que es reactiva con el reactivo marcado con fluorocromo específico, mientras que las células no fluorescentes o las 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 es también semicuantitativo ya que muestra 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 equiparse para medir parámetros no fluorescentes, tales como volumen celular o luz dispersada por la célula cuando pasa a través del haz de láser. El volumen celular 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 en un ángulo recto (dispersión lateral; SSC). FSC es habitualmente un índice de tamaño, mientras que SSC es un índice de complejidad celular, aunque otros factores pueden influir en ambos parámetros.

Preferiblemente, el citómetro de flujo está equipado con más de un detector de emisión de PMT. Los PMT adicionales pueden detectar otras longitudes de onda de emisión, permitiendo la detección simultánea de más de un fluorocromo, cada uno en canales separados individuales. Los ordenadores permiten el análisis de cada canal o la correlación de cada parámetro 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 intenso).

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

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

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

50 En un aspecto, se extrae sangre directamente de la sangre periférica circulante de un donante. La sangre se filtra continuamente a través de una columna que contiene la molécula de unión unida a la fase sólida, tal como un anticuerpo frente a VEGFR-2, para capturar EPC. La sangre deficitaria en células progenitoras se devuelve inmediatamente al sistema circulatorio del donante mediante métodos conocidos en la técnica, tales como hemaféresis. La sangre se procesa de esta manera hasta que un número suficiente de células progenitoras se une a la columna. Entonces, las células madre se aíslan de la columna mediante métodos conocidos en la técnica. Este método permite recoger células progenitoras de sangre periférica poco comunes a partir de un volumen de sangre muy grande, ahorrando al donante los gastos y el dolor de recoger médula ósea y los riesgos asociados de anestesia, analgesia, transfusión de sangre e infección.

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

65 Se siembran suspensiones celulares en cualquier receptáculo capaz de sustentar 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 cm². Las células cultivadas en suspensión se resuspenden a de aproximadamente 5x10⁴ a 2x10⁵ células/ml (por ejemplo, 1x10⁵ células/ml). Las células sembradas en placa sobre un sustrato fijado se siembran en placa a aproximadamente 2-3x10³ células/cm². Opcionalmente, las placas de cultivo están recubiertas 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 contienen complementos que se requieren para el metabolismo celular tal como glutamina y otros aminoácidos, vitaminas, minerales y proteínas tales como transferrina y similares. El medio de cultivo también puede contener antibióticos para prevenir contaminación con levaduras, bacterias y hongos tales como penicilina, estreptomycin, gentamicina y similares. El medio de cultivo puede contener suero derivado de bovinos, equinos, pollos y similares.

Las condiciones de cultivo deben estar cercanas a las condiciones fisiológicas. El pH del medio de cultivo debe estar cercano 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 complementa con al menos un factor de crecimiento que induce proliferación ("mitogénico"). Un "factor de crecimiento" es una proteína, péptido u otra molécula que tiene un efecto de crecimiento, de inducción de proliferación, de inducción de diferenciación o trófico sobre EPC. "Factores de crecimiento que inducen proliferación" son factores tróficos que permiten proliferar a las EPC, incluyendo cualquier molécula que se une a un receptor en la superficie de la célula para ejercer un efecto trófico, o de inducción de crecimiento, en la célula. Los factores de crecimiento que inducen proliferación incluyen EGF, anfirregulina, factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), VEGF y combinaciones de los mismos. Los factores de crecimiento se añaden habitualmente 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 suficientes habitualmente. Pueden realizarse fácilmente ensayos de titulación simple para determinar la concentración óptima de un factor de crecimiento particular.

Los efectos biológicos de factores tróficos y de crecimiento están mediados generalmente por 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. Pueden analizarse las EPC para determinar la presencia receptores de factores de crecimiento en todas las fases de diferenciación. En muchos casos, la identificación de un receptor particular proporciona orientación para la estrategia a usar en diferenciación adicional de las células a lo largo de rutas de desarrollo específicas con la adición de factores tróficos y de crecimiento exógenos.

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

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

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

Tratamiento de EPC con prostaciclina

Según un aspecto de la divulgación, se usa prostaciclina para tratar EPC aisladas. El término "prostaciclina" usado en el presente documento comprende explícitamente cualquier prostaglandina I₂ (PGI₂), cualquier análogo de prostaciclina y cualquier agonista del receptor PGI₂. Los ejemplos comprenden epoprostenol sódico (por ejemplo Flolan®), treprostinilo (por ejemplo TYVASO®, Remodulin®), iloprost (por ejemplo Ventavis®), y agonista del receptor PGI₂ (por ejemplo Selexipag).

Las EPC tratadas con prostaciclina muestran un fenotipo hiperproliferativo con propiedades angiogénicas potenciadas, que son ventajosas en el tratamiento de PAH en comparación con EPC no tratadas.

5 Pueden tratarse EPC con prostaciclina de diversas maneras. Por ejemplo, puede usarse prostaciclina para tratar EPC *ex vivo* durante la expansión de EPC; la prostaciclina puede administrarse conjuntamente con EPC al receptor; la prostaciclina también puede usarse para tratar EPC después de un trasplante. Según un aspecto de la presente divulgación, se preparan EPC a partir de la propia sangre o médula ósea del receptor. En ese caso, la prostaciclina también puede usarse para tratar EPC antes de que se aislen de los receptores.

10 Administración de EPC

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

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

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

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

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

50 Las EPC pueden encapsularse y usarse para administrar factores al huésped, según tecnologías de encapsulación conocidas, incluyendo microencapsulación (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350) y macroencapsulación (véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses n.ºs 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente internacional PCT WO 92/19195 y WO 95/05452). 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.

60 Las EPC preparadas a partir de tejido que es alogénico respecto al del receptor pueden someterse a prueba para su uso mediante los métodos bien conocidos de histotipado, para coincidir estrechamente con el tipo de histocompatibilidad del receptor.

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

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

5 Según un aspecto de la presente divulgación, las EPC pueden administrarse conjuntamente al receptor con al menos un factor de crecimiento, tal como FGF, VEGF-A, VEGFB, BMP-4, TGF-beta, etc. Las EPC también pueden administrarse conjuntamente al receptor con células madre mesenquimatosas o un medio de cultivo de las mismas, y/o una prostaciclina (por ejemplo, treprostínilo).

10 Células madre mesenquimatosas (MSC)

Las células madre mesenquimatosas (MSC) son células que se encuentran en médula ósea, sangre, células de pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en diferentes líneas germinales tales como mesodermo, endodermo y ectodermo. Por tanto, las MSC son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células incluyendo, pero sin limitarse a, tejidos adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y conjuntivo fibroso. La ruta de diferenciación y destino de linaje específica a 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 del microentorno local establecidas por tejidos huésped. Por tanto, las MSC son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para dar células hijas que o bien son células madre o bien son células precursoras que en su momento se diferenciarán de manera irreversible para dar una célula fenotípica. Los ejemplos de MSC incluyen células precursoras mesenquimatosas (MPC).

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

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

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

40 En algunos aspectos, antes de administrar conjuntamente una MSC o un medio de cultivo condicionado con MSC con EPC y/o prostaciclina a un paciente, la MSC o el medio de cultivo condicionado con MSC puede tratarse previamente con prostaciclina opcionalmente. Por consiguiente, también se proporciona, en un aspecto, un método para preparar una célula madre mesenquimatosas (MSC) o medio de cultivo condicionado con MSC para administración *in vivo*, que comprende poner en contacto la MSC o el medio de cultivo condicionado con MSC con una prostaciclina. Aún otro aspecto proporciona una MSC o medio de cultivo condicionado con MSC tratados obtenibles mediante un método de este tipo.

50 El pretratamiento 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. Opcionalmente, sin embargo, 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 las plaquetas) y/o hipoxia.

55 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 MSC; también puede usarse prostaciclina para tratar MSC después de la administración. Según un aspecto de la presente divulgación, pueden prepararse MSC a partir de la propia sangre o médula ósea del receptor. En ese caso, también puede usarse prostaciclina para tratar MSC antes de aislarlas de los receptores.

60 Composición farmacéutica

Normalmente, las células se administran en una composición farmacéutica que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación 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 una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material encapsulante de disolvente.

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

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

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

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

40 Los portadores poliméricos adecuados incluyen mallas o esponjas porosas formadas por polímeros naturales o sintéticos, 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 polímeros tanto biodegradables como no biodegradables. Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros de hidroxiácidos tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico)- ácido poliglicólico (PLGA), poliortoésteres, polianhídridos, polifosfacenos, y combinaciones de los mismos. Los polímeros no biodegradables incluyen poliacrílatos, polimetacrílatos, etileno-acetato de vinilo y alcoholes polivinílicos.

45 Se usan polímeros que pueden formar hidrogeles reticulados iónica o covalentemente que son maleables para encapsular células. Un hidrogel es una sustancia formada cuando un polímero orgánico (natural o sintético) se reticula mediante enlaces de hidrógeno, covalentes o iónicos para crear una estructura reticular abierta tridimensional que atrapa moléculas de agua para formar un gel. Los ejemplos de materiales que pueden usarse para formar un hidrogel incluyen polisacáridos tales como alginato, polifosfacenos y poliacrílatos, que están reticulados iónicamente, o copolímeros de bloque tales como Pluronic.TM. o Tetronic.TM., copolímeros de bloque de óxido de polietileno-polipropilenglicol que se reticulan mediante temperatura o pH, respectivamente. Otros materiales incluyen proteínas tales como fibrina, polímeros tales como polivinilpirrolidona, ácido hialurónico y colágeno.

50 En general, estos polímeros son solubles al menos parcialmente en disoluciones acuosas, tales como agua, soluciones salinas tamponadas o disoluciones acuosas de alcoholes, que tienen grupos secundarios cargados, o una sal iónica monovalente de los mismos. Ejemplos de polímeros con grupos secundarios ácidos que pueden hacerse reaccionar con cationes son poli(fosfacenos), ácidos poliacrílicos, ácidos polimetacrílicos, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, acetato de polivinilo y polímeros sulfonados, tales como poliestireno sulfonado. También pueden usarse copolímeros que tienen grupos secundarios ácidos formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y monómeros o polímeros de vinil éter. Ejemplos de grupos ácidos son grupos ácido carboxílico, grupos ácido sulfónico, grupos alcohol halogenado (preferiblemente fluorado), grupos OH fenólicos y grupos OH ácidos. Ejemplos de polímeros con grupos secundarios básicos que pueden hacerse reaccionar con aniones son poli(vinilaminas), poli(vinilpiridina), poli(vinilimidazol) y algunos polifosfacenos sustituidos con imino. La sal cuaternaria o de amonio de los polímeros también puede formarse a partir de los nitrógenos de estructura principal o

grupos imino colgantes. Ejemplos de grupos secundarios básicos son grupos imino y amino.

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 a tratar la inflamación o el dolor, o un agente antiinfeccioso para prevenir la infección del sitio tratado con la composición. Más específicamente, los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos útiles incluyen las siguientes categorías terapéuticas: analgésicos, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos, agonistas de opiáceos y salicilatos; agentes antiinfecciosos, tales como antihelmínticos, antianaerobios, antibióticos, antibióticos aminoglucósidos, antibióticos antifúngicos, antibióticos cefalosporinas, antibióticos macrólidos, diversos antibióticos beta-lactámicos, antibióticos penicilínicos, antibióticos quinolonas, antibióticos sulfonamidas, antibióticos tetraciclinas, antimicobacterianos, antimicobacterianos antituberculosis, antiprotozoarios, antiprotozoarios antipalúdicos, agentes antivirales, agentes antirretrovirales, escabicidas, agentes antiinflamatorios, agentes antiinflamatorios corticosteroides, anestésicos locales/antipruriginosos, antiinfecciosos tópicos, antiinfecciosos tópicos antifúngicos, antiinfecciosos tópicos antivirales; agentes renales y electrolíticos, tales como agentes acidificantes, agentes alcalinizantes, diuréticos, diuréticos inhibidores de anhidrasa carbónica, diuréticos del asa, diuréticos osmóticos, diuréticos ahorradores de potasio, diuréticos tiazídicos, reponedores de electrolitos y agentes uricosúricos; enzimas, tales como enzimas pancreáticas y enzimas trombolíticas; agentes gastrointestinales, tales como antidiarreicos, agentes antiinflamatorios gastrointestinales, agentes antiulcerosos antiácidos, agentes antiulcerosos inhibidores de la bomba de ácidos gástricos, agentes antiulcerosos de la mucosa gástrica, agentes antiulcerosos bloqueantes de H₂, agentes colestílicos, 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 barbitúricos, anestésicos intravenosos de benzodiazepinas y anestésicos intravenosos agonistas de opiáceos; hormonas y modificadores de hormonas, tales como abortivos, agentes suprarrenales, agentes suprarrenales de corticosteroides, andrógenos, antiandrógenos, agentes inmunobiológicos, tales como inmunoglobulinas, inmunosupresores, toxoides y vacunas; anestésicos locales, tales como anestésicos locales tipo amida y anestésicos locales tipo éster; agentes musculoesqueléticos, tales como agentes antiinflamatorios antigotosos, agentes antiinflamatorios de corticosteroides, agentes antiinflamatorios de compuestos de oro, agentes antiinflamatorios inmunosupresores, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), agentes antiinflamatorios de salicilatos, minerales; y vitaminas, tales como vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K.

Composiciones útiles para los métodos de la presente divulgación pueden incluir componentes de cultivos celulares, por ejemplo, medios de cultivo que incluyen aminoácidos, metales, factores de coenzimas, así como pequeñas poblaciones de otras células, por ejemplo, algunas de las que pueden surgir mediante diferenciación posterior de las células madre.

Pueden prepararse composiciones útiles para los métodos de la presente divulgación, por ejemplo, sedimentando las células objeto del medio de cultivo y resuspendiéndolas en la disolución o el material deseado. Las células pueden sedimentar y/o cambiarse fuera del medio de cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración, ultrafiltración, etc.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de células y portador(es) opcional(es) en las composiciones y que van a administrarse en métodos de la divulgación. En un aspecto, cualquier aditivo (además de la(s) célula(s) activa(s)) está presente en una cantidad del 0,001 al 50 % (en peso) de disolución en solución salina tamponada con fosfato, y el principio activo está presente del orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente el 0,0001 al aproximadamente el 5 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 1 % en peso, todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,0001 a aproximadamente el 0,05 % en peso o de aproximadamente el 0,001 a aproximadamente el 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 % en peso, y todavía más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5 % en peso. Por supuesto, para cualquier composición que va a administrarse a un animal o humano, y para cualquier método particular de administración, 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 las mismas y momento de administración de la(s) composición/composiciones, que provoca(n) una respuesta adecuada. Tales determinaciones no requieren experimentación excesiva a partir del conocimiento del experto en la técnica, esta divulgación y los documentos citados en el presente documento. Además el momento de las administraciones secuenciales puede determinarse sin experimentación excesiva.

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

Modificación genética de EPC

- En un aspecto, las células usadas en los métodos de la divulgación están modificadas genéticamente. Preferiblemente, las células se modifican genéticamente para producir una proteína heteróloga. Normalmente, las células se modificarán genéticamente de modo que la proteína heteróloga se secreta de las células. Sin embargo, en un aspecto las células pueden modificarse para expresar un polinucleótido que no codifica para proteína funcional tal como ARNbc (normalmente para silenciamiento de ARN), un oligonucleótido antisentido o un ácido nucleico catalítico (tal como una ribozima o ADNzima). En un aspecto, la EPC se modifica genéticamente para expresar o sobreexpresar una proteína seleccionada del grupo que consiste en óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), hemo oxigenasa (HMOX1) y prostaciclina sintasa (PTGIS).
- 5
- 10 Las células modificadas genéticamente pueden cultivarse en presencia de al menos una citocina en una cantidad suficiente para soportar el crecimiento de las células modificadas. Las células modificadas genéticamente así obtenidas pueden usarse inmediatamente (por ejemplo, en trasplante), cultivarse y expandirse *in vitro*, o almacenarse para usos posteriores. Las células modificadas pueden almacenarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, congeladas en nitrógeno líquido.
- 15
- 20 La modificación genética tal como se usa en el presente documento abarca cualquier método de modificación genética que implica la introducción de un polinucleótido foráneo o exógeno 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 huésped de un huésped o donante a un receptor, o bien *in vitro* o bien *in vivo*), transfección (transformación de células con genomas de ADN viral aislados), transferencia mediada por liposomas, electroporación, transfección o coprecipitación con fosfato de calcio y otros. Los métodos de transducción incluyen cultivo conjunto directo de células con células productoras o cultivar con sobrenadante viral solo con o sin factores de crecimiento y policaciones apropiados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende células progenitoras endoteliales (EPC) tratadas para su uso en un método para tratar hipertensión arterial pulmonar (PAH), en la que las EPC muestran un fenotipo hiperproliferativo con actividad angiogénica potenciada y se obtienen tratando un cultivo de EPC *ex vivo* durante la expansión de EPC con una prostaciclina, comprendiendo el método:
- 10 administrar una composición que comprende las EPC tratadas junto con una célula madre mesenquimatosa (MSC) o un medio de cultivo condicionado con MSC a un sujeto que padece PAH, en la que la MSC o el medio de cultivo condicionado con MSC se obtiene tratando la MSC *ex vivo* con una prostaciclina.
- 15 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la prostaciclina se selecciona del grupo que consiste en epoprostenol sódico, treprostínilo e iloprost.
- 20 3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un ser humano.
4. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que las EPC son autólogas, o en la que las EPC se aíslan de la sangre del sujeto que padece PAH, preferiblemente el sujeto se trata previamente con prostaciclina antes del aislamiento de las EPC, o en la que las EPC son células que forman colonias endoteliales, o en la que las EPC están modificadas genéticamente.
- 25 5. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición es una composición farmacéutica que comprende además al menos un portador farmacéuticamente aceptable o al menos un agente terapéutico distinto de EPC.
- 30 6. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la administración de la composición favorece la reparación vascular pulmonar.
7. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición se administra conjuntamente con al menos un factor de crecimiento, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en FGF, VEGF-A, VEGF-B, BMP-4 y TGF-Beta, o en la que la composición se administra conjuntamente con una prostaciclina.
- 35 8. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el método comprende:
- (i) administrar conjuntamente prostaciclina y las EPC a un sujeto que padece PAH;
- (ii) administrar las EPC a un sujeto que padece PAH; y administrar prostaciclina al sujeto; o
- 40 (iii) administrar prostaciclina al sujeto que padece PAH; y administrar las EPC al sujeto.
- 45 9. Composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un cultivo de EPC, una MSC o un medio de cultivo condicionado con MSC, y un portador farmacéuticamente aceptable en la que las EPC se obtienen tratando un cultivo de EPC *ex vivo* durante la expansión de las EPC con una prostaciclina que provoca que las EPC tratadas muestren un fenotipo hiperproliferativo con actividad angiogénica potenciada, en la que la MSC y el medio de cultivo condicionado con MSC se obtiene tratando la MSC *ex vivo* con una prostaciclina.