

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 182**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/28** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**C12N 5/0775** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2013 PCT/JP2013/071981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14027684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2013 E 13879518 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2886123**

54 Título: **Células madre pluripotentes que inducen reparación y regeneración después de un infarto de miocardio**

30 Prioridad:

**17.08.2012 JP 2012181029**

**19.02.2013 WO PCT/JP2013/054049**

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

**16.06.2020**

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC. (33.0%)**

**1-1 Marunouchi 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8251, JP;**

**GIFU UNIVERSITY (33.0%) y  
TOHOKU UNIVERSITY (33.0%)**

72 Inventor/es:

**YOSHIDA, MASANORI;  
MINATOGUCHI, SHINYA y  
DEZAWA, MARI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 767 182 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**

Células madre pluripotentes que inducen reparación y regeneración después de un infarto de miocardio

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una preparación celular utilizada en medicina regenerativa. Más particularmente, la presente invención se refiere a una preparación celular que contiene células madre pluripotentes que son efectivas para reparar y regenerar tejido cardíaco que ha sido dañado por infarto de miocardio.

10

Antecedentes de la invención

El infarto de miocardio, que es causado por la necrosis miocárdica provocada por la oclusión de la arteria coronaria, es un problema importante que debe resolverse en la medicina clínica, ya que causa la muerte cardíaca súbita y la muerte cardíaca crónica. En el caso del infarto agudo de miocardio en particular, la tasa de mortalidad es alta, del 35% al 50%, y del 60% al 70% de los casos fatales mueren dentro de 1 a 2 horas después del ataque. Además, incluso si los pacientes sobreviven a la etapa aguda, en los casos en que la lesión necrótica del miocardio es grande después del ataque inicial, existe un alto riesgo de sucumbir a un infarto de miocardio recurrente o insuficiencia cardíaca acompañante. Por lo tanto, en el tratamiento del infarto de miocardio, es necesario implementar rápidamente el tratamiento poco después de que se haya producido el ataque, y es importante minimizar al máximo el tamaño del miocardio necrotizado, es decir, el tamaño del infarto.

Por ejemplo, en infartos de miocardio tales como infarto de miocardio masivo severo, dado que la remodelación ventricular izquierda continúa conduciendo a insuficiencia cardíaca, se sabe que el pronóstico es malo. En general, se realiza típicamente la terapia de recanalización coronaria en forma de terapia trombolítica o revascularización para el infarto de miocardio. Sin embargo, hay muchos casos en los que los efectos de la recanalización pueden no obtenerse o, por el contrario, las células del miocardio pueden dañarse por la lesión por reperfusión y similares, y pueden no obtenerse efectos terapéuticos satisfactorios solo con la terapia de recanalización. En consecuencia, aunque se han realizado estudios sobre agentes farmacéuticos que se espera que demuestren una acción protectora del miocardio para su uso como terapia adyuvante para la terapia de recanalización, todavía no se ha encontrado un agente farmacéutico satisfactorio. Además, en el caso de infarto de miocardio masivo grave, el pronóstico mejoraría si fuera posible regenerar el tejido miocárdico necrótico y mejorar la remodelación ventricular izquierda. Sin embargo, actualmente no existe un tratamiento médico que sea efectivo contra los trastornos antes mencionados.

Como se describió anteriormente, en el tratamiento del infarto de miocardio, aunque se requiere proporcionar tratamiento rápidamente poco después de un ataque, ya que no existe un método de tratamiento definitivo para minimizar el tamaño del infarto, los esfuerzos se están centrando en la regeneración del tejido miocárdico que ha necrotizado. En particular, la atención se ha centrado recientemente en células biológicas capaces de contribuir a la regeneración de tejidos. Aunque los ejemplos conocidos de células obtenidas de adultos que tienen la capacidad de diferenciarse incluyen las células madre mesenquimales (MSC) que tienen la capacidad de diferenciarse en hueso, cartílago, adipocitos, neuronas o músculo esquelético y similares (documentos no patente 1 y 2), consistiendo estas en grupos de células que contienen diversas células, no se comprende el estado real de su capacidad para diferenciarse, y ha habido fluctuaciones considerables en los efectos terapéuticos. Además, aunque se ha informado que las células iPS (Documento de patente 1) son células madre pluripotentes derivadas de adultos, además del establecimiento de células iPS que requieren un procedimiento extremadamente complejo que implica la introducción de genes específicos en células mesenquimales en forma de fracción de fibroblastos cutáneos y la introducción de compuestos específicos en las células somáticas, dado que las células iPS tienen un alto potencial tumorigénico, se deben superar obstáculos extremadamente altos para su aplicación clínica.

Se ha determinado a partir de la investigación realizada por M. Dezawa, uno de los inventores de la presente invención, que las células resistentes al estrés que diferencian multilineaje (células Muse) que expresan el antígeno de superficie en forma de antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA)-3, que están presentes en las fracciones de células mesenquimales y pueden obtenerse sin pasar por un procedimiento de inducción, son responsables de la pluripotencia que poseen las fracciones de células mesenquimales y tienen el potencial de aplicación al tratamiento de la enfermedad dirigido a la regeneración de tejidos. Además, también se determinó que las células Muse podían concentrarse estimulando las fracciones celulares mesenquimales con diversos tipos de estrés (Documento de Patente 2, Documento de Patente 3). Sin embargo, todavía no se han dado ejemplos del uso de las células Muse para la prevención y/o el tratamiento del infarto de miocardio, como el infarto de miocardio masivo grave o la insuficiencia cardíaca que lo acompaña, y la obtención de los efectos terapéuticos anticipados aún no se ha determinado claramente.

[Documentos de la técnica anterior]

[Documentos de Patente]

[Documento de Patente 1] Patente Japonesa No. 4183742

[Documento de Patente 2] Publicación Internacional No. WO 2011/007900

[Documentos no Patente]

5 [Documento de Patente 3] La Publicación Internacional WO 2002/057430 describe una composición que comprende una población de células madre adultas pluripotentes aisladas que tienen, por ejemplo, altos niveles de actividad de telomerasa.

10 [Documento de Patente 4] La Publicación Internacional WO 2009/046058 describe el método de tratamiento de enfermedades cardíacas y trastornos cardíacos que comprende administrar células madre mesenquimales (MSC) al tejido cardíaco de un paciente.

15 [Documento de Patente 5] El documento WO2011/007900 describe células Muse y la preparación de las mismas. Esta referencia no enseña ni confirma que las células Muse sean útiles para tratar el infarto de miocardio.

[Documento no Patente 1] Dezawa, M., et al., J. Clin. Invest., Vol. 113, p. 1701-1710 (2004)

20 [Documento no Patente 2] Dezawa, M., et al., Science, vol. 309, p. 314-317 (2005)

[Documento no Patente 3] Wakao, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, vol. 108, p. 9875-9880 (2011)

25 [Documento no Patente 4] Kuroda, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 107, p. 8639-8643 (2010) describe células Muse y la preparación de las mismas. Esta referencia no enseña ni confirma que las células Muse sean útiles para tratar el infarto de miocardio.

Divulgación de la invención

[Problemas para resolver por la invención]

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva aplicación terapéutica usando células madre pluripotentes (células Muse) en medicina regenerativa. Más específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar una preparación celular para el tratamiento del infarto de miocardio (y particularmente, infarto de miocardio masivo grave), así como la prevención y/o tratamiento de su insuficiencia cardíaca acompañante, que  
35 contiene células Muse.

[Medios para resolver los problemas]

40 Los inventores de la presente invención encontraron que, al administrar células Muse por inyección intravenosa para infarto de miocardio inducido por isquemia de la arteria coronaria (30 minutos) usando conejos blancos japoneses, las células Muse se acumulan localmente en tejido miocárdico dañado, se diferencian en células de miocardio dentro del tejido miocárdico dañado, y generan una reducción en el tamaño del infarto y mejora o restaura la función cardíaca, conduciendo así a completar la presente invención.

45 A saber, la presente invención es como se describe a continuación.

[1] Una preparación celular para usar en el tratamiento del infarto de miocardio, que contiene una fracción celular en donde han sido concentradas células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 aisladas de tejido biológico mesenquimal o células mesenquimales cultivadas,

50 en donde la preparación celular se administra en una vena o arteria coronaria de un sujeto a lo largo de 1 mes después de la isquemia de una a diez veces en una cantidad terapéuticamente efectiva de  $1 \times 10^3$  células/individuo a  $1 \times 10^6$  células/individuo, o  $1.7 \times 10^5$  a  $2.5 \times 10^5$  células/kg por individuo y

55 en donde dichas células madre pluripotentes tienen una pluralidad de propiedades, comprendiendo dicha pluralidad de propiedades:

(i) SSEA-3-positivas;

60 (ii) CD105 positivas;

(iii) actividad baja o ausente de telomerasa;

(iv) capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales;

65 (v) ausencia de demostración de proliferación neoplásica; y

(vi) capacidad de autorrenovación.

5 [2] La preparación celular descrita en [1], en donde las células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 contienen una fracción celular concentrada como resultado de la estimulación por estrés externo.

[3] La preparación celular descrita en [1] o [2] más arriba para la prevención y/o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca después de un infarto de miocardio masivo grave en humanos.

10 [4] La preparación celular descrita en [1] a [3] más arriba, en donde las células madre pluripotentes son CD117-negativas, CD146-negativas, NG2-negativas, CD34-negativas, vWF-negativas y CD271-negativas.

15 [5] La preparación celular descrita en [1] a [4] más arriba, en donde las células madre pluripotentes son CD34-negativas, CD117-negativas, CD146-negativas, CD271-negativas, NG2-negativas, vWF-negativas, Sox10-negativo, Caracol-negativas, Babosa-negativas, Tyrp1-negativas y Dct-negativas.

[6] La preparación celular descrita en [1] a [5] más arriba, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de acumularse en el sitio del infarto de miocardio.

20 [7] La preparación celular descrita en [1] a [6] más arriba, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en células endoteliales vasculares.

[8] La preparación celular descrita en [1] a [7] más arriba, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en células miocárdicas.

25 [9] La preparación celular descrita en [1] a [8] más arriba, en donde el tamaño del infarto de miocardio se reduce en comparación con un control no administrado.

30 [10] La preparación celular descrita en [1] a [9] más arriba, en donde al menos un indicador de función cardíaca, seleccionado del grupo que consiste en el cambio en la presión ventricular izquierda con el tiempo, dimensión ventricular izquierda-diastólica final (LVDd), fracción de eyección (FE), el acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo (FS) y la dimensión sistólica final del ventrículo izquierdo (DVI) se restablecen al valor normal.

[Efectos de la invención]

35 La presente invención es capaz de reducir drásticamente el tamaño de un infarto de miocardio por medio de un mecanismo de regeneración de tejido cardíaco mediante el cual las células Muse se acumulan selectivamente en el tejido miocárdico dañado y se diferencian en el músculo cardíaco después de su administración en una vena o similar a un sujeto que sufre infarto de miocardio, y particularmente infarto de miocardio masivo grave.

40 Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1 representa secciones de tejido cardíaco que contienen un sitio infartado obtenido de un modelo de infarto de miocardio de conejo. Los sitios infartados se determinaron por tinción con cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC). Las regiones no manchadas rodeadas por líneas discontinuas indican los sitios infartados. El panel derecho es una sección de tejido obtenida 14 días después de la reperfusión que fue reperfundida 30 minutos después de la isquemia seguida de la administración intravenosa de células Muse 24 horas después de la reperfusión. El panel izquierdo es una sección de tejido en donde se administró solución salina fisiológica por vía intravenosa en lugar de células Muse. El trasplante de células Muse dio como resultado una disminución significativa en el tamaño del sitio infartado.

50 La Figura 2 es un gráfico de barras que representa el tamaño del infarto calculado como la relación (%) de regiones infartadas a regiones isquémicas después de la determinación de sitios infartados por tinción con TTC. La barra izquierda indica el valor promedio del tamaño del infarto para un grupo de control salino fisiológico (n=3), mientras que la barra derecha indica el valor promedio del tamaño del infarto en un grupo de trasplante de células Muse (n=4). El trasplante de células Muse dio como resultado una disminución significativa en el tamaño del infarto.

55 La Figura 3 muestra los resultados de un examen histológico de los efectos de reducción en el tamaño del infarto según lo determinado por la tinción tricrómica (MT) de Masson. En la tinción con MT, el tejido compuesto por células viables se tiñe de rojo, mientras que el tejido de las regiones infartadas que exhiben fibrosis de colágeno no se tiñe y parece pálido. Un grupo de trasplante de células Muse (n=4) demostró una región infartada más pequeña y una reducción considerable en el tamaño del infarto en comparación con un grupo control con solución salina fisiológica administrada (n=3). Además, aunque se observó una reducción del tamaño del infarto en el tejido trasplantado con una fracción de células madre mesenquimales (MSC), los efectos de reducción sobre el tamaño del infarto fueron menos potentes en comparación con el grupo de trasplante de células Muse.

65

- La Figura 4 representa la diferenciación de células Muse en células miocárdicas en tejido cardíaco. Los sitios infartados y los no infartados se distinguen con la línea discontinua que se muestra como una línea de límite en el panel izquierdo. Las células miocárdicas se tiñeron de rojo mediante tinción con rodamina-faloídina (panel central). Además, se puede ver que las células Muse introducidas preliminarmente con el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) antes del trasplante usando un lentivirus se localizan en sitios infartados (panel derecho). El resultado de superponer estas dos imágenes se muestra en el panel izquierdo. Como resultado, una gran cantidad de células donde los colores rojo y verde se superponen están presentes en los sitios infartados, lo que sugiere que las células Muse trasplantadas se diferencian en células miocárdicas.
- La Figura 5 muestra los resultados de examinar el estado diferenciado de las células Muse que se han integrado en sitios infartados. La presencia o ausencia de expresión del péptido natriurético auricular (ANP), del cual se sabe que se expresa en células juveniles de miocardio, se examinó mediante tinción fluorescente. El color verde indica la tinción con GFP (células Muse), el color rojo indica la tinción con ANP y el color azul indica la tinción con DAPI (que se usa para teñir los núcleos celulares). En el panel izquierdo, estos tres tipos de fluorescencia se observan dentro de una pluralidad de las mismas células, lo que sugiere que las células se incluyen entre las células Muse trasplantadas que se diferencian en células miocárdicas.
- La Figura 6 indica los resultados del examen de la función cardíaca después del trasplante de células Muse utilizando los cambios en la presión arterial a lo largo del tiempo como un indicador ( $\pm dp/dt$ , p: presión arterial, t: tiempo). El panel superior indica los resultados de medir la función sistólica ventricular ( $+dp/dt$ ), mientras que el panel inferior indica los resultados de medir la función diastólica ventricular ( $-dp/dt$ ). Estos resultados sugieren que la función cardíaca en un grupo de conejos trasplantados con células Muse mejoró significativamente en comparación con un grupo de control.
- La Figura 7 representa ecocardiogramas 2D de secciones transversales paraesternales de eje largo del ventrículo izquierdo. El panel izquierdo indica una imagen del ventrículo izquierdo de un conejo administrado con solución salina fisiológica (control), mientras que el panel derecho indica una imagen del ventrículo izquierdo de un conejo trasplantado con células Muse. Los indicadores de la función cardíaca que consiste en LVDd (dimensión diastólica final ventricular izquierda), fracción de eyección (EF) y acortamiento fraccional ventricular izquierdo (FS) se midieron con base en estas imágenes. Se demostró que cada uno de estos valores se restableció a la normalidad en el grupo de trasplante de células Muse.
- La Figura 8 es un gráfico que representa el tamaño del infarto calculado como la relación (%) de la región infartada al ventrículo izquierdo después de la determinación de los sitios infartados por la tinción tricrómica de Masson. Tamaño del infarto (círculos blancos) y sus valores promedio (puntos negros) de un grupo fisiológico de control de solución salina (n=10), un grupo de trasplante MSC (fracción de células madre mesenquimales) (n=10), un grupo de trasplante de células Muse (n=10), y un grupo de células no Muse (células MSC que no incluyen células Muse) (n=4) se trazan respectivamente en el eje horizontal que se mueve de izquierda a derecha. El trasplante de células Muse dio como resultado una reducción significativa en el tamaño del infarto de la misma manera que en la Figura 2).
- La Figura 9 muestra los resultados de un examen histológico de los efectos de reducción en el tamaño del infarto según lo determinado por la tinción tricrómica (MT) de Masson de la misma manera que la Figura 3. La Figura 9 representa fotografías de una muestra seleccionada al azar de cada grupo de trasplante correspondiente a los resultados mostrados en la Figura 8).
- La Figura 10 muestra los resultados de examinar el estado diferenciado de las células Muse que se han integrado en sitios infartados. La presencia o ausencia de expresión de troponina I, del cual se sabe que es un marcador de miocardio, se examinó mediante tinción fluorescente de la misma manera que la Figura 4. El color verde indica la tinción con GFP (células Muse), el color rojo indica la tinción con troponina I y el color azul indica la tinción con DAPI (que se usa para teñir los núcleos celulares). En el panel izquierdo, estos tres tipos de fluorescencia se observan dentro de una pluralidad de las mismas células, lo que sugiere que las células se incluyen entre las células Muse trasplantadas que se diferencian en células miocárdicas.
- La Figura 11 indica los resultados del examen de la función cardíaca después del trasplante de células Muse utilizando los cambios en la presión arterial a lo largo del tiempo como un indicador ( $\pm dp/dt$ , p: presión arterial, t: tiempo) de la misma manera que la Figura 6.  $+dp/dt$  indica función sistólica mientras que  $-dp/dt$  indica función diastólica. Estos resultados sugieren que la función cardíaca en un grupo de conejos trasplantados con células Muse mejoró significativamente en comparación con un grupo de control, un grupo de trasplante de MSC y un grupo de trasplante de células no Muse.
- La Figura 12 indica los resultados de la medición de los indicadores de la función cardíaca que consisten en LVDd (dimensión diastólica final ventricular izquierda), dimensión sistólica final ventricular izquierda (LVDs), fracción de eyección (EF) y acortamiento fraccional ventricular izquierdo (FS) en ecocardiogramas 2D. Se demostró que cada uno de estos valores se restableció a la normalidad en el grupo de trasplante de células Muse.
- La Figura 13 muestra los resultados de examinar el estado diferenciado de las células Muse que se han integrado en sitios infartados. Se examinó la presencia o ausencia de expresión de CD31, del cual se sabe que es un marcador de

células endoteliales vasculares. Dado que la densidad microvascular CD31 positiva fue alta en los sitios infartados de tejido trasplantado con células Muse en comparación con otros grupos de trasplante, se sugiere la posibilidad de que las células Muse de trasplante se diferencien en células endoteliales vasculares. La densidad microvascular como se observa en un campo de alta potencia (HPF) se representa en el eje vertical.

5

Modo para realizar la invención

La presente invención se refiere a una preparación celular para tratar el infarto de miocardio que contiene células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 (células Muse). Lo que sigue proporciona una explicación detallada de la presente invención.

10

### 1. Enfermedades aplicables

La presente invención se usa con el propósito de tratar el infarto de miocardio, y el infarto de miocardio masivo particularmente grave, junto con su insuficiencia cardíaca acompañante, usando una preparación celular que contiene células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 (células Muse). Aquí, "infarto de miocardio" se refiere a la necrosis miocárdica provocada por la oclusión de la arteria coronaria. Además, la "insuficiencia cardíaca" se refiere a un síndrome causado por la falla de la función cardíaca para hacer circular una cantidad adecuada de sangre, e incluye una disminución en el gasto cardíaco y un aumento acompañante de la presión venosa, así como varios síntomas clínicos que ocurren como resultado en esto. El infarto de miocardio es una causa de muerte cardíaca súbita y muerte cardíaca crónica. En el caso del infarto agudo de miocardio en particular, la tasa de mortalidad es alta, del 35% al 50%, y del 60% al 70% de los casos fatales mueren dentro de 1 a 2 horas después del ataque. Además, incluso si los pacientes sobreviven a la etapa aguda, en los casos en que la lesión necrótica del miocardio es grande después del ataque inicial, existe un alto riesgo de sucumbir al infarto de miocardio recurrente. Por lo tanto, en el tratamiento del infarto de miocardio, es necesario implementar rápidamente el tratamiento poco después de que se haya producido el ataque, y es importante minimizar al máximo el tamaño del miocardio necrotizado, es decir, el tamaño del infarto. Además, se utilizan varias clasificaciones para evaluar la gravedad del infarto de miocardio. Ejemplos de los mismos incluyen la clasificación de acuerdo con la cantidad de tiempo transcurrido, la clasificación morfológica (rango dentro del miocardio, el sitio y/o el tamaño de la necrosis, etc.), la forma de necrosis miocárdica, la remodelación ventricular posterior al infarto, la clasificación hemodinámica (en relación con tratamiento, prevención y similares) y clasificación según la gravedad clínica. Aquí, el infarto de miocardio que tiene un alto grado de severidad en el cual la necrosis de miocardio cubre un amplio rango en particular se denomina "infarto de miocardio masivo severo". Un ejemplo de esto es la oclusión completa de la porción distal de la arteria coronaria izquierda. Además, se sabe que el infarto de miocardio masivo se asocia con un mal pronóstico, ya que la remodelación ventricular izquierda del músculo cardíaco continúa y produce insuficiencia cardíaca. Aquí, la "remodelación del ventrículo izquierdo" después del infarto de miocardio se refiere a una serie de cambios, incluida la hipertrofia de las células del miocardio, el aumento del intersticio (matriz extracelular) y el agrandamiento de la luz cardíaca, que se producen como compensación a la disminución de la función cardíaca causada por el adelgazamiento del sitio infartado que ocurre después de un infarto de miocardio. Dado que el pronóstico a largo plazo después del infarto de miocardio se correlaciona con el grado de disfunción ventricular izquierda, la inhibición de la remodelación ventricular izquierda es esencial para mantener y preservar la función del ventrículo izquierdo.

15

20

25

30

35

40

En general, en el caso de infarto de miocardio dentro de las 6 horas posteriores al ataque, la terapia de reperfusión agresiva de la arteria coronaria ocluida permite reducir el rango necrotizado del músculo cardíaco. Además de esta terapia, es significativo realizar una terapia de reperfusión en los casos en que hayan transcurrido 24 horas o menos desde el ataque. En el caso de la etapa aguda, la enfermedad de la arteria coronaria se trata frecuentemente con un catéter. En contraste, la preparación celular de la presente invención puede ser dirigida para el tratamiento de casos en los que el tiempo hasta la reperfusión es extremadamente largo o casos en los que la reperfusión y el cateterismo fueron ineficaces. En otras palabras, de acuerdo con la presente invención, se proporciona una preparación celular que contiene células Muse con el fin de tratar el infarto de miocardio basado en la regeneración de tejido cardíaco, incluida la prevención de la aparición de insuficiencia cardíaca causada por la remodelación ventricular izquierda.

45

50

### 2. Preparación celular

#### (1) Células madre pluripotentes (células Muse)

La existencia de las células madre pluripotentes utilizadas en la preparación celular de la presente invención en el cuerpo fue descubierta por M. Dezawa, uno de los solicitantes de la presente invención, y las células se denominaron "células multilínea resistentes al estrés diferenciador (Muse)". Las células Muse se pueden obtener a partir de aspirados de médula ósea o tejido de la piel, como el tejido conectivo dérmico, y están presentes esporádicamente en el tejido conectivo de varios órganos. Además, estas células tienen las propiedades de las células madre pluripotentes y las células madre mesenquimales, y se identifican como doblemente positivas para cada uno de los marcadores de la superficie celular del "antígeno embrionario específico de estadio 3 (SSEA-3)" y "CD105". Por lo tanto, las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse pueden aislarse del tejido corporal mediante el uso de estos marcadores de antígeno como indicadores. Además, dado que las células Muse son resistentes al estrés, pueden concentrarse a partir de tejido mesenquimal biológico o células mesenquimales cultivadas mediante la

60

65

estimulación con diversos tipos de estrés. Una fracción celular en donde las células Muse han sido concentradas por estimulación de estrés también se puede usar para la preparación celular de la presente invención. Los detalles relativos a los métodos utilizados para aislar, identificar y concentrar células Muse, así como sus características, se describen en la Publicación Internacional No. WO 2011/007900. Además, como ha sido informado por Wakao, et al. (2011, citado anteriormente), en el caso de utilizar un cultivo celular obtenido mediante el cultivo de células mesenquimales presentes en la médula ósea, la piel y similares como la población madre de células Muse, se sabe que todas las células positivas para SSEA-3 son positivas para CD105. Por lo tanto, en la preparación celular de la presente invención, en el caso de aislar células Muse de tejido biológico mesenquimal o células mesenquimales cultivadas, las células Muse se pueden purificar y usar simplemente usando SSEA-3 como marcador de antígeno. Además, en la presente descripción, las células madre pluripotentes (células Muse) pueden usarse en una preparación celular para tratar el infarto de miocardio que se ha aislado del tejido mesenquimal biológico o células mesenquimales cultivadas usando SSEA-3 como marcador de antígeno, o una población celular que contiene células Muse puede describirse simplemente como "células positivas para SSEA-3".

En términos simples, las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse pueden aislarse de tejido biológico (tal como el tejido mesenquimal) usando un anticuerpo para el marcador de superficie celular SSEA-3 solo o usando un anticuerpo para SSEA-3 y CD105, respectivamente. Aquí, "tejido biológico" se refiere al tejido biológico de un mamífero. En la presente invención, aunque un embrión en una etapa de desarrollo anterior a una etapa de óvulo o blástula fertilizado no se incluye en el tejido biológico, sí se incluye un embrión en una etapa de desarrollo en o después de la etapa de feto o la blástula, incluida la blástula. Ejemplos de mamíferos incluyen, entre otros, primates como humanos o monos, roedores como ratones, ratas, conejos o conejillos de indias, así como gatos, perros, ovejas, cerdos, vacas, caballos, burros, cabras y hurones. Las células Muse utilizadas en la preparación celular de la presente invención se distinguen claramente de las células madre embrionarias (ES) y las células germinales embrionarias (EG) en que derivan del tejido biológico. Además, "tejido mesenquimal" se refiere a tejido de hueso, cartílago, grasa, sangre, médula ósea, músculo esquelético, dermis, ligamentos, tendones o corazón y similares, así como al tejido conectivo de los mismos. Por ejemplo, las células Muse se pueden obtener de la médula ósea y la piel. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar una preparación celular usada con el propósito de regenerar el músculo cardíaco, y, por ejemplo, se usan preferiblemente células Muse que se han aislado del tejido mesenquimal recogido del cuerpo vivo. Además, las células Muse también pueden aislarse de células mesenquimales cultivadas usando los medios de aislamiento mencionados anteriormente. Además, las células Muse utilizadas en la preparación celular de la presente invención pueden ser autólogas o alogénicas en relación con el receptor que recibe el trasplante celular.

Como se ha descrito anteriormente, aunque las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse pueden aislarse del tejido biológico utilizando su propiedad de ser SSEA-3-positivas y CD105-positivas, se sabe que la piel humana adulta contiene varios tipos de células madre y células precursoras. Sin embargo, las células Muse no son lo mismo que estas células. Ejemplos de tales células madre y células precursoras incluyen células precursoras derivadas de la piel (SKP), células madre de cresta neural (NCSC), melanoblastos (MB), células perivasculares (PC), células precursoras endoteliales (EP) y células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC). Las células Muse se pueden aislar de estas células mediante el uso de "no expresión" de un marcador único como indicador de estas células. Más específicamente, las células Muse se pueden aislar usando la no expresión de al menos uno de los 11 marcadores, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 marcadores, seleccionados del grupo compuesto por CD34 (marcador para EP y ADSC), CD117 (c-kit) (marcador MB), CD146 (marcador PC y ADSC), CD271 (NGFR) (marcador NCSC), NG2 (marcador PC), factor vWF (von Willebrand factor) (marcador EP), Sox10 (marcador NCSC), Caracol (marcador SKP), Babosa (marcador SKP), Tyrp1 (marcador MB) y Dct (marcador MB). Por ejemplo, aunque no se limita a esto, las células Muse pueden aislarse usando la no expresión de CD117 y CD146 como indicador, pueden aislarse usando la no expresión de CD117, CD146, NG2, CD34, vWF y CD271 como indicador, y puede aislarse utilizando la no expresión de los 11 marcadores mencionados como indicador.

Además, las células Muse que tienen las características mencionadas anteriormente utilizadas en la preparación celular de la presente invención pueden tener al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) actividad baja o ausente de telomerasa;
- (ii) capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales;
- (iii) ausencia de demostración de proliferación neoplásica; y,
- (iv) capacidad de autorrenovación.

En un aspecto de la presente invención, las células Muse utilizadas en la preparación celular de la presente invención tienen todas las propiedades mencionadas anteriormente. Aquí, con respecto a lo mencionado anteriormente (i), "actividad de telomerasa baja o ausente" se refiere a que la actividad de telomerasa es baja o no se puede detectar en el caso de haber detectado actividad de telomerasa usando, por ejemplo, el Kit de detección de telomerasa Trapeze XL (Millipore Corp.). Actividad de telomerasa "baja" se refiere a tener una actividad de telomerasa aproximadamente igual a la de los fibroblastos humanos, por ejemplo, o tener una actividad de telomerasa que es 1/5 o menos y

preferiblemente 1/10 o menos en comparación con las células Hela. Con respecto a (ii) mencionada anteriormente, las células Muse tienen la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) in vitro e in vivo, y al inducir la diferenciación mediante el cultivo in vitro, por ejemplo, pueden diferenciarse en piel, hígado, nervio, músculo, hueso o grasa y similares. Además, las células Muse también pueden demostrar la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales en el caso de trasplante in vivo en testículos, por ejemplo.

Además, las células Muse también tienen la capacidad de migrar, injertarse y diferenciarse en un órgano dañado (como el corazón, la piel, la médula espinal, el hígado o los músculos) al ser trasplantadas al cuerpo mediante inyección intravenosa. Con respecto a lo mencionado anteriormente (iii), aunque las células Muse proliferan a una velocidad de crecimiento de aproximadamente 1.3 días en un cultivo en suspensión, también tienen la propiedad de interrumpir la proliferación durante aproximadamente 10 días, y en el caso de haber sido trasplantadas a testículos, tener la propiedad de no volverse malignas durante al menos seis meses. Además, con respecto a lo mencionado anteriormente (iv), las células Muse tienen la capacidad de autorrenovación (autorreplicación). Aquí, la "autorrenovación" se refiere al cultivo de células contenidas en una masa celular similar a la del cuerpo embrioide obtenida mediante el cultivo en suspensión de una sola célula de Muse y permitiéndoles reformar una masa celular similar a la del cuerpo embrioide. La autorrenovación puede llevarse a cabo por un ciclo o repetirse por una pluralidad de ciclos.

Además, una fracción celular que contiene células Muse utilizadas en la preparación celular de la presente invención puede ser una fracción celular obtenida por un método que consiste en aplicar un estímulo de estrés externo al tejido biológico mesenquimal o células mesenquimales cultivadas, erradicando aquellas células diferentes a células que son resistentes al estrés externo, y recuperando las células supervivientes, en las cuales han sido concentradas células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 y positivas para CD105 que tienen todas las propiedades indicadas a continuación:

- (i) SSEA-3-positivas;
- (ii) CD105-positivas;
- (iii) actividad baja o ausente de telomerasa;
- (iv) capacidad de diferenciarse en tres capas germinales;
- (v) ausencia de demostración de proliferación neoplásica; y,
- (vi) capacidad de autorrenovación.

El estrés externo mencionado anteriormente puede consistir en cualquiera de los tratamientos con proteasa, cultivo a baja concentración de oxígeno, cultivo en condiciones deficientes en fosfato, cultivo en condiciones deficientes en suero, cultivo en malas condiciones nutricionales, cultivo bajo exposición al choque térmico, cultivo bajo estimulación mecánica, cultivo bajo tratamiento de agitación, cultivo bajo tratamiento a presión y choque físico o una combinación de una pluralidad de los mismos.

La duración del tratamiento de proteasa mencionado anteriormente para impartir estrés externo a las células es preferiblemente un total de 0.5 horas a 36 horas. Además, la concentración de proteasa es la concentración utilizada al exfoliar las células que se han adherido al recipiente de cultivo, al romper una masa celular en células individuales o al recuperar células individuales del tejido.

La proteasa mencionada anteriormente es preferiblemente una serina proteasa, proteasa de ácido aspártico, cisteína proteasa, metaloproteasa, proteasa de ácido glutámico o treonina proteasa N-terminal. La proteasa mencionada anteriormente es más preferiblemente tripsina, colagenasa o dispasa.

Además, las células Muse que tienen las características mencionadas anteriormente usadas en la preparación celular de la presente invención se acumulan en el tejido miocárdico dañado (sitio de infarto de miocardio) después de la administración intravenosa como se describirá posteriormente, y como resultado de la diferenciación en células miocárdicas en ese tejido, pueden reducir el tamaño del infarto y permitir que la función cardíaca mejore o vuelva a la normalidad (Ejemplos 2 a 4).

## (2) Preparación y uso de la preparación celular

La preparación celular de la presente invención, aunque no se limita a la misma, se obtiene suspendiendo células Muse o una población celular que contiene células Muse obtenidas en el (1) mencionado anteriormente en solución salina fisiológica o un regulador adecuado (tal como solución salina fisiológica regulada con fosfato). En este caso, en el caso de que el número de células Muse aisladas de tejido autógeno o alogénico sea bajo, las células pueden cultivarse antes del trasplante celular y dejar que proliferen hasta que se obtenga una concentración celular prescrita. Además, como se ha informado anteriormente (Publicación Internacional No. WO 2011/007900), dado que las células

Muse no experimentan transformación neoplásica, hay pocas posibilidades de que las células se vuelvan malignas, incluso si se contienen células recuperadas del tejido biológico que aún no se han diferenciado, lo que los hace seguros. Además, aunque no existen limitaciones particulares al respecto, el cultivo de células Muse recuperadas se puede llevar a cabo en un medio de crecimiento ordinario (como un medio esencial mínimo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM) que contiene un 10% de suero bovino de ternera). Más específicamente, se puede preparar una solución que contenga una concentración prescrita de células Muse seleccionando medios, aditivos (tales como antibióticos y suero) y similares adecuados para el cultivo y la proliferación de células Muse con referencia a la Publicación Internacional No. WO 2011/007900 mencionada anteriormente. En el caso de administrar la preparación celular de la presente invención para el tratamiento del infarto de miocardio a un humano, se recogen aproximadamente varios mililitros de aspirado de médula ósea del ilion humano, y después de aislar las células Muse usando un marcador de antígeno para SSEA-3 como indicador, se permite que las células proliferen cultivándolas durante una cantidad de tiempo apropiada hasta que se alcanza una dosis terapéutica efectiva (tal como durante 2 a 3 semanas), seguido de la preparación de células Muse autólogas en forma de una preparación celular.

Además, cuando se usa la preparación celular de células Muse, también se puede incluir dimetilsulfóxido (DMSO) o albúmina sérica para proteger las células, o antibióticos y similares para prevenir la contaminación y el crecimiento de bacterias, en la preparación celular. Además, otros componentes farmacéuticamente permitidos (como un portador, vehículo, agente desintegrante, regulador, emulsionante, agente de suspensión, agente calmante, estabilizador, agente de almacenamiento, conservante o solución salina fisiológica), o células o componentes que no sean células Muse contenidas en células mesenquimales, también pueden estar contenidos en la preparación celular. Una persona con habilidad ordinaria en la técnica puede agregar estos factores y agentes farmacéuticos a una preparación celular en concentraciones adecuadas. De esta manera, las células Muse se pueden usar en forma de una composición farmacéutica que contiene diversos tipos de aditivos.

El número de células Muse contenidas en la preparación celular preparada de la manera descrita anteriormente puede ajustarse adecuadamente en consideración del sexo, la edad y el peso corporal del sujeto, el estado de la enfermedad y el estado en el que se usan las células para obtener el efecto deseado en el tratamiento del infarto de miocardio (como la reducción del tamaño del infarto o la mejora de la función cardíaca). En los ejemplos 1 a 4 que se describirán posteriormente, aunque se produjo un modelo de infarto de miocardio de conejo y se examinaron varios tipos de efectos del trasplante de células Muse, se obtuvieron efectos extremadamente superiores mediante la administración de células positivas para SSEA3 a conejos blancos japoneses que pesan aproximadamente 2 kg a 3 kg a  $5 \times 10^5$  células/animal. Sobre la base de este resultado, se puede esperar que se obtengan efectos superiores mediante la administración de  $1.7 \times 10^5$  a  $2.5 \times 10^5$  células/kg por mamífero individual en función del peso corporal. Por otro lado, las células positivas para SSEA-3 pueden estar contenidas en una preparación celular a  $1 \times 10^6$  células/individuo o menos, por ejemplo, como la cantidad por administración única para evitar la oclusión vascular atribuible a la administración de células. Aquí, ejemplos de individuos incluyen, entre otros, conejos y humanos. Además, la preparación celular de la presente invención se puede administrar una pluralidad de veces (como 2 a 10 veces) en un intervalo adecuado (como dos veces al día, una vez al día, dos veces por semana, una vez por semana o una vez cada dos semanas) hasta que se obtenga el efecto terapéutico deseado. Por lo tanto, aunque depende del estado del sujeto, la dosis terapéuticamente efectiva se administra preferiblemente, por ejemplo, 1 a 10 veces a  $1 \times 10^3$  células a  $1 \times 10^6$  células por individuo. Aunque no existen limitaciones particulares al respecto, los ejemplos de dosis individuales totales incluyen  $1 \times 10^3$  células a  $1 \times 10^7$  células,  $1 \times 10^4$  células a  $5 \times 10^6$  células,  $2 \times 10^4$  células a  $2 \times 10^6$  células y  $5 \times 10^4$  células a  $1 \times 10^6$  células.

Las células Muse utilizadas en la preparación celular de la presente invención tienen la propiedad de acumularse en un sitio de infarto de miocardio. Por lo tanto, al administrar la preparación celular, no hay limitaciones en el sitio de administración o tipo de vaso al que se administra la preparación celular (venas y arterias). Ejemplos de venas adecuadas para la administración incluyen, pero no se limitan a, la vena del oído y la vena yugular. En el caso de un humano, es preferible la vena cubital. Además, los ejemplos de arterias adecuadas para la administración incluyen, pero no se limitan a, una arteria coronaria. Sin embargo, en consideración de factores tales como la eficiencia del transporte celular y la recuperación rápida del sujeto después de la cirugía, la preparación celular se administra preferiblemente directamente en una arteria coronaria en un sitio infartado por inserción transdérmica de un catéter cardíaco. Aunque no hay limitaciones en el sitio de punción del catéter cardíaco, algunos ejemplos incluyen la muñeca (arteria radial), el codo (arteria braquial) y la ingle (arteria femoral).

Aunque la preparación celular de la presente invención está dirigida al tratamiento del infarto de miocardio masivo grave y otros tipos de infarto de miocardio, se supone que el tiempo de administración es un intervalo que se extiende desde varias horas hasta varias semanas después de la isquemia. Por lo tanto, aunque no existen limitaciones al respecto, el tiempo de administración de la preparación celular de la presente invención es preferiblemente a más tardar dentro del mes siguiente a la isquemia. El tiempo de administración es más preferiblemente a lo largo de 14 días, incluso más preferiblemente a lo largo de 7 días, aún más preferiblemente a lo largo de 72 horas, incluso más preferiblemente a lo largo de 48 horas, incluso más preferiblemente a lo largo de 24 horas, aún más preferiblemente a lo largo de 12 horas y lo más preferiblemente a lo largo de 6 horas después de la isquemia. Dado que el objetivo del tratamiento utilizando la preparación celular de acuerdo con la presente invención consiste en casos en los que la cantidad de tiempo hasta la reperfusión es extremadamente larga o casos en los que la reperfusión y el cateterismo han sido ineficaces, es extremadamente útil para tratar el infarto de miocardio. Además, dado que las células Muse

utilizadas se han confirmado en un experimento realizado por los inventores de la presente invención para no inducir una reacción inmune incluso en el caso de derivarse de una fuente alogénica, no hay limitaciones en el número de administraciones de las mismas, y puede administrarse adecuadamente hasta que se obtenga el efecto deseado del tratamiento del infarto de miocardio.

5 En una realización de la presente invención, el tamaño del infarto en un sujeto que presenta infarto de miocardio puede reducirse administrando la preparación celular de la presente invención. Aquí, el "tamaño del infarto" cuando se usa en la presente descripción se define como la relación (%) de una región infartada a una región isquémica. Aquí, una región isquémica se determina usando la tinción azul de Evan, y las regiones no isquémicas se tiñen con esta tinción. Por otro lado, una región infartada se determina por tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). Además, en el caso de examinar el efecto de la preparación celular de la presente invención sobre la reducción del tamaño del infarto, es útil usar la tasa de reducción relativa al tamaño del infarto de un control (es decir, (tamaño del infarto del control - tamaño del infarto después trasplante de células)/ tamaño del infarto de control  $\times$  100). De acuerdo con la presente invención, el tamaño del infarto se reduce preferiblemente al 100% con respecto a un grupo al que no se le administró la preparación celular (control). El tamaño del infarto se reduce más preferiblemente del 10% al 90%, incluso más preferiblemente del 20% al 70%, y aún más preferiblemente del 30% al 50%. Además, como se indica en el Ejemplo 2 que se describirá posteriormente, en el caso de usar un modelo de infarto de miocardio de conejo, en contraste con el tamaño del infarto que fue un promedio de 30.4% en un grupo de control, el tamaño del infarto en un grupo de trasplante de células Muse fue un promedio de 18.2%. Sobre la base de estos valores, se puede entender que el tamaño del infarto se ha reducido en  $(30.4 - 18.2)/30.4 \times 100 =$  aproximadamente 40% como resultado del trasplante de células Muse.

En una realización de la presente invención, la preparación celular de la presente realización es capaz de mejorar la función cardíaca después del infarto de miocardio o restaurarla a la normalidad (o valores normales). La mejora de la función cardíaca cuando se usa en la presente descripción se refiere al alivio e inhibición de la progresión de diversos síntomas asociados con el infarto de miocardio, y preferiblemente se refiere al alivio de los síntomas en un grado en que no hay deterioro de la vida diaria. Además, la restauración de la función cardíaca a la normalidad se refiere a todos los síntomas atribuibles al infarto de miocardio que regresa al estado anterior al infarto de miocardio. Además, en un modo de la presente invención, la preparación celular de la presente invención puede usarse para prevenir y/o tratar la insuficiencia cardíaca (crónica) después de un infarto de miocardio.

Aquí, ejemplos típicos de indicadores utilizados para evaluar la función miocárdica incluyen, pero no se limitan a, cambios en la presión sanguínea del ventrículo izquierdo con el tiempo ( $\pm dp/dt$ , p: presión sanguínea, t: tiempo), dimensión diastólica final ventricular izquierda (LVDd), fracción de eyección (EF), acortamiento fraccional ventricular izquierdo (FS) y dimensión sistólica final ventricular izquierda (LVDs). La mejora o restauración de la función cardíaca mediante la preparación celular de la presente invención se puede evaluar utilizando al menos uno de los cinco indicadores mencionados anteriormente. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 4, con respecto a los cambios en la presión sanguínea del ventrículo izquierdo a lo largo del tiempo ( $\pm dp/dt$ ), aunque  $+dp/dt$  representa la función sistólica cardíaca mientras que  $-dp/dt$  representa la función diastólica cardíaca ventricular izquierda, se determinó que la función cardíaca mejoraba significativamente en un grupo de trasplante de células en comparación con un grupo de control basado en ambos valores medidos (Figuras 6 y 11). Además, con respecto a LVDd, aunque se observó un aumento en LVDd en un grupo de control basado en los resultados de la ecocardiografía 2D, no se observó un aumento en LVDd en un grupo de trasplante de células Muse y estaba dentro del rango normal (Figuras 7 y 12). A continuación, aunque la fracción de eyección (EF), que es uno de los indicadores de la función sistólica cardíaca, se considera normal a un valor de 55% o más, ya que los valores de EF fueron 60.9% (Figura 7) y un promedio de 59.3% (n=10) (Figura 12) en un grupo de trasplante de células Muse usando un modelo de infarto de miocardio de conejo, se sugirió que los valores de EF habían vuelto a la normalidad. Además, con respecto al acortamiento fraccional ventricular izquierdo (FS) también, que también es un indicador de la función sistólica cardíaca de la misma manera que la FE, los valores de FS fueron 30.4% (Figura 7) y un promedio de 30.0% (n=10) (Figura 12) en conejos trasplantados con células Muse. Dado que el valor normal para FS en humanos se considera entre 30% y 50%, se sugirió que los valores de FS también volvieron a la normalidad con respecto a este modelo de infarto de miocardio de conejo.

Aunque lo siguiente proporciona una explicación más detallada de la presente invención a través de ejemplos de la misma, la presente invención no está limitada de ninguna manera por estos ejemplos.

## [Ejemplos]

### Ejemplo 1: Producción de modelo de infarto de miocardio de conejo

El protocolo de experimentación con conejos en el presente ejemplo fue aprobado por el comité de ética con respecto a la experimentación con animales de la Universidad de Gifu, y se llevó a cabo de acuerdo con las "Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" (edición revisada de 1996) por los the U.S. National Institutes of Health (NIH). Más específicamente, el procedimiento fue como se describe a continuación. Primero, se anestesiaron conejos blancos japoneses (peso corporal: aproximadamente 2 a 3 kg/animal) usando pentobarbital sódico a 30 mg/kg. Los conejos se sometieron continuamente a análisis de gases en sangre arterial, y las condiciones de ventilación se ajustaron adecuadamente para que los gases en sangre arterial se mantuviera dentro del rango fisiológico. La arteria

carótida izquierda y la vena yugular se canularon, seguido de un control de la presión arterial. Después de realizar la toracotomía izquierda en el tercer espacio intercostal, se expuso el corazón y se ligó el centro de la superficie anterior externa del ventrículo izquierdo con hilo de seda 4-0 debajo de una rama de la aorta descendente. Se pasó un tubo de vinilo estrecho sobre ambos extremos del hilo de sutura, y se ocluyó la rama de la aorta tirando de este hilo de sutura. A continuación, el tubo se fijó en posición sujetándolo con pinzas hemostáticas Mosquito. La isquemia miocárdica se confirmó por la presencia de cianosis local y cambios en el electrocardiograma. La duración de la oclusión (isquemia) se ajustó adecuadamente. Después de liberar el hilo de sutura, se confirmó que el músculo cardíaco cambiaba a un color rojo en toda el área crítica (consulte Yasuda, et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 296, p. 1558-1565, 2009).

Ejemplo 2: Efecto del trasplante de células Muse en la reducción sobre el tamaño del infarto de miocardio

(1) Preparación de células Muse

Se recogieron células de médula ósea de conejos (peso corporal: aproximadamente 2 kg a 3 kg/animal) y se aislaron células positivas para SSEA-3 (células Muse) usando FACS. Más específicamente, las células Muse se aislaron de acuerdo con el método descrito en la publicación internacional número WO 2011/007900 relacionada con el aislamiento y la identificación de células Muse humanas. Además, las células Muse utilizadas para el trasplante se derivaron de células de médula ósea de individuos de conejo en los que se había inducido un infarto de miocardio, se cultivaron células mesenquimales adhesivas de la médula ósea y se introdujo lentivirus-GFP en las células después de permitir que las células proliferaran. Las células Muse o una población celular que contiene células Muse marcadas con GFP se aislaron con FACS para obtener células doblemente positivas para GFP y SSEA-3. Posteriormente, las células se ajustaron a una concentración prescrita y se retornaron al mismo conejo con infarto de miocardio mediante inyección intravenosa. Además, como se describió anteriormente, en el caso del uso de células obtenidas mediante el cultivo de células mesenquimales como las células de la médula ósea como una población madre de células Muse, se sabe que todas las células positivas para SSEA-3 son positivas para CD105 según lo informado por Wakao, et al. (2001, citado previamente).

(2) Efecto del trasplante de células Muse en la reducción sobre el tamaño del infarto de miocardio

La duración del infarto (isquemia) inducida por la ligadura en los conejos fue de 30 minutos (correspondiente a una duración de la isquemia en humanos de 3 horas), seguido del inicio de la reperfusión liberando el hilo de sutura. Las células positivas para SSEA-3 ( $5 \times 10^5$  células), para las cuales la concentración se ajustó con solución salina fisiológica después de haberse obtenido como se describe en (1) anteriormente, se administraron en una vena del oído de los conejos. Además, se administraron respectivamente una fracción de células mesenquimales (MSC) ( $5 \times 10^5$  células) y solución salina fisiológica en diferentes conejos para usar como controles comparativos seguidos de reperfusión. Luego se realizó un estudio comparativo del efecto reductor sobre el tamaño del infarto de las células Muse 14 días después de la reperfusión.

Más específicamente, los conejos se sacrificaron 14 días después de la reperfusión mediante tratamiento con heparina (500 U/kg) e inyectando por vía intravenosa una cantidad en exceso de pentobarbital sódico. Después de extirpar los corazones de los animales, se determinaron las regiones infartadas de tejido miocárdico mediante tinción con cloruro de trifeníl tetrazolol (TTC). Las regiones que no se tiñeron indicaron sitios infartados. Por otro lado, las regiones isquémicas se determinaron inyectando la mancha azul de Evan (4%, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EE.UU.) en la arteria aórtica a 80 mm Hg. El tejido que no se había vuelto isquémico se tiñó de azul por esta tinción, mientras que las regiones isquémicas se veían blancas ya que esta tinción no es transportada por los capilares.

El ventrículo izquierdo se cortó para obtener anillos auriculoventriculares y se obtuvo un total de siete secciones de tejido. Después de pesar cada tejido, las secciones de tejido se incubaron en una solución de TTC al 1% a 37°C para visualizar regiones infartadas y capturar imágenes de las mismas (consúltese Fishbein, et al., Am. Heart J., 101, 593-600, 1981). Los resultados se muestran en la Figura 1. En la figura, el panel izquierdo muestra una solución salina fisiológica administrada con un anillo auriculoventricular para su uso como control, mientras que el panel derecho muestra un anillo atrioventricular después del trasplante de células Muse. Las regiones en estas secciones de tejido que están rodeadas por líneas discontinuas (que constituyen una porción del músculo cardíaco y el músculo papilar) indican regiones infartadas que no se tiñeron con TTC. Aunque se observaron regiones infartadas similares a las presentes en el control en la sección de tejido trasplantada con células Muse, se puede ver que esas regiones son mucho más estrechas en comparación con el control.

Además, el tamaño del infarto se calculó como la relación (%) de regiones infartadas a regiones isquémicas (Figura 2). Aunque el tamaño del infarto fue del 30.4% en un grupo de control (n=3), el tamaño del infarto después del trasplante de células Muse (n=4) fue del 18.2%, lo que demuestra que las células Muse redujeron significativamente el tamaño del infarto. Cuando este efecto se calcula en términos de tasa de reducción, se determinó que las células Muse podían reducir el tamaño del infarto en aproximadamente un 40%. Además, se realizó una prueba similar después de aumentar el número de muestras (Figura 8). El valor promedio del tamaño del infarto en un grupo de control salino fisiológico (n=10) fue del 27.0%, en un grupo de trasplante de células MSC (fracción de células mesenquimales) (n=10) fue del 21.0%, en un grupo de trasplante de células Muse (n=10) fue del 13.9%, y eso en una

célula no Muse (células MSC que no contienen células Muse) (n=4) fue del 22.8%. Sobre la base de estos resultados también, se determinó que las células Muse tienen un efecto considerable en la reducción del tamaño del infarto.

Además, se realizó un examen histológico del efecto reductor sobre el tamaño del infarto mediante la tinción tricrómica de Masson. Después de fijar los corazones extirpados de la manera descrita anteriormente en formalina al 10% e incrustarlos en parafina, se prepararon secciones en la dirección de la sección transversal horizontal de cada muestra para obtener anillos auriculoventriculares. Posteriormente, los anillos auriculoventriculares se tiñeron con tinción tricrómica (MT) de Masson de acuerdo con métodos ordinarios para visualizar regiones infartadas del músculo cardíaco (Figuras 3 y 9). En el caso de la tinción con MT, el tejido compuesto por células viables se tiñe de rojo, mientras que el tejido en el que ha progresado la fibrosis de colágeno es pálido y parece haber perdido color. El tejido que exhibe fibrosis de colágeno que no está teñida por MT (sitios infartados) cubre un área amplia en un grupo control de solución salina fisiológica administrada. Por otro lado, en el tejido ventricular izquierdo de un grupo de conejos trasplantado con células Muse, las áreas pálidas eran más pequeñas que en el grupo control, lo que demuestra que el tamaño del infarto ha disminuido. Además, también se observó característicamente que el músculo papilar se había recuperado del infarto. Por otro lado, cuando el tejido del ventrículo izquierdo de conejos trasplantados con células MSC que sirve como control comparativo se comparó con un grupo control al que se administró solución salina, aunque se observó una reducción en el tamaño del infarto, el efecto reductor en el tamaño del infarto fue menos potente en comparación con el del grupo de trasplante de células Muse. Además, la recuperación del músculo papilar observada en el grupo de trasplante de células Muse no se observó en el tejido trasplantado con células MSC.

### Ejemplo 3: Diferenciación de células Muse en tejido cardíaco

Se realizó un estudio para determinar si la reducción del tamaño del infarto atribuible a las células Muse observada en el Ejemplo 2 fue el resultado de la diferenciación de las células Muse en células de miocardio. Primero, las células Muse ( $5 \times 10^5$ ), insertadas con un gen para expresar la proteína verde fluorescente (GFP), se inyectaron en un modelo de infarto de miocardio de conejo a través de una vena del oído. Las secciones de tejido se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 2 y el tejido se observó usando tintes fluorescentes para cada tipo de mancha de tejido (Figura 4). Como se muestra en el panel izquierdo de la Figura 4, la línea discontinua blanca indica una línea límite entre una parte infartada y una parte no infartada, con la parte superior y a la derecha de la línea límite que indica los sitios infartados y la parte inferior y a la izquierda de la línea límite que indica los sitios no infartados. El panel central muestra los resultados de la tinción de células de miocardio en rojo con tinción con rodamina-faloidina de acuerdo con los métodos ordinarios. Esta tinción permite distinguir claramente los sitios infartados y los no infartados. Además, el panel derecho indica una imagen obtenida de la tinción con GFP, y las células Muse introducidas con el gen de GFP (verde) se indican como acumuladas selectivamente en los sitios de infracción. Una imagen obtenida al superponer estas dos imágenes se muestra en el panel izquierdo. Como resultado, una gran cantidad de células donde los colores rojo y verde se superponen están presentes en los sitios infartados, lo que sugiere que las células Muse trasplantadas se diferenciaron en células miocárdicas.

Además, para investigar el estado diferenciado de las células Muse positivas para GFP que se integraron en sitios infartados, estas células se examinaron para detectar la presencia o ausencia de expresión del péptido natriurético auricular (ANP) de acuerdo con métodos ordinarios. Se sabe que este ANP se expresa en células de miocardio juvenil. En la Figura 5, el color verde indica la tinción con GFP (células Muse), el color rojo indica la tinción con ANP y el color azul indica la tinción con DAPI (que se usa para teñir los núcleos celulares). Como se puede entender desde el panel izquierdo de la Figura 5, dado que estos tres tipos de fluorescencia se observaron dentro de una pluralidad de las mismas células, se sugirió que las células Muse trasplantadas incluían células que se diferenciaban en células miocárdicas.

A continuación, se realizó un examen de la presencia o ausencia de la expresión de troponina I, de la cual se sabe que es un marcador de miocardio, en células Muse positivas para GFP que se integraron en sitios infartados. En la tinción con troponina I, se usó como anticuerpo primario el anticuerpo anti-troponina I de ratón humano (Chemical International, Inc.), que reacciona de forma cruzada con la troponina I de conejo. En la Figura 10, el color verde indica la tinción con GFP (células Muse), el color rojo indica la tinción con troponina I y el color azul indica la tinción DAPI (que se usa para teñir los núcleos celulares). Como se puede entender desde el panel derecho en la Figura 10, dado que estos tres tipos de fluorescencia se observaron dentro de una pluralidad de las mismas células, se sugirió que las células Muse trasplantadas incluyeran células que se diferenciaban en células miocárdicas de la misma manera que lo demostrado por los resultados antes mencionados (Figura 5).

Además, se realizó un examen de la presencia o ausencia de expresión de CD31, del cual se sabe que es un marcador de células endoteliales vasculares, con el fin de investigar el estado diferenciado de las células Muse que se integraron en los sitios infartados. Más específicamente, el anticuerpo monoclonal CD31 antihumano de ratón (adquirido de Dako Corp.), que reacciona de forma cruzada con células endoteliales vasculares de conejo, se usó como anticuerpo primario, y las células que expresaron CD31 se tiñeron histoquímicamente. Como se desprende de las micrografías mostradas en la Figura 13, la densidad microvascular CD31 positiva en los sitios infartados fue mayor en el tejido trasplantado con células Muse que en los otros grupos de trasplante. Sobre la base de esto, se sugirió la posibilidad de que las células Muse trasplantadas se diferenciaron en células endoteliales vasculares en sitios infartados.

## Ejemplo 4: Evaluación de la mejora de la función cardíaca por trasplante de células Muse

Se realizó un examen de la función cardíaca después del trasplante de células Muse utilizando cambios en la presión sanguínea a lo largo del tiempo como indicador ( $\pm dp/dt$ , p: presión sanguínea, t: tiempo), y se evaluó con base en imágenes de secciones transversales del ventrículo izquierdo obtenidas por ecocardiografía 2D. En estos experimentos, a los conejos se les administró solución salina fisiológica 24 horas después de la reperfusión (grupo control, n=3) y se usó un grupo de conejos a los que se administraron células Muse (n=4). Primero, la medición de los cambios en la presión arterial a lo largo del tiempo se realizó anestesiando suavemente a cada conejo 14 días después de la reperfusión con 10 mg/kg de pentobarbital sódico e insertando un catéter equipado con un micromanómetro (SRP 407, Millar Instruments Inc.) en el ventrículo izquierdo de los conejos a través de la arteria carótida. Se registraron los valores de  $+dp/dt$ , que representa la función sistólica cardíaca del ventrículo izquierdo, y  $-dp/dt$ , que representa la función diastólica cardíaca del ventrículo izquierdo, que se obtuvieron con este catéter. Los resultados se muestran en la Figura 6. Tanto la función sistólica cardíaca ( $+dp/dt$ ) (parte superior de la Figura 6) como la función diastólica cardíaca ( $-dp/dt$ ) (parte inferior de la Figura 6) demostraron una mejora significativa de la función cardíaca en un grupo trasplantado con células Muse en comparación con un grupo de control.

Además, los resultados de haber examinado la función cardíaca usando cambios en la presión sanguínea a lo largo del tiempo de la misma manera que se describió previamente después de aumentar el número de muestras se muestran en la Figura 11. Tanto la función sistólica cardíaca ( $+dp/dt$ ) (parte superior de la Figura 11) como la función diastólica cardíaca ( $-dp/dt$ ) (parte inferior de la Figura 11) demostraron una mejora significativa de la función cardíaca en un grupo de conejo trasplantado con células Muse (n=10) en comparación con un grupo de control (n=10), un grupo de trasplante de células MSC (n=10) y un grupo de trasplante de células no Muse (n=9).

A continuación, se realizó una ecocardiografía 2D para confirmar aún más la función cardíaca en los conejos mencionados anteriormente (grupo de control y grupo de trasplante de células Muse). En esta ecocardiografía 2D, las imágenes de los corazones de los conejos fueron capturadas usando un sistema de diagnóstico por ultrasonido para animales (SSD2000, Aloka Corp.). Las secciones transversales del eje largo paraesternal del ventrículo izquierdo obtenidas por medición se muestran en la Figura 7. El panel izquierdo indica una imagen del ventrículo izquierdo de un conejo de control, mientras que el panel derecho indica una imagen del ventrículo izquierdo de un conejo trasplantado con células Muse. La dimensión final diastólica del ventrículo izquierdo (DVI) en el control fue de 22.2 mm. En contraste, dado que el valor en el conejo trasplantado con células Muse fue menor a 19.5 mm, se puede entender que el tamaño del infarto se redujo por las células Muse. Además, la medición de la fracción de eyección (EF), que también se utiliza como indicador de la función sistólica cardíaca, arrojó un valor del 34.1% en el control, mientras que el valor en el conejo trasplantado con células Muse fue del 60.9%. Esta fracción de eyección se representa como la relación entre un gasto cardíaco único del ventrículo izquierdo y el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo. Normalmente, un volumen de eyección del 55% o más se considera normal en humanos. Por lo tanto, el resultado de la medición antes mencionado sugiere que la función cardíaca volvió a la normalidad mediante el trasplante de células Muse en conejos en comparación con el control. Además, la medición del acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo (FS), que también se utiliza como indicador de la función sistólica cardíaca de la misma manera que la EF, arrojó un valor del 15.1% en el control y un valor del 30.4% en el conejo trasplantado con células Muse. Este acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo se representa como un porcentaje midiendo la dimensión diastólica final ventricular izquierda y la dimensión sistólica final ventricular izquierda utilizando ecocardiogramas en modo M obtenidos mediante imágenes, y dividiendo la diferencia de los mismos por la dimensión diastólica final ventricular izquierda. Normalmente, el valor normal en humanos se considera dentro del rango de 30% a 50%. Por lo tanto, los resultados de medición mencionados anteriormente sugieren que la función cardíaca volvió a la normalidad mediante el trasplante de células Muse en conejos en comparación con el control.

Para reconfirmar la restauración de la función cardíaca a la normalidad en conejos después del trasplante de células Muse, se midieron LVDd, EF, FS (como se describió anteriormente) y la dimensión sistólica del extremo ventricular izquierdo (LVDs) para conejos de control, conejos trasplantados con células MSC y conejos trasplantados con células no Muse. De manera similar a los resultados antes mencionados, LVDd, EF y FS demostraron que la función cardíaca volvió a la normalidad en conejos como resultado del trasplante de células Muse. Además, con respecto a los DVI también, a diferencia de que los DVI tienen un promedio de 18.3 mm en los conejos de control, el valor promedio en conejos trasplantados con células Muse fue menor a 13.8 mm, lo que sugiere que la función cardíaca volvió a la normalidad como un resultado del trasplante de células Muse.

## Aplicabilidad industrial

La preparación celular de la presente invención es capaz de regenerar el músculo cardíaco en un sitio infartado, reducir el tamaño del infarto y mejorar la función cardíaca mediante la administración por vía intravenosa en un modelo de infarto cardíaco, y puede aplicarse al tratamiento del infarto de miocardio, y particularmente infarto de miocardio masivo grave e insuficiencia cardíaca asociada con el mismo en humanos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una preparación celular para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio, que contiene una fracción celular en donde han sido concentradas células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 aisladas de tejido mesenquimal biológico o células mesenquimales cultivadas,
- 10 en donde la preparación celular se administra en una vena o arteria coronaria de un sujeto a lo largo de 1 mes después de la isquemia de una a diez veces en una cantidad terapéuticamente efectiva de  $1 \times 10^3$  células/individuo a  $1 \times 10^6$  células/individuo, o  $1.7 \times 10^5$  a  $2.5 \times 10^5$  células/kg por individuo y
- 15 en donde dichas células madre pluripotentes tienen una pluralidad de propiedades, comprendiendo dicha pluralidad de propiedades:
- (i) SSEA-3-positivas;
- (ii) CD105-positivas;
- (iii) actividad baja o ausente de telomerasa;
- 20 (iv) capacidad de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales;
- (v) ausencia de demostración de proliferación neoplásica; y
- 25 (vi) capacidad de autorrenovación.
2. La preparación celular para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 han sido concentradas por estimulación de estrés externo.
- 30 3. La preparación celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para la prevención y/o tratamiento de la insuficiencia cardíaca después de un infarto de miocardio masivo grave en humanos.
- 35 4. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre pluripotentes son CD117-negativas, CD146-negativas, NG2-negativas, CD34-negativas, vWF-negativas y CD271-negativas.
- 40 5. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células madre pluripotentes son CD34-negativas, CD117-negativas, CD146-negativas, CD271-negativas, NG2-negativas, vWF-negativas, Sox10-negativas, Caracol-negativas, Babosa-negativas, Tyrpl-negativas y Dct-negativas.
- 45 6. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de integrarse en el sitio del infarto de miocardio.
7. La preparación celular para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en células miocárdicas.
- 50 8. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en células endoteliales vasculares.
9. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tamaño del infarto de miocardio se reduce en comparación con un control sin administración.
- 55 10. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde al menos un indicador de función cardíaca, seleccionado del grupo que consiste en el cambio en la presión ventricular izquierda con el tiempo, dimensión diastólica final ventricular izquierda (LVDd), fracción de eyección (EF), acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo (FS) y a dimensión sistólica final del ventrículo izquierdo (LVDs), se restablecen al valor normal.

FIG. 1

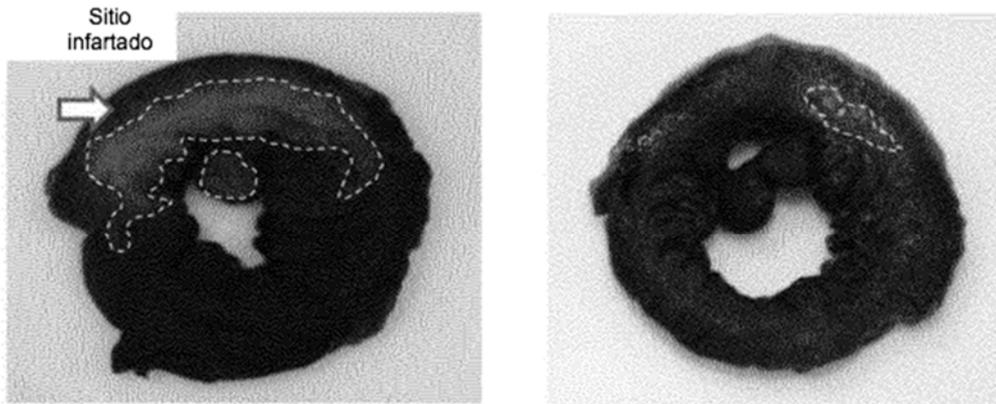


FIG. 2

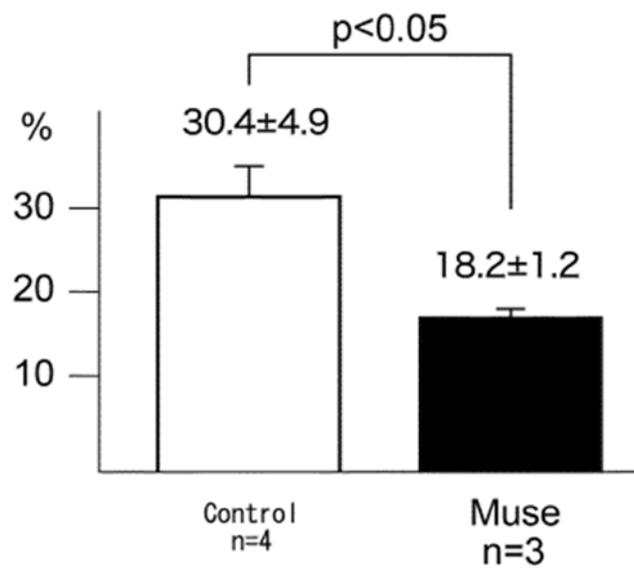


FIG. 3

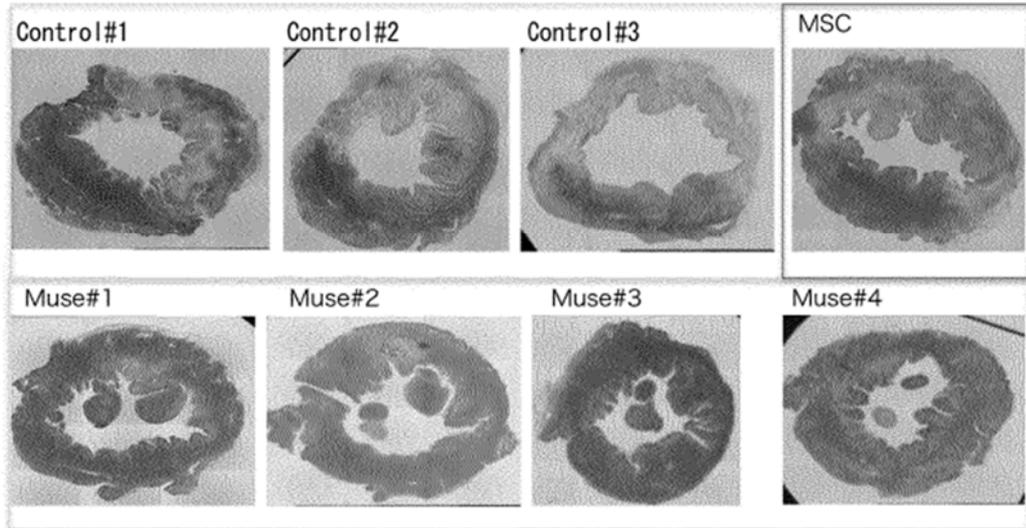


FIG. 4

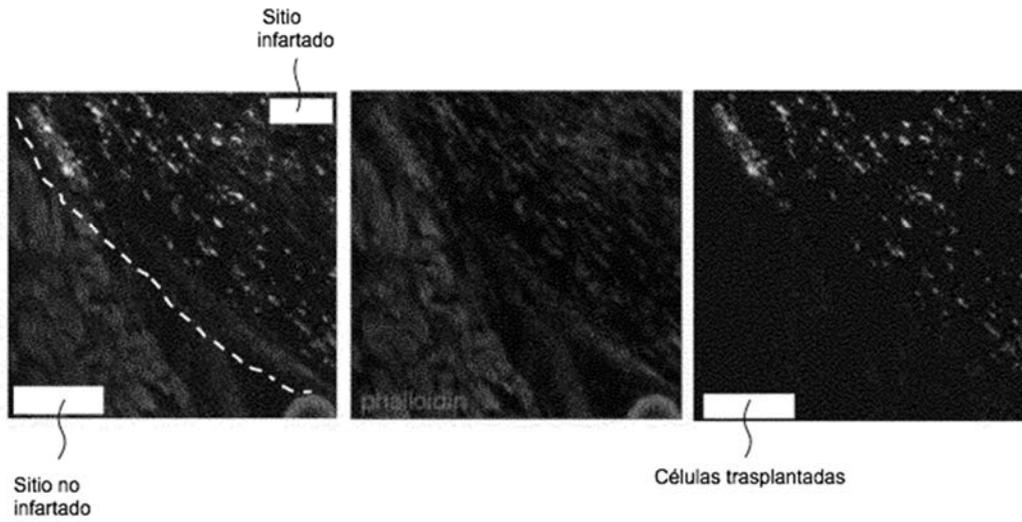


FIG. 5

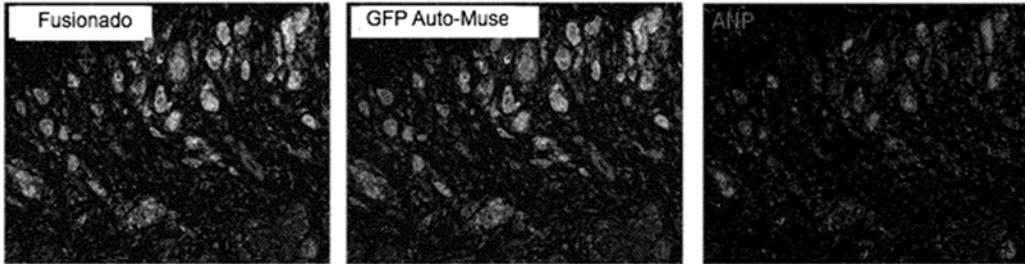


FIG. 6

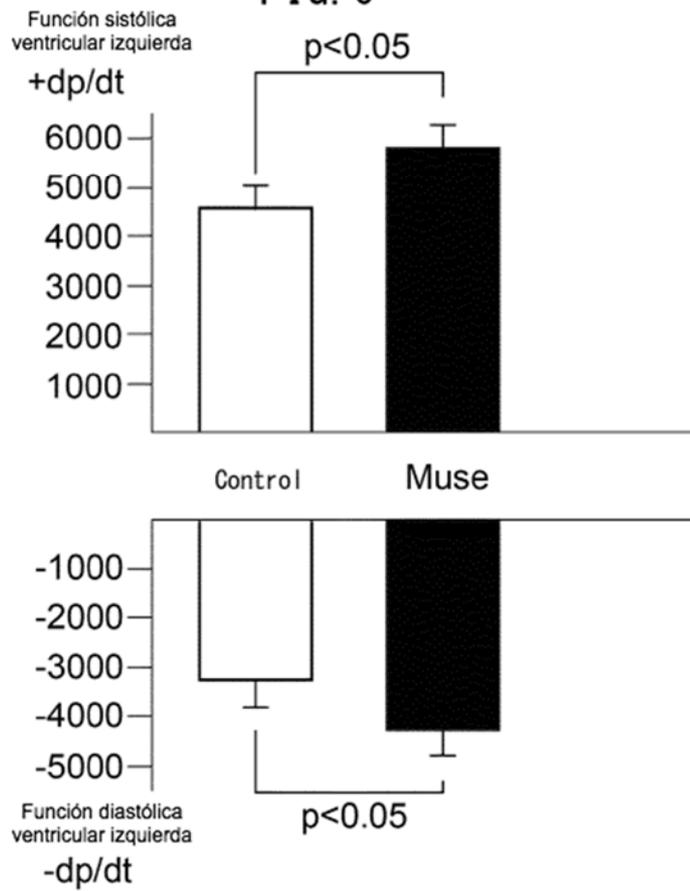


FIG. 7

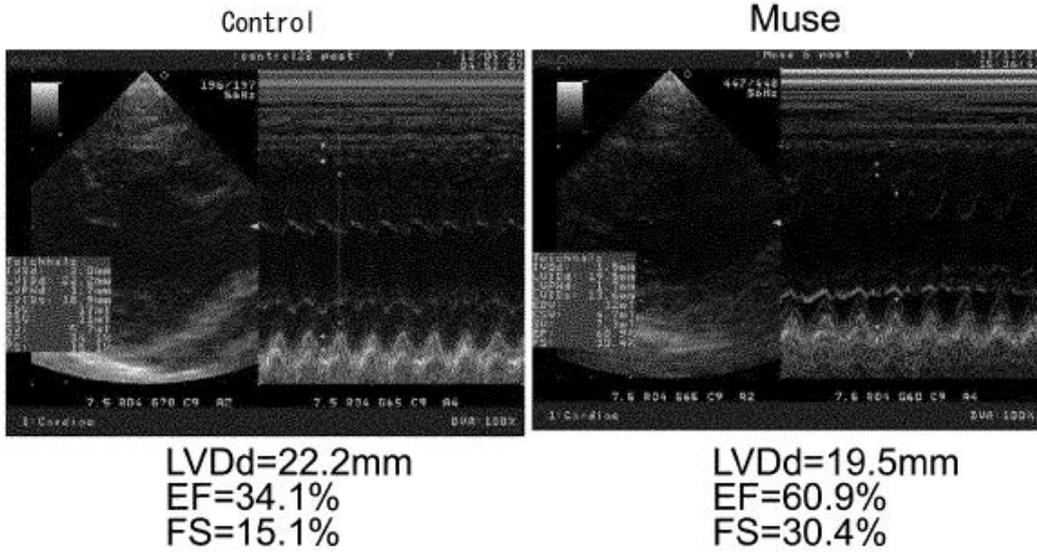


FIG. 8

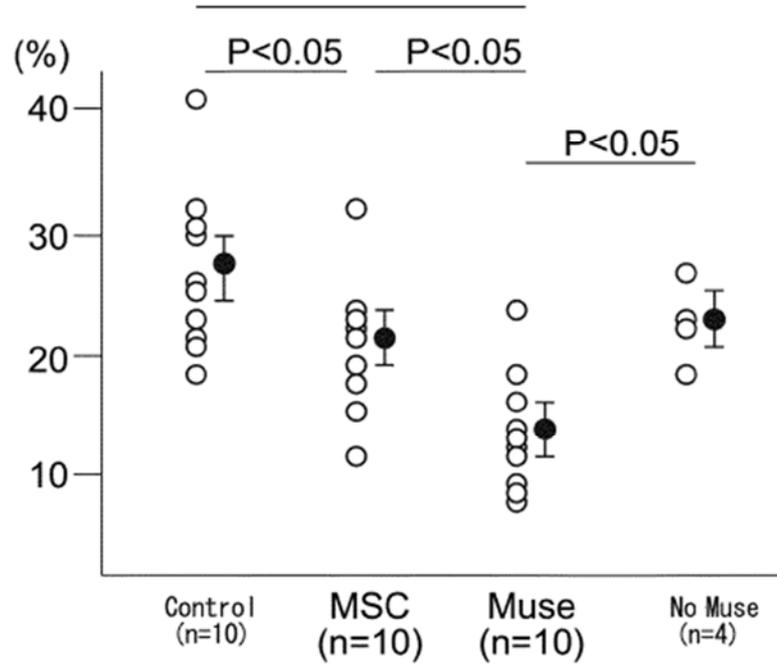


FIG. 9

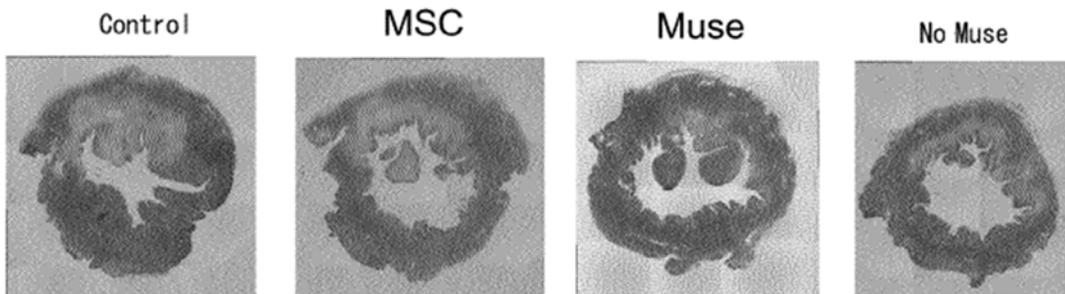


FIG. 10

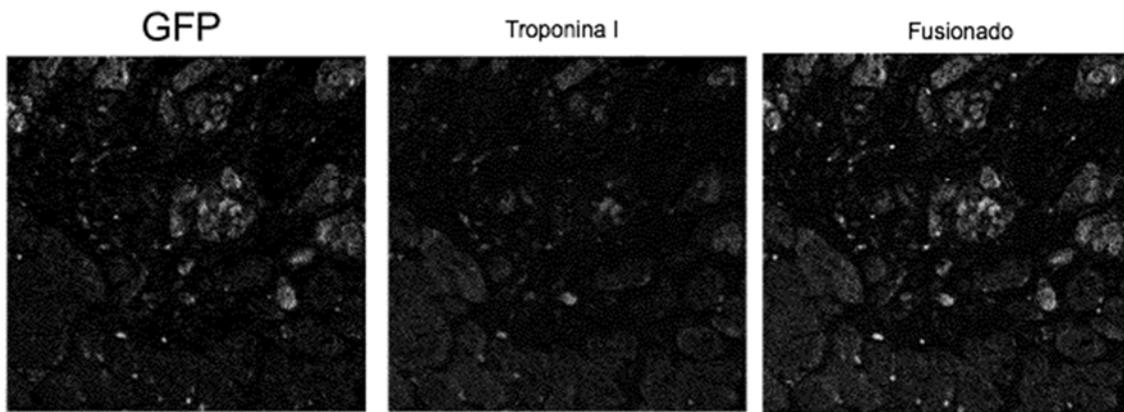


FIG. 11

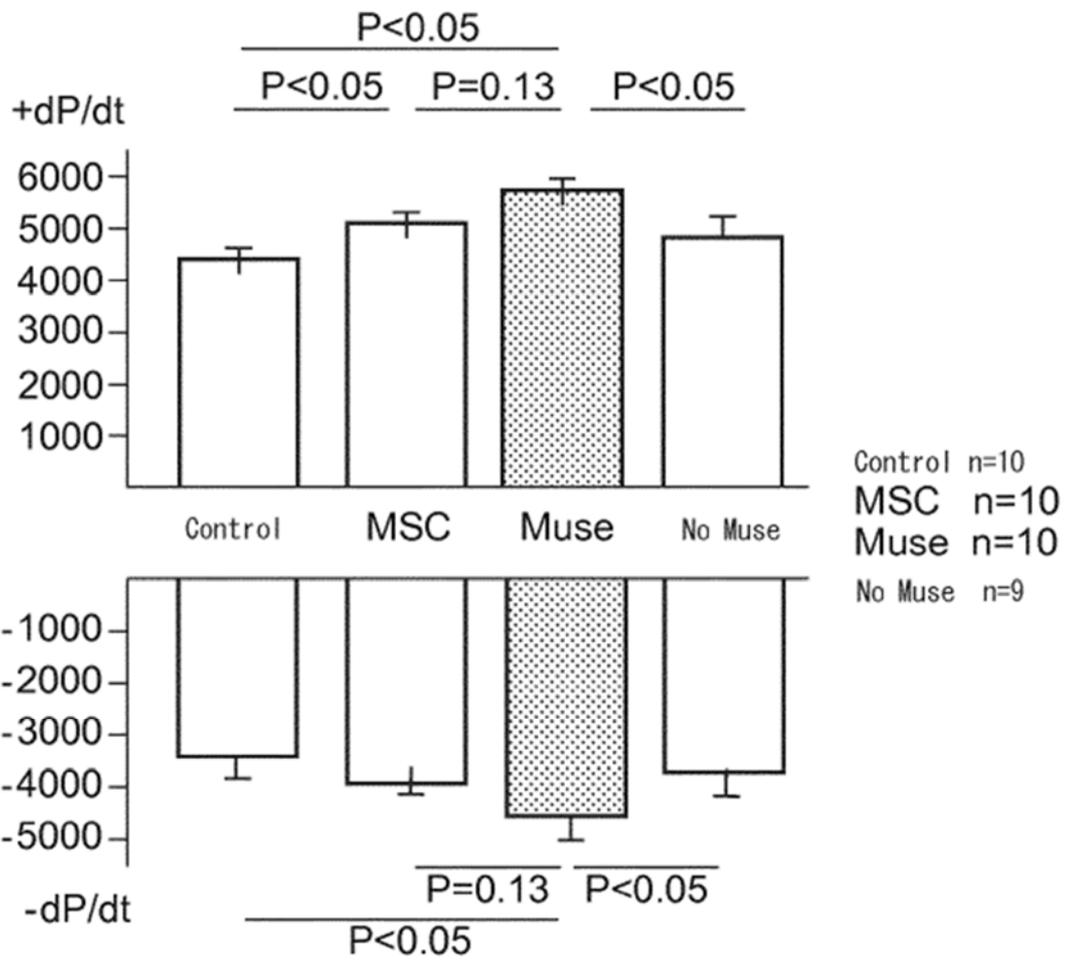


FIG. 12

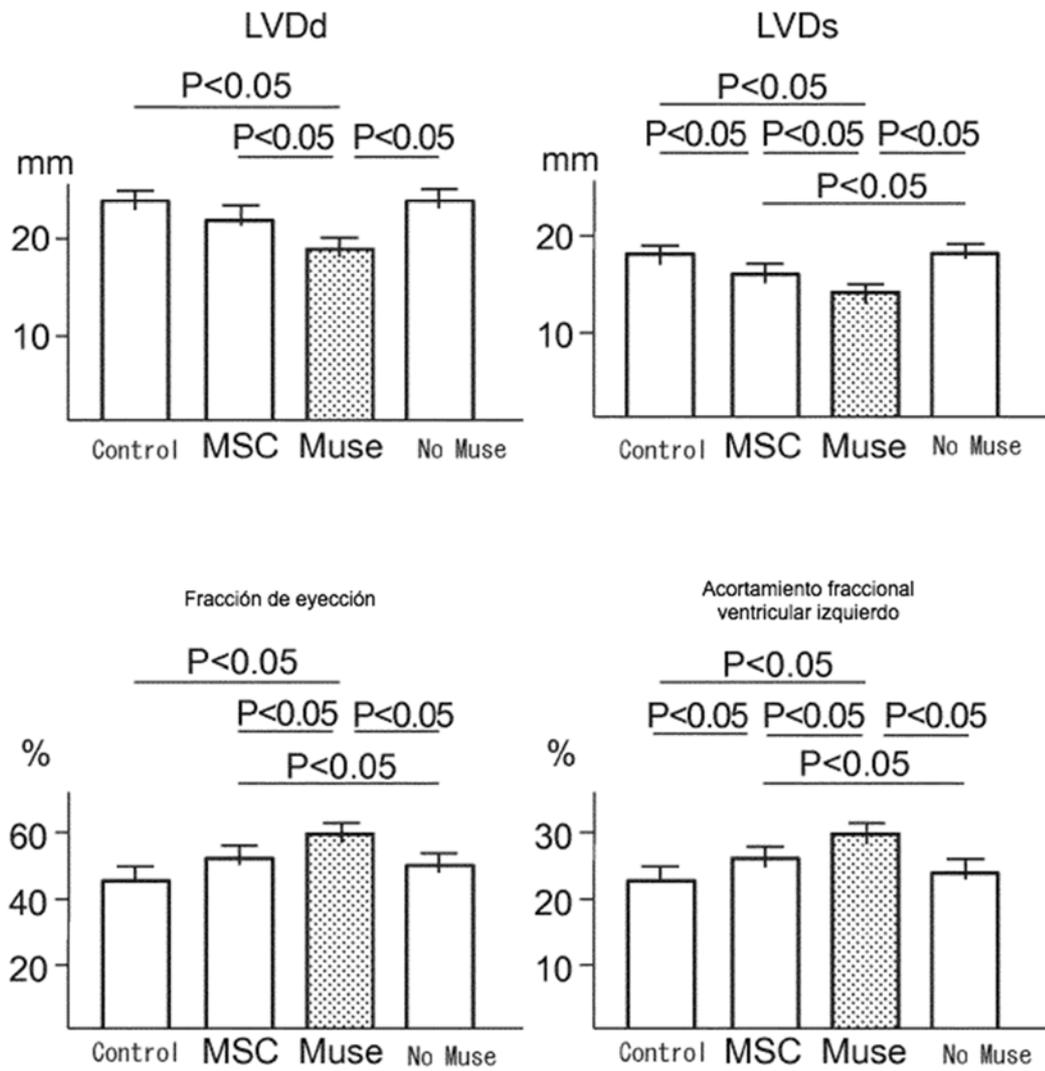


FIG. 13

