(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 486 300**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 35/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN REVISADA DE PATENTE EUROPEA T4

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2006 E 11008854 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2441461**

(54) Título: **Composiciones y métodos de reparación de lesiones vasculares**

(30) Prioridad:

07.11.2005 US 734151 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción revisada de la patente:
25.05.2020

(73) Titular/es:

CALADRIUS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
110 Allen Road
Basking Ridge, New Jersey 07920, US

(72) Inventor/es:

PRETI, ROBERT A. y
PECORA, ANDREW L.

(74) Agente/Representante:

LÓPEZ CAMBA, María Emilia

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos de reparación de lesiones vasculares.

Esta solicitud reivindica el beneficio del documento de patente United States Provisional Application Serial nº 60/734.151, presentada el 7de Noviembre de 2005.

AMBITO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a las composiciones que comprenden un producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas y a los métodos de utilización de las mismas en la reparación del daño causado por insuficiencia vascular, incluyendo miocardio infartado, así como otras condiciones vasculares similares o relacionadas con la insuficiencia vascular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El infarto agudo de miocardio sigue siendo común con una incidencia anual registrada de 1,1 millones de casos solamente en los Estados Unidos (Antman, E.M., Braunwald, E., Infarto agudo de miocardio, en Principles of Internal Medicine, 15th Ed., Braunwald, E. et al., Eds., New York: McGraw-Hill (2001)). Datos preclínicos y clínicos demuestran que a continuación de un infarto de miocardio, la pérdida aguda de las células del músculo del miocardio y al acompañante hipo-perfusión de la zona periférica del infarto dan como resultado una cascada de eventos que causa una disminución inmediata de la función cardiaca, con un potencial de persistencia a largo plazo. El grado de pérdida de células del miocardio depende de la duración de la oclusión de la arteria coronaria, de la circulación colateral coronaria existente y la condición de la micro vascularización cardíaca. Paul et al., Am Heart J. 131: 710-15 (1996); Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Circulation 81:1161-72 (1990); Sheiban, I. e. al, J. Am. Coll. Cardiol. 38: 464-71 (2001); Braunwald E., Bristow, M. R, Circulation n 102: IV-14-23 (2000); Rich et al., Am. J. Med 92:7-13 (1992); Ren et al., J. Hystochem. Cytochem. 49: 71-79 (2002); Hirai, T. et al., Circulation 79:791-96 (1989); Ejiri, M. et al., J. Cardiology 20: 31-37 (1990). Debido a que las células del miocardio no tienen prácticamente ninguna capacidad de regenerarse, el infarto de miocardio conduce a una disfunción cardiaca permanente debida a la pérdida de células musculares contráctiles y su sustitución con una cicatriz fibrótica no funcional. Frangogiannis, N.G., et al., Cardiovascular Res. 53: 31-47 (2002). Además, la hipertrofia compensatoria del músculo cardiaco viable conduce a la insuficiencia micro vascular que da como resultado adicional la muerte de la función cardiaca causando la hibernación del musculo miocardial y la apoptosis de miocitos hipertrofiados en la zona periférica del infarto.

Entre los supervivientes de infarto de miocardio, la función cardiaca residual está influida en su mayor parte por el grado de remodelación ventricular (cambios significativos en tamaño, forma y función, típicamente un declive en la función, del corazón después de la lesión). Las alteraciones en la topografía ventricular (es decir, la forma, configuración o morfología de un ventrículo) ocurren en ambos el tejido infartado y el tejido cardíaco sano después del infarto de miocardio. Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Circulation 81: 1161-72 (1990). La dilatación ventricular (lo que significa un estiramiento, agrandado o extendido fuera de un ventrículo) provoca una disminución de la función cardiaca global y se ve más afectada principalmente por el tamaño del infarto, curación del infarto y por las tensiones (stresses) de la pared ventricular. Los recientes esfuerzos para minimizar la remodelación han tenido éxito debido a la limitación del tamaño del infarto a través de una rápida reperfusión (lo que significa restauración del flujo de sangre) usando agentes tromobolíticos y las intervenciones mecánicas, incluyendo, pero no limitándose a, la colocación de un stent, junto con la reducción de las tensiones (stresses) en la pared ventricular mediante el uso juicioso de terapias de precarga y la apropiada gestión de la post carga. Con independencia de estas intervenciones, un porcentaje importante de pacientes experimentan clínicamente relevantes disfunciones cardiacas a largo plazo después del infarto de miocardio. Sheiban, I. et al, J. Am Coll. Cardiol. 38: 464-71 (2001). A pesar de la revascularización de la circulación de las arterias relacionadas con el infarto y la gestión médica apropiada para minimizar las tensiones (stresses) en la pared ventricular, un porcentaje significativo de pacientes experimentan un remodelado ventricular, una disfunción cardiaca permanente y por lo tanto permanecen en un riesgo aumentado durante toda su vida de experimentar eventos cardíacos adversos incluyendo la muerte. Paul et al., Am. Heart J. 131:710-15 (1996); Pfeffer, M.A., Braunwald, E., Circulation 81:1161-72 (1990).

Al nivel celular, inmediatamente después de un infarto al miocardio, ocurre una transitoria disfunción cardiaca uniformemente generalizada. En el marco de una breve oclusión de la arteria coronaria (es decir, de una duración de tres minutos a cinco minutos), se deteriora el metabolismo de la energía, lo que conduce a la disfunción del músculo cardiaco demostrable que puede persistir durante hasta las 48 horas a pesar de la reperfusión inmediata. Este denominado "fenómeno de miocardio aturdido" ocurre subsecuentemente a o después de la reperfusión y se piensa que es un resultado de especies de oxígeno reactivas. El proceso es transitorio y no está asociado con una respuesta inflamatoria. Frangogiannis, N.G., et al., Cardiovascular Res. 53: 31-47 (2002). Después de la revascularización con éxito, sucede, una recuperación significativa del aturdimiento, dentro de los tres o cuatro días aunque la recuperación completa puede tomar mucho más tiempo. Boli, R., Prog. Cardiovascular Disease 40(6): 477-515 (1998); Sakata, K. et al., Ann. Nucleic. Med. 8:153-57 (1994); Wollert, K.C. et al., Lancet 364: 141-48 (2004).

La oclusión de la arteria coronaria de duración más significativa, es decir, que dura más de cinco minutos, conduce a una isquemia miocardial (es decir, un flujo de sangre insuficiente a la masa muscular del corazón) y está asociada con una respuesta inflamatoria significativa que comienza inmediatamente después de la reperfusión y puede durar hasta varias semanas. Frangogiannis, N.G., et al., Cardiovascular Res. 53: 31-47 (2002); Frangogiannis, N.G. et al., Circulation 98: 687-798 (1998).

El proceso inflamatorio que sigue a la reperfusión es complejo. Inicialmente contribuye al daño miocárdico pero más tarde conduce a la curación y a la formación de cicatriz. Este complejo proceso parece que sucede en dos fases. En la primera llamada también fase "caliente" (dentro de los primeros cinco días), especies de oxígeno reactivas (en el tejido del miocardio isquémico) y activación complementaria generan una señal quimio táctica para leucocitos (quimio tactismo es el movimiento dirigido de una célula móvil, organismo o parte hacia las condiciones ambientales que considere atractivas y/o el alejamiento de los alrededores de las que encuentra repelentes) e inicia una cascada de citoquinas. Lefer, D.J., Granger, D.N., Am J. Med. 4:315-23 (2000); Frangogiannis, N.G., et al., Circulation 7:699-710 (1998). La degranulación de mastocitos, el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α), la liberación y aumento de interleucina-6 (IL-6), la molécula de adhesión intercelular 1 ("ICAM-1 ó CD-54, un receptor típicamente expresado en las células endoteliales y en células del sistema inmunitario), la selectina (L, E y P) y la expresión de la integrina (CD 11a, CD11b y CD18) todos parecen contribuir a la acumulación de neutrófilos y a la degranulación en el miocardio isquémico. Frangogiannis, N.G. et al., Circulation 7: 699-710 (1998), Kurrelmeyer, K.M, et al.., Proc. Nat ' l Acad. Sci. 10: 5456-61 (2000); Lasky, L.A., Science 258:964-69 (1992); Ma, X.L., et al., Circulation 88 (2): 649-58 (1993); Simpson, P.J. et al., J. Clin. Invest. 2: 624-29 (1998). Los neutrófilos contribuyen significativamente al daño de las células del miocardio y a la muerte a través de la obstrucción micro vascular y la activación de vías de explosión respiratoria neutrofila tras la adhesión ligante-especifica a miocitos cardiacos. Entman, M.L., et al., J. Clin. Invest. 4:1335-45 (1992). Durante la fase "caliente", la angiogénesis está inhibida debido a la liberación de sustancias angiostáticas, incluyendo la proteína gamma-inducible interferon (IP 10). Frangogiannis, N.G., et al., FASEB J. 15: 1428-30 (2001).

En la segunda fase, comienza el proceso de reparación cardiaca (alrededor del día 6 a alrededor del día 14), que eventualmente lleva a la formación de la cicatriz (aproximadamente del día 14 a aproximadamente el día 21) y al subsecuente remodelado ventricular (alrededor del día 21 a aproximadamente el día 90). Poco después de la reperfusión, los monocitos infiltran el miocardio infartado. Atraídos mediante el complemento (C5a), el factor de transformación de crecimiento B1 ("TGF-B1") y la proteína quimio táctica de monocitos 1 ("MCP-1"), los monocitos se diferencian en macrófagos que inician el proceso de curación por compactación del tejido muerto, regulando el metabolismo de la matriz extracelular e induciendo la proliferación de fibroblasto. Birdshall, H.H., et al., Circulation 3:684-92 (1997). La secreción de interleuquina 10 (IL-10) mediante la infiltración de linfocitos también promueve la curación por la disminución regulada de las citoquinas inflamatorias y la influencia en la remodelación tisular. Frangogiannis, N.G. et al., J. Immunol. 5:2798-2808 (2000). Los productos mastocitos también parecen estar implicados en las posteriores etapas de la reparación del miocardio mediante la participación en la formación de tejido cicatricial fibrótico. El factor de célula madre (SCF) es un potente atrayente de células mastocitos. Ha sido mostrado el SCF mRNA para ser regulado en segmentos del miocardio isquémicos en un modelo de infarto de miocardio canino y de esta manera puede contribuir a la acumulación de mastocitos en los lugares del miocardio isquémico. Frangogiannis, N.G. et al., Circulation 98: 687-798 (1998). Los productos de mastocitos (incluyendo TGF-B, factor de crecimiento fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y gelatinasas A y B) inducen la proliferación de fibroblastos, influyen en el metabolismo de la matriz extracelular e inducen angiogénesis. Fang, K.C., et al., J. Immunol. 162: 5528-35 (1999); Takeshi, S., et al., 93 Cardiology: 168-74 (2000).

Tras un infarto de miocardio, ocurre una neo angiogénesis después de que disminuye la fase "caliente" del proceso inflamatorio (alrededor del día 5) coincidente con el aumento de los niveles de VEGF (los picos de VEGF se producen alrededor del día 7 y disminuye gradualmente la línea base alrededor del día 14 a alrededor del día 21). Durante esta fase del proceso de curación, son movilizadas las células precursor endoteliales (EPCs) y llevadas al sitio del infarto. Shinitani, S., et al., Circulation 103: 2776-79 (2001). Sin estar limitado por la teoría, se ha sugerido que el factor-1 derivado de las células estromales de quimiocina (SDF-1), que es el ligante para el receptor de quimiocina CXCR-4 expresado por las células CD34+, que también desempeña un papel en el autoguiado hacia el blanco de las células a las zonas de daño isquémico. Ceredini, D.J., et al. Nature Medicine 10: 858-63 (2004); Askari, a., et al., Lancet 362: 697-703 (2003); Yamaguchi, J.et al, Circulation 107: 1322-34 (2003). Mientras que es conocido que el SDF-1 juega un papel en la hematopoyesis y está involucrado en la migración, autoguiado y supervivencia de progenitores hematopoyéticos y mientras que el SDF-1 ha sido implicado en la neo vascularización isquémica in vivo mediante el aumento del reclutamiento de EPC a los sitios isquémicos (Yamaguchi et al., Circulation 107: 1322-1328 (2003), el papel del SDF-1 en la neo angiogénesis no es seguro. Hay evidencia sugestiva implicando al SDF-1. Por ejemplo, la expresión gene de SDF-1 es regulada durante la hipoxia, una deficiencia de oxígeno en los tejidos, mediante el factor 1 inducible de la hipoxia. Además, las células CD34+ son capaces de auto guiado hacia las zonas de isquemia, ricas en SDF-1, incluyendo el miocardio infartado. Askari et al., Lancet 362:697-703 (2003). Además, prácticamente todas las células CD34+ CXCR-4 co-expresan VEGF-2 y por lo tanto emigran en respuesta tanto al VEGF como al SDF-1. Peichev M., et al., Blood 95: 952-58 (2000). Las células CD34+ CXCR-4+VEGF-1, una vez reclutadas, son capaces de contribuir a la neo angiogénesis. Yamaguchi, J. et al., Circulation 107: 1322-34(2003).

Hasta la fecha, no existe una terapia ideal para prevenir las consecuencias adversas a largo plazo de la insuficiencia vascular, particularmente la insuficiencia vascular significativa que resulta de un infarto de miocardio. Mientras que la revascularización del vaso grande (es decir, la colocación con éxito de un stent) parece prometedora, los estudios hasta la fecha han demostrado que dichas aplicaciones son insuficientes para abordar el aumento en las exigencias planteado por la hipertrofia del miocardio compensatoria. Como resultado, sucede con frecuencia una extensión del infarto y el reemplazo fibroso, independientemente de la revascularización del vaso grande, de la gestión médica adecuada de las tensiones (stresses) de la pared ventricular y el natural potencial, aunque subóptimo, de la neoangiogénesis mediada por células CD34+ (una de las teorías relacionadas con la causa subyacente del infarto del miocardio es que la capacidad de movilizar estas células puede estar biológicamente limitada)

Se ha desarrollado un intenso interés en la evaluación de la capacidad de las células precursor del miocardio y endoteliales con el fin de limitar el daño al miocardio después de un infarto y para limitar o impedir el remodelado ventricular. Los datos preclínicos significativos y algunos datos clínicos demuestran la seguridad y el potencial de la terapia celular usando una variedad de precursores de células (células particularmente hematopoyéticas) para contribuir a la neo angiogénesis, la limitada miogénesis cardiaca (principalmente por la fusión) y preservación del musculo en la zona del infarto de miocardio. Véase, por ejemplo, Jackson, et al., J. Clin. Invest. 107: 1395-1402 (2001); Edelberg, J.M., et al., Cir. Res. 90: e89-e93 (2002); Schichinger, V. et al., New Engl. J. Med. 355 (12): 1210-21 (2006) (utilizando células del progenitor derivadas de médula de hueso); Assmus, B. et al., New Engl. J. Med. 355 (12) 1222-32 (2006) (usando las células del progenitor derivadas de médula de hueso), sin embargo, véase Lunde, K. et al., New Eng. J. Med. 355 (12): 1199-209 (2006) (usando las células del progenitor derivadas de médula de hueso).

La médula ósea consiste en una variedad de tipos de células maduras y precursoras, incluyendo las células hematopoyéticas (los precursores de las células de sangre maduras) y las células del estroma (los precursores de un amplio espectro de células del tejido conectivo), las cuales parece que son capaces ambas de diferenciarse en otros tipos celulares. Wang, J.S. et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 122:699-705 (2001); Tomita, S. et al., Circulation 100 (Suppl. II): 247-256 (1999); Saito, T. et al., Tissue Eng. 1: 327-43(1995). Han sido utilizadas sin modificar (es decir, no fraccionadas) las células de médula ósea o las células derivadas de sangre en varios estudios clínicos, por ejemplo, Hamano, K. et al, Japan Cir. J. 65:845-47 (2001); Strauer, B.E., et al., Circulation 106: 1913-18 (2002); Assmus, et al., Circulation 106: 3009-3017 (2002); Dobert, N. et al, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 8: 1146-51 (2004); Wollert, K.C. et al., Lancet 364: 141-48 (2004). Debido a que la fracción mono nuclear de la médula ósea contiene células del estroma, precursores hematopoyéticos y precursores endoteliales, permanece desconocida la contribución relativa de los, permanece desconocida, la contribución relativa de cada una de estas poblaciones a los efectos observados, si la hubiere.

El CD34 es un antígeno de células madre hematopoyéticas expresado selectivamente en células madre hematopoyéticas y células progenitor derivadas de la médula ósea humana, de la sangre y del hígado fetal. Yin et al., Blood 90: 5002-5012 (1997); Miaglia, S. et al., Blood 90: 5013-21 (1997). Las células que expresan CD34 se denominan CD34+. Las células del estroma no expresan CD34 y por lo tanto, son denominadas células CD34- las CD34 aisladas de la sangre humana pueden ser capaces de diferenciarse en los cardiomiocitos, en células endoteliales y en las células musculares lisas in vivo. Véase Yeh, et al., Circulation 108: 2070-73 (2003). Las células CD34+ representan aproximadamente el 1% de las células nucleadas derivadas de la médula ósea; El antígeno CD34 también es expresado por precursores de células endoteliales inmaduras; las células endoteliales maduras no expresan CD34+. Peichev, M. et al., Blood 95: 952-58 (2000). In vitro, las células CD34+ derivadas de médula ósea de adultos dan lugar a una mayoría de las colonias de células progenitoras de granulocitos/macrófagos (CFU-GM), algunos forman colonias unidades-mezcla (CPU-Mix) y una menor población de células progenitoras eritroides primitivas (explosionan formando unidades, eritrocitos o BFU-E). Yeh, et al., Circulation 108: 2070-73 (2003). Las células CD34+ también pueden tener el potencial para diferenciarse en o para contribuir al desarrollo del nuevo músculo del miocardio, aunque con baja frecuencia.

Se han desarrollado técnicas utilizando la separación por goteo inmunomagnético para aislar una altamente purificada y viable población de las células CD34+ de células mono nucleares de la medula del hueso. Ver documentos de patente U.S. Nº 5.536.475, 5.035.994, 5.130.144, y 4.965.205, el contenido de cada uno de los cuales se incorpora a este documento como referencia. Dos estudios clínicos apoyan la aplicación clínica de las células CD34+ derivadas de la médula después de infarto de miocardio. Véase C. Stamm, et al., Lancet 361: 45-46(2003); Herenstein, B. et al., Blood Supplement, Abs 2696 (2004).

El documento publicado de patente número U.S. 2005/0069527 Al divulga las formulaciones basadas en células y los kits relacionados para el tratamiento de los tejidos isquémicos tales como el miocardio isquémico. En particular, son divulgadas las formulaciones que incluyen las células precursor endoteliales enriquecidas CD133+ /CD34+.

Sin embargo, hasta la fecha, no existe terapia ideal para prevenir las consecuencias adversas a largo plazo de la insuficiencia vascular, particularmente de la insuficiencia vascular que produce infarto de miocardio.

La presente invención enfoca la cuestión de si una composición que incluye un producto de célula madre hematopoyética quimio táctica que comprende una población enriquecida de células CD34+ aisladas que contiene una sub población de células que tiene actividad quimio táctica puede ser

Fabricado, permaneciendo estable durante un período comercialmente viable y ser entregado a un sujeto que tenga necesidad del mismo de tal manera que células potentes puedan auto dirigirse y reparar sitios de insuficiencia vascular, incluyendo el miocardio infartado.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular en un sujeto tal y como se define en la reivindicación 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 muestra que la viabilidad funcional del producto de célula hematopoyética quimio táctica de la presente invención a las 72 horas es equivalente a la de las 48 horas.
La Fig. 2 muestra la eficacia migratoria del producto formulado de célula madre hematopoyética quimio táctica que incluye células CD34+ de la invención presente.
La Fig. 3 muestra la estabilidad mejorada de las células CD34+ formulada en suero humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las siguientes definiciones establecen los parámetros de la presente invención.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "angiogénesis" se refiere al proceso de formación y desarrollo de los vasos sanguíneos.

El término "c-kit" se refiere a una proteína en la superficie de algunas células que se une al factor de células madre (una sustancia que causa que crezcan ciertos tipos de células). Formas alteradas de este receptor pueden asociarse con algunos tipos de cáncer.

El término "biomarcadores cardiacos" se refiere a las enzimas, proteínas y hormonas asociadas con la función, daño o fallo del corazón, que se utilizan para propósitos de diagnóstico y pronóstico. Los diferentes biomarcadores tienen diferentes momentos en los que sus niveles se elevan, alcanzan los picos o máximos y caen dentro del cuerpo, permitiéndoles ser utilizados no sólo para seguir el progreso de un ataque al corazón pero también para estimar cuando comienza y supervisar para la recurrencia. Algunas de las pruebas son específicas para el corazón mientras que otras son también elevadas con daño muscular esquelético. Los actuales biomarcadores cardiacos incluyen, pero no se limitan a, CK (creatina fosfoquinasa o creatina quinasa) y CK-MB (los niveles de creatina-quinasa-mioglobina (para ayudar a distinguir entre el músculo del corazón y el músculo esqueletal)), troponina (los niveles de la troponina I o T en la sangre seguirán siendo altos durante 1-2 semanas después de un ataque al corazón; la troponina no es generalmente afectada por los daños a otros músculos), mioglobina (para determinar si el músculo, particularmente el músculo del corazón, ha sido herido) y BNP (péptido natri urético cerebral) o NT-proBNP (péptido natri urético cerebral pro hormona N-terminal (para ayudar a diagnosticar el fallo cardiaco y el grado de la severidad de ese fallo cardíaco).

El término "cateterismo cardíaco" se refiere a un procedimiento en el cual se pasa un catéter a través de una arteria hasta el corazón y en una arteria coronaria. Este procedimiento produce los angiogramas (es decir, imágenes de rayos x) de las arterias coronarias y el ventrículo izquierdo, la cámara de bombeo principal del corazón que pueden utilizarse para medir las presiones en la arteria pulmonar y para supervisar la función del corazón.

El término "células CD34+" tal y como es utilizado en este documento se refiere a las células progenitoras y madre hematopoyéticas y células derivadas de la médula de hueso humana que "son positivas para" es decir, "expresan", un antígeno de células madre hematopoyéticas, por lo menos una subpoblación de las cuales expresan CXCR4 y que pueden migrar a las áreas de lesión.

El término "CD38" se refiere a un marcador de proteína presente en los macrófagos, en las células dendríticas y en las células B y NK activadas, que puede mediar la adherencia entre los linfocitos y las células endoteliales.

Los términos "CD45" y "antígeno leucocitario común" se refieren a una proteína tirosina fosfatasa (PTP) localizada en las células hematopoyéticas excepto en los eritrocitos y las plaquetas.

El término "CD59" se refiere a un glicosilfosfatidilinositol (GPI)- vinculado a glicoproteína de membrana que protege las células humanas de la lisis mediada desde complemento.

El término "quimiotaxis" se refiere al movimiento dirigido de una célula móvil o parte hacia condiciones ambientales que ella misma considera atractivas y/o alejadas de un entorno que considera repelente.

El término "CXCR-4" tal y como se utiliza en este documento se refiere a un receptor de quimioquiina G-proteína-ligado.

El término "citoquinas" tal y como se utiliza en este documento se refiere a pequeñas sustancias de proteína soluble secretadas por las células que tienen una variedad de efectos sobre otras células. Las citoquinas median en muchas importantes funciones fisiológicas tales como el crecimiento, el desarrollo, la cicatrización de heridas y la respuesta inmune. Actúan mediante la unión a sus receptores específicos de célula situada en la membrana celular, que permite una cascada de transducción de señal distinta para iniciarse en la célula, que finalmente conducirá a cambios bioquímicos y fenotípicos en las células objetivo. Generalmente, las citoquinas actúan localmente. Se incluyen citoquinas de tipo I que las, que engloban muchas de las interleuquinas, así como varios factores de crecimiento hematopoyéticos; las citoquinas de tipo II, incluyendo los interferones y la interleuquina-10; el factor de necrosis tumoral "(TNF-)-relacionado con moléculas, incluyendo TNF y la linfotoxina; los miembros de la súper familia de la inmunoglobulina, incluyendo la interleuquina 1 ("IL-1"); y las quimioquinas, una familia de moléculas que desempeñan un papel crítico en una amplia variedad de funciones inmunes e inflamatorias. La misma citoquina puede tener efectos diferentes sobre una célula dependiendo del estado de la célula. A menudo las citoquinas regulan la expresión de y cascadas gatillo de otras citoquinas.

El término "factor estimulante de colonias" se refiere a una citoquina responsable de controlar la producción de células blancas de la sangre. Los tipos incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)y el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF).

El término "células madre hematopoyéticas" se refiere a una célula aislada de la sangre o de la médula ósea que puede renovarse a sí misma, diferenciándose en una variedad de células especializadas, movilizarse fuera de la médula ósea en la sangre circulante y que puede someterse a la muerte celular programada (apoptosis). En algunas realizaciones de la presente invención, las células madre hematopoyéticas derivadas de sujetos humanos expresan al menos un tipo de marcador de la superficie celular, incluyendo pero no limitando a, CD34, CD38, HLA-DR, c-kit, CD59, Sca-1, Thy-1, y/o CXCR-4 o una combinación de los mismos.

"HLA-DR" se refiere a un antígeno de histocompatibilidad clase II humana presente en varios tipos de células, incluyendo células antígeno-presente, células B, monocitos, macrófagos y células T activadas.

El término "interleuquina" tal y como es usado en este documento, se refiere a una citoquina secretada por las células blancas de la sangre como un medio de comunicación con otros glóbulos blancos.

Los términos "VEGF-1" o "factor-1 de crecimiento endotelial vascular" se usan indistintamente para referirse a una citoquina que interviene en numerosas funciones de las células endoteliales, incluyendo la proliferación, la migración, la invasión, la supervivencia y la permeabilidad. El VEGF es crítico para la angiogénesis.

El término "quimioquina" tal y como es usado en este documento, se refiere a una clase de citoquinas quimio tácticas que señalan a los leucocitos a moverse en una dirección específica. El término "quimio tácticos" se refiere al movimiento o la orientación de una célula a lo largo de un gradiente de concentración química igualmente acercándose o alejándose de un estímulo químico.

El término "hemograma completo" (CBC) se refiere a un examen de laboratorio que provee información detallada sobre la cuantía y la calidad de cada uno de los tipos de células sanguíneas. Generalmente incluye una medida de cada una de las tres células más importantes de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas) y una medida de la hemoglobina y el hematocrito. "Hemoglobina"

El (HGB) se refiere a la cantidad de gramos de hemoglobina en un decilitro de sangre (g/dL). Los niveles normales de hemoglobina en los sujetos humanos adultos sanos son de alrededor de unos 14 g/dL y alrededor de 18 g/dL para los hombres y de alrededor de unos 12 g/dL hasta alrededor de unos 16 g/dL para las mujeres. Como una guía aproximada, la hemoglobina generalmente debe ser alrededor de un tercio del hematocrito. El "Conteo de Glóbulos Rojos de la sangre (RBC) " se refiere al número total de glóbulos rojos en una cantidad de sangre. Los rangos normales en sujetos humanos son de alrededor de unos 4,5 millones de células/mm^3 a alrededor de unos 6 millones de células/mm^3 para los hombres y de alrededor de unos 4 millones de células/mm^3 a alrededor de unos 5,5 millones de células/mm^3 para las mujeres. El "Conteo" de Glóbulos Blancos de la sangre (WBC) se refiere al número total de glóbulos blancos o leucocitos en una cantidad de sangre. Los rangos normales en sujetos humanos son de alrededor de unos 4,3 x 103 células/mm^3 a alrededor de unos 10,8 x 103 células /mm^3. El "Hematocrito"(HCT) se refiere a la proporción de glóbulos rojos de la sangre como un porcentaje del volumen total de sangre. Un hematocrito normal para sujetos humanos es de alrededor del 40% a alrededor del 55% para los hombres y alrededor de un 35% a alrededor de un 45% para las mujeres.

El término "enfermedad" o "desorden", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un deterioro de la salud o una condición de funcionamiento anormal. El término "síndrome" tal como se utiliza en este documento, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de una enfermedad o condición. El término "condición", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una variedad de estados de salud y pretende significar que incluye trastornos o enfermedades causados por cualquier mecanismo subyacente o desorden, lesiones y la promoción de órganos y tejidos sanos.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "inflamación" se refiere a una respuesta a las infecciones y a las lesiones por la cual las células participantes en la destoxificación y en la reparación se movilizan hacia el sitio comprometido por los mediadores inflamatorios. La inflamación está a menudo caracterizada por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, particularmente de los neutrófilos (células polimorfas nucleares). Estas células promueven el daño en los tejidos por la liberación de sustancias tóxicas en la pared vascular o en un tejido no lesionado.

Independientemente del agente iniciador, los cambios fisiológicos que acompañan la inflamación aguda abarcan cuatro características principales: (1) la vasodilatación, que da como resultado un aumento neto en el flujo sanguíneo, es uno de las primeras respuestas físicas a la lesión aguda del tejido; (2) en respuesta a estímulos inflamatorios, las células endoteliales recubren la contracción de las vénulas, ensanchan las uniones intracelulares para producir las brechas, conducen al aumento de la permeabilidad vascular que permite la salida de proteínas de plasma y las células de la sangre fuera de los vasos sanguíneos; (3) a menudo, la inflamación se caracteriza por una fuerte infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, particularmente de los neutrófilos (células polimorfo nucleares). Estas células promueven el daño en el tejido por la liberación de sustancias tóxicas en la pared vascular o en el tejido no lesionado; y (4) la fiebre, producida por pirógenos liberados desde los leucocitos en respuesta a estímulos específicos.

Durante el proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios solubles de la respuesta inflamatoria trabajan junto con los componentes celulares de una manera sistémica en el intento de contener y eliminar los agentes que causan el dolor físico. Los términos "inflamatorios" o inmuno inflamatorios", tal y como se utilizan en el presente documento con respecto a los mediadores se refieren a los mediadores moleculares del proceso inflamatorio. Estas moléculas difusibles solubles, actúan localmente en el sitio del daño del tejido y de la infección y en sitios más distantes. Algunos mediadores inflamatorios son activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros son sintetizados y/o liberados de fuentes celulares en respuesta a la inflamación aguda o por otros mediadores inflamatorios solubles. Algunos ejemplos de los mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria, incluyen, pero no están limitados a, las proteasas de plasma, el complemento, las quininas, las proteínas fibrinolíticas y de coagulación, los mediadores lipídicos, las prostaglandinas, los leucotrienos, el factor de activación de plaquetas (PAF), los péptidos y las aminas, incluyendo pero no limitando a, la histamina, la serotonina y los neuropéptidos, las citoquinas proinflamatorias, incluyendo pero no limitando a, interleuquina-1, interleuquina-4, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral (TNF), interferón-gamma e interleuquina 12.

El término "en la fecha" se refiere al intervalo de tiempo entre la finalización de la adquisición del sujeto un preparación que incluye una población enriquecida de células CD34+ potentes de un sujeto bajo condiciones estériles y la iniciación de las células CD34+ potentes esterilmente purificadas desde la preparación. El término "fuera de la fecha" se refiere al intervalo de tiempo entre la terminación de la adquisición del sujeto de una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34+ potentes bajo unas condiciones estériles y la infusión en el sujeto de la composición farmacéutica formulada que comprende un producto celular hematopoyético quimio táctico.

Los términos "infundir" o "infusión" tal y como se utilizan en este documento se refieren a la introducción de un líquido distinto de la sangre en un vaso sanguíneo de un sujeto, incluidos los seres humanos, con fines terapéuticos.

La "solución de infusión" de la presente invención sin suero autologus contiene una solución salina tamponada de fosfato (PBS) suplementada con 25 unidades/ml USP de heparina y 1% de albúmina de suero humano (HSA). En algunas realizaciones, la solución de infusión se complementa con suero. En algunas realizaciones, el suero es autologus.

El término "lesión" se refiere a los daños o los perjuicios causados a la estructura o función del cuerpo de un sujeto ocasionados por un agente o fuerza, que puede ser físico o químico. El término "lesión vascular" se refiere a daños a la vasculatura (es decir, la red vascular, lo que significa la red de vasos sanguíneos o los conductos que transportan fluidos, tales como, sin limitación, la sangre o la linfa).

El término "macrófago" tal y como es usado en este documento se refiere a una célula activamente fagocítica mono nuclear, derivada de células madre monocíticas en la médula ósea. Estas células están ampliamente distribuidas en el cuerpo y pueden variar en morfología y en motilidad. Típicamente la actividad fagocítica está mediada por factores de reconocimiento de suero, incluyendo ciertas inmunoglobulinas y componentes del sistema complemento, pero también puede ser inespecíficas. Los macrófagos también están involucrados en ambos, en la producción de

anticuerpos y en las respuestas inmune celular-mediadas, particularmente en la presentación de los antígenos a los linfocitos. Secretan una variedad de moléculas inmuno reguladoras.

Los términos "microbio" o "microorganismo" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un organismo demasiado pequeño para ser visto claramente con el ojo desnudo, incluyendo pero sin limitarse a las bacterias microscópicas, los hongos (moldes), las algas, los protozoos y, a los virus.

El término "modular" tal y como se utiliza en este documento significa regular, modificar, adaptar o ajustar a una determinada medida o proporción.

El término "infarto de miocardio" se refiere a la muerte o daño permanente al músculo cardíaco. La mayoría de los ataques al corazón son causados por la obstrucción de las arterias coronarias que interrumpe el flujo de sangre y oxígeno al músculo del corazón, conduciendo a la muerte de las células del corazón en esa zona. El músculo cardíaco dañado pierde su capacidad para contraerse, dejando el restante músculo del corazón para compensar el área debilitada. La presente invención incluye pasos relacionados con la evaluación de la idoneidad de sujetos para el tratamiento de acuerdo con la presente invención mediante el uso de pruebas para observar el tamaño, la forma y la función del corazón según como late, para detectar cambios en el ritmo del corazón y para detectar y evaluar los tejidos dañados y las arterias bloqueadas. Ejemplos de estas pruebas incluyen, pero no se limitan a, la electrocardiografía, la ecocardiografía, la angiografía coronaria y la ventriculografía nuclear. También son utilizados biomarcadores cardiacos con el fin de evaluar la idoneidad de los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la presente invención.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "potente" o "potencia" se refiere a la actividad biológica necesaria del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención, es decir, las células potentes de la presente invención permanecen viables, son capaces de movilidad mediada y son capaces de crecer, es decir, para formar colonias hematopoyéticas en un ensayo in vitro CFU.

El término "célula progenitora" tal y como se utiliza en este documento se refiere a una célula inmadura en la médula ósea que puede ser aislada mediante el cultivo de suspensiones crecientes de células de médula ósea en platos de cultivo con factores de crecimiento agregados. Las células progenitoras maduran en células precursoras que maduran hasta convertirse en células sanguíneas. Las células progenitoras son contempladas como unidades formadoras de colonias (CFU) o como células formadoras de colonias (CFC). El linaje específico de una célula progenitora está indicado por un sufijo, tales como, pero sin limitarse a, CFU-E (eritrocítica), CFU-GM (granulocitica/macrófago) y CFU-GEMM (progenitoras hematopoyéticas pluri-potenciales).

El término "reparar" tal y como se utiliza en este documento como un sustantivo, se refiere a cualquier corrección, refuerzo, reacondicionamiento, remedio, medios para corregir, haciendo sonido, renovación, reparación, parches o similares que restauran la función. Cuando se usa como un verbo, significa corregir, reforzar, reacondicionar, remediar, compensar, al parecer, renovar, enmendar, parchear u otro que de cualquier manera restaure la función. En algunas realizaciones "reparación" incluye reparación completa y reparación parcial.

El término "Sca-1" o " antigeno-1 de célula madre" se refiere a un componente de la proteína de la superficie en un camino de señalización que afecta la habilidad de auto-renovación de las células madre mesenquimales.

El término "células madre" se refiere a células indiferenciadas que tienen alto potencial de proliferación con la capacidad de auto-renovación que puede generar células hijas que pueden estar bajo la diferenciación terminal en más de un fenotipo de células diferenciadas.

El término "stent" se utiliza para referirse a un tubo pequeño usado para abrir una arteria. El stent es colapsado en un diámetro pequeño, colocado sobre un catéter con globo, insertado a través de una arteria en la ingle (arteria femoral) o del brazo (arteria braquial) y roscado hasta la sección reducida/bloqueada de la arteria. Cuando llega a la posición correcta, el globo es inflado ligeramente para impulsar cualquier placa fuera del camino y a ampliar la arteria (angioplastia de globo). Cuando el globo se infla, el stent se expande, encaja en su lugar y forma un andamio para mantener la arteria abierta. El stent se queda permanentemente en la arteria. En ciertos sujetos, un stent reduce la recurrencia del estrechamiento que se produce después de la angioplastia de globo u otros procedimientos que utilizan catéteres. Un stent también puede ayudar a restablecer el flujo sanguíneo normal y mantener una arteria abierta si se ha roto o lesionado por el catéter de globo. El re-cerrado (reestenosis) es un problema con el procedimiento del stent. Los stents liberadores de fármacos son los stents recubiertos con fármacos que son liberados lentamente. Estos medicamentos pueden ayudar a impedir el cierre de los vasos sanguíneos.

El término "sujeto" tal y como se utiliza en este documento incluye especies animales de origen mamífero, incluyendo a los humanos.

El término "Thy-1" se refiere a la glicoproteína Thy-1 súper-familia Ig de la superficie de la célula expresada en las células inmunes y neuronas de roedores y seres humanos, que hipotéticamente funciona en la adherencia celular y la transducción de señal y en la diferenciación, proliferación y apoptosis de células T.

Tal y como se utiliza en este documento el término "tratamiento" incluye derogar, inhibir sustancialmente, frenar o revertir la progresión de una condición, mejorando sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una condición, previniendo substancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una condición y protegiendo de estímulos perjudiciales o molestos.

Las composiciones de la presente invención

En uno de los aspectos de la presente invención, las células madre hematopoyéticas de la presente invención pueden migrar, lo que significa que pueden moverse de un lugar, ubicación o área a otro. En una realización, la migración las células madre hematopoyéticas es impulsada mediante quimiotaxis.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos para la reparación del daño causado por insuficiencia vascular. Los términos "formulación" y "composición" son utilizados indistintamente en el presente documento para referirse a un producto de la presente invención que comprende todos los ingredientes activos e inertes. El término "activo" se refiere al ingrediente, componente o constituyente de las composiciones de la presente invención responsable del efecto terapéutico deseado. Los términos "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica" tal y como se utilizan en este documento se refieren a una formulación o composición que es empleada para prevenir, reducir en intensidad, curar o de otra manera tratar una condición objetivo o una enfermedad.

La composición farmacéutica para la reparación de lesiones vasculares de la presente invención se compone de un producto de célula madre hematopoyética quimio táctica que comprende una población enriquecida de células CD34+ que contiene una sub-población de células que tienen actividad quimio táctica enriquecida. En algunas realizaciones, esta actividad quimio táctica es mediada por SDF-1, VEGF y/o CXCR-4. De acuerdo con una realización, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas es preparado mediante el aislamiento o purificación de células madre hematopoyéticas CD34+ de la médula ósea extraídas del sujeto. De acuerdo con la presente invención, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas enriquecido por las células CD34+ contiene por lo menos alrededor del 70%, por lo menos alrededor del 75%, por lo menos alrededor del 80%, por lo menos alrededor del 85%, por lo menos alrededor del 90% o por lo menos alrededor del 95% de células CD34+ puras. En otra realización, por lo menos alrededor del 70%, por lo menos alrededor del 75%, por lo menos alrededor del 80%, por lo menos alrededor del 85%, por lo menos alrededor 90% o por lo menos alrededor del 95% de las células CD34+ son viables durante por lo menos alrededor de 24 h, por lo menos alrededor de 48 horas, o por lo menos alrededor de las 72 horas siguientes desde la adquisición de la población enriquecida de células CD34+. En otra realización, las células CD34+ pueden formar colonias hematopoyéticas in vitro para por lo menos alrededor de 24, por lo menos alrededor de 48 horas, o por lo menos alrededor de 72 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34+.

Las células CD34+ pueden ser enriquecidas/seleccionadas por cualquiera de las técnicas conocidas por el experto en la Técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la población de células de médula ósea que comprende células CD34+ es enriquecida por las células que expresan antígeno celular CD34 y antígeno celular CXCR4 mediante la clasificación de célula activada por fluorescencia (FACS). En algunas realizaciones, las células CD34+ en la médula ósea son enriquecidas/seleccionadas mediante técnicas de immuno separación positiva o negativa. En algunas realizaciones, el aislamiento y/o purificación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se basa en los métodos de fraccionamiento celular basados en el tamaño y en la densidad de la célula, la emanación de los tintes metabólicos o de resistencia a los agentes citotóxicos. En una realización, por ejemplo, las células CD34+ en la médula ósea están enriquecidas/seleccionadas usando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 y una técnica de separación immunomagnética.

Las células CD34+ seleccionadas pueden ser identificadas, cuantificadas y caracterizadas por técnicas conocidas en la Técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el porcentaje de células CD34+ en la médula ósea y en el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas puede determinarse mediante análisis FACS. En otra realización, la expresión de la proteína CD34 es cuantificada mediante la mancha Western (Western blot). El término "Western blot" se refiere a un método para identificar las proteínas en una mezcla compleja; las proteínas son separadas electroforéticamente en un medio de gel; transferidas desde el gel a una hoja o membrana de proteína vinculada; y la hoja o membrana que contiene las proteínas separadas expuestas a anticuerpos específicos que vinculan a, localizan y permiten la visualización de la(s) proteína(s) de interés. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-CD34 puede utilizarse para detectar proteína CD34 adherida a una membrana in situ.

En otra realización, se puede cuantificar la expresión de CD34, mARN y ADN en las células CD34 aisladas. El término “Northern blot” ("mancha Northern") como se utiliza en este documento se refiere a una técnica en la cual el ARN de un espécimen es separado en sus partes componentes en gel por electroforesis y transferido a un soporte de papel especialmente modificado para que el mARN se fije en sus posiciones electroforéticas. Las secuencias relacionadas con CD34 son identificadas mediante sondas que incluyen una molécula informadora, tales como, pero sin limitación, una etiqueta radiactiva. En otra realización, el nivel de expresión de CD34 y/o CXCR4 se determinó mediante técnicas cuantitativas o semi-cuantitativas PCR o la transcriptasa inversa PCR "(RT-PCR). La abreviación

"PCR" se refiere a la reacción en cadena de polimerasa, que es una técnica para ampliar la cantidad de ADN, haciendo, por lo tanto más fácil de aislar, clonar y secuenciar el ADN. Véase, por ejemplo, los documentos de patente U.S. Pat. Nº 5.656.493, 5.333.675, 5.234.824, y 5. 187.083, cada uno de los cuales se incorpora a este documento como referencia.

En otra realización, las células madre hematopoyéticas seleccionadas CD34+ del producto de célula madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención contienen una sub-población de células CD34+ que tienen actividad quimio táctica mediada por CXCR-4. En una realización preferente, el producto de células madre hematopoyéticas de la presente invención consta de un número mínimo de células madre hematopoyéticas CD34+ aisladas tal que está presente una sub-población de por lo menos 0,5 x 10^6 células CD34+ teniendo actividad quimio táctica mediada por CXCR-4. En otra realización, por lo menos el 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, ó 34% de actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 de las células CD34+ es retenido durante por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas o por lo menos las 72 horas siguientes a la adquisición de la población enriquecida de células CD34+. En otra realización, por lo menos un promedio de alrededor del 17% de actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 de las células CD34+ es retenido durante por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas o por lo menos 72 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34+. En otra realización, las células CD34+ en el producto de células hematopoyéticas quimio tácticas retienen por lo menos alrededor del 2% de actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 durante al menos durante 72 horas después de la adquisición de la población enriquecida de células CD34+.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención se compone de suero en una concentración de por lo menos el 10% en volumen de la composición. En una realización, el suero es autologus. En otra realización, el suero es un suero recombinante o sintético. La concentración mínima de suero presente en la composición es por lo menos del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65% ó 70% expresado en ml/100cc en volumen final de la composición. La máxima concentración de suero presente en la composición de la presente invención es de alrededor del 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% ó 10% expresado en ml/100cc de volumen final de la composición.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención puede formularse con un excipiente, portador o vehículo incluyendo, pero no limitando a, un solvente. Los términos "excipiente", "portador" o "vehículo" tal y como son utilizados en este documento se refieren a materiales portadores adecuados para la formulación y administración del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas, descrito en este documento. En este documento, los portadores y vehículos útiles incluyen cualesquiera materiales conocidos en la Técnica que son no tóxicos y que no interactúan con otros componentes. Tal y como es utilizada en este documento la frase "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier portador sustancialmente no tóxico utilizable para la formulación y administración de la composición de la presente invención en el cual el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención permanecerá estable y biodisponible.

El portador farmacéuticamente aceptable debe ser de suficientemente alta pureza y de toxicidad suficientemente baja para hacerle conveniente para la administración al mamífero que está siendo tratado. Además, debe mantener la estabilidad y la biodisponibilidad de un agente activo. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y es seleccionado, con la planeada manera de la administración en mente, para proporcionar el volumen deseado, la consistencia, etc., cuando se combina con un agente activo y otros componentes de una composición determinada. Por ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser, sin limitación, un agente de enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.), un rellenador (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil celulosa, poli-acrilatos, fosfato hidrogenado de calcio, etc.), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, glicoles de polietileno, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.), un desintegrante (por ejemplo, almidón, glicolato almidón de sodio, etc.) o un agente humectante (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.). Otros portadores farmacéuticamente aceptables convenientes para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, agua, soluciones salinas, alcoholes, glicoles de polietileno, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hydroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares. Tales soluciones portadoras también pueden contener búferes (tampones), diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "búfer" (“tampón”) tal y como es utilizado en este documento se refiere a una solución o líquido cuyo proceso químico neutraliza los ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Los ejemplos de búferes de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, la solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco (PBS), la solución de Ringer, un 5% de dextrosa en agua (D5W), la solución salina fisiológica/ normal (0,9% de NaCl). En algunas realizaciones, la solución de infusión es isotónica a los tejidos del sujeto. En algunas realizaciones, la solución de infusión es hipertónica a los tejidos del sujeto. Las composiciones de la presente invención que son para la administración parenteral pueden incluir portadores farmacéuticamente aceptables tales como soluciones acuosas estériles, soluciones no-acuosas en solventes comunes tales como alcoholes o soluciones en una base de aceite líquido.

En algunas realizaciones, el portador de la composición de la invención presente puede incluir un agente liberador tal como un portador para una liberación sostenida o un portador para una liberación retardada. En esas realizaciones, el portador puede ser cualquier material capaz de sostener o retrasar la liberación del activo para proporcionar una administración más eficiente, por ejemplo, que da como resultado menos frecuentes y/o disminuidas dosis de la composición, mejorar la facilidad de manejo y extender o retrasar los efectos sobre enfermedades, trastornos, condiciones, síndromes y similares, que están siendo tratados, prevenidos o promovidos. Los ejemplos sin limitación de tales tipos de portadores incluyen liposomas, micro-esponjas, micro-esferas o micro-cápsulas de polímeros naturales y sintéticos y otros similares. Las liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilaminas o fosfatidilcolinas.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral en forma de una suspensión acuosa inyectable estéril u oleaginosa. Los términos "parenteral" o "parenteralmente" tal y como se utilizan en este documento se refieren a la introducción en el cuerpo por medio de una inyección (es decir, la administración por inyección), incluyendo pero no limitando a, las técnicas de infusión. La composición de la presente invención, que incluye que un producto de células madre hematopoyéticas quimio táctico es aplicado al sujeto por medio de un catéter con globo adaptado para la entrega de las composiciones fluidas (es decir, composiciones capaces de fluir) en estructura anatómica seleccionada.

La composición estéril de la presente invención puede ser una solución estéril o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Una solución se considera generalmente como una mezcla homogénea de dos o más sustancias; es con frecuencia, aunque no necesariamente, un líquido. En una solución, las moléculas del soluto (o sustancia disuelta) están uniformemente distribuidas entre las del solvente. Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la cual unas especies finamente divididas están en combinación con otras especies, con el anterior estando tan finamente divididas y mezcladas que no se asientan rápidamente en la vida diaria, las suspensiones más comunes son las de sólidos en agua líquida. Entre los vehículos aceptables y solventes que pueden ser empleados están el agua, la solución de Ringer y una solución (salina) isotónica de cloruro de sodio. En algunas realizaciones, se emplean soluciones hipertónicas. Adicionalmente, aceites fijos, estériles, se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente convenientes consisten en soluciones, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextran.

Las composiciones adicionales de la presente invención pueden prepararse fácilmente usando la tecnología que se conoce en la Técnica, tal como se describe en las Remington Pharmaceutical Sciences, ediciones 18 ó 19, publicadas por la Mack Publishing Company de Easton, Pensilvania.

Tal y como se utilizan en este documento los términos "terapéuticamente eficaces", "cantidad de reparación de lesión vascular", "cantidad de reparación de insuficiencia vascular " o "cantidad farmacéuticamente efectiva" se refieren a la cantidad de las composiciones de la invención de dan resultado en un efecto beneficioso o terapéutico después de su administración a un sujeto. El efecto de reparación de la insuficiencia vascular, reparación de la lesión vascular, terapéutico o farmacéutico puede ser curado, minimizando, previniendo o mejorando una enfermedad o trastorno o puede tener cualquier otro efecto beneficial de reducción de la insuficiencia vascular, reparación de lesiones vasculares o farmacéutico. La concentración de la sustancia es seleccionada con el fin de ejercer su efecto de reparación de la insuficiencia vascular, reparación de la lesión vascular, terapéutico o farmacéutico, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios significativos dentro del ámbito y buen juicio del médico. La cantidad efectiva de la composición puede variar con la edad y la condición física del sujeto biológico que está siendo tratado, la severidad de la condición, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente, el momento de la infusión, el compuesto específico, la composición u otro ingrediente activo empleado, el portador particular utilizado y factores similares.

Un experto en la Técnica puede determinar una cantidad farmacéuticamente efectiva de las composiciones inventivas mediante la determinación de la dosis en una unidad de dosificación (lo que quiere significar unidad de uso) que provoca una determinada intensidad del efecto, en adelante denominado la "unidad de dosis". El término "relación dosis-intensidad de la relación" se refiere a la forma en que la intensidad del efecto en un recipiente individual se relaciona con la dosis. La intensidad del efecto señalada es generalmente de la frecuencia de datos de respuesta en una población. "Eficacia" tal y como es utilizado en este documento se refiere a la propiedad de las composiciones de la presente invención para lograr la respuesta deseada y "máxima eficacia" se refiere al efecto máximo alcanzable. La cantidad de producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas en las composiciones farmacéuticas de la presente invención que será efectiva en el tratamiento de una condición o desorden particular dependerá de la naturaleza del desorden o condición y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. (Véase, por ejemplo, Goodman and Gilman THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel g. Harman, Lee E. Limbird Eds.; McGraw Hill, Nueva York, 2001; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, Medical Economics Company, Inc., Oradell, NJ, 1995; y DRUGS, FACTS AND COMPARISONS, FACTS AND COMPARISONS, INC., St. Louis, Mo., 1993). La dosis precisa para ser empleada en las formulaciones de la presente invención también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o desorden

y debe ser decidido según el criterio del practicante y las circunstancias de cada sujeto. Se ha comprobado que los sujetos pueden beneficiarse de múltiples administraciones de la composición farmacéutica de la presente invención.

Se considera preferente que las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención contengan un numero mínimo de células madre hematopoyéticas CD34+ que tienen una sub-población de por lo menos 0,5 x 10^6 células CD34+ que tengan actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 por unidad de dosificación para la administración parenteral a discreción del médico.

En otro aspecto de la presente invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir además uno o más ingredientes activos compatibles que tienen por objetivo proporcionar la composición con otro efecto farmacéutico adicional al que proporciona el producto aislado de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención. "Compatibles" tal y como es utilizado en este documento significa que los ingredientes activos parte de una composición son capaces de ser combinados con otros de tal manera que no existe interacción que podría reducir sustancialmente la eficacia de cada ingrediente activo o la composición bajo condiciones ordinarias de uso. En algunas realizaciones, la terapia de combinación se compone de administrar a un sujeto que necesite del mismo una composición farmacéutica que comprende un producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención combinado con un agente seleccionado del grupo formado de un inhibidor enzima convertidor de la angiotensina (ACE), un betabloqueante, un diurético, un agente anti-arrítmico, un agent anti-anginal, un agente vasoactivo o inotropo, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico y un agente hipercolesterolémico.

En algunas realizaciones, la composición de la presente invención comprende además aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 5% de albúmina. En algunas realizaciones, la cantidad mínima de albúmina es aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 0,75%, aproximadamente el 0,10, aproximadamente el 1,25%, aproximadamente el 1,5%, aproximadamente el 1,75%, aproximadamente el 2,0%, aproximadamente el 2,5%, aproximadamente el 2,75%, aproximadamente el 3,0%, aproximadamente el 3,5%, aproximadamente el 4,0%, aproximadamente el 4,5%, ó aproximadamente el 5,0%, expresado en ml/100cc de volumen de la composición. En algunas realizaciones, la máxima cantidad de albúmina en las composiciones de la presente invención es aproximadamente el 5,0%, aproximadamente el 4,75%, aproximadamente el4,5%, aproximadamente el 4,25%, aproximadamente el 4,0%, aproximadamente el 3,75%, aproximadamente el 3,5%, aproximadamente el 3,25%, aproximadamente el 3,0%, aproximadamente el 2,75%, aproximadamente el 2,5%, aproximadamente el 2,25%, aproximadamente el 2,0%, aproximadamente el 1,75%, 1,5%, aproximadamente el 1,25% ó aproximadamente el 1,0%, expresado en ml/100cc de volumen de la composición. En algunas realizaciones, la albúmina es albúmina humana. En algunas realizaciones de la albúmina es albúmina humana recombinante.

Métodos de la presente invención

En otro aspecto, la invención presente proporciona un método para testear la esterilidad de la composición farmacéutica con se define en la reivindicación 8.

La evaluación de la esterilidad de la composición farmacéutica comprende los pasos de (i) centrifugar el producto de células madre hematopoyéticas quimio táctico que comprende células CD34 potentes para formar un pellet de células y un sobrenadante, comprendiendo el pellet celular las células CD34+ potentes; (ii) eliminar esterilizadamente el sobrenadante sin disturbar el pellet celular y (iii) analizar si el sobrenadante está contaminado por un microbio determinando de esa manera la esterilidad del pellet celular.

El proceso de adquisición celular quimio táctico puede ser una técnica de recogida de médula mini-ósea utilizada para adquirir una preparación que comprende una población enriquecida de células CD34+ potentes de la médula ósea del sujeto bajo condiciones esteriles. La técnica de recogida de la médula ósea comprende además los pasos: (i) las jeringas de recogida precargadas con heparina antes de la recogida de la médula ósea de un sujeto; (ii) la aspiración de la médula ósea de un cresta ilíaca posterior izquierda y una cresta ilíaca posterior derecha del sujeto utilizando las jeringas de recogida y una técnica de recogida de médula mini-ósea para formar médula ósea recogida; y (iii) la infusión de la médula ósea recogida en una bolsa de recogida. Las jeringas de recogida en el paso (i) y la bolsa de recogida en el paso (iii) pueden contener una solución heparinizada libre preservante que incluye una solución salino normal al 0,9%. La concentración final de heparina en la solución salina heparinizada es de alrededor de 20 unidades por ml a alrededor de 25 unidades por ml.

Opcionalmente, la médula ósea recogida es transportada a una instalación de procesamiento diferente de la instalación donde se recogió la médula ósea. El método para el transporte de la médula ósea recogida a la instalación de procesamiento puede constar de los pasos (a) la colocación de la médula ósea recogida en una bolsa de recogida; (b) la colocación de la bolsa de recogida en una bolsa secundaria; (c) la colocación de la bolsa secundaria que contiene la bolsa de recogida en un contenedor que comprende un compartimento interior que contiene hielo húmedo y por lo menos una hoja de plástico de burbujas; (d) la colocación de un supervisor de etiqueta de temperatura en el compartimiento interior de la caja de envío; (e) el sellado del contenedor; y (f) el envío del contenedor de transporte a la instalación de procesamiento.

La presente invención es útil en un método de tratar las lesiones debidas a la insuficiencia vascular en un sujeto que necesite del mismo. Este método puede abarcar los pasos: (a) evaluar si el sujeto está calificado para la terapia con la composición farmacéutica de la presente invención; (b) preparar la composición farmacéutica que comprende un producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas; (c) cargar la composición farmacéutica en un aparato de aplicación intravascular; (d) aplicar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica al sujeto intravascularmente (lo que significa dentro de un vaso sanguíneo); y (e) seguimiento de la función cardiaca del sujeto.

El sujeto puede ser un paciente de infarto de miocardio re-vascularizado. El término "re-vascularizado" tal y como se utiliza en esta realización se refiere a la colocación con éxito de un stent. Pueden utilizarse evaluaciones clínicas, por ejemplo, de insuficiencia coronaria utilizando pruebas de no-laboratorio, cateterismo cardíaco, medición de citoquinas inflamatorias y medición de biomarcadores cardíacos con el fin de determinar el momento oportuno para administrar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con los métodos de la presente invención. La detección de producción máxima en cascada de citoquinas inflamatorias puede permitir que la administración sea realizada a medida del marco más crucial para el sujeto en particular. La producción máxima en cascada de citoquinas inflamatorias puede ser determinada por la medición de los niveles de la (s) citoquina (s) apropiada (s) en el plasma y o en la orina. Alternativamente, los niveles de la (s) citoquina (s) apropiada (s) pueden ser medidos inmunoquímicamente, por ejemplo, por un inmuno-ensayo de enzima sándwich, por ensayos de inmunosorción de enzima-vinculada (ELISA) o por kits de gota múltiplex.

La composición puede ser administrada al sujeto después de un pico de producción máxima en cascada de citoquinas inflamatorias. La composición se puede administrar al paciente revascularizado del infarto de miocardio alrededor de los 5 días a alrededor de los 14 días después del infarto. El tiempo mínimo en el cual se administra la composición al paciente revascularizado del infarto de miocardio es de alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 días. El tiempo máximo en el cual se administra la composición es de alrededor de 14, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5.

El aparato para la aplicación intravascular utilizado para aplicar la composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto que necesita la misma consta de una jeringa de infusión, una jeringa de descarga, una llave (válvula) de cuatro vías y un catéter de globo. En una realización, la aplicación intravascular comprende (a) un dispositivo de infusión, conectado a una llave estéril de cuatro vías, conteniendo la composición farmacéutica que comprende el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas; (b) un dispositivo de descarga conectado a la llave estéril de cuatro vías, conteniendo, el dispositivo de descarga, una solución de lavado y (c) un catéter acoplado al aparato de aplicación mediante la llave estéril de cuatro vías. De acuerdo con una realización, el dispositivo de infusión es una jeringa hecha de cualquier material adecuado. El cuerpo y el mango de la apropiada llave de cuatro vías pueden hacerse del mismo o de un material diferente. Los ejemplos de llaves de cuatro vías adecuadas incluyen, sin limitación, una llave de paso que tiene un cuerpo de policarbonato/un mango de policarbonato, una llave de paso que tiene un cuerpo de polietileno/un mango de polietileno, una llave de paso que tiene un cuerpo de policarbonato/un mango de policarbonato o una llave de paso desechable. En otra realización, un dispositivo está, además, unido a la llave de paso para regular la presión ejercida sobre la solución aplicada. En algunas realizaciones un dispositivo integral de descarga o jeringa está conectado a la llave de paso. En una realización, el catéter es un catéter con globo. El término "catéter con globo" se refiere a un tipo de tubo flexible delgado "suave" que tiene un "globo" inflable en su punta el cual es usado durante el procedimiento de cateterización para agrandar una abertura estrecha o pasaje dentro del cuerpo. El catéter con el globo desinflado es posicionado, inflado para realizar el procedimiento necesario y desinflado otra vez para ser retirado.

La viabilidad y eficacia potencial del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención que incluye las células CD34+ potentes depende de que las células mantengan su potencia según vayan pasando a través de un catéter. El catéter utilizado en los métodos de la presente invención tiene como mínimo un diámetro interior de 0,36 mm. Cualquier tipo de catéter que tenga un diámetro interno mínimo de 0,36 mm puede ser eficaz en la aplicación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Por ejemplo, un catéter con control de flujo, que disminuye el drenaje de la sangre a través de la vasculatura de la arteria coronaria permite a las células el tiempo de tránsito a través de la pared del vaso sanguíneo y en el tejido.

En algunas realizaciones, el catéter es un catéter con globo. Por ejemplo, sin limitación, han sido validados los siguientes catéteres de dilatación con globo, de Cordis, Boston Scientific, Medtronic y Guidant que tienen un diámetro interno de alrededor de 0,36 mm (véase Tabla 1).

Tabla 1.Cateteres de globo validados para la infusión de células CD34+ a través del IRA

Fabricante	Nombre y núm. de modelo	Dimensiones del globo	Diámetro Interior Luz
Cordis	Raptor OTW 579-130	15 mm x 3.0 mm	0.36 mm (0.14 in.)
Boston Scientific	OTW Maverick 20620-1530	15 mm x 3.0 mm	0.36 mm (0.14 in.)
Medtronic	OTW Sprinter SPR 3015W	15 mm x 3.0 mm	0.36 mm (0.14 in.)
Guidant	Voyager OTW 1009443-15	15 mm x 3.0 mm	0.36 mm (0.14 in.)

Adicionalmente, los catéteres que han sido descritos tienen puerto de aplicación de fluido adyacente al globo de tal manera que el globo puede ser inflado contra una pared del vaso para aislar el sitio de aplicación hemodinámicamente frente al globo desde el puerto, el cual puede ser situado distalmente del globo. Adicionalmente, los catéteres de globo que han sido divulgados tienen los lúmenes terminando en los puertos laterales dispuestos proximalmente al catéter con globo; generalmente, estos catéteres con globo pueden ser conocidos como catéteres "globo/aplicación", aunque referencias particulares pueden utilizar diferentes descriptores. Véase, por ejemplo, el documento de patente U.S. Pat. Nº 5.415.636 de Forman.

En algunas realizaciones, el método de tratamiento o reparación de una lesión vascular incluye administrar la composición vía cateterización de globo en una arteria infartada. En algunas realizaciones, a continuación de la angioplastia es insertado un catéter de globo de aplicación vía una arteria femoral en una arteria coronaria deseada, tal como la arteria coronaria descendiente anterior izquierda. Algunas condiciones médicas pueden requerir tanto un catéter con globo y un catéter de aplicación de fluido para facilitar el tratamiento.

En algunas realizaciones, se utiliza un catéter para inyectar directamente las células en el miocardio.

Donde se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor de intervención, al décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualesquiera otros rangos más pequeños o valor de intervención en ese rango establecido también se engloba dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de los rangos más pequeños que puedan independientemente estar incluidos en los rangos más pequeños también se engloban dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido del rango especificado. Donde el rango establecido incluye uno o ambos de los límites, los rangos que están excluyendo tanto ambos esos límites incluidos también están incluidos en la invención.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado como es entendido comúnmente por una persona de habilidad ordinaria en la Técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento también pueden ser utilizados en la práctica o pruebas de la presente invención, los métodos y los materiales preferentes se describen ahora.

Tal y como se utiliza en este documento y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "a", "y", y "el" incluye referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado.

Las publicaciones discutidas en este documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento pretende ser interpretado como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar tal publicación en virtud de invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales de publicación que puede ser necesario confirmarlas independientemente.

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes divulgados con el propósito de proporcionar a aquellos de habilidad ordinaria en la Técnica con una divulgación completa y descripción de cómo hacer y usar la presente invención y no se pretenden que limiten el alcance de lo que consideran como su invención los inventores ni pretenden representar que los experimentos de más abajo son todos o el único de los experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben ser tenidos en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso promedio en peso molecular, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1. Selección de Sujetos Elegibles

Los sujetos/pacientes que presentan con síntomas y resultados clínicos sugestivos de un infarto de miocardio recibirán diagnóstico de emergencia y gestión clínica de acuerdo con las pautas institucionales. Si un transmural (es decir a través de la pared) confirma el infarto de miocardio, el tiempo de los primeros síntomas y el tiempo de éxito de la instalación del stent serán registrados. Los sujetos revascularizados recibirán tratamiento médico apropiado para reducir las tensiones (stresses) de la pared ventricular de acuerdo con las pautas institucionales. El término "revascularizado" tal y como se utiliza en esta realización, se refiere a la instalación de un stent con éxito.

Todos los tipos de stents, incluyendo los stents liberadores de fármacos (por ejemplo, paclitaxel o sirolimus) son aceptables para el uso en la revascularización de la arteria relacionada de infarto ("IRA"). Los estudios previos empleando catéteres con globo para infusionar productos celulares no han informado de límites para el diámetro del vaso de referencia para la colocación del stent. Puesto que este estudio está diseñado para distribuir el producto celular en la circulación de la IRA y en un intento por limitar el potencial de daño a los vasos muy pequeños, la presente invención requiere que los stents sean colocados antes de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención.

Los efectos de los fármacos relacionados con el stent ocurren predominantemente en el sitio de contacto del stent con la pared del vaso. Consecuentemente con la dilatación con globo, existe un flujo de sangre limitado a través del stent durante la infusión celular y por lo tanto, no se espera ningún efecto significativo adverso del debido al fármaco en las células CD34+ en el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas. Insistiendo sobre ello, los estudios clínicos anteriores han demostrado que durante las 96 horas después de la activación de los fármacos de la colocación del stent, los niveles de sangre entera o tanto de paclitaxel o sirolimus están debajo de los límites de detección. Por lo tanto, los niveles de tejido en los sitios del miocardio a los cuales son infundidas las células CD34+ que tienen actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 pretenden migrar se espera que sean inconsecuentes. Véase Sousa, J. et al., Circulation 107: 2274-79, 2383-89 (2003).

Durante la revascularización, la función cardiaca y la perfusión del sujeto serán evaluadas mediante los métodos estándar. Las medidas pertinentes de la función cardiaca tras un infarto de miocardio incluyen la evaluación de las fracciones de eyección global y regional, los volúmenes ventriculares, la perfusión de stress y descanso, movimiento de la pared segmentada y el tamaño del infarto.

La ecocardiografía, la exploración con radionúclidos (por ejemplo, Multiple Gated Acquisition Scan (MUGA), un escaneo nuclear que evalúa la función de bombeo de los ventrículos, cámaras y cómo el corazón se contrae) y la ventriculografía izquierda son medidas todas ellas que son fácilmente disponibles y precisas de la fracción de eyección ventricular izquierda (“LVEF”). La ecocardiografía ha sido utilizada para determinar los volúmenes diastólico-final y sistólico-final mediante el método de longitud de área biplano. El índice de puntuación de movimiento de la pared ventricular izquierda ("WMSI") se calcula dividiendo el ventrículo izquierdo en segmentos y luego clasificando el movimiento de la pared sistólica y el engrosamiento por un índice de puntuación semi-cuantitativo como sigue: 1 = normal o hiperquinesia; 2 = hipoquinesia; 3 = aquinesia; y 4 = disquinesia. Tal y como se utiliza en este documento, el término "hiperquinesia" se refiere a un movimiento excesivo o actividad muscular; el término "hipoquinesia" se refiere a un movimiento lento o disminuido o actividad muscular; el término "aquinesia" se refiere a la pérdida o ausencia de movimiento o actividad muscular; y el término "disquinesia" se refiere a movimiento anormal o actividad muscular. El WMSI se obtiene entonces dividiendo la suma de las puntuaciones de los segmentos por el número de segmentos evaluados. Véase Schiller, N.B. et al., J. Am. Soc'y Echocardiogr. 2: 358-67 (1989). Las nuevas modalidades ecocardiográficas permiten la evaluación de la fracción de eyección regional, la perfusión miocárdica y las anormalidades de la pared después del stress.

Otras medidas de la función cardiaca en el período posterior al infarto incluyen la evaluación del índice de volumen de la obstrucción y la velocidad del acortamiento de la fibra circunferencial. Strauer, et al., Circulation 106: 1913-18 (2002). La evaluación de la reparación del miocardio infartado también ha incluido la evaluación de la perfusión de la región periférica del infarto usando la escintigrafía de talio. *Id*. Más recientemente, las imágenes por resonancia magnética (RMN) (MRI, siglas en inglés) parecen ser la herramienta más útil para evaluar la función cardiaca y la viabilidad (tamaño del infarto) en este escenario. Véase Yin, A, et al., Blood 90: 5002-5012 (1997).

El día después de la colocación con éxito del stent, los sujetos serán evaluados para la elegibilidad del estudio y, si son apropiados, les será ofrecido el consentimiento informado para participar en el estudio. Los sujetos que exhiban síntomas durante no más de tres (3) días antes de la colocación con éxito del stent serán evaluados, antes de la descarga, para la elegibilidad del estudio. A los sujetos encontrados para satisfacer los criterios de elegibilidad (véase más adelante) se les ofrecerá el consentimiento informado para participar.

Los sujetos que hayan consentido tendrán un ecocardiograma de entrada al estudio no antes de las 96 horas después de la colocación del stent. Los sujetos son elegibles para continuar en el estudio si la LVEF es menor o igual al 50% en la ecocardiografía y una anormalmente pared segmental ventricular es observada en la IRA. Los sujetos elegibles pueden completar inmediatamente la función cardiaca basal y la evaluación de la perfusión.

En concreto, la función cardiaca basal incluye: la ecocardiografía transtorácica en reposo y con dobutamina de dosis baja para evaluar la función cardiaca incluyendo la fracción de eyección, volúmenes sistólico final y diastólico final y el índice del movimiento de la pared y la viabilidad. La ecocardiografía de contraste miocárdico se utilizará para evaluar el movimiento de la pared del segmento y flujo sanguíneo miocárdico al nivel del tejido. También serán evaluadas las tasas de deformación miocárdica. Se evaluará la perfusión utilizando un escaneo de radionúclidos de rutina Tc- 9m Sestamibi en reposo y después de la adenosina intravenosa. El movimiento y global y regional de la pared, el tamaño del infarto y los volúmenes ventriculares izquierdos ("LV") se medirán usando MRI. Los sujetos recibirán contraste de Gadolinio durante el escaneado. La resonancia magnética utilizará la técnica de mantenimiento de la respiración. Se realizará la precesión de estado estacionario de imágenes para obtener la función LV global y regional como en el caso de la imagen de Gadolinio. Los volúmenes ventriculares sistólico final y diastólico final, LVEF, dimensión diastólica LV final, el espesor de la pared en sístole y diástole de la región infartada y el tamaño del infarto serán reportados utilizando el modelo 17-segmento AHA/AVV con extensión transmural del infarto reportado como <25%, 26%-50%, 51%-75% y >76%. Un laboratorio de revisión central evaluará la MRI con el intérprete cegado a la cohorte del estudio.

Para ser seleccionadas para este estudio, los sujetos deberán cumplir con todos los criterios clínicos siguientes ("criterios de inclusión"):

- Edad: 18 a 75 años;
- Infarto agudo de miocardio con elevación segmental ST cumpliendo con los criterios ACC/AHA, con síntomas de dolor de pecho dentro de los 3 días de admisión. Los criterios incluyen (Elevación del segmento ST > 1mm en derivaciones de extremidades o 2 mm en dos o más derivaciones precordiales y niveles aumentados de troponina, creatina quinasa MB (CPK MB) o ambas cosas), New York Heart Association (NYHA) clase de fallo de corazón (para ser registrado) de I, II o III
- Elegibles para la intervención coronaria percutánea (ICP)
- Elegibles para MRI;
- Elegibles para obtener imágenes mediante Tomografía computerizada de emisión de protón único (SPECT);
- Conclusión del laboratorio de ecocardiografía de la capacidad para evaluar adecuadamente los parámetros cardiacos después de la revisión de la ecocardiografía de admisión;
- Ecocardiograma de entrada al estudio (96 a 144 horas {es decir, alrededor de 4 días a alrededor de 6 días} después de la colocación del stent), LVEF menor o igual al 50% en la ecocardiografía y anormalidad de la pared ventricular segmental en la circulación de la IRA mediante ecocardiografía después de la reperfusión;
- El sujeto debe ser capaz de dar consentimiento informado por escrito y debe estar dispuesto a participar en todas las evaluaciones de seguimiento requeridas;
- Los sujetos deben tener un contenido de hemoglobina (Hgb) > 10 gramos/dL, un conteo de glóbulos blancos de la sangre (WBC) > 3500 células/mm^3, un conteo de plaquetas > 100.000 células/mm^3 y un ratio normalizado internacional (INR, una prueba de coagulación de sangre) < 2.0 el día antes de la recogida de la médula ósea;
- Los sujetos deben tener una creatinina del suero < 2.5, una bilirrubina total < 2.0 dentro de 7 días de la recogida de la médula ósea;
- La IRA y la lesión objetivo deben ser claramente identificables cuando la enfermedad está presente en más de un vaso;
- La reperfusión y la colocación de stent intracoronario con éxito, con Trombolisis en infarto de miocardio (TIMI) de flujo 2 ó 3 y la IRA con < 20% de estenosis después de la revascularización;
- Los sujetos deben considerarse elegibles para recibir sedación consciente, recogida de médula mini ósea y segunda cateterizacion para la infusión de producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas;
- El tipo de stent utilizado y la hora y la fecha de la inserción deberán ser registrados
- Los stents liberadores de fármaco deben limitarse a tipos de paclitaxel o sirolimus;
- Los sujetos incluidos deben tener una supervivencia prevista de al menos un año y no deben tener enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización o esperar para requerir la intervención dentro de los 6 meses de la entrada al estudio.

Los sujetos que cumplan alguno de los siguientes criterios no se califican para y quedarán excluidos de, el estudio ("criterios de exclusión"):

- Sujetos que no son candidatos para la intervención percutánea, sedación consciente, MRI, SPECT de imágenes o la recogida de médula mini-ósea;
- Historia sostenida del dolor de pecho que no se alivia con nitratos, sucediendo 4 ó más días antes de la revascularización;
- Los sujetos que no pueden volver a inundar la arteria coronaria relacionada con el infarto o de la colocación del stent sin éxito;
- Conclusión del laboratorio de ecocardiografía después de la revisión ecocardiografíca de admisión de que no es adecuado para la evaluación de parámetros cardíacos;
- Los sujetos que se presentan con shock cardiogénico (presión sistólica < 80 en vasopresores o contra pulsación intra aórtica);

- Los sujetos con una rama lateral de la lesión objetivo > 2 mm y con estrechamiento ostial > 50% de estenosis de diámetro después de la revascularización;
- Los sujetos incapaces de recibir aspirina, clopidogrel o ticlopidina;
- Los sujetos que están recibiendo warfarina_deben tener un INR menor o igual a 2; el término INR se refiere al INR International Normalized Ratio, que es un sistema establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Comité Internacional sobre sobre la Trombosis y la Hemostasia para informar de los resultados de los exámenes de la coagulación de la sangre (coagulación);
- Los sujetos con estenosis aortica severa;
- Los sujetos con estados de inmunodeficiencia severa (por ejemplo, SIDA);
- Los sujetos con cirrosis que requieren gestión médica activa;
- Los sujetos con malignidad que requieren tratamiento activo (excepto el cáncer de piel de células basales)
- Los sujetos con documentado abuso activo de alcohol y/o de otras sustancias;
- Las hembras de potencial espera de niño teniendo por lo menos una prueba de que es negativo el embarazo dentro de los 7 días de la recogida de médula mini-ósea;
- Los sujetos con fracciones de eyección superiores al 50% en el ecocardiograma de entrada al estudio (96 a 144 horas después de la colocación del stent);
- Los sujetos con menos de tres meses del procedimiento de índice posterior a la terapia antiplaquetaria planeada;
- Los sujetos con enfermedad de múltiples vasos después de la revascularización que requieren intervención planeada subsecuente durante los próximos 6 meses;
- Los sujetos con participación en un ensayo en fase de investigación en curso.
- Los sujetos con infección bacteriana activa que requieren antibióticos sistémicos;

Las evaluaciones basales de la función cardiaca y la perfusión cardiaca serán obtenidos un día antes de la recogida de médula mini ósea planeada y la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas (véase más abajo). Una recogida de médula mini-ósea ("MMH") se realizará el día siguiente de la evaluación basal de la función cardíaca y la perfusión cardíaca.

Ejemplo 2. Cateterizacion Cardíaca

Preparación Estéril y Vestimenta adecuada

El sujeto será llevado al Laboratorio de Cateterización Cardiaca después de que el investigador ha obtenido un consentimiento informado. El sujeto recibirá una preparación estéril y vestimenta en el Laboratorio de Cateterización Cardíaca.

Cateterización Cardíaca

Se obtendrá el acceso vascular mediante la técnica estándar utilizando la ingle derecha o izquierda. Se colocará una vaina en la arteria femoral o en la arteria braquial derecha o izquierda. Será realizado un examen arteriográfico coronario con el fin de obtener vistas estándar de ambas arterias coronarias derecha e izquierda. Serán obtenidas varias vistas para identificar la previamente dotada con stent arteria infartada relacionada. Todos los sujetos recibirán medicamentos estándar durante el procedimiento de cateterismo de acuerdo con la práctica habitual.

Ejemplo 3: Proceso de Adquisición Para Adquirir el Producto de Células Madre Hematopoyéticas Quimio tácticas que puede Entonces Ser Enriquecido Para Células CD3+

Mientras que es contemplado que cualquier proceso de adquisición puede ser apropiado para adquirir el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye células CD34+ potentes, en el siguiente ejemplo se ilustra un proceso de ese tipo que en el presente documento se denomina técnica de recogida de médula mini ósea.

Preparación de las Jeringas de Recogida

Antes de la recogida de la médula ósea, cuarenta jeringas de 10cc cargadas con alrededor de de 2-ml de una solución salina heparinizada libre de preservativos (alrededor de 100 unidades/ml a alrededor de 125 unidades/ml, APP. Cat. Nº 42592B o equivalente) serán preparadas bajo condiciones de esterilidad. La heparina será inyectada vía un puerto estéril en cada una de las dos bolsas de 100 ml de solución salina norma estéril al 0,9% ("Normal Saline", Hospira Cat. Nº 7983-09 o equivalente) después de la retirada de 10 cc a 12,5 cc de solución salina normal de cada bolsa, resultando en una concentración final de heparina de alrededor de 100 unidades/ml (U/ml) a alrededor de 125 unidades/ml (U/ml). Se cargarán 2-ml de solución de heparina libre de preservativos (alrededor de 100 U/ml a alrededor de 125 U/ml) bajo condiciones estériles en cada una de las cuarenta jeringas de 10cc, que luego son tapadas y colocadas en una bolsa estéril para el transporte al sitio de la recogida.

Los sujetos se prepararán para la recogida de la médula ósea después de que el consentimiento informado por escrito ha sido obtenido tal como se ha detallado en el Ejemplo 1. Se proporcionará una sedación consciente

utilizando los procedimientos estándar y las directrices institucionales. La recogida de la medula de hueso se realizará bajo condiciones estériles. El término "condiciones estériles" tal y como es utilizado en este documento incluye la limpieza y la utilización de batas apropiadas con una máscara y guantes estériles usados por el responsable de la recogida y el ayudante. El proceso de recogida puede realizarse fuera de una sala de operaciones como sigue: después de la preparación estéril y la vestimenta, cada cresta ilíaca debe ser anestesiada con una solución de lidocaína al 1%, usando un mínimo de 10 ml para cada cresta. El área de anestesia debe ser un área circular de no menos de 10 cm de diámetro. Se inserta la aguja de recogida hasta que la cresta ilíaca está perforada. La tapa y el estilete se retiran y 2 ml de médula ósea son recogidos en la jeringa de recogida de 10 ml que contiene los 2 ml de solución de la solución de heparina. Entonces es retirada la jeringa y colocada en el ámbito estéril. Después de volver a insertar el estilete, la aguja de recogida es avanzada ligeramente y luego girada 90 °. Entonces se retira el estilete y unos 2 ml adicionales de médula ósea son introducidos en la jeringa de recogida obtenida del ámbito estéril. Este procedimiento es repetido dos veces más hasta que la jeringa contiene contiene 8 ml de médula ósea para un total de 10 ml de médula heparinizada con una concentración final de heparina de alrededor de 20U/ml a alrededor de 25U/ml. Finalmente la jeringa de recogida una vez completa es entregada al ayudante de la recogida que la agita y la infusiona en la bolsa de recogida estéril como se describe a continuación. El médico responsable de la recogida toma entonces la otra aguja de recogida que ha sido lavada previamente con la solución de heparina y se repite este proceso.

La jeringa de recogida completa se infusiona en la bolsa de recogida estéril como sigue. El ayudante de recogida que está manejando la jeringa de recogida llena y la vacía en la bolsa de recolección de 500 ml a través del adaptador estéril conectado a la bolsa. Luego la aguja de recogida es lavada con la solución de heparina en la jeringa lavada y devueltas al ámbito estéril.

El proceso de recogida se repite en una cresta ilíaca hasta que unas 19 jeringas han sido recogidas y vaciadas en la bolsa de recolección. El mismo proceso se repite en la otra cresta ilíaca hasta que alrededor de otras 19 jeringas han sido llenadas. Un total de treinta y ocho aspiraciones de 8 ml de ambas crestas ilíacas (idealmente 19 de cada cresta ilíaca) darán como resultado 302-ml de médula de hueso recogidos en un volumen final de 380 ml en una concentración de heparina de alrededor de 20 U/ml a alrededor de 25 U/ml.

La bolsa de recogida es sellada mediante el atado del tubo de conexión tres veces y entonces cerrada mediante abrazadera distal con respecto a los lazos. La bolsa es apropiadamente etiquetada como "Recogida de médula ósea humana" y los resultados del procedimiento de recogida, incluyendo el volumen final recogido y cualquier complicación relacionada con el procedimiento, se registran en el formulario de informe de caso (MCRS) de Mayo Clinical Score Risk. La etiqueta completa es fijada a la bolsa de la médula ósea. Entonces, la bolsa se coloca en una bolsa de transporte estéril para ser transportada a la instalación de procesamiento.

Ejemplo 4. Preparación del Producto de la Médula Ósea para el Transporte

La médula de hueso recogida pueden ser transportada a la instalación de procesamiento de la siguiente manera. Cuando el sitio clínico está preparado para enviar la preparación de la médula ósea, se proporcionará un aviso con 24 horas a la instalación de procesamiento. El laboratorio de procesado hará los arreglos del envío a la mayor brevedad de tiempo posible para la recogida de la entrega en el mismo día para entrega el mismo día al laboratorio de procesamiento. Inmediatamente después de la médula ósea es recogida, se colocará el producto de la médula ósea en el contenedor suministrado para el envío. El contenedor de envío contiene dos pequeños bloques de hielo húmedo en la parte inferior y una hoja de envoltorio de burbuja encima del hielo húmedo. El producto de la médula ósea se coloca en una bolsa secundaria y la bolsa secundaria es colocada encima del envoltorio de burbuja. Un monitor de etiqueta de temperatura (un sensor utilizado para monitorizar la temperatura interna) es fijado en el interior de la caja. Entonces se coloca otra capa de envoltorio de burbuja sobre el producto antes de que el contenedor de envío sea sellado.

Ejemplo 5: La Selección de las Células CD34+ del Producto de Médula Ósea Recogida

Las células CD34+ serán aisladas del producto de médula ósea recogida. Las células CD34+ pueden ser aisladas utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CD34 (Mab), Dynabeads ® M-450 Sheep anti-Mouse IgG y PR34+ (™) componentes del Agente Liberador de Células Madre del Isolex 300i Magnetic Cell Selection System (Baxter Healthcare Corp. Cat. Nº 4R9734) tal y como se describe en los documentos de patente U.S. Nº 5.536.475, 5.035.994, 5.130.144, 4.965.204, 5.968.753, 6.017.719,6;251.295, 5,980,887, 6,676,937, en el documento publicado de solicitud de patente U.S. Published Application Nº 2003/0232050 y en el inserto del envase Isolex 300i. Ha sido adaptado este sistema de funcionamiento para el aislamiento de las células CD34+ de médula ósea.

A su llegada al laboratorio de procesamiento, el producto de médula ósea recogida (en la bolsa de recogida) es inspeccionado inmediatamente y la bolsa comprobada para cualquier fuga. La recogida debería tener flujo libre sin grumos aparentes y no debe estar hemolizada. La recogida no se utilizará si la integridad de la bolsa ha sido violada en modo alguno.

El producto de la médula ósea debe procesarse dentro de las 12 horas hasta las 24 horas desde la inspección. Se obtiene un contenedor de empaquetado de transferencia de 300 ml ó 400 ml y un conjunto (set) de transferencia de plasma es conectado al puerto de muestreo del contenedor. El producto de la médula ósea se transfiere de la bolsa de recogida al contenedor de empaquetado de transferencia. El producto de la recogida de médula ósea reunido es mezclado cuidadosamente invirtiendo el contenedor veinte (20) veces.

El producto de la recogida de médula ósea reunido se muestrea entonces para el análisis. Un volumen total de 2,0 ml del producto es retirado y distribuido de forma alícuota como sigue: 0,3 ml se utiliza para realizar por duplicado el conteo sanguíneo completo (CBC, siglas en inglés) usando un analizador de hematología; 0,2 ml se dispensa en un tubo de vidrio de 75 x 100 mm para la detección de bacterias Gram positivas y Gram negativa mediante Gram Stain (Gram Stain Kit, VWR, Cat. No. BB231401); se dispensan, como una comprobación de la esterilidad, 0,6 ml en un Caldo de Soja Tríptico (*Tryptic Soy Broth)* (TSB) (VWR, Cat. Nº 29446-184) una botella para el ensayo de crecimiento de bacterias aerobias, 0,6 ml se dispensan en una botella de Medio Fluido Tioglicolato (*Fluid Thioglycollate Media)* (FTM) (VWR Cat. #29446-138) para el ensayo de crecimiento de bacterias anaeróbicas y 0,3- ml es usado en el análisis de flujo para la enumeración de células y viabilidad de células CD34+.

La recogida es pesada en una báscula electrónica y el apropiado peso de la tara de la bolsa de recogida es registrado. La relación del volumen del producto de la médula con el peso del producto se puede expresar como

Volumen (ml) = [Peso (gm) de producto – Tara del peso de la bolsa (gm)] ÷ 1,06 (gm/ml) (Fórmula I)

El número de Células Nucleadas Totales (TNC, siglas en inglés) en el producto de la médula ósea se calcula usando el conteo de glóbulos blancos de la sangre (WBC, siglas en inglés) obtenido desde el CBC según la siguiente relación:

TNC = WBC/µl x 1000 x Volumen de producto (ml) (Fórmula 2)

El número de células CD34+ en el producto de la médula ósea se calcula de la siguiente relación:

Células Totales CD34+ en el producto de la médula ósea = Número de células CD34+/µl x 1000 x Volumen de producto (ml) (Fórmula 3)

El volumen de glóbulos rojos de la sangre (RBC, siglas en inglés) del producto de la recogida de la médula ósea se calcula a partir de la siguiente relación:

Volumen RBC (ml) = Volumen del producto (ml) x Hematocrito (%)/100 (Formula 4)

Si la recogida contiene más de 20 ml de RBC, es necesaria la reducción de glóbulos rojos de la sangre. Los RBCs son reducidos mediante la centrifugación. La centrifugación a 1000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente se realiza para separar el recubrimiento brillante (buffy coat) de los RBCs. El término "buffy coat" se refiere a una fracción blanca grisácea fina de una muestra de sangre que contiene la mayoría de células blancas de la sangre (leucocitos). Inmediatamente después de la centrifugación, una jeringa de 60 ml es conectada a la parte inferior de la bolsa de centrifugación y se retiran los glóbulos rojos RBCs. Puede necesitarse más de una jeringa para recoger todos los RBC empaquetados. El producto de médula ósea con reducción de los RBCs es entonces lavado para retirar los contenidos de grasa.

Se utiliza una jeringa de 1 ml para retirar 0,3 ml del producto celular de médula ósea con reducción de los RBCs a través del conjunto de transferencia unido a la bolsa de producto y es realizado un CBC. El TNC del producto de médula ósea con reducción de los RBCs es determinado de la siguiente relación:

TNC Total del producto con reducción de los RBCs = WBC/µl de producto con reducción de los RBCs x 100 180 ml (Fórmula 5)

La recuperación del TNC del producto con reducción de los RBCs, que debe ser al menos el 80% del conteo del producto original, es calculado de la relación:

Recuperación del TNC = TNC del producto con reducción de los RBCs ÷ TNC de producto sin procesar x 100% (Fórmula 6)

El volumen total de RBC es calculado y descrito *supra*; el volumen en el producto con reducción de los RBCs debería ser menos que < 20 ml.

El sistema Isolex 300i puede ser utilizado para procesar el producto con reducción de los RBCs o el producto de la médula ósea el volumen de RBC del cual es < 20 ml de acuerdo con los siguientes pasos:

(i) la médula ósea se lava automáticamente para eliminar las plaquetas;
(ii) Las células CD34 positivas (CD34+) son etiquetadas específicamente para la selección mediante la incubación con el anticuerpo monoclonal Isolex 300i CD34 (Mab);
(iii) El agente sobrante se elimina mediante el lavado de la suspensión celular con una solución tampón;
(iv) Las células CD34+ sensibilizadas (es decir, las células CD34+ etiquetadas con CD34 Mab) son capturadas mediante Dynabeads M-450 Sheep anti-Mouse IgG;
(v) Se utiliza una columna de selección para separar las etiquetadas magnéticamente Dynabeads habiendo capturado las células CD34+ de las células no deseadas, que son lavadas a través de la columna de selección y recogidas en la Bolsa de Fracción Negativa; y
(vi) El agente liberador de células madre PR34+ libera las células CD34+ de la columna y las células CD34 son recogidas en la Bolsa de Producto Final. El sistema realiza varios pasos de lavado, eliminando la mayor parte del líquido en la Bolsa de de Residuos de Tampón.

La fracción CD34 seleccionada por el Isolex(R) es ensayada como se indica a continuación para determinar los rendimientos de WBC y células CD34+. El volumen de la Fracción Positiva de CD34 se determina mediante la mezcla de las células en la Bolsa de Producto Final; la bolsa es masajeada con cuidado a mano para asegurar una distribución incluso celular. Un conjunto de transferencia se inserta en el puerto de muestreo de la Bolsa de Producto Final y una jeringa de 60 ml adjunta. La suspensión de células se retira con la jeringa (máximo 50 ml a la vez) de manera ordenada para asegurar la medida del volumen total.

Se utiliza una jeringa de 3 ml ó 5 ml A para extraer una muestra de 2,0 ml de la Bolsa de Producto Final a través del conjunto de transferencia para una prueba de control de calidad. Los volúmenes alícuotas de las muestras y los análisis realizados en esas muestras son tal y como se ha descrito previamente, es decir, CBC: 0,3 ml; Gram stain: 0,3 ml; Viabilidad celular y enumeración de las células CD34: 0,2-ml.

El TNC total de la Fracción Positiva de CD34 se calcula a partir de la relación:

TNC total de la Fracción Positiva = WBC/µl de la Fracción positiva x 1000 x Volumen de la Fracción Positiva (Fórmula 7)

La recuperación del TNC de la Fracción Positiva, que debe ser inferior al 5% del conteo original de producto, es calculado de la relación siguiente:

Recuperación del TNC = TNC total de la Fracción Positiva ÷ TNC Total del producto no procesado x 100% (Fórmula 8)

El número total de células CD34+ viables en la Fracción Positiva se determina de la siguiente relación:

Células totales CD34+ en la Fracción Positiva = Número de células CD34+/µl del producto final x 1000 x Volumen de Producto Final (Fórmula 9)

La recuperación celular CD34+ de la Fracción Positiva se calcula de la siguiente relación:

La recuperación celular CD34+ = Células totales CD34+ en la Fracción Positiva ÷ Total de células CD34+ del producto no procesado x 1000 (Fórmula 10)

Ejemplo 6. Preparación de las células CD34+ seleccionadas para Transfusión

Las muestras del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas se retirarán para ser ensayadas para el conteo WBC, por citometría de flujo (para la enumeración y la viabilidad de células CD34+), Gram stain y esterilidad.

Las células CD34+ se caracterizan por análisis de citometría de flujo mostrando fluorescencia $CD34^{bright}$ y $CD45^{dim}$ mediante doble etiquetado con anticuerpos anti-CD34 y anti-CD45 (Beckman Coulter, PN IM3630). La viabilidad de las células CD34+ y CD45+ se determina mediante la exclusión de las células colororeadas las cuales tomarán el ADN intercalante tinte 7-aminoactinomicin D (7AAD). Ver Brocklebank AM, Sparrow RL. Cytometry. 2001; 46:254-261 (2001); Barnett D, et al.. Br. J. Haematol. 106:1059-1062 (1999); Sutherland, et al, J. Hematotherapy 5:213-226 (1996) y documentos de patente U.S. Patent Nº 4.520.110; 4.859.582; 5.055.556; Patente Europea Nº 76.695; Canadian Patent Nº 1.179.942 (PE, APC); U.S. Patent Nº 4.876.190 (PerCP); U.S. Patent Nº 5.268.486; 5.486.616; 5.569.587; 5.569.766; 5.627.027 (Cy); U.S. Patent Nº 4.714.680; 4.965.204; 5.035.994 (CD34); U.S. Patent Nº 5.776.709 (método de Lyse/no-wash); Patente Nº 5.723.218 y 5.187.288 (Tubos Tru-COUNT).

Para la realización de los análisis de viabilidad y de enumeración de las células CD34+ puede utilizarse cualquier citómetro de flujo o un dispositivo equivalente. En una realización, el laboratorio de procesamiento emplea un citómetro de flujo BD FACSCalibur(TM) y utiliza el software BD FACSComp(TM) para la configuración del instrumento y supervisión. Una plantilla y un panel de etiquetas de leyendas están preinstalados para la adquisición

y el análisis. Antes de usar los reactivos, a saber: CD45FITC/CD34PE, Fluoroesferas Stem-Count, Solución de Lisis de Cloruro de Amonio Concentrado y Tinte de Viabilidad 7AAD, son llevados a temperatura ambiente. Los controles de células CD34+ funcionan como un control positivo para asegurar que el instrumento esté configurado para analizar las células CD34+ y los resultados son comparados con el rango de porcentaje CD34 predeterminado del fabricante.

El producto sin procesar de la médula y los productos de células madre hematopoyéticas quimio tácticas procesados con Isolex pueden ser analizados por muchos procedimientos diferentes. Inmediatamente después de recibir la muestra, si el conteo de WBC de la muestra es mayor de 2 x 10^7 células por ml, la muestra puede ser diluida con fluido Sheath para lograr un conteo de células de aproximadamente 2 x 10^7 WBC por ml. 100 µl del producto diluido son distribuidos de manera alícuota en dos tubos de 15 x 100 mm. Usando una micro pipeta, 20 µl de CD45FITC/CD34 PE y el reactivo tinte de viabilidad 7-AAD se agregan en cada tubo y las muestras suavemente agitadas. Los tubos son cubiertos con papel de aluminio y dejados a temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos. Los RBCs son disueltos (lysed) añadiendo 1,5 ml de 1 x Solución de Disolución (Lysing Solution) a cada tubo, moviéndoles en torbellino suavemente. Los tubos son incubados durante diez minutos a temperatura ambiente, protegiéndoles de la luz. Las muestras se almacenan a alrededor de 2° c a alrededor de 8 ° C (es decir, en un baño de hielo) protegidos de la luz hasta que se lleva a cabo la adquisición de datos. La adquisición de datos debe realizarse dentro de una hora después de añadir el tampón de lisis (lysing buffer). Antes de la adquisición de datos, las Fluoroesferas Stem-Count son resuspendidas mediante rotación extremo-a-extremo (10 veces). Se añaden 100 µl de Fluoroesferas a cada tubo y suavemente se mueve en torbellino teniendo cuidado de no generar burbujas de aire. El recuento absoluto de células CD34+ en el producto es calculado a partir de la relación:

$$\textbf{Número de células viables CD34+por µl de producto} = \frac{\text{LCD34 x FAC}}{\text{F}} \quad \textbf{(Formula 11)}$$

En donde LCD34 es el número de eventos promediado para Vivas CD34+ /Todas CD 45+; "FAC" es Concentración Ensayada con Fluoroesferas; y F es el número promediado de camisetas Fluoroesferas contado.

El volumen de la Fracción PositivaCD34+ es calculado para obtener el número de células CD34+ requeridas para la dosis que se necesite. El volumen de la Fracción Positiva Necesaria (ml) se define como:

La Dosificación Necesaria de células CD34 ÷ (Total de células CD34+ por µl en la Fracción Positiva x 1000). (Fórmula 12)

Un número apropiado de células es dispensado en un tubo cónico de 50 ml y centrifugado a 500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante es retirado utilizando una pipeta serológica de 30 ml y desechado como residuo mientras se tiene cuidado de no dispersar los pellets celulares en la parte inferior de los tubos durante este proceso. La solución de infusión (20 ml) se agrega en el tubo de la Fracción Positiva de células CD34+ y las células dispersadas utilizando una pipeta serológica de 10 ml por repetición del pipeteo. Las células resuspendidas son centrifugadas durante 10 minutos a 500 g. Se utiliza una pipeta serológica de 30 ml (sin disturbar el pellet celular) para transferir la solución la sobrenadante/infusión a un tubo cónico de 50 ml con una etiqueta que indique "Sobrenadante de la Fracción Positiva" fijada. El tubo que contiene el sobrenadante es agitado en torbellino para homogeneizar la solución. Es utilizada una pipeta serológica de 10 ml para la transferencia de 10 ml del sobrenadante homogeneizada de vuelta al tubo de la Fracción Positiva de células CD34. Los restantes 10 ml de suspensión en el tubo del Sobrenadante serán utilizados para las pruebas de esterilidad (5 ml en cada una de las botellas, botella de TSB (Trypticase Soy Broth) y en una botella de FTM (Fluid Thioglycollate)). Las células en la Fracción Positiva de células CD34+ son resuspendidas mediante un lento vaciado y aspiración a través de de una aguja de extremo romo colocada en una jeringa de 10 ml (Jeringa de Infusión) varias veces. La suspensión celular se retira con la jeringa, aspirándose cualesquiera burbujas de aire y se retira la aguja del extremo romo. La jeringa de infusión está conectada al puerto de inyección de una llave de 4 vías.

El producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención será liberado mediante la infusión sólo si reúne los siguientes criterios:

- Pureza de células CD34+ de por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95%;
- Un resultado negativo de Gram stain para la fracción positiva seleccionada;
- Niveles de endotoxinas: menos de 0,5 unidades de endotoxinas/ml;
- Rendimiento celular de CD34+ viable del "producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas" cumple con la dosificación necesaria según la cohorte de tratamiento;
- Las células CD34+ son por lo menos unos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% viables por 7-AAD;
- Resultado de esterilidad USP para el " Sobrenadante de la Fracción Positiva": negativo (14 días más tarde); y
- La selección de células CD34+ de la médula ósea se inició dentro de alrededor de 12 horas a alrededor de 24 horas de la finalización de la recogida de médula ósea.

La evaluación de esterilidad del producto de células madre incluyendo la Gram Staining y la endotoxina será realizada previamente a la liberación del producto para infusión. El cultivo de la esterilidad USP (bacterias y hongos)

será realizado y los resultados serán comunicados al investigador principal. En el caso de un resultado positivo de esterilidad USP, el sujeto y el médico que lo atiende serán notificados inmediatamente, provistos de identificación y sensibilidad del organismo cuando está disponible y la documentación del tratamiento antimicrobiano apropiado y el resultado del tratamiento serán registrados por la unidad de investigación y el patrocinador.

Después de conocer estos criterios de liberación, será lanzado el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas para infusión y envasado para el transporte a las instalaciones de la cateterización. También se enviará una muestra para pruebas in vitro. El producto será liberado solamente si la selección células CD34 es iniciada dentro alrededor de las 12 horas a alrededor de las 24 horas de la terminación de la recogida de medula de hueso y solamente si es infundido dentro de las 48 horas a alrededor de las 72 horas de la finalización de la recogida de la médula ósea.

Ejemplo 7. Formulación del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas comprendiendo células CD34+

El producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas es formulado de 10 ml de solución salina (0,9% de cloruro de sodio, Inyección, USP, Hospira, Cat# 7983-09) suplementado con el 1% de HSA (Human Albmin USP, Alpha. Cat# 521303) (“Solución para Infusión”) y por lo menos 10% de suero autologus. Adicionalmente puede haber algunas trazas de cantidad de materiales (cantidades no determinadas) en el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que serán usadas y dejadas allí durante el procesamiento del producto. Esos materiales incluyen: la Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline- Ca++, Mg++ free (D-PBS) (Baxter Cat. # EDR9865), el Citrato de Sodio (Baxter/Fenwal, Cat. # 4B7867), el Hetastarch (Abbott Laboratories, Cat. # 0074-7248-03). IVIg (Gammagard® Inmune Globuline Intravenous, Baxter, Cat. # 060384) y los reactivos presentes en el kit Isolex® 300i Stem Cell Reagent Kit (Baxter, Cat. # 4R9734) incluyendo el anticuerpo monoclonal anti-CD34, el agente liberador de célula madre y gotas magnéticas de Sheep anti-mouse.

El producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que cumpla con los criterios de liberación será cargado en una jeringa estéril de 10 cc dentro de un armario de seguridad biológica Clase 100 localizado dentro de un ambiente aséptico controlado, por ejemplo, como mínimo en una instalación de procesado de células Clase 100.000; es preferible que sea Clase 100.000, pero no es necesario. El producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas será suspendido en 10 ml de PBS suplementado con HSA y el contenedor etiquetado de acuerdo con los criterios de liberación. Tiene que haber cuatro cohortes de dosificación consistiendo cada cohorte de cinco sujetos. La primera recibirá alrededor de 5 x 10^6 células CD34+, la segunda alrededor de 10 x 10^6 células CD34+, la tercera alrededor de 20 x 10^6 células CD34+ y la cuarta 30 x 10^6 células CD34+. Los sujetos en las cohortes 2-4 con inadecuadas cantidades de células CD34+ para cumplir con la dosis de la cohorte asignada serán añadidos a una cohorte anterior con la mayor dosis posible de células CD34+. La jeringa de infusión cargada será unida a una llave de cuatro vías junto con una jeringa de lavado, provista de tapa que tenga protecciones de seguridad para prevenir pérdidas. El aparato de aplicación estará sellado en una bolsa estéril doble e instalado en una caja segura de transporte para su transporte a la instalación de cateterización cardíaca. Siguiendo a la liberación del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas y las asignaciones de cohorte el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas será transportado al lugar de la cateterización para la infusión arterial relacionada con el infarto (“administración intravascular”).

Ejemplo 9. Infusión Intra-Coronaria de producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas

Una vez recibida la notificación de la instalación de procesado de células de que el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas ha sido liberado para la infusión (véase *supra*) el sujeto /paciente será programado para que llegue a la instalación de cateterización a tiempo para coincidir con la llegada del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas.

Las enzimas cardíacas (péptido natriuretico cerebral (BNP), troponina y CMK MB), los completos conteos de sangre, un panel químico (test de funciones de hígado y renal) y un EKG serán realizados justo antes de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas. Será registrada la evaluación clínica del estado del fallo del corazón de acuerdo con el sistema de clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA).

Una vez recibido el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas y la liberación del seguro de calidad final para infusión (por facsímil), el sujeto recibirá la cateterización cardiaca tal y como se detalla más arriba. Sera realizada una arteriografía coronaria para evaluar la resistencia (lo que significa abertura, libertad de bloqueo) de la arteria relacionada infartada y el flujo angiographico Trombolisis en Infarto de Miocardio (Thrombolysis in Miocardial Infarction) (TIM), Un catéter de globo sobre un cable será instalado en el segmento donde esté situado el stent en la arteria relacionada infartada. Será utilizado cualquier catéter apropiado con globo de dilatación que tenga un diámetro interno de por lo menos 0,36 mm compatible con la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas. Después del posicionamiento, el cable del globo será retirado. El aparato de aplicación del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas será retirado de la caja de transporte.

El aparato de aplicación estará en una bolsa estéril y tendrá bloques de seguridad unidos a la jeringa de infusión (conteniendo el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas) y la jeringa de lavado. El aparato consiste en la jeringa de infusión (conteniendo 10 ml del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas) y la jeringa de lavado (conteniendo 6 ml de solución de lavado) en donde ambas están unidas a una válvula de cuatro vías estéril. El aparato de aplicación completo debe ser agitado suavemente para resuspender las células CD34+ en la solución de infusión. La jeringa de lavado es utilizada para eliminar cualesquiera burbujas de aire en el aparato (con el fin de prevenir una embolia de aire) y el aparato de aplicación entonces unido al catéter de dilatación de globo vía la válvula de cuatro vías.

La aplicación del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas al sujeto mediante infusión procederá como sigue. Primero, con la llave de cuatro vías abierta entre la jeringa de lavado (6 ml de solución) y el lumen central del catéter de globo 1 ml de solución de lavado será infundida (después de la retirada de la protección) en el lumen central del catéter durante 15 segundos. Segundo, el globo debe ser inflado a dos atmosferas de presión dentro del stent, con el fin de evitar daño al endotelio de la arteria coronaria y entonces la válvula de cuatro vías ajustada para permitir la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas distal al globo inflado (después de la retirada de la protección). Con el globo inflado, alrededor de 3 cc a alrededor de 4 cc de la jeringa de infusión serán infundidos a mano durante un periodo de alrededor de 30 segundos a alrededor de 45 segundos (será controlado el tiempo y documentado). El globo permanecerá inflado para permitir la adhesión de las células CD34+ y para prevenir el flujo contracorriente durante un total de alrededor de 2 minutos a alrededor de 3 minutos (incluyendo el tiempo para la infusión). Entre las infusiones, el globo permanecerá desinflado durante 3 minutos para permitir la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión). Se espera que sean requeridas 3 infusiones para vaciar la jeringa de infusión. Tercero, una vez terminada la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas y con el globo desinflado, la válvula de cuatro vías será ajustada para permitir el llenado de la jeringa de infusión desde la jeringa de lavado. Finalmente, con el globo inflado (alrededor de 2 minutos a alrededor de 3 minutos), los 4 ml de solución de lavado ahora en la jeringa de infusión serán infundidos durante un periodo de alrededor de 30 segundos a alrededor de 45 segundos para desalojar cualesquiera células CD34+ de la jeringa y el catéter en la circulación de la IRA. Entonces, el catéter es retirado.

Será realizada una evaluación de isquemia relacionada con la infusión (flujo de sangre inadecuado) durante las primeras 24 horas después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas. Serán obtenidos, un EKG a alrededor de las 12 horas y a alrededor de las 24 horas y un análisis químico de enzimas cardiacas (BNP, troponina y CPK MB) a alrededor de las 8 horas y a alrededor de las 24 horas. Inmediatamente después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas será realizada una evaluación de arritmia (monitor Holter durante 24 horas). Será realizada la habitual ecocardiografía con el fin de evaluar la función ventricular izquierda regional y global antes de la descarga del sujeto después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas.

Se proporcionara a todos los sujetos un termómetro digital y un libro de registros para registrar dos veces al día la temperatura durante los 30 días después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas. Los sujetos serán instruidos para notificar inmediatamente a la unidad de investigación de temperaturas registradas superiores a 100,5ºF. Será realizado un seguimiento rápido con cultivos apropiados y evaluaciones radiográficas de acuerdo con las prácticas clínicas habituales estándar. Se informará de manera documental de las infecciones bacterianas al IRB y a la FDA.

Las visitas adicionales de seguimiento para evaluaciones de seguridad incluirán visitas en la primera semana y en la segunda semana después de la administración del producto. Las visitas de evaluación incluirán un examen físico y un historial médico completo, EKG, conteos completos de sangre, completo panel químico (tests del hígado y renal) y medida de los marcadores del suero cardíaco (BNP, troponina y CPK MB). Será registrada en las semanas una y dos la evaluación clínica de clase funcional de NYHA.

A la primera semana después de la infusión será realizada la habitual ecocardiografía torácica.

A las 4 semanas después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas, serán obtenidos, un EKG y enzimas cardíacas (BNP, troponina y CPK MB). También será realizada la habitual ecocardiografía torácica para evaluar la función ventricular izquierda regional y global. Será utilizado un monitor Holter de 24 horas para evaluar las arritmias. Será registrada la evaluación clínica de clase funcional de NYHA. Tambien será realizado un test de ejercicio de andado (treadmill exercise testing) utilizando un protocolo de Bruce limitante de síntomas.

A alrededor de los 3 meses y alrededor de los 6 meses después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas, será realizada una supervisión con un monitor Holter de 24 horas. Será registrada la evaluación clínica de clase funcional de NYHA. A alrededor de los 6 meses después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas, un test de ejercicio de andado de limitados síntomas será registrado utilizando el protocolo Bruce.

Una evaluación de seguridad a alrededor de los 12 meses después de la infusión del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas incluirá, una historia médica completa y un examen físico, EKG, conteo completo de sangre, panel químico completo, (tests del hígado y renal) y la medida de los marcadores del suero cardíaco (BNP, troponina y CPK MB). También será realizada la habitual ecocardiografía torácica para evaluar la función ventricular izquierda regional y global. Será realizada una supervisión con un monitor Holter de 24 horas. Será registrada la evaluación clínica de clase funcional de NYHA.

Análisis estadístico

Un diseño pareado, donde cada sujeto sirve como el control de él o de ella, será utilizado en algunas realizaciones. Las diferencias entre antes y después del tratamiento, por sujeto, serán analizadas para cada una de las cuatro funciones numéricas cardíacas (es decir, contractilidad miocardial, volumen sistólico final, volumen diastólico final y perfusión). Será utilizado un análisis de regresión lineal con el fin de evaluar la significancia de los niveles de dosificación aumentados. La hipótesis O (nula) (null) es que la pendiente de la línea de regresión (sirviendo el nivel de dosificación como la variable independiente y sirviendo la diferencia entre el "después" menos el "antes" como la variable dependiente) es igual a cero. El poder de rechazo de una hipótesis nula falsa es 0,68 en el nivel alfa 0,05 de significancia para una correlación alta de 0,5 entre la dosificación y la mejora de la función cardíaca. El intervalo de confianza 95% alrededor de la pendiente de la línea de regresión será utilizado para evaluar la significancia médica del aumento en el nivel de dosificación. Si la pendiente de la línea de regresión no es significantemente diferente de cero pero el intercepto de la línea de regresión es diferente de cero, entonces todos los grupos de tratamiento serán combinados y un t-test de pareado será realizado para evaluar la efectividad del tratamiento total. La hipótesis O es que el significado de las diferencias es igual a cero. Un test de rangos-firmados de Wilcoxon (signed-ranks test) será también realizado como un test adicional para determinar la efectividad del tratamiento. Este test es más poderoso (rechazando una hipótesis O falsa) que un t-test en el caso de que las observaciones no están normalmente distribuidas. El poder del t-test es 0,79 para el rechazo de una hipótesis O falsa al nivel alfa de 0,05 y teniendo el tratamiento un efecto de tamaño medio (un efecto bastante grande para ser discernible por el ojo desnudo). La significancia médica del tamaño del efecto de tratamiento será determinada mediante el cálculo de un intervalo de confianza 95% alrededor el significado de las diferencias (el significado medio de las diferencias estará en este intervalo en el 95% de las muestras probadas).

Con el fin de evaluar la mejora en la perfusión, será utilizada la regresión logística con el nivel de dosificación como la variable independiente y el cambio en la perfusión (1=si, 0=no) como la variable dependiente. Los ratios impares de los cuatro niveles de dosis serán calculados separadamente con 5 x 10^6 células sirviendo como el grupo índice.

Será utilizado un test binomial para evaluar la significancia de las dosis de las células CD34+ en la perfusión. Se espera que no existirán mejoras espontáneas en un defecto de perfusión si está presente en el escaneo de la línea basal de la perfusión. Por lo tanto, cualquier mejora significante clínicamente en un defecto de perfusión cuando la evaluación se haga a los 6 meses y se haya comparado con la línea basal será considerada como un efecto del tratamiento.

Será evaluado un grupo concurrente (controles no tratados) reuniendo la elegibilidad pero sin recibir las células CD34+ de manera similar al grupo tratado y evaluado para las mejoras significantes en la perfusión/función cardíaca. Cada lugar de estudio será el acumulado alternativo de los controles tratados y no tratados. Será echado a suertes mediante una moneda (cara o cruz) para determinar la secuencia inicial de sujetos (tratados o no tratados) en cada lugar. Será realizada la comparación de los datos provenientes entre los grupos tratados y no tratados. El laboratorio principal estará cegado (realizara las pruebas sin saber el origen) con respecto al tratamiento o no tratamiento.

Será realizada una evaluación para determinar si existe una correlación entre los datos clínicos y el contenido celular (CD34+) y/o el crecimiento de las colonias in vitro /CFU-GM, CFU,-GEMM, BFU-E), movilidad CXCR-4 y CXCR-4 y/o expresión antigénica superficial VEGF.

Un total de 20 sujetos recibirán el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención. Existirán cuatro dosis de cohorte (alrededor de 5 x 10^6, alrededor de 10 x10^6, alrededor de 20 x 10^6 y alrededor de 30 x 10^6 células CD34+). Si el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas en cualquier sujeto no es suficiente para la cohorte asignada, ese sujeto será reasignado a una cohorte anterior con la dosis más grande posible. Los sujetos que tengan menos de 5 x 10^6 células CD34+ disponibles para infusión, serán retirados del estudio, no se llevará a cabo la repetición de la cateterización y no serán tenidos en cuenta como parte del grupo de estudio de los 20 sujetos. Adicionalmente, si el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención no reúne los criterios de liberación, el sujeto no recibirá el producto celular y no será tenido en cuenta como un candidato para el estudio, para ser reemplazado por el siguiente sujete. En cualquier grupo de dosis de cohorte, si un sujeto experimenta una toxicidad aguda inesperada (lo que significa inmediatamente dentro de los 7 días después de la infusión) considerada para ser (probablemente) un resultado de la infusión del producto celular, la escalada de la dosis será detenida y 3 sujetos adicionales serán acumulados a ese nivel de dosificación. Si no se observa otra toxicidad inesperada, entonces la escalada de la dosis se llevará a su término, sin embargo no se sobrepasará el total de los 20 sujetos. Si ocurre otra toxicidad a ese nivel de dosis, entonces todos los sujetos subsecuentes serán acumulados al siguiente nivel de dosis.

El producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención no será administrado a ningún sujeto en la cohorte de dosis de mayor nivel hasta que todos los sujetos de la cohorte de dosis anterior hayan completado sus evaluaciones de seguimiento dos semanas después de la administración del producto.

Ejemplo 10. Resultados Experimentales de los Estudios Preliminares

Una serie de estudios preclínicos preliminares han sido realizados con la intención de conseguir los siguientes objetivos:

(1) Optimizar el proceso de fabricación para la Recogida de Medula Mini Ósea (MMH)
(2) Evaluar la estabilidad del producto MMH dentro de los límites y el producto hematopoyético fuera de los límites
(3) Evaluar la concesión del diámetro interno y la seguridad de los catéteres;
(4) Evaluar la compatibilidad del producto celular con los catéteres que se intenta que sean utilizados en el estudio y
(5) Evaluar la conveniencia de utilizar el sobrenadante del producto celular hematopoyético final para representar el producto celular hematopoyético final para las pruebas de estabilidad.

Estudio 1: Optimizando el proceso de fabricación para la Recogida de Médula Mini Ósea (MMH)

Se ha evaluado el efecto de las más importantes variables en el rendimiento de las células CD34 viables de productos de médula de hueso. Un total de seis (6) donantes voluntarios de edad superior a los 45 años (basados en una gama/rango desde 45 a 57) y tres de menos de 37 años de edad (basados en una gama/rango de 21 a 28) estuvieron de acuerdo en donar una media de 45 ml (basados en un gama/rango de 31 ml- 54 ml) de médula ósea y proporcionaron el consentimiento informado por escrito para el procedimiento. La técnica de aspiración de médula empleada fue idéntica a la que estaba realizada para la escala clínica MMH (ver Ejemplo 3, supra). Tal y como se muestra en la Tabla 2 los conteos de células de células nucleadas (NC) y de células CD34+ de la Recogida de Médula Mini Ósea derivados de células recogidas de los donantes voluntarios aparecen estando relacionados por edad.

Tabla 2. Efecto de la edad del donante en el rendimiento de célula nucleada del MMH

Donante	Grupo de edad del donante					
	Más de 45 (45-57)			Menor de 30 (23-28)		
	Volumen de MMH (ml)	Viabilidad (%)	Células CD34 (10^5 por ml	Volumen de MMH (ml)	Viabilidad (%)	Células CD34 (10^5 por ml
1	31.30	83.85	1.27	48.00	96.90	7.98
2	43.50	97.42	3.89	50.60	96.28	11.60
3	51.50	85.74	1.37	39.90	87.17	5.99
4	47.50	80.95	1.76	-	-	-
5	53.70	98.21	5.58	-	-	-
6	44.90	96.36	4.48	-	-	-
Media	45.40	90.42	3.06	46.17	93.45	8.52

El conteo promedio de células de los productos de médula ósea de los donantes de mayor edad (N=6) fue de 28,4 x 10^6 (basado en una gama/rango de 15,8 x 10^6 – 49,5 x 10^6) células nucleadas por ml [“NC/ml”], con una viabilidad media, de acuerdo con lo determinado por 7-AAD dye exclusión (exclusión por color) y citometría de flujo, de 90,42% (basado en una gama/rango de 80,95%-98,21%) y un contenido de CD34+ de 3,06 x 10^5/ml (basado en una gama/rango de 1,27 x 10^5/ml – 5,58 x 10^5/ml). En el grupo de sujetos de edad más joven (N=3) el promedio del conteo de células recogidas de la aspiración medular fue 46,2 x 10^6 NC/ml (basado en un rango de 39,9 x 10^6 NC/ml-50,6 x 10^6 NC/ml), con una media de viabilidad 7-AAD de 93,5% (basado en un rango de 87,17%-96,90%) y un contenido total de CD34+ de 8,5 x 10^5/ml (basado en un rango de 5,99 x 10^5 células CD34+/ml – 11,60 x 10^5 células CD34+/ml)

Reducción Glóbulos Rojos y selección CD34

Tabla 3: Recuperación de células CD34+ después de reducción de RBC de MMH del grupo de donantes edad mayor (4457)

	Donante					
	1	2	3	4	5	Promedio
Método reducción de RBC	Hetastarch	Buffy coat	Buffy coat	Buffy coat	Buffy coat	-
% células CD34+ en MMH Pre-reducción de RBC	1.09	1.64	1.63	1.45	1.99	1.58
% células CD34+ en MMH Post-reducción de RBC	1.33	1.55	1.51	1.61	1.84	1.57
Recuperación células CD34+ post reducción RBC (%)	65.68	92.36	80.66	78.79	81.67	79.83

Tal y como se muestra en la Tabla 3, siguiendo la reducción de los glóbulos rojos de los productos de médula ósea derivados de la MMH recogidos de los donantes de mayor edad, fue recuperada una media de 70,83% (basada en un rango de 65,68% - 92,36%) de las células CD34+ de la inicial MMH. No existe diferencia significativa entre la pureza inicial de las células CD34 (1,58€, basada en un rango de 1,09% - 1,99%) y la siguiente a la reducción de glóbulos rojos (1,57%, basada en un rango de 1,33%-1,84%)

Tabla 4: Recuperación células CD34+, pureza, actividad migratoria CXCR-4, viabilidad y crecimiento CFU hematopoyéticas inmediatamente después del proceso de MMH con Isolex del grupo de donantes de mayor edad (edad 45-edad 57)

	Donante					
	1	2	3	4	5	Promedio
Tiempo de almacenamiento (horas) a 4°C-8°C	0	0	0	12	10.50	-

(continuación)

	Donante					
	1	2	3	4	5	Promedio
Recuperación células CD34+ (%)	32.36	29.09	15.31	43.60	40.20	32.11
Pureza células CD34+ (%)	76.76	73.64	71.66	72.52	72.01	73.32
Viabilidad células CD34+	98.49	93.80	97.38	98.28	98.39	97.27
Actividad migratoria (%) CXCR-4 células CD34+	22.10	2.60	22.00	19.90	19.70	17.26
CFU hematopoyéticas / 100 células DC34+ cultivadas	27.5	25.0	18.9	17.0	21.00	21.9

Tal y como se muestra en la Tabla 4, la selección siguiente de CD34 utilizando el sistema Isolex, en cual incluye Dynabeads® inmunomagneticas y anti-CD34 MAb, hemos recuperado una media de 32,11% (basado en un rango de 15,31%-43,60%) de las células CD34 con una pureza promedio de 73,32% (basada en un rango de 71,66% - 73,64%) y una viabilidad media de 97,27% (basada en un rango de 93,80% - 98,49%). Adicionalmente, esas células CD34+mostraban una media de 17,26% de capacidad migratoria CXCR-4 (basada en un rango de 2,60% - 22,10%) inmediatamente después de la selección y siendo capaces de generar colonias hematopoyéticas (21,89

colonias/100 células CD34 plateadas (basado en un rango de 17,0 colonias/100 células CD34+ plateadas- 27,5 colonias/100 células CD34+ plateadas) en cultivo MethoCult.

Estudios 2 Evaluación de la estabilidad de la recogida de médula mini ósea en los limites y el producto celular hematopoyético quimio táctico fuera de los limites.

Fue realizada una serie de experimentos, utilizando voluntarios con buena salud, con el fin de evaluar la estabilidad de la MMH dentro de límites y del producto celular hematopoyético quimio táctico fuera de los límites de la presente invención. Una evaluación de la viabilidad funcional de los productos dentro de los límites y fuera de los límites fue evaluada mediante viabilidad celular (7-AAD), SDF-1/CXCR-4 mediada de migración de células CD34+ y la capacidad para formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (capacidad de formar colonias CFU)

Con el fin de evaluar la estabilidad del producto dentro de los limites para propósitos de envío y transporte y la coordinación con las programaciones clínicas, los productos de la MMH fueron almacenados a 4ºC a 8ºC como se ha indicado. Con el fin de evaluar la estabilidad del producto fuera de los limites para propósitos de envío y transporte, el producto enriquecido de células madre hematopoyéticas quimio tácticas incluyendo células CD34+ siguiendo la MMH fue almacenado a 4ºC a 8ºC como se ha indicado.

En estudios preliminares, las células fueron procesadas inmediatamente o bien mantenidas a 4-8ºC durante 12 horas después de ser procesadas para evaluar el impacto del envío y la duración logística en la fabricación de un producto celular adecuado para la infusión. A pesar de la duración del almacenaje antes del procesado (expiración del producto dentro de los limites), los resultados no variaron significativamente (no se muestran los datos).

En otra serie de experimentos, las células fueron almacenadas a alrededor de 4ºC a alrededor de 8ºC durante 12 horas y alrededor de 24 horas antes de la reevaluación para estimular los productos infundidos a alrededor de 36 horas y a alrededor de 48 horas, respectivamente, siguientes a la MMH.

Tabla 5: Viabilidad células CD34+, crecimiento y actividad migratoria CXCR4 13-13,5 horas después procesado con Isolex de MMH

	Donante		
	1	2	Promedio
Viabilidad células CD34+ (%)	97.59	96.90	97.24
Actividad migratoria (%) CXCR-4 células CD34+	7.70	7.50	7.60
CFU hematopoyéticas / 100 células CD34+ cultivadas	18.00	25.00	21.5

Tal y como se muestra en la Tabla 5, las células CD34+ aisladas del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas tuvieron una viabilidad media del 97,24% basado en un rango de 96,90%-97,59%) y un promedio de capacidad migratoria mediada por CXCR-4 de 7.60% (basado en un rango de 7,50% - 7,70%). Tal y como se muestra en la Tabla 6 después del almacenamiento para una media de 26,3 horas (basado en un rango de 26,0 h – 26,5 h) esas células tenían una viabilidad media de 96, 81% (basada en un rango de 96,39% - 97,22%) y un promedio de capacidad migratoria mediada por CXCR-4 del 4,75% (basado en un rango de 4,50 % - 5,00 %). Además, las células mantenían aún su capacidad para generar colonias hematopoyéticas in vitro.

Tabla 6: Viabilidad células CD34+, crecimiento y actividad migratoria CXCR-4 26,0-26,5 horas después proceso con Isolex de MMH

	Donante		
	1	2	Promedio
Viabilidad células CD34+ (%)	97.22	96.39	96.81
Actividad migratoria (5) CXCR-4 células CD34+	4.50	5.00	4.75
CFU hematopoyéticas / 100 células CD34+ cultivadas	28.00	14.00	21.00

De esta manera, una media de 13,3 horas (basada en un rango 13,0h – 13,5h) después de la selección de las células CD34+, representando 26,0-265,5 horas después de la MMH, la población celular CD34+ tenía una viabilidad media del 97,24% (basada en un rango de 96,90% - 97,59%) con una media de capacidad migratoria mediada por CXCR-4 el 7,60% (basada en un rango de 7,50% - 7,70%). A una media de 26,3 horas (basada en un rango de 26,0 h - 26,5 h) siguientes a la MMH, la viabilidad media de las células fue de un 96,81 % (basada en un rango de 96,39% - 97,2%) y mantenido un promedio de capacidad migratoria mediado por CXCR-4 de un 4,75% (basado en un rango de 4,50% - 5,00%).

La formulación de la composición de la presente invención comprendiendo este producto sucedió en una media de 8 horas (8,63 $\pm$ 1,80 N= 4) después de la recogida MMH y la infusión ocurrió dentro de las 48 horas desde la MMH.

Tabla 7: Viabilidad células CD34+ como una función de tiempo después MMH: 12 horas dentro de tiempo y 48 horas fuera de tiempo (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de MMH)

Tiempo (h) después MMH (SD)	Viabilidad células CD34+ (%)				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
	98.22	97.13	97.60	99.00	97.99 (0.29)
24	95.32	97.76	-	-	96.54 (1.73)
33	91.92	96.32	95.90	80.00	91.04 (7.62)

En un experimento subsecuente, fueron recogidos cuatro (4) productos de MMH y almacenados a 4ºC por una media de 12,8 horas (basada en un rango de 12,5h-13h) antes de que las células CD34+ fueran aisladas mediante el procedimiento Isolex. Este grupo, representando el grupo “12 horas en-fecha” lo que significaba que el producto fue formulado dentro del tiempo en-fecha de alrededor de 12 horas) fue evaluado para la viabilidad funcional fuera-de fecha a “24 horas” (22,9 $\pm$ 1,63, N=4), “33 horas” (33,38 + 1,11, N02) y “48 horas” (48,33 $\pm$ 0,82, N= 4) después de la recogida MMH. Los datos resumidos en las Tablas 7 a 9, demuestran que siguiendo a la recogida MMH, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas, incluyendo célulasCD34+ enriquecidas mantiene 1) alta viabilidad (> 90,0 % de viabilidad media, Tabla 7), 2) 76,65% ($\pm$ 21,66) de su capacidad migratoria mediada SDF-1/VEGF/CXCR-4 (tabla 8) y 3) su capacidad para formar colonia hematopoyéticas in vitro (Tabla 9), respectivamente.

La tabla 8 muestra la migración de las células CD34+ mediadas SDF-1/VEGF/CXCR-4 (5 de migración de las células CD34+ como una función de tiempo después de la MMH: 12 horas en-fecha y 48 horas fuera-fecha (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de la MMH). Con el propósito de determinar el impacto de tiempo después de la MMH en la capacidad migratoria de las células CD34+, el punto de tiempo “X” fue considerado el punto de referencia, tal como esto fue determinado para representar el punto de tiempo más temprano siguiente a la MMH en el cual las células razonablemente puede esperarse que serán retornadas al sujeto en una formulación terminada. La restante actividad migratoria en los siguientes puntos de tiempo (Y=33 horas, Z=48 horas) fueron calculados como una capacidad migratoria restante siguiente al punto de tiempo de 24 horas (X).

Tabla 8: Migración celular CD34+ mediado SDF-1/VEGF/CXCR-4 [% de células CD34+ migrantes como una función de tiempo después MMH: 12 horas dentro tiempo-y 48 horas fuera tiempo (todos los puntos de tiempos medidos desde terminación MMH)

Tiempo (h) después MMH	Células CD34+ migrantes (%)				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
24 (X)	20.00	18.50	21.50	36.00	24 (8.09)

(continuación)

Tiempo (h) después MMH	Células CD34+ migrantes				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
% Pendiente	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 (0)
33 (Y)	21.80	10.50	-	-	16.15 (7.99)
*% Pendiente	109.00	56.76	-	-	82.88 (36.94)
48 (Z)	8.80	17.00	17.50	31.00	18.58 (9.19)
@% Pendiente	44.00	91.89	81.40	86.00	75.85 (21.66)
* = (Y ÷ X) x 100% @ = (Z ÷ X) x 100%					

La Tabla 9 muestra el número de unidades formando colonias (CFU) por 100 células CD34+ viables plateadas como una función de tiempo después de MMH: 12 horas dentro tiempo y 48 horas fuera tiempo (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de MMH. Tabla 9

Tiempo (h) después MMH	# de CFU por 100 células viables plateadas				
	A	B	C	D	Promedio(SD)
24	13.00	30.00	37.00	39.00	29.75 (11.81)
33	12.00	34.00	-	-	23.00 (15.56)
48	15.00	30.00	20.00	8.00	28.25 (14.57)

En un intento de extender ambos, los parámetros de estabilidad en-fecha y fuera-fecha al producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención incluyendo células CD34+ desde 12 horas (en-fecha) y desde 48 horas (fuera-fecha) (12/48) respectivamente, a 24 horas (en-fecha) y 72 horas (fuera-fecha) (24/72) respectivamente, las células CD34 fueron purificadas alrededor de 12 horas después de la recogida MMH (12 horas en-fecha) y alrededor de 24 horas después de la recogida MMH (24 horas en-fecha) y analizadas para viabilidad funcional a alrededor de 48 horas y a alrededor de 72 horas de tiempo total desde la MMH a tiempo de comprobar anticipadamente la infusión (48 horas fuera-fecha y 72 horas fuera-fecha, respectivamente) De manera específica, fueron evaluadas las características de viabilidad funcional de dos MMH/productos de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención a las 48 horas y a las 72 horas. Los datos resultantes fueron, además, comparados a los mismos índices derivados en los puntos previos de tiempo 12/48 (Tablas 7 a 9).

Las Tablas de la 10 a la 12 muestran que a las 33 horas (basado en 32,5 ± 0,71, N=2), a las 48 horas (basado en un punto de datos a las 49 horas) y a las 72 horas (basado en 72,5h ± 0,71, N= 2), las células aisladas del producto de

células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención mantenían 1) por encima del 90% de viabilidad (Tabla 10), 2) 102,19 ± 32,69% de su capacidad migratoria mediada por SDF-1/VEGF/CXCR-4 (Tabla 11) y 3) su capacidad para generar colonias hematopoyéticas in vitro (Tabla 12).

Tabla 10: Viabilidad células CD34+ como una función de tiempo después MMH: 24 h dentro tiempo y 72 h fuera tiempo (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de MMH)

Tiempo (h) después MMH	Viabilidad células CD34+ (%)		
	A	B	Promedio (SD)
33	98.00	99.00	98.50 (0.71)
48	-	97.00	97.00 (-)
72	91.00	97.00	94.00 (4.24)

Tabla 11: Migración celular CD34+ mediada SDF-1/VEGF/CXCR-4 (% población de células emigradas como una función de tiempo después MMH): 24h dentro tiempo y 72 h fuera de tiempo (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de MMH).

Tiempo (h) después MMH (SD)	Células CD34+ migrantes (%)		
	A	B	Promedio (rango)
33	8.20	14.05	11.13 (2.93)
% Pendiente	100.00	100.00	100.00 (0.00)
48	-	18.61	18.61 (-)
% Pendiente	-	132.46	132.46 (-)
72	5.70	18.95	12.33 (6.63)
% Pendiente	69.51	134.88	102.19 (32.69)

Los ratios de pendientes (restantes) en la Tabla 11 fueron determinados con en la Tabla 8 de más arriba.

Tabla12: Número de CFU por 100 células CD34+ viables plateadas como una función de tiempo después MMH: 24 h dentro tiempo y 72 horas fuera tiempo (todos los puntos de tiempo medidos desde la terminación de MMH)

Tiempo (h) después MMH (SD)	**# de CFU por 100 células CD34+ viales plateadas**		
	A	B	**Promedio (rango)**
33	26.00	28.50	22.25 (1.25)
48	-	16.80	16.80 (-)
72	14.50	27.50	21.00 (6.5)

La evaluación adicional de los parámetros de viabilidad funcional del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye células CD34+ aisladas de la presente invención ("producto clínico") a las 8 horas (8.6h ± 1,80, N=4), a las 12 horas (12,87h ± 1,91, N= 4), a las 32 horas (un punto de tiempo a 33,5 h), a las 48 horas (47,50h ± 2,5, N= 2) y a las 72 horas (71,5h ± 0,50, N=2) después de la MMH, muestra que después de 72 horas, el producto retiene su 1) viabilidad (Tabla 13), 2) capacidad migratoria mediada SDF-1/VEGF/CXCR-4 (tabla 14) y 3) capacidad para formar colonias hematopoyéticas in vitro (Tabla 15), equivalente al punto de tiempo de 24 horas.

Tabla 13: Experiencia Producto Clínica: Viabilidad de células CD34+ como función de tiempo después MMH

Tiempo (h) después MMH	Viabilidad células CD34+ (%)				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
8	98.30	99.08	90.00	96.45	95.96 (4.12)
12	98.89	96.96	99.00	99.43	98.57 (1.10)
33	-	93.42	-	-	93.42
48	-	93.15	91.58	-	92.37 (1.11)
72	-	91.25	89.25	-	90.30 (1.48)

Tabla 14: Experiencia Producto Clínica: Migración células CD34+ mediada SDF-1/VEGF/CXCR-4 (% células migrantes CD34+ como una función de tiempo después MMH)

Tiempo (h) después MMH	Células CD34+ migrantes (%)				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
12 (X)	14.31	13.08	9.74	31.73	17.97 (11.34)
% Pendiente	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
33 (Y)	-	6.17	-	-	6.17

(continuación)

Tiempo (h) después MMH	Células CD34+ migrantes (%)				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
*% Pendiente	-	47.17	-	-	47.17
48 (Y)	-	4.88	8.21	-	6.55 (2.35)
% Pendiente	-	37.30	84.29	-	60.79 (23.49)
72 (Y)	-	3.7	6.6	-	5.15 (2.05)
*% Pendiente	-	28.29	21.19	-	24.74 (3.55)
* = (Y ÷ X) x 100%					

Todos los ratios pendientes (restantes) fueron calculados con en la Tabla 8 de más arriba

Tabla 15: Experiencia Producto Clínica: # de CFU por 100 CD34+ viables plateadas como una función de tiempo después MMH

Tiempo (h) después MMH	# de CFU por 100 células CD34+ plateadas				
	A	B	C	D	Promedio (SD)
12.	98.14	33.30	24.00	22.50	44.49 (36.09)
33	-	16.50	-	-	16.5
48	-	19.56	20.50	-	20.03 (0.66)
72	-	20.45	21.19	-	20.82 (1.10)

Basado en esos datos está justificada la extensión de la en-fecha a las 24 horas (desde las 12 horas) y la fuera-fecha a las 72 horas (desde las 48 horas) para el producto clínico de células CD34+ de la presente invención.

La Figura 1 indica la equivalencia de la viabilidad funcional del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención a las 72 horas a los mismos índice evaluados a las 48 horas.

Estudio 3: La seguridad del catéter

La viabilidad y la eficacia potencial del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas de la presente invención que incluye células CD34+ aisladas dependen de que las células mantengan su potencial según ellas vayan pasando a través de un catéter. El catéter utilizado deber ser de un diámetro interno de por lo menos 0,36 mm. Cualquier tipo de catéter teniendo un diámetro interno de por lo menos 0,36 mm puede ser efectivo en la aplicación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

En una realización, el catéter es un catéter de globo. Fueron conducidos estudios de seguridad de los catéteres de globo con el fin de determinar tanto si las altas concentraciones de células y las repetidas perfusiones afectan adversamente la viabilidad de las células, la recuperación de las células o la integridad del catéter. Fueron utilizados progenitores de sangre periféricos no movilizados con el fin de obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Los catéteres fueron evaluados para la infusión del producto celular de la presente invención que incluye células CD34+ seleccionadas a través del IRA. Ninguno de los catéteres de 0,36 mm de diámetro interno probados afectó adversamente la viabilidad, el crecimiento en cultivo o la movilidad en los ensayos CXCR-4, de las células CD34+ seleccionadas.

Tabla 16: Viabilidad de células CD34+ antes y después de las infusiones a través de los catéteres

Catéter	Condición	Viabilidad (%)				
		1	2	3	4	5
-	Pre Infusión	81.45				
Raptor	Después 1ª infusión	84.29	70.94	87.89	88.02	84.68
	Después 2ª infusión	83.00	87.44	86.39	79.91	83.18
Sprinter	Después 1ª infusión	93.39	91.09	84.13	88.28	81.68
	Después 2ª infusión	91.89	91.08	84.88	77.65	77.73

(continuación)

Catéter	Condición	Viabilidad (%)				
		1	2	3	4	5
Voyager	Después 1ª infusión	94.21	86.21	83.08	77.53	69.68
	Después 2ª infusión	88.03	84.71	79.27	78.11	76.80
Maverick	Después 1ª infusión	90.00	89.76	90.79	85.49	81.31
	Después 2ª infusión	90.94	87.38	81.98	80.09	85.47

Tal y como se muestra en la Tabla 16, en todos los catéteres probados, la media de la viabilidad de las células CD34+ fue igual o por encima del 70% a continuación del paso a través de los catéteres.

Con el fin de demostrar que la infusión del producto de las células CD34+ no supone ningún incumplimiento de la seguridad del catéter utilizado y que un porcentaje significante de producto celular no se adhiere al interior de las paredes del catéter, los catéteres fueron probados con infusiones repetidas de producto de células CD34+ que tenían una concentración considerablemente más alta que la utilizada clínicamente. Fueron evaluadas cuatro marcas de catéteres (Sprinter, Voyager, Maverick y Raptor) utilizando 5 catéteres de cada tipo. Fueron utilizados productos de aféresis no movilizados con el fin de obtener un número adecuado de células para realizar el análisis. Una concentración de células mayor de tres veces que la planeada para las dosis de tratamiento para el estudio, es decir, 160 x 10^6 células nucleadas conteniendo células CD34+ en 10 ml de suspensión de infusión, fue pasada dos veces a través de cada catéter. La recuperación media de células CD34+ fue 100,59% (basada en un rango de 76,99% a 228,70%) a continuación del paso a través de los catéteres.

Todos, los veinte catéteres, fueron probados para la integridad utilizando test de pérdidas de coloración azul de metileno (methylene blue dye leak test) después de dos perfusiones con las células nucleadas. No existe evidencia de pérdidas y los puntos de contacto y las puntas del catéter fueron normales en el momento de la inspección.

Tal y como se muestra en la Tabla 17a y en la tabla 17b, el efecto en las células de su perfusión a través de un catéter parece ser independiente del modelo y marca entre esos catéteres probados y fue independiente de la cantidad de tiempo durante el cual las células estuvieron almacenadas bien antes del procesamiento y/o después de la selección de las células CD34+ y antes de la perfusión resultando en una formulación final conteniendo un promedio de recuperación del 96,0% (rango del 80,8% - 102,2%) de las células CD34+ (tabla 17b) y 86,36% de las células CD45+ perfusionadas a través del catéter. Además la media de viabilidad de las células fue del 96,5% (rango del 92,5% - 98,6%, N=16); las células mantenían ambas, la capacidad migratoria CXCR-4 (los datos no se muestran) y su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en metilcelulosa (media de 25,8 CFU/100 células sembradas (rango del 21,0% -30,5%)

Tabla 17a: Recuperación y Viabilidad de células CD45 después de haber sido infundidas a través de los catéteres

		1		2		3		4		5		Promedio	
Catéter	Condición	Recuperación	Rec viab	Recuperación	Rec viab	Recuperación	Rec viab	Recuperación	Rec viab	Recuperación	Rec viab	Recuperación	Rec viab
Raptor	Después 1ª Infusión	69.68%	-1.35%	78.67%	2.08%	72.14%	-4.55%	80.54%	1.83%	73.21%	-2.13%	74.85% (30.83%)	-0.82% (2.53%)
	Después 2ª Infusión	97.91%	-8.55%	81.84%	-4.76%	142.98%	3.28%	107.82%	-8.48%	94.08%	0.08%	104.93% (47.60%)	-3.69% (4.94%)
Sprinter	Después 1ª Infusión	76.74%	-0.60%	68.56%	4.01%	72.63%	5.29%	73.61%	6.06%	66.83%	8.31%	71.67% (29.48%)	4.61% (3.51%)
	Después 2ª Infusión	78.82%	2.86%	85.40%	0.98%	90.29%	-1.02%	82.22%	6.50%	91.61%	0.00%	85.67% (35.30%)	1.86% (2.76%)
Voyager	Después 1ª Infusión	87.38%	1.58%	83.93%	-0.36%	103.58%	0.93%	95.82%	4.52%	131.55%	-4.39%	100.45 (44.39%)	0.46% (2.91%)
	Después 2ª Infusión	82.70%	7.01%	69.34%	15.90%	69.54%	10.40%	89.04%	0.27%	69.03%	7.50%	75.93% (32.11%)	8.22% (6.09%)
Maverick	Después 1ª Infusión	73.97%	1.58%	87.01%	0.42%	78.31%	0.69%	75.53%	2.61%	77.22%	2.95%	78.41% (32.33%)	1.65% 1.21%
	Después 2ª Infusión	152.35%	-5.06%	73.44%	2.78%	80.85%	-3.92%	97.10%	-2.97%	91.11%	-2.07%	98.97% (49.11%)	-2.25% (2.85%)
											Promedio de todos los catéteres:	86.36%	1.26%

[1] Recuperación de células CD45+ = (# de células CD45 después de la infusión ÷ # de CD45 antes de la infusión) x 100%
[2] Reducción Viabilidad de células CD45+ = [1 – (% Viabilidad células CD45+ después de la infusión ÷ % Viabilidad células CD45+ antes de la infusión)] x 100%

Tabla 17b: Recuperación y Viabilidad células CD34 después de haber sido infundidas a través de los catéteres

		1		2		3		4		5		Promedio	
Catéter utilizado	Condición	Recuperación[a]	Rec viable[b]	Recuperación	Rec viable	Recuperación	Rec viable	Recuperación	Rec viable	Recuperación	Rec viable	Recuperación (SD)	Rec viable (SD)
Raptor	Después 1ª Infusión	116.49%	-3.48%	121.62%	12.91%	110.89%	-7.91%	97.55%	-8.06%	96.14%	-3.97%	108.54% (45.46%)	-2.10% (7.79%)
	Después 2ª Infusión	91.66%	1.53%	85.18%	-23.26%	122.47%	1.71%	111.33%	9.21%	98.96%	1.78%	101.92% (43.73%)	-1.81% (11.14%)
Sprinter	Después 1ª Infusión	89.19%	-14.66%	83.34%	-11.83%	102.72%	-3.29%	84.57%	-8.39%	88.65%	-0.28%	89.69% (37.26%)	-7.69% (6.16%)
	Después 2ª Infusión	103.52%	1.61%	99.82%	0.01%	82.11%	-0.89%	114.87%	12.05%	100.45%	4.84%	100.15% (42.22%)	3.52% (4.90%)
Voyager	Después 1ª Infusión	81.02%	-15.67%	96.08%	-5.84%	90.16%	-2.00%	82.73%	4.82%	89.32%	14.46%	87.86% (36.28%)	-0.85% (10.13%)
	Después 2ª Infusión	106.48%	6.56%	81.66%	1.74%	95.04%	4.58%	94.81%	-0.75%	91.01%	-10.23%	93.80% (39.12%)	0.38% (5.86%)
Maverick	Después 1ª Infusión	76.99%	-10.50%	101.79%	-10.21%	98.62%	-11.46%	112.58%	-4.96%	96.05%	0.18%	97.21% (41.34%)	-7.39% (5.34%)
	Después 2ª Infusión	228.70%	-1.05%	88.66%	2.65%	103.35%	9.70%	89.35%	6.31%	117.63%	-5.12%	125.54% (73.48%)	2.50% (5.33%)
											Promedio de todos los catéteres:	100.59%	-1.68%

[a] Recuperación de células CD34+ = (# de células CD34 después de la infusión ÷ # de CD34 antes de la infusión) x 100%

[b] Reducción Viabilidad de células CD34+ = [1 – (% Viabilidad células CD34+ después de la infusión ÷ % Viabilidad células CD34+ antes de la infusión)] x 100%

Esos experimentos demuestran colectivamente que el paso de series de un producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye células CD34+ a través de un catéter cardiaco con un diámetro interno de por lo menos alrededor de 0,36 mm no afecta adversamente tanto la integridad del catéter o a la potencia de las células CD34+, es decir, a la viabilidad de las células CD34+, al crecimiento de las colonias CFU o a la movilidad/capacidad migratoria de CD34+ mediada por CXCR-4.

Estudio 4: La Compatibilidad del producto celular con los catéteres

Con el fin de probar aún más la compatibilidad del producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye células CD34+ con cada uno de los catéteres que puede ser utilizado para la aplicación del producto celular en el estudio, los productos celulares fueron probados después de múltiples pasajes a través de cada tipo de catéter para evaluar los efectos de las condiciones extremas de stress que pudieran ser mayores que aquellas esperadas durante el protocolo de tratamiento.

A las 48 horas después de la recogida MMH, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye un rango completo de alrededor de 5,73 x 10^6 células CD34+ a alrededor de 21,10 x 10^6 células CD34+ (es decir dosificaciones reflectivas de la cohorte de tratamiento) obtenido de donantes individuales fue infundido secuencialmente a través de tres catéteres de la misma marca, un tipo de catéter para cada donante (Sprinter, Voyager o Maverick) y el producto celular evaluado para la recuperación de células CD34+, formación de colonias y viabilidad.

Tabla 18: Recuperación y esterilidad células CD34+ después de infusiones secuenciales a través de los catéteres

Condición	Parámetro	Catéter utilizado		
		Sprinter	Voyager	Maverick
Pre infusión	Rendimiento células CD34+	$9.72x10^6$	$2.11x10^7$	5.73×10^6
Después 1er catéter	Recuperación células CD34+	111%	103%	99%
Después 2º catéter	Recuperación células CD34+	94%	104%	97%
Después 3er catéter	Recuperación células CD34+	99%	99%	106%
	Esterilidad (microbios aerobios y anaerobios)	Negativo	Negativo	Negativo

Tal y como se muestra en la Tabla 18 fueron recuperadas células viables, formando colonias en todos los experimentos con, todos, los tres catéteres probados (recuperación celular del 99%, 99% y 106%).

Tal y como se muestra en la tabla 19, la media de viabilidad de las células CD34+ después del paso a través del tercer catéter fue del 94,000% (basada en un rango de 93,5%-94,4%) contra el 96,1% (basada en un rango del 94,18%-97,93%) del producto celular antes de la infusión.

Tabla 19. Viabilidad células CD34+ después de las infusiones secuenciales a través de los catéteres

Condición	Viabilidad células CD34+			
	Sprinter	Voyager	Maverick	Promedio
Antes de la infusión	94.18%	95.91%	97.93%	96.01%
Después 1er catéter	94.73%	96.31%	95.45%	95.50%
Después 2º catéter	95.34%	95.72%	95.01%	95.36%
Después 3er catéter	93.55%	94.40%	94.04%	94.00%

Tal y como se muestra en la Tabla 20, el crecimiento de las unidades formando colonias (CFU) derivado de las células CD34+ después del paso a través del tercer catéter fue el 95,27% (basado en un rango del 43,47%-163,64%) del producto para infusión (es decir, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluye células CD34+)

Tabla 20. Crecimiento de las CFU de células CD34+ después de la infusión secuencial a través de los catéteres

Condición	CFU por 100 CD34+ cultivadas		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Antes de la infusión	30.5	11.5	11.0
Después del 1er catéter	22.0	14.0	22.0

(continuación)

Condición	CFU por 100 CD34+ cultivadas		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Después del 2º catéter	20.5	4.0	19.0
Después del 3er catéter	24.0	5.0	18.0
Recuperación desde el producto antes de la infusión después del 3er catéter	78.69%	43.47%	163.64%
Recuperación media	95.27%		

Con el fin de determinar la perfusión del catéter en la movilidad y capacidad para crecer en cultivo de las células CD34+, fueron realizados una serie de experimentos donde las células MMH obtenidas de donantes con buena salud fueron almacenadas a 4ºC durante 12 ó 24 horas antes del inicio del proceso Isolex. El producto celular CD34+ aislado que ha estado almacenado durante alrededor de 12 horas antes del proceso Isolex fue entonces almacenado a 4ºC hasta alrededor de 36 horas transcurridas desde el fin del proceso, para un total de alrededor de 48 horas después de la MMH. En ese momento fueron evaluadas para la movilidad SDF-1/CXCR-4 y el crecimiento de CFU antes y después de la perfusión a través de un catéter cardiaco de globo de 0,36 mm de diámetro interior (i.d.) (siglas en inglés). Similarmente, las células que fueron almacenadas antes del proceso Isolex durante 24 horas fueron entonces almacenadas a 4ºC hasta transcurridas 48 horas desde el fin del proceso Isolex, para un total de 72 horas y entonces evaluadas.

Tabla 21: Movilidad 12 dentro limites/48 fuera límites y 48 horas dentro limites / 72 horas fuera limites desde MMH: SDF-1/CXCR-4 (% de población de células CD34+ migradas) y CFU (por 100 células CD34+ viables plateadas) antes ("PRE") de la infusión con catéter y después ("POST") de la perfusión de catéter

Tiempo (h) desde MMH Dentro límite/fuera límite	Movilidad SDF/ CXCR4-1(%) // # de CFU por 100 células CD34* viables plateadas				
	A	B	C	D	E
12/48 PRE	2.7 // 14	8.8 // 15	15.8 // 16	-	-
12/48 POST	3.4 // 15	18.9 // 13	17.6 // 8	-	-
24/72 PRE	-	-	-	34 // 37	18.9 // 27.5
24/72 POST				34 // 43	23.5 // 24

Los resultados en la Tabla 21 demuestran que ni la movilidad de las células CD34+ mediadas por CXCR-4 ni la capacidad de las células para crecer en cultivo en cualquiera de los puntos de tiempo probados fueron afectadas adversamente por la perfusión a través de un catéter teniendo un diámetro interno de por lo menos 0,36 mm.

El efecto estabilizante del suero

Los siguientes datos confirman la importancia del efecto estabilizante del suero a la capacidad migratoria de las células CD34+ seleccionadas.

Tal y como se muestra en la Tabla 22, no fue observada actividad migratoria CXCR-4 para todas las muestras probadas incluyendo las muestras anteriores a la infusión por catéter cuando la composición que incluía un producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas fue formulada sin suero.

Tabla 22: Quimio taxis de células CD34+ después de las infusiones secuenciales a través de los catéteres en la ausencia de suero

Condición	% Migración		
	Sprinter	Voyager	Maverick
Antes de la infusión	0.0	0.0	0.1
Después 1er catéter	0.0	0.0	0.0
Después 2º catéter	0.0	0.0	0.1
Después 3er catéter	0.0	0.0	0.0

Las Figuras 2 y 3 ilustran además que las células CD34+ seleccionadas por Isolex retenían su capacidad migratoria durante más tiempo cuando estaban formuladas en presencia de suero humano. A continuación del proceso Isolex, el producto de células madre hematopoyéticas quimio tácticas derivado de la médula ósea y comprendiendo células seleccionadas CD34+ fue formulado bien en 1) una solución salina tamponada de fosfato (Dulbecco´s phosphate buffered saline Ca++, Mg++ Free (Baxter Cat. No. EDR9865) (“PBS”, siglas en inglés) conteniendo el 1% de albumina de suero humano, 25U/ml de heparina sódica y varias concentraciones (alrededor de 0%, alrededor de 10%, alrededor de 20%, alrededor de 70%) de suero autologus; ó 2) solución salina normal (0,9%) conteniendo el 1% de albumina de suero humano, 25U/ml de heparina sódica y suero autologus (alrededor de 0% o alrededor de 10%). Fue evaluada la capacidad migratoria de las células CD34+ mediada SDF-1/ CXCR-, en diferentes momentos durante el almacenamiento del producto final (a 2ºC-8ºC) y después de pasar las células a través del catéter y al mismo ratio y duración como se anticipó mediante el protocolo clínico. Ninguna de esas formulaciones afectó la viabilidad de las células CD34+ o la recuperación de las células CD34+ después de que ellas fueron pasadas a través del catéter.

A pesar de todo, los productos de células madre hematopoyéticas quimio tácticas que incluyen células CD34+ seleccionadas fueron (i) formulados tanto en suero-PBS o en suero salino y (ii) o bien pasados a través del catéter inmediatamente o pasados a través del catéter después de un intervalo de almacenamiento de estabilidad prolongada a alrededor de 4ºC a alrededor de 8ºC, mantuvieron una media de viabilidad del 96,6% (rango del 92,5 – 98,6%) y una media de capacidad migratoria mediada por CXCR-4 del 11,4% (rango del 2,4% - 30,6%), representando un tiempo total desde la recogida al análisis de movilidad de hasta 48 horas.

Tal y como se muestra en la Fig. 2 panel (a), las células formuladas en PBS únicamente y alrededor de 25 horas retuvieron alrededor del 10% su capacidad migratoria mediada por CXCR-4, la cual bajo hasta cerca de 0 a alrededor de las 48 horas. Tal y como se muestra en el panel (b), las células formuladas en una solución salina normal únicamente, retenían una pequeña, si es que existía, de su capacidad migratoria. Tal y como se muestra en los panales (c) y ((d) las células formuladas con PBS conteniendo por lo menos alrededor del 10% de suero retenían alrededor del 10-15% de su capacidad migratoria durante hasta alrededor de las 55 horas (c), mientras que las células formuladas con solución salina y por lo menos alrededor del 10% de suero retenían alrededor del 20% de su capacidad migratoria durante hasta alrededor de las 50 horas. Como se muestra en los paneles (e) y (f), las células retenían un mayor capacidad migratoria durante una más larga duración de tiempo en los suplementados con PBS con incluso una más alta concentración de suero.

Tal y como se muestra en la Fig. 3, el producto de la presente invención comprendiendo células CD34+ seleccionadas cuando estaba formulado en 10% de suero, retenía el 14,25%, <1%,<6%, y 5,8% de su capacidad migratoria mediada por CXCR-4, alrededor de las 24, alrededor de las 32, alrededor de las 48 y alrededor de las 56 horas después de la recogida, respectivamente. La Fig. 3 muestra además que el producto de la presente invención comprendiendo células CD34+ cuando estaba formulado en 20% de suero retenía el 18,25%, el 10,25%, el 17% y el 11% de su capacidad migratoria de sus CD34+ mediada por CXCR-4, alrededor de las 24, alrededor de las 32, alrededor de las 48 y alrededor de las 56 horas después de la recogida, respectivamente. El término “cantidad estabilizante” tal como se utiliza en este documento se refiere por tanto a la cantidad de suero que, cuando está incluido en la formulación del producto de la presente invención comprendiendo células CD34+ seleccionadas, permite a esas células retener su actividad quimio táctica mediada por CXCR-4 y su capacidad para formar colonias hematopoyéticas.

Estudio 5: Prueba de la Esterilidad del producto Final

Debido al limitado rendimiento de células obtenido de una recogida MMH de 300 ml, la esterilidad del producto celular final será evaluada utilizando el sobrenadante retirado de la formulación del producto final con la finalidad de preservar producto celular para la infusión. Las muestras de sobrenadante son cargadas en las jeringas en una manera idéntica a aquella usada para cargar el producto celular en las jeringas utilizadas para la infusión (véase *supra*). Con el fin de demostrar que tal muestra será representativa de la formulación del producto celular final, inoculamos células CD34+ seleccionadas en la solución para infusión antes de la centrifugación del producto final con *C. sporogenes* (13 CFU/ml), *P. aeruginosa* (2 CFU/ml), *S. aureus* (18 CFU/ml), *A, niger* (17 CFU/ml), *C. albicans*

(3 CFU/ml) y B. *subtilis* (17 CFU/ml) (véase Tabla 22). Después de la centrifugación, fue evaluada la esterilidad de ambas fracciones, pellet celular y sobrenadante no celular utilizando las pruebas aeróbica y anaeróbica USP.

Tabla 23: Bacterias y hongos utilizados para el estudio de esterilidad.
Cada vial de microorganismo fuente preparado por Microbiological Environments (Entornos Microbiológicos) conteniendo 400 microbios por ml, pero los números de CFU derivados de cada especie son variados

Microbio	# total de microbios / ml	CFU totales / ml	CFU esperados / ml de la muestra inoculada (21 ml)
C. sporogenes	400	279	13
P. aeruginosa	400	36	2
S. aureus	400	371	18
A. niger	400	356	17
C. albicans	400	62	3
B. subtilis	400	349	17

Tal y como se muestra en la Tabla 24, ambas fracciones, la fracción de pellet celular y las fracciones de suspensión fueron probadas mostrando las muestras crecimiento demasiado grande de los microorganismos, mientras que las muestras no inoculadas mostraron que no había crecimiento. Además, fue observado que no había un ratio de diferencial aparente de crecimiento entre las pruebas de las fracciones de pellet celular y las fracciones de suspensión para todos los microorganismos probados. En las muestras tomadas antes de cada paso del procedimiento del proceso y a continuación de la perfusión final a través de los catéteres se comprobó que existía una contaminación microbial negativa.

Tabla 24: Pruebas de esterilidad de 14 días de muestras de células nucleadas (NC) inoculadas con especies especificas de microorganismos (400 microbios en 21 ml de muestra NC

Muestra con microbio inoculado	Tipo medio	Fracción muestra	Test 1	Test 2	Test 3
C. sporogenes	FTM[a]	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
S. aureus	FTM	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
P. aeruginosa	FTM	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
A. niger	TSB[b]	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
C. albicans	TSB	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
B. subtilis	TSB	Pellet celular	Positivo	Positivo	Positivo
		Suspension	Positivo	Positivo	Positivo
Control positivo: *C. sporogenes*	FTM	Suspensión celular	Positivo		
Control positivo: *S. aureus*	FTM		Positivo		
Control positivo: *P. aeruginosa*	FTM		Positivo		
Control positivo: *A. niger*	TSB		Positivo		
Control positivo: *C. albicans*	TSB		Positivo		
Control positivo: *B. subtilis*	TSB		Positivo		
Control negativo: Sin microbios	FTM	Suspensión celular	Negativo		
Control negativo: Sin microbios	TSB		Negativo		

[a] **Medio Fluido Tioglicolato**
[b] **Caldo de Soja Triptico**

Resumen del Estudio Pre Clínico

Colectivamente, estos datos preclínicos indican que los procedimientos de pruebas y fabricación descritos son capaces de generar números adecuados de células viables con una estabilidad adecuada para resistir el envío y la perfusión a través del catéter en una manera que no debería suponer unas preocupaciones adicionales al sujeto diferentes de aquellas asociadas con la utilización habitual de la infusión de fluido a través del catéter de globo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular causada por una insuficiencia vascular, comprendiendo la composición farmacéutica:

(A) una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas estériles, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es eficaz para reparar una lesión vascular causada por insuficiencia vascular, comprendiendo el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas una población aislada de células mononucleares autólogas obtenidas de un paciente a tratar y enriquecidas para células CD34+, las cuales además contienen una subpoblación de células potentes CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas comprende al menos $0{,}5x10^6$ células potentes CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4; y
(B) una cantidad estabilizante de suero, en donde la cantidad estabilizante de suero es de al menos el 10 % (v/v) y es eficaz para retener la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y la actividad de formación de colonias hematopoyéticas de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+,

en donde la composición farmacéutica se prepara por un procedimiento que comprende:

(a) purificación estéril de una población de células mononucleares que comprende células CD34+ obtenidas del paciente, en condiciones estériles, para células CD34+ para producir células CD34+ enriquecidas, en donde las células CD34+ enriquecidas, las cuales además contienen una subpoblación de células potentes CD34+ que expresan CXCR-4 que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, son un producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas;
(b) estabilización de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 y de la actividad de formación de colonias hematopoyéticas de la subpoblación de células CD34+/CXCR-4+ por medio de la adición de una cantidad estabilizante de al menos el 10 % de suero (v/v);
(c) formulación estéril del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas estériles para formar una composición farmacéutica;
(d) evaluación de la esterilidad de la composición farmacéutica;
(e) confirmación de que, durante al menos 24 horas después de la obtención de dicha población de células mononucleares que comprende células CD34+ del paciente, la subpoblación de células potentes CD34+/CXCR-4+, cuando analizadas *in vitro* después del paso a través de un catéter:

(i) retiene al menos un 2 % de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células potentes CD34+CXCR-4+ que tuvieron actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4;
(ii) puede formar colonias hematopoyéticas; y
(iii) es, al menos, un 70 % viable, y

(f) liberación de la composición farmacéutica estéril como elegible para la infusión en el paciente.

2. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población de células mononucleares autólogas aisladas que contiene células CD34+, las cuales contienen además una subpoblación de células potentes células CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 se deriva de componentes celulares de un aspirado de médula ósea.

3. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, durante al menos las 48 horas siguientes a la adquisición del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, cuando analizadas *in vitro* después del paso a través de un catéter:

(a) las células en la composición son capaces de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y
(b) la composición retiene al menos un 2 % de la actividad quimiotáctica de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células potentes CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

4. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, durante al menos las 72 horas siguientes a la adquisición del producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas, cuando analizadas *in vitro* después del paso a través de un catéter:

(a) las células en la composición son capaces de formar colonias hematopoyéticas *in vitro*; y

(b) la composición retiene al menos un 2 % de la actividad quimiotáctica de la actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4 de la subpoblación de células potentes CD34+/CXCR-4+ que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4.

5. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición se formula para administración parenteral en un vaso sanguíneo coronario o para administración parenteral a través del catéter en el miocardio.

6. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el catéter es un catéter de control de flujo o un catéter de balón.

7. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el catéter tiene un diámetro interno de al menos aproximadamente 0,36 mm.

8. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la esterilidad del producto de células hematopoyéticas quimiotácticas es confirmado por un método que comprende las etapas:

(a) centrifugar el producto de células madre hematopoyéticas quimiotácticas para formar un producto celular distinto que comprende (i) un sedimento que comprende la población de células mononucleares aisladas enriquecidas para células CD34+ y (ii) un sobrenadante;
(b) retirar el sobrenadante del producto celular distinto sin alterar el sedimento celular del producto celular distinto, y
(c) analizar la esterilidad del sobrenadante del producto celular distinto, determinando de esta manera la esterilidad del sedimento celular del producto celular distinto, sin delecionar el producto de células hematopoyéticas quimiotácticas.

9. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la población de células mononucleares autólogas aisladas que contiene células CD34+, las cuales contienen además una subpoblación de células potentes CD34+ que expresan CXCR-4 y que tienen actividad quimiotáctica mediada por CXCR-4, se deriva de sangre periférica.

10. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la insuficiencia vascular es el resultado de la oclusión de una arteria coronaria.

11. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la insuficiencia vascular resultado de la oclusión de una arteria coronaria es una insuficiencia microvascular; una isquemia; una insuficiencia vascular transitoria; o una isquemia de miocardio; o en donde la insuficiencia vascular resultado de la oclusión de una arteria coronaria produce un infarto de miocardio.

12. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células CD34+/CXCR-4+ de la composición farmacéutica estéril migran y reparar el daño causado por la insuficiencia vascular.

13. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la migración de las células CD34+/CXCR-4+ de la composición farmacéutica estéril es estimulada por quimiotaxia.

14. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la quimiotaxia es mediada por al menos uno de SDF-1 y CXCR-4.

15. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición farmacéutica incluye además al menos un agente activo compatible seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), un betabloqueador, un diurético, un agente antiarrítmico, un agente antianginoso, un agente vasoactivo o inotrópico, un agente anticoagulante, un agente fibrinolítico, y un agente hipercolesterolémico.

16. La composición farmacéutica estéril para su uso en un método de tratamiento de una lesión vascular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el procedimiento de preparación de la composición farmacéutica comprende además el transporte de la población de células mononucleares autólogas que comprende células CD34+ obtenidas del paciente en un centro de procesamiento.

.

Resultados estudio Amorcyte: Viabilidad, expresión CXCR-4 y migración mediada SF-1/CXCR-4 de células CD34+ después de la selección con Isolex

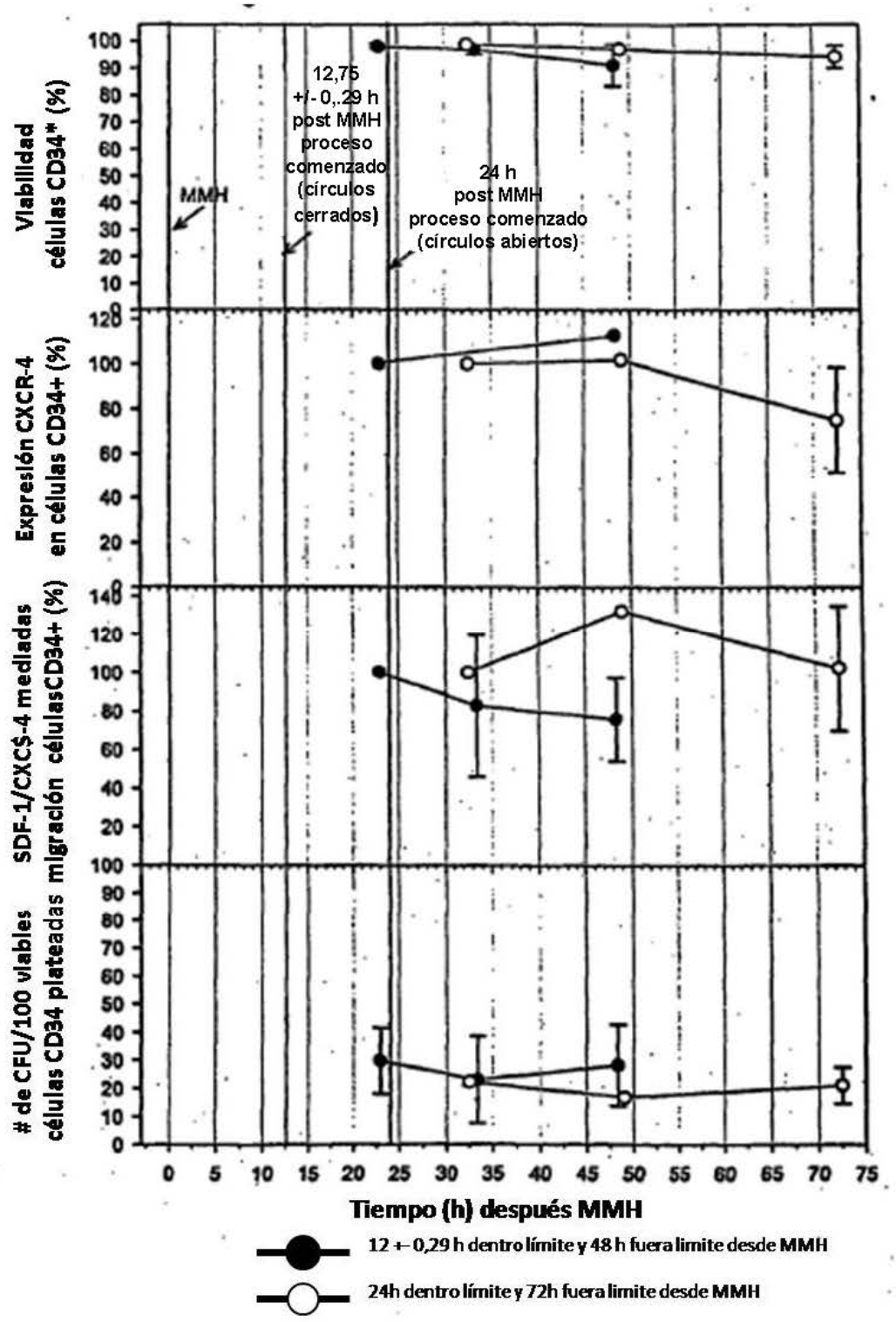


FIG. 1

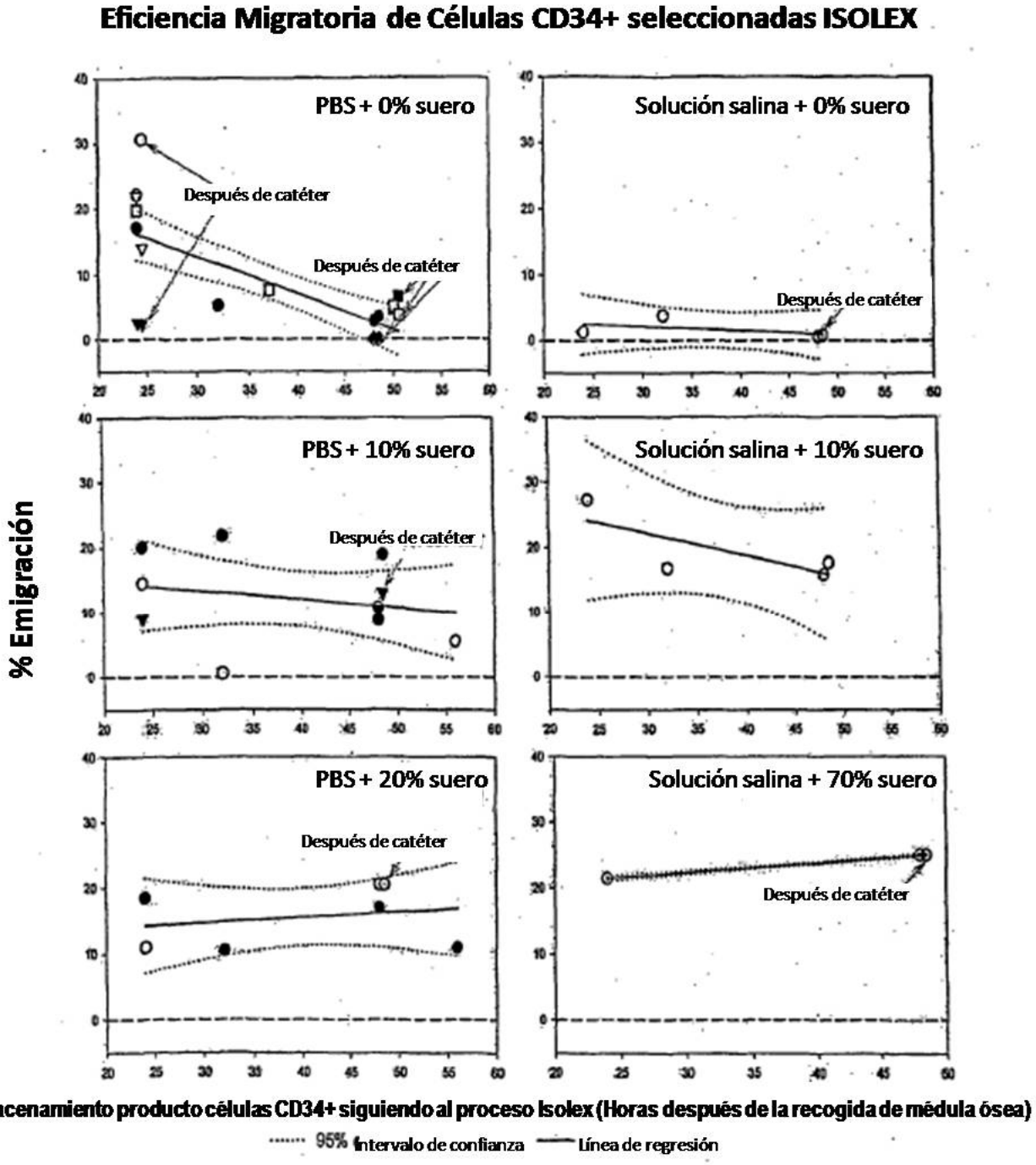
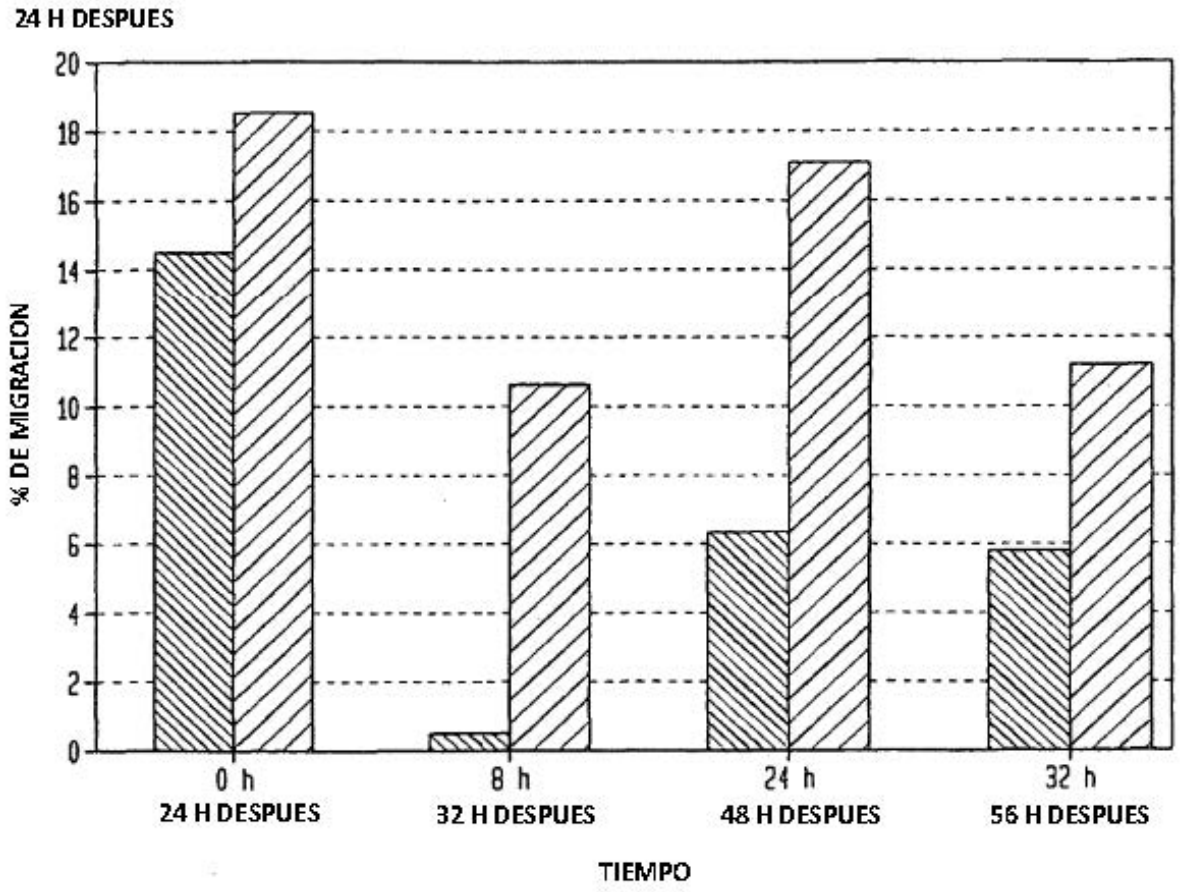

Eficiencia Migratoria de Células CD34+ seleccionadas ISOLEX
PBS + 0% suero
Después de catéter
Después de catéter
Solución salina + 0% suero
Después de catéter
PBS + 10% suero
Después de catéter
Solución salina + 10% suero
PBS + 20% suero
Después de catéter
Solución salina + 70% suero
Después de catéter
% Emigración
Almacenamiento producto células CD34+ siguiendo al proceso Isolex (Horas después de la recogida de médula ósea)
95% Intervalo de confianza
Línea de regresión

FIG. 2

FIG. 3


24 H DESPUES
% DE MIGRACION
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0 h
24 H DESPUES
8 h
32 H DESPUES
24 h
48 H DESPUES
32 h
56 H DESPUES
TIEMPO