

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 427**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00	(2006.01) A61K 35/28	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01) A61K 35/34	(2015.01)
A61K 38/43	(2006.01) A61K 47/69	(2007.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61P 1/18	(2006.01)
A61B 6/00	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61B 8/08	(2006.01) A61P 9/14	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)
A61K 49/18	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
A61K 51/04	(2006.01) A61P 25/16	(2006.01)
A61K 51/12	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2017 PCT/US2017/013564**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17124037**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2017 E 17739105 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022 EP 3402490**

54 Título: **Uso terapéutico de mitocondrias y agentes mitocondriales combinados**

30 Prioridad:

15.01.2016 US 201662279442 P
15.01.2016 US 201662279489 P
10.11.2016 US 201662420381 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2022

73 Titular/es:

THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (33.3%)
55 Shattuck Street
Boston, Massachusetts 02115, US;
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. (33.3%) y
FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC. (33.3%)

72 Inventor/es:

MCCULLY, JAMES D.;
LEVITSKY, SIDNEY;
COWAN, DOUGLAS B.;
EMANI, SITARAM M.;
DEL NIDO, PEDRO J.;
RUBENS, JACOB R. y
MILWID, JOHN MILES

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 927 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de mitocondrias y agentes mitocondriales combinados

CAMPO

La descripción se refiere al uso terapéutico de mitocondrias y agentes mitocondriales combinados.

5 ANTECEDENTES

10 Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana que se encuentran en el citoplasma de las células eucariotas nucleadas. Se encuentran en casi todas las células del cuerpo humano, excepto en los glóbulos rojos. Son el sitio principal del metabolismo energético de la célula, y generan trifosfato de adenosina (ATP) para diferentes funciones celulares. Por lo general, más del 90% de la necesidad de ATP de una célula es suministrado por las propias mitocondrias de la célula.

Las mitocondrias están compuestas por dos membranas concéntricas, que tienen funciones especializadas. La membrana mitocondrial interna contiene proteínas para la ATP sintasa. La membrana mitocondrial externa, que contiene un gran número de proteínas de membrana integrales, encierra todo el orgánulo.

15 La estructura de las mitocondrias tiene sorprendentes similitudes con algunos procariotas modernos. De hecho, se cree que las mitocondrias se originaron a partir de una antigua simbiosis cuando una célula nucleada engulló a un procariota aeróbico. En la relación de simbiosis, la célula anfitriona llegó a depender del procariota engullido para la producción de energía, y la célula procariota comenzó a depender del entorno protector proporcionado por la célula anfitriona.

20 Debido a la función principal de las mitocondrias en el metabolismo celular, el daño y la disfunción en las mitocondrias pueden causar una variedad de enfermedades humanas. Las enfermedades causadas por mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) incluyen el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de MELAS, y la neuropatía óptica hereditaria de Leber. Estas enfermedades a menudo son transmitidas por una madre a su descendencia. Además, se cree que enfermedades, tal como el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de Pearson y la oftalmoplejía externa progresiva se deben a reordenamientos del ADNmt a gran escala.

25 Además, el daño y la disfunción en las mitocondrias también pueden ser causados por afecciones mitocondriales adquiridas. Estas afecciones mitocondriales adquiridas pueden ser causadas por lesiones, toxicidad, quimioterapia, y cambios relacionados con la edad. En particular, la lesión por isquemia/reperfusión puede causar daño mitocondrial, lo que tendrá un impacto negativo en el consumo de oxígeno y la síntesis de energía.

30 El documento WO 2015/192020 A1 describe aparatos, kits y métodos de filtración para el aislamiento rápido de mitocondrias intactas y viables a partir de tejidos.

Christine M. Kusminski et al. describen, en *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, núm. 9, 1 de septiembre de 2012, en las páginas 435-443, la disfunción mitocondrial en tejido adiposo blanco.

35 Xiao Yin et al. describen, en *Journal of Endocrinology and Metabolism*, vol. 99, núm. 2, 1 de febrero de 2014, en las páginas E209-E216, que la función mitocondrial de los adipocitos se reduce en la obesidad humana, independientemente del tamaño de las células grasas.

Aaron Cypess et al. describen, en *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 17, núm. 2, 1 de abril de 2010, en las páginas 143-149, grasa parda como terapia para la obesidad y la diabetes.

Alessandro Pescechera et al. describen, en *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 119, núm. 4, 30 de septiembre de 2013, en las páginas 151-160, perspectivas terapéuticas de un "pardeamiento" del tejido adiposo.

40 Actualmente, no existen tratamientos conocidos y aprobados que involucren a las mitocondrias. Hay una necesidad de tal tratamiento. También existe la necesidad de utilizar las mitocondrias para la administración de fármacos y algunos otros fines terapéuticos y de diagnóstico.

SUMARIO

45 La presente invención está definida por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones adicionales de la invención.

50 La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden mitocondrias, y composiciones para uso en métodos de tratamiento de trastornos que usan tales composiciones farmacéuticas. La memoria descriptiva proporciona además métodos de diagnóstico y de formación de imágenes usando dichas composiciones farmacéuticas. Los métodos descritos se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que las propias mitocondrias aisladas, y las mitocondrias aisladas vinculadas a un agente terapéutico, agente de diagnóstico y/o agente de formación de imágenes, pueden administrarse en el tejido de un paciente inyectándolas en los vasos

sanguíneos del paciente. Es decir, la inyección o aplicación directa de mitocondrias al tejido diana, aunque se contempla mediante ciertos métodos descritos aquí, no siempre es necesaria. Más bien, en algunos casos, los métodos descritos aquí aprovechan el descubrimiento de que después de inyectar o infundir mitocondrias, por ejemplo en una arteria, las mitocondrias pueden atravesar la pared arterial y ser captadas por células de los tejidos del paciente.

5 Los métodos descritos aquí pueden proporcionar una distribución localizada y general de mitocondrias, o mitocondrias con agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de formación de imágenes, a tejidos o células para una variedad de fines de tratamiento, diagnóstico y/o de formación de imágenes usando procedimientos médicos relativamente simples.

La invención se refiere a composiciones para uso en métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno metabólico. Los métodos incluyen las etapas de administrar una composición que comprende mitocondrias aisladas en tejido adiposo blanco del sujeto en una cantidad suficiente para tratar el trastorno metabólico. En algunas realizaciones, el trastorno metabólico es obesidad o diabetes tipo II. La composición se puede administrar inyectando la composición en el tejido adiposo blanco. El tejido adiposo blanco se puede ubicar debajo del mentón o en el abdomen del sujeto.

Como se usa aquí, la expresión "mitocondrias aisladas" significa mitocondrias funcionales e intactas que están libres de material extraño de células eucariotas.

15 Un "agente mitocondrial combinado" es una mitocondria aislada que se combina artificialmente con un agente farmacéutico, de diagnóstico o de formación de imágenes, o cualquier otro. El agente se combina con una mitocondria de cualquier manera, por ejemplo se une (por ejemplo, se une química o electrostáticamente) a una mitocondria, se adhiere a una mitocondria, se incrusta en la membrana mitocondrial, se encierra sustancialmente dentro de una mitocondria, o es encapsulado completamente por una mitocondria, siempre que la mitocondria y el agente estén en contacto físico entre sí. Los agentes mitocondriales combinados están diseñados de manera que la mitocondria actúe como un "portador" que puede transportar el agente a los tejidos del paciente después de la inyección.

20 Los términos "sujeto" y "paciente" se usan a lo largo de la memoria descriptiva para describir un animal, ser humano o no humano, al que se proporciona tratamiento según los métodos de la presente descripción. Las aplicaciones veterinarias están claramente anticipadas por la presente descripción. El término incluye, pero no se limita a, aves, reptiles, anfibios y mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, conejillos de Indias, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Los sujetos preferidos son seres humanos, animales de granja, y mascotas domésticas tales como gatos y perros.

El término "tratamiento" se usa aquí para indicar el retraso del inicio, la inhibición, el alivio de los efectos o la prolongación de la vida de un paciente que padece una afección, por ejemplo una enfermedad descrita aquí.

30 Una "enfermedad relacionada con la isquemia" es una enfermedad que implica isquemia. La isquemia, tal como se usa aquí, es un flujo sanguíneo reducido a un órgano y/o tejido. El flujo sanguíneo reducido puede ser causado por cualquier mecanismo adecuado, incluido un bloqueo parcial o completo (una obstrucción), un estrechamiento (una constricción), y/o una fuga/rotura, entre otros, de uno o más vasos sanguíneos que suministran sangre al órgano y/o tejido.

35 Por "inmediatamente después de que se recolecten las mitocondrias de las células" se entiende inmediatamente después de que se recolecten las mitocondrias de las células y antes de que pueda ocurrir cualquier reducción sustancial en la viabilidad de las mitocondrias.

40 Como se usa aquí, el término "trasplante" se usa a lo largo de la memoria descriptiva como un término general para describir el proceso de implantar un órgano, tejido, masa de células, células individuales, u orgánulos celulares, en un receptor. La expresión "trasplante de células" se usa a lo largo de la memoria descriptiva como un término general para describir el proceso de transferir al menos una célula, por ejemplo una célula de los islotes o una célula madre, a un receptor. Por ejemplo, dicho trasplante se puede realizar extrayendo las células β (o los islotes intactos) del páncreas de un donante y colocándolos en un paciente receptor cuyo páncreas no puede producir suficiente insulina. Las expresiones incluyen todas las categorías de trasplantes conocidas en la técnica, excepto las transfusiones de sangre. Los trasplantes se clasifican por sitio y relación genética entre el donante y el receptor. El término incluye, por ejemplo, autotrasplante (extracción y transferencia de células o tejido de un lugar, en un paciente, al mismo u otro lugar en el mismo sujeto), alotrasplante (trasplante entre miembros de la misma especie), y xenotrasplante (trasplantes entre miembros de diferentes especies).

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y una referencia aquí mencionada, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no pretenden ser limitativos.

55 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de un protocolo ejemplar para aislar mitocondrias de tejido o células cultivadas.

La FIG. 2A es un conjunto de imágenes de corazones de conejo regionalmente isquémicos a los que se les han inyectado 1×10^8 mitocondrias doblemente marcadas al inicio de la reperfusión. La fila superior muestra representaciones volumétricas del corazón. La tomografía microcomputarizada (μ CT), la tomografía por emisión de positrones (PET), y las representaciones combinadas se muestran de izquierda a derecha. La fila central muestra cortes coronarios individuales de los corazones. Las imágenes de resonancia magnética (MRI), PET, y combinadas se muestran de izquierda a derecha. Las imágenes de la fila inferior son cortes transversales individuales de corazones inyectados. Las imágenes de MRI, PET y combinadas se muestran de izquierda a derecha.

La FIG. 2B es un conjunto de imágenes de corazones de conejo regionalmente isquémicos perfundidos con 1×10^8 mitocondrias doblemente marcadas al inicio de la reperfusión. La fila superior muestra representaciones volumétricas del corazón, y las representaciones de μ CT, PET y combinadas se muestran de izquierda a derecha. La fila central muestra cortes coronarios individuales de los corazones, y las imágenes de MRI, PET y combinadas se muestran de izquierda a derecha. La fila inferior muestra cortes transversales individuales de corazones perfundidos. Las imágenes de MRI, PET y combinadas se muestran de izquierda a derecha.

La FIG. 3A es un conjunto de imágenes que muestran tinciones histológicas de corazones isquémicos inyectados con mitocondrias humanas. Las secciones de corazón inyectadas se inmunotñeron de forma fluorescente para desmina (verde) y el marcador mitocondrial específico de humano MTC02 (anticuerpo monoclonal de ratón antimitocondria específico de humano, rojo) [MTC02] (ab80649, Abcam, Cambridge, MA)) (fila superior). La fila central muestra la tinción con aglutinina de germen de trigo (rojo) y el marcador mitocondrial específico de humano 113-1 (verde) (anticuerpo anti-mitocondria [113-1] (ab92824)). Los núcleos se identifican usando el colorante de unión al ADN, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (azul). MTC02 y la tinción nuclear se muestran con iluminación de contraste de fase (fila inferior). Las mitocondrias trasplantadas asociadas con las membranas de los miocitos cardíacos se indican con flechas.

La FIG. 3B es un conjunto de imágenes que muestran tinciones histológicas de corazones isquémicos perfundidos con mitocondrias humanas. Los corazones perfundidos se inmunotñeron con α -actinina (rojo) y MTC02 (anticuerpo monoclonal de ratón antimitocondria específico de humano, verde [MTC02] (ab80649, Abcam, Cambridge, MA)) (fila superior). Las mitocondrias trasplantadas se indican con flechas. Algunos corazones se perfundieron con lectina antes de la fijación, para revelar superficies vasculares lumbales. La fila central muestra la tinción de lectina (verde) y 113-1 (roja); mientras que la fila inferior muestra la tinción con azul de Prusia para el hierro (azul) y una contratinción de pararosanilina (rosa).

La FIG. 4 es un diagrama esquemático que muestra la cuantificación del área en riesgo (usando pigmento azul de Monastryl) y el tamaño del infarto (usando tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)) en corazones con isquemia regional de control ($n = 3$) y en aquellos perfundidos con 1×10^8 mitocondrias hepáticas de origen autólogo ($n = 3$).

La FIG. 5 es un diagrama esquemático que muestra la función miocárdica regional en el área isquémica evaluada por acortamiento sistólico segmentario usando tres transductores ultrasónicos piezoeléctricos.

La FIG. 6A es una imagen de canal rojo de microscopía de iluminación estructurada de superresolución (SR-SIM) que muestra la internalización y fusión mitocondrial en cardiomiocitos humanos.

La FIG. 6B es una imagen de canal verde de SR-SIM que muestra la internalización y fusión mitocondrial en cardiomiocitos humanos.

La FIG. 6C es una imagen de canal azul de SR-SIM que muestra la internalización y fusión mitocondrial en cardiomiocitos humanos.

La FIG. 6D es una imagen combinada de SR-SIM que muestra la internalización y fusión mitocondrial en cardiomiocitos humanos.

La FIG. 7A es un gráfico que muestra los resultados de la citometría de flujo para las mitocondrias en el grupo de control.

La FIG. 7B es un gráfico que muestra los resultados de la citometría de flujo para mitocondrias marcadas con proteína fluorescente verde (GFP).

La FIG. 7C es un gráfico que muestra los resultados de la citometría de flujo para mitocondrias marcadas con proteína fluorescente roja (RFP).

La FIG. 7D es un gráfico que muestra los resultados de la citometría de flujo para las mitocondrias aisladas de cardiomiocitos iCell[®] tratados con mitocondrias marcadas con GFP.

- La FIG. 8 es un diagrama esquemático que muestra un modelo propuesto de las vías endosómicas para la internalización de las mitocondrias.
- La FIG. 9 es un diagrama que muestra un protocolo experimental para demostrar que las mitocondrias inyectadas no obstruyen el flujo sanguíneo coronario.
- 5 La FIG. 10 A es un gráfico de trazado de electrocardiograma (ECG) que muestra el ECG inicial y el ECG después de que el modelo porcino se trata con adenosina, vasopresina y epinefrina.
- La FIG. 10B es un gráfico de trazado de ECG que muestra el ECG después de que el modelo porcino se trata con vehículos y mitocondrias.
- 10 La FIG. 10C es un gráfico de trazado de ECG que muestra el ECG después de que el modelo porcino se trata con perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm .
- La FIG. 11A es un gráfico de barras que muestra el QRS inicial y el QRS después de que el modelo porcino se trata con adenosina, vasopresina, epinefrina, mitocondrias, y vehículos.
- La FIG. 11B es un gráfico de barras que muestra el intervalo QT corregido de referencia (cQT) y el intervalo cQT después de que el modelo porcino se trata con adenosina, vasopresina, epinefrina, mitocondrias, y vehículos.
- 15 La FIG. 11C es un gráfico de barras que muestra el QRS inicial y el QRS después de que el modelo porcino se trata con perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm y mitocondrias.
- La FIG. 11D es un gráfico de barras que muestra el intervalo cQT de referencia y el intervalo cQT después de que el modelo porcino se trata con perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm y mitocondrias.
- 20 La FIG. 12A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de acortamiento sistólico después de la infusión coronaria de vehículos, adenosina, epinefrina, vasopresina, y mitocondrias.
- La FIG. 12B es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de acortamiento sistólico después de la infusión coronaria de perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm , y mitocondrias.
- La FIG. 13A es un gráfico de barras que muestra el flujo sanguíneo coronario después de la infusión coronaria de vehículos, adenosina, vasopresina, y mitocondrias.
- 25 La FIG. 13B es un gráfico de barras que muestra el flujo sanguíneo coronario después de la infusión coronaria de mitocondrias, mitocondrias desvitalizadas, y perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm .
- La FIG. 14 es un gráfico que muestra el flujo sanguíneo coronario en diferentes momentos después de la infusión coronaria de adenosina, vasopresina, mitocondrias, y mitocondrias desvitalizadas (mitocondrias 1×10^9 orgánulo/ml; adenosina 60 μg ; vasopresina 1U; mitocondrias desvitalizadas 1×10^9 orgánulo/ml; línea de base = 20 ml/min; los valores son la media \pm SE).
- 30 La FIG. 15A es un gráfico de barras que muestra el flujo sanguíneo coronario en respuesta a diferentes dosis de mitocondrias.
- La FIG. 15B es un gráfico que muestra el flujo sanguíneo coronario en diferentes momentos en respuesta a diferentes dosis de mitocondrias.
- 35 La FIG. 16 es un diagrama que muestra los métodos para demostrar la cardioprotección proporcionada por la infusión vascular de mitocondrias en un modelo de animal grande (cerdos).
- La FIG. 17A es un conjunto de gráficos que muestran la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTVI) y la dP/dt de la presión del ventrículo izquierdo con infusión vascular de mitocondrias.
- 40 La FIG. 17B es un gráfico que muestra el porcentaje de acortamiento sistólico con infusión vascular de mitocondrias.
- La FIG. 18A es un gráfico que muestra el porcentaje de área en riesgo en el ventrículo izquierdo con infusión vascular de vehículos y con infusión vascular de mitocondrias.
- La FIG. 18B es un gráfico que muestra el porcentaje del tamaño del infarto en el área de riesgo con infusión vascular de vehículos y con infusión vascular de mitocondrias.
- 45 La FIG. 19A es un gráfico de barras que muestra el número de puntos en ratones que reciben inyecciones únicas o múltiples de mitocondrias autógenas, e inyecciones únicas y múltiples de esplenocitos.
- La FIG. 19B es un gráfico de barras que muestra el número de puntos en ratones que reciben inyecciones únicas o múltiples de mitocondrias alogénicas, e inyecciones únicas y múltiples de esplenocitos.

- La FIG. 20 es un gráfico que muestra el porcentaje de aloanticuerpos en respuesta a inyecciones únicas y múltiples de mitocondrias autógenas y alogénicas, e inyecciones únicas y múltiples de esplenocitos.
- La FIG. 21 es un diagrama que muestra los protocolos para determinar la concentración óptima de rodamina 6G, el tiempo de incubación, y las temperaturas para que las mitocondrias absorban la rodamina 6G.
- 5 La FIG. 22A es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción libre en diferentes condiciones de incubación (4°C).
- La FIG. 22B es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción libre en diferentes condiciones de incubación (26°C).
- 10 La FIG. 23A es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida en diferentes condiciones de incubación (4°C).
- La FIG. 23B es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida en diferentes condiciones de incubación (26°C).
- La FIG. 24A es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida después de incubar las mitocondrias con rodamina 6G 2,5 uM en diferentes condiciones de incubación.
- 15 La FIG. 24B es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida después de incubar las mitocondrias con rodamina 6G 2,5 uM en diferentes condiciones de incubación.
- La FIG. 25A es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida después de incubar las mitocondrias con rodamina 6G 1,25 uM en diferentes condiciones de incubación.
- 20 La FIG. 25B es un gráfico de barras que muestra la concentración de rodamina 6G en la fracción unida después de incubar las mitocondrias con rodamina 6G 1,25 uM en diferentes condiciones de incubación.
- La FIG. 26 es un diagrama esquemático que muestra la transferencia de mitocondrias adoptivas a células formadoras de colonias endoteliales humanas (ECFC).
- La FIG. 27A es un diagrama esquemático que muestra el ensayo de vasculogénesis *in vivo*.
- 25 La FIG. 27B es un conjunto de imágenes macroscópicas que muestran explantes cosechados 7 días después del trasplante.
- La FIG. 28A son dos imágenes de tinción de hematoxilina y eosina (H&E) que muestran abundantes vasos sanguíneos llenos de eritrocitos en implantes que contenían ECFC-Mitocondrias (ECFC-Mito), pero no en implantes que contenían ECFC-Control.
- 30 La FIG. 28B es un gráfico que muestra la cuantificación de la densidad de microvasos que revela una mayor densidad vascular en los implantes que contenían ECFC-Mito que en los implantes que contenían ECFC-Control.
- La FIG. 29A es una imagen que muestra la unión de la lectina UEA-1 conjugada con rodamina en los lúmenes de los vasos perfundidos recién formados.
- La FIG. 29B es una imagen de inmunotinción CD31 (h-CD31) específica de humano de los lúmenes de los vasos perfundidos recién formados.
- 35 La FIG. 30A es una imagen PET/CT que muestra la distribución de las mitocondrias en los pulmones izquierdo y derecho después de que se inyectaron mitocondrias marcadas con ¹⁸F-rodamina 6G en la arteria pulmonar principal.
- La FIG. 30B es una imagen PET/CT que muestra la distribución de las mitocondrias en los pulmones izquierdo y derecho después de que se inyectaron mitocondrias marcadas con ¹⁸F-rodamina 6G en la arteria pulmonar principal.
- 40 La FIG. 31A es una foto que muestra una lesión por isquemia/reperfusión pulmonar sin tratamiento mitocondrial.
- La FIG. 31B es una foto que muestra una lesión por isquemia/reperfusión pulmonar con tratamiento de mitocondrias.
- 45 La FIG. 32 es una imagen PET/CT que muestra las mitocondrias ubicadas en el nervio óptico después de que se inyectaron mitocondrias marcadas con ¹⁸F-rodamina 6G en la arteria carótida común del ratón.
- La FIG. 33 es un diagrama esquemático que muestra las segmentaciones cardíacas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las mitocondrias aisladas, y las mitocondrias aisladas unidas a un agente terapéutico, agente de diagnóstico y/o agente de formación de imágenes, pueden administrarse en el tejido de un paciente inyectándolas en los vasos sanguíneos del paciente. Los médicos expertos pueden distribuir local y/o generalmente mitocondrias a tejidos y/o células de un paciente para una variedad de fines, usando procedimientos médicos relativamente simples. Además, las mitocondrias se pueden usar como agentes transportadores, por ejemplo para administrar agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de formación de imágenes a los tejidos de un paciente. En comparación con algunos regímenes terapéuticos tradicionales que implican a nanopartículas, se observa además que las mitocondrias no son tóxicas, y no causan ninguna respuesta inmunológica o autoinmune adversa sustancial.

- 5 Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría, se cree que las mitocondrias infundidas se extravasan a través de la pared capilar adhiriéndose primero al endotelio. Después de inyectarlas o infundirlas en una arteria, las mitocondrias pueden cruzar el endotelio de los vasos sanguíneos y ser absorbidas por las células tisulares a través de un proceso de internalización dependiente de la actina endosomal.

Agentes mitocondriales combinados

- 15 Los agentes mitocondriales combinados incluyen mitocondrias que están físicamente asociadas con un agente, tales como un agente terapéutico, un agente de diagnóstico y/o un agente de formación de imágenes.

Un agente terapéutico puede ser cualquier agente que tenga un uso terapéutico o profiláctico. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, por ejemplo, agentes terapéuticos para trastornos relacionados con la isquemia, agentes citotóxicos para tratar el cáncer, entre muchos otros. En algunos casos, las mitocondrias pueden administrar agentes terapéuticos a células específicas, por ejemplo células tumorales. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, un inhibidor intracelular, desactivador, toxina, sustancia de detención, y/o sustancia citostática/citotóxica que, una vez dentro de una célula, inhibe, destruye, detiene, modifica y/o altera la célula de manera que no puede ya funcionar normalmente y/o sobrevivir. El agente terapéutico puede ser un agente para restaurar la función adecuada de una célula, por ejemplo un vector de ADN para terapia génica. Un agente terapéutico puede ser, por ejemplo, un compuesto inorgánico u orgánico; una molécula pequeña (menos de 500 daltons) o una molécula grande; una molécula proteínica, tal como un péptido, polipéptido, proteína, proteína modificada postraduccionalmente, o anticuerpo; o una molécula de ácido nucleico, tal como ADN bicatenario, ADN monocatenario, ARN bicatenario, ARN monocatenario, o una molécula de ácido nucleico de triple hélice. En algunos ejemplos, un agente terapéutico puede ser un producto natural derivado de cualquier organismo conocido (por ejemplo, de un animal, planta, bacteria, hongo, protista o virus) o de una biblioteca de moléculas sintéticas. En algunos ejemplos, un agente terapéutico puede ser un compuesto monomérico o polimérico. Algunos ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes citotóxicos, vectores de ADN, ARN pequeño de interferencia (ARNpi), micro ARN (miARN), péptidos reactivos, nanopartículas, microesferas, y moléculas fluorescentes.

- 20 Un agente de diagnóstico es un agente que tiene un uso de diagnóstico. Como las mitocondrias transportan un agente de diagnóstico a una célula, en algunos ejemplos, el agente de diagnóstico puede diseñarse para determinar la condición dentro de una célula, por ejemplo el pH y el estrés oxidativo dentro de una célula.

Un agente de formación de imágenes es un agente que se emplea para uso en técnicas de formación de imágenes. Las técnicas o modalidades incluyen, pero no se limitan a, rayos X, tomografía computarizada (TC), formación de imágenes por resonancia magnética (RMI), gammagrafía, fluorescencia, ultrasonido, etc. El agente de formación de imágenes puede ser fluorescente y/o radiactivo. En algunos ejemplos, un agente de formación de imágenes también puede ser un agente de diagnóstico. Los ejemplos de agentes de formación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos MitoTracker (Thermo Fisher Scientific Inc.), CellLight® RFP, BacMam 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.), colorantes fluorescentes pHrodo sensibles al pH (Thermo Fisher Scientific Inc.), ¹⁸F-Rodamina 6G, rodamina B marcada con ¹⁸F, nanopartículas de óxido de hierro magnético, y nanopartículas a base de oro y platino.

- 25 Como se discutió anteriormente, un agente mitocondrial combinado comprende una mitocondria y un agente que están en contacto físico directo y/o indirecto entre sí. Por ejemplo, un agente puede estar enlazado a las mitocondrias, unido a las mitocondrias, incrustado en la membrana mitocondrial, o encerrado total o parcialmente en las mitocondrias. En algunos casos, un agente farmacéutico se puede unir covalentemente a las mitocondrias. En algunos casos, el agente se une a los constituyentes de la membrana mitocondrial directamente a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace de carboxamida y un enlace de disulfuro), o indirectamente a través de un enlazador (por ejemplo, un enlazador peptídico) u otro agente enlazado covalentemente. En otros casos, un agente puede enlazarse a las mitocondrias de forma no covalente, por ejemplo a través de una interacción hidrofóbica, una interacción de Van der Waals, y/o una interacción electrostática, etc.

- 30 En algunos ejemplos, un agente mitocondrial combinado puede comprender dos o más tipos diferentes de agentes, por ejemplo dos tipos diferentes de agentes terapéuticos, tres tipos diferentes de agentes de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico y un agente de diagnóstico, etc. El experto apreciará que es posible cualquier variación.

Un enlazador particularmente útil para enlazar las mitocondrias y un agente proporciona una liberación sostenida del agente tras la inyección. Esto se puede lograr, por ejemplo, usando un grupo funcional de hidrazona. Por ejemplo, se forma una hidrazona para unir covalentemente un agente a los constituyentes de la membrana mitocondrial. Una vez que las células absorben este agente mitocondrial combinado, el cambio en el pH dará como resultado la hidrólisis de la hidrazona, liberando dentro de la célula el agente unido.

En algunos ejemplos, un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, y/o un agente de formación de imágenes se pueden unir a la membrana mitocondrial externa usando química superficial funcionalizada. En algunos casos, las químicas heterobifuncionales pueden enlazar un agente terapéutico, un agente de diagnóstico y/o un agente de formación de imágenes a la superficie mitocondrial, y, una vez que se internalizan, estos agentes pueden liberarse a través de interacciones con esterases intercelulares (por ejemplo, a través de una interacción con un éster de acetoximetilo) o a través de una estrategia de activación con luz ultravioleta o de activación con luz infrarroja cercana. Las estrategias de activación con luz ultravioleta y con luz infrarroja cercana se describen, por ejemplo, en Zhou, Fang, Hanjie Wang y Jin Chang, "Progress in the Field of Constructing Near-Infrared Light-Responsive Drug Delivery Platforms", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 16.3 (2016): 2111-2125; Bansal, Akshaya, y Yong Zhang, "Photocontrolled nanoparticle delivery systems for biomedical applications", *Accounts of chemical research* 47.10 (2014): 3052-3060; Barhouni, Aoune, Qian Liu, y Daniel S. Kohane, "Ultraviolet light-mediated drug delivery: Principles, applications, and challenges", *Journal of Controlled Release* 219 (2015): 31-42.

Composiciones farmacéuticas y otras

La descripción proporciona composiciones que comprenden mitocondrias aisladas, composiciones que comprenden agentes mitocondriales combinados, composiciones que comprenden tanto mitocondrias aisladas como agentes mitocondriales combinados, y métodos para usar dichas composiciones.

Una composición farmacéutica descrita aquí puede incluir mitocondrias y/o agentes de mitocondrias combinados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es disolución salina amortiguada con fosfato, disolución salina, amortiguador de Krebs, disolución de Tyrode, medio de contraste, u omnipaque, o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es amortiguador mitocondrial estéril (sacarosa 300 mM; K⁺-HEPES 10 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico amortiguado con potasio, pH 7,2); K⁺-EGTA 1 mM, (ácido etilenglicol tetraacético amortiguado con potasio, pH 8,0). En algunas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un amortiguador de respiración (sacarosa 250 mM, KH K₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 10 mM, amortiguador K-HEPES 20 mM (pH 7,2) y K-EGTA 0,5 mM (pH 8,0)).

Las composiciones farmacéuticas normalmente se formulan para que sean compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), sublingual, transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal, y rectal.

Una composición farmacéutica se puede formular para diversos usos clínicos, por ejemplo obtención de imágenes, tratamiento de heridas, tratamiento de lesiones, conservación de órganos, mejora de las funciones mitocondriales en órganos o tejidos, y cuidado de la piel. En algunos casos, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un agente de contraste con fines de formación de imágenes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir agentes antisépticos, agentes antibacterianos (por ejemplo, antibióticos), agentes antifúngicos, desinfectantes, agentes analgésicos, agentes anestésicos, esteroides, suplementos nutricionales, aceites etéreos, etc. Un agente anestésico es un fármaco que puede prevenir dolor durante la cirugía o el tratamiento. Los ejemplos de agentes analgésicos incluyen, sin limitación, paracetamol, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, salicilatos, ibuprofeno y lidocaína. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, sin limitación, alcohol diclorobencílico, amilmetacresol y antibióticos. Ejemplos de antibióticos incluyen penicilinas carbapenémicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, bacitracina, gramidina, mupirocina, cloranfenicol, tiamfenicol, lincomicina, clindamicina, macrólidos, novobiocina, polimixinas, rifamicinas, espectinomicina, tetraciclinas, vancomicina, teicoplanina, estreptograminas, agentes antifolato, sulfonamidas, trimetoprima, pirimetamina, nitrofuranos, mandelato de metenamina, hipurato de metenamina, nitroimidazoles, quinolonas, fluoroquinolonas, isoniazida, etambutol, pirazinamida, ácido paraaminosalicílico, cicloserina, capreomicina, etionamida, protionamida, tiacetazona y viomicina. Los agentes antisépticos son sustancias antimicrobianas que se pueden aplicar a la piel/tejidos vivos para reducir la posibilidad de infección, septicemia, o putrefacción. Los ejemplos de antisépticos incluyen, sin limitación, clorhexidina y sales de la misma, benzalconio y sales del mismo, triclosán y cloruro de cetilpiridio. Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, sin limitación, tolnaftato, miconazol, fluconazol, clotrimazol, econazol, ketoconazol, itraconazol, terbinafina, anfotericina, nistatina y natamicina. Los esteroides ejemplares incluyen, sin limitación, acetato de prednisona, valerato de prednisona, prednisolona, dipropionato de alclometasona, acetónido de fluocinolona, dexametasona, metilprednisolona, desonida, pivolato, pivolato de clorcortolona, acetónido de triamcinolona, prednicartrato, propionato de fluticasona, flurandrenolida, furoato de mometasona, desoximetasona, dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, propionato de betametasona, benzoato de betametasona, diacetato de diflorasona, fluocinonida, halcinonida, amcinonida, propionato de halobetasol, y propionato de clobetasol. Los suplementos nutricionales

ejemplares incluyen, sin limitación, vitaminas, minerales, productos herbales y aminoácidos. Las vitaminas incluyen, sin limitación, la vitamina A, las de la familia de la vitamina B, la vitamina C, las de la familia de la vitamina D, la vitamina E y la vitamina K. Los aceites etéreos incluyen, sin limitación, los derivados de la menta, salvia, abeto, lavanda, albahaca, limón, enebro, romero, eucalipto, caléndula, manzanilla, naranja y similares. Muchos de estos agentes se describen, por ejemplo, en el documento WO 2008152626.

Las composiciones que comprenden mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados pueden formularse en cualquier forma, por ejemplo líquidos, semisólidos o sólidos. Los ejemplos de composiciones incluyen líquidos, cremas, ungüentos, pomadas, aceites, emulsiones, formulaciones de liposomas, entre otros.

Composiciones para trasplante

Las mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados se pueden incluir en composiciones que están diseñadas para uso en trasplante de órganos, tejidos o células. La composición puede incluir mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados y un líquido que sea adecuado para la administración a pacientes y/u órganos *in situ* o *ex vivo*, por ejemplo para el mantenimiento de órganos, tejidos o células *ex vivo*. En general, el líquido será una disolución acuosa. Los ejemplos de disoluciones incluyen disolución salina amortiguada con fosfato (PBS), disolución Celsior™, disolución Perfadex™, disolución de Collins, disolución de citrato, medios de cultivo de tejidos (por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)), disolución de histidina-triptófano-cetoglutarato (HTK), y la disolución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994).

La disolución de almacenamiento en frío de la Universidad de Wisconsin se considera una disolución estándar para el trasplante de órganos. Incluye lo siguiente: lactobionato de potasio 100 mM, KH₂PO₄ 25 mM, MgSO₄ 5 mM, rafinosa 30 mM, adenosina 5 mM, glutatona 3 mM, alopurinol 1 mM, y hidroxietilalmidón 50 g/l. Las mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados se pueden añadir a estos líquidos para la preservación de órganos, tejidos y células.

Productos sanguíneos

Las mitocondrias y/o los agentes mitocondriales combinados pueden incluirse en composiciones que incluyen sangre y/o productos derivados de la sangre. En algunos ejemplos, la composición puede incluir mitocondrias y/o agentes mitocondriales y sangre, por ejemplo sangre completa, suero, uno o más componentes sanguíneos individuales, y/o un sustituto de sangre artificial. En algunos casos, estos productos sanguíneos se pueden administrar a un sujeto, y las mitocondrias en los productos sanguíneos pueden mejorar la función mitocondrial en el sujeto. Por ejemplo, dichos productos sanguíneos se pueden administrar a un paciente como parte de un procedimiento de transfusión de sangre. Como se sabe en la técnica, la sangre o los productos sanguíneos se pueden almacenar en cualquier cantidad de recipientes, por ejemplo en bolsas de sangre, ampollas, y/o viales.

Composiciones para la piel y cosméticos

Las mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados se pueden incluir en composiciones que se pueden aplicar (por ejemplo, tópicamente y/o mediante inyección) a la piel y/o heridas (por ejemplo, quemaduras, cortes pequeños, laceraciones más grandes, regiones necróticas, regiones dañadas por infección con bacterias, hongos o virus, o áreas con daño causado por inflamación, por ejemplo erupciones), arrugas, o cicatrices, en la piel. La composición también puede incluir cualquier agente conocido que pueda usarse en productos para la piel o cosméticos, por ejemplo agentes abrasivos, agentes antisépticos, agentes antibacterianos (por ejemplo, antibióticos), agentes antifúngicos, desinfectantes, agentes analgésicos, agentes anestésicos, esteroides, suplementos nutricionales, y/o aceites etéreos.

Los expertos apreciarán que para una composición tópica, por ejemplo una composición tal como un líquido, crema, loción, ungüento o aceite, se puede añadir un agente abrasivo a la composición para ayudar en el suministro de mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados a capas subyacentes de células de la piel tras la aplicación (por ejemplo, cuando la composición se frota y/o se unta sobre la piel). Un agente abrasivo es un material que se usa para desgastar parte del tejido (por ejemplo, células cutáneas dañadas o muertas) por fricción. Las composiciones que incluyen un agente abrasivo y mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados se pueden usar para diversos fines, por ejemplo uso cosmético, tratamiento de heridas, etc. Algunos agentes abrasivos se describen, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5830445, la patente U.S. nº 2561043, la patente U.S. nº 4279890. Los expertos también apreciarán que cualquier agente o composición conocida en la técnica que ayude en el transporte de un compuesto a las capas subyacentes de la piel y/o los poros de la piel puede ser útil en tales ejemplos, y puede incluirse o aplicarse a un paciente por separado pero junto con una composición que comprende mitocondrias y/o agentes mitocondriales.

Métodos para preparar composiciones que comprenden mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados

Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias para uso en los métodos descritos en la presente pueden aislarse o proporcionarse a partir de cualquier fuente, por ejemplo aislarse de células o tejidos cultivados. Los ejemplos de células incluyen, pero no se

limitan a, células de tejido muscular, fibroblastos cardíacos, células cultivadas, células HeLa, células de cáncer de próstata, levadura, entre otras, y cualquier mezcla de las mismas. Los ejemplos de tejidos incluyen, pero no se limitan a, tejido hepático, músculo esquelético, corazón, cerebro, y tejido adiposo. Las mitocondrias se pueden aislar de células de una fuente autógena, una fuente alogénica, y/o una fuente xenogénica. En algunos casos, las mitocondrias se aíslan de células con una modificación genética, por ejemplo células con ADNmt modificado o ADN nuclear modificado.

Las mitocondrias se pueden aislar de células o tejidos por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. En un ejemplo, las muestras de tejido o muestras de células se recogen y después se homogeneizan. Tras la homogeneización, las mitocondrias se aíslan mediante centrifugación repetitiva. Alternativamente, el homogeneizado celular se puede filtrar a través de filtros de malla de nailon. Los métodos típicos para aislar mitocondrias se describen, por ejemplo, en McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, Toumpoulis IK, Dayalan H y Levitsky S, Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection, *Am J Physiol* 296, H94-H105. PMC2637784 (2009); Frezza, C., Cipolat, S., y Scorrano, L, Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature protocols*, 2(2), 287-295 (2007); y una solicitud PCT titulada "Products and Methods to Isolate Mitochondria" (PCT/US2015/035584; WO 2015192020).

Métodos para obtener agentes mitocondriales combinados

Los expertos apreciarán que un agente puede unirse a las mitocondrias de varias formas, por ejemplo uniéndose a las mitocondrias, incrustándose parcial o completamente en la membrana mitocondrial, encerrándose en las mitocondrias, o encapsulándose dentro de las mitocondrias.

Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría o enfoque particular, se cree que la membrana externa de las mitocondrias es adherente, y por lo tanto particularmente susceptible de combinación con diversos agentes. En algunos ejemplos, los agentes farmacéuticos se pueden unir a la membrana externa de las mitocondrias simplemente mediante incubación. Por ejemplo, una cantidad eficaz de agentes farmacéuticos se puede mezclar completamente con mitocondrias aisladas en un amortiguador, por ejemplo amortiguador de respiración, a una temperatura favorable para las mitocondrias aisladas, por ejemplo de 0°C a 26°C, de 0°C a 4°C, o alrededor de 0°C, 4°C, 26°C. Este procedimiento es útil para unir una cantidad eficaz de agentes farmacéuticos (por ejemplo, nanopartículas, vectores de ADN, vectores de ARN) a las mitocondrias.

En algunos ejemplos, los cationes orgánicos (por ejemplo, rodamina y tetrametilrosamina) son fácilmente secuestrados por las mitocondrias en funcionamiento debido al potencial eléctrico en la membrana mitocondrial. Las membranas mitocondriales sanas mantienen una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior del orgánulo, lo que se conoce como potencial de membrana. Este potencial de membrana es un resultado directo de los procesos funcionales mitocondriales, y puede perderse si las mitocondrias no funcionan correctamente. Los cationes liposolubles son secuestrados por las mitocondrias como consecuencia de su carga positiva y de su solubilidad tanto en los lípidos de la membrana interna como en el espacio acuoso de la matriz. De manera similar, en algunos otros ejemplos, los aniones se pueden unir a la membrana externa de las mitocondrias debido a su carga negativa. Para enlazar las mitocondrias con estos agentes farmacéuticos, se debe mezclar completamente una cantidad eficaz de agentes farmacéuticos con mitocondrias aisladas en un amortiguador, por ejemplo amortiguador de respiración, a una temperatura favorable para las mitocondrias aisladas, por ejemplo alrededor de 0°C o 4°C.

El agente terapéutico, de diagnóstico y/o de formación de imágenes se puede unir a fosfolípidos, péptidos o proteínas en la membrana mitocondrial a través de un enlace químico. Por ejemplo, las moléculas que incluyen fluoróforos (pHrodo Red (Thermo Fisher Scientific, Inc.)) y partículas metálicas (por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro magnético de 30 nm (Sigma)) se pueden unir covalentemente a grupos de amina expuestos en proteínas y péptidos expuestos en la membrana exterior de mitocondrias intactas usando conjugados de éster de succinimidilo. Estos reactivos reaccionan con grupos de amina alifática no protonada, incluyendo el extremo amino de las proteínas y el grupo ϵ -amino de los restos de lisina, lo que crea un enlace de carboxamida estable. En otro ejemplo, cuando el agente farmacéutico, por ejemplo MitoTracker® Orange CTMMRos (Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA), se mezcla con mitocondrias funcionales, se oxida y después reacciona con tioles en proteínas y péptidos en mitocondrias para formar conjugados.

Hay numerosos restos químicos reactivos disponibles para unir agentes terapéuticos, de diagnóstico y/o de formación de imágenes a la superficie de las mitocondrias (por ejemplo, ácido carboxílico, funcionalizado con amina, etc.).

Los agentes se pueden unir a la membrana mitocondrial externa o interna a través de enlaces de proteínas, enlaces de aminas, u otros métodos de unión. Alternativamente, o además, un agente se puede unir a la membrana mitocondrial a través de interacción hidrofóbica, interacción de Van der Waals, y/o interacción electrostática.

En muchos casos, los agentes terapéuticos, los agentes de diagnóstico y los agentes de formación de imagen pueden mezclarse simplemente con mitocondrias aisladas e incubarse en un amortiguador (por ejemplo, amortiguador de respiración) durante un período de tiempo suficiente (por ejemplo, unos pocos minutos, 5 minutos, 10 minutos, o 1 hora) en condiciones favorables (por ejemplo, de 0°C a 26°C, de 0°C a 4°C, o alrededor de 0°C, 4°C, 26°C, pH 7,2-8,0).

Los métodos ejemplares para preparar agentes mitocondriales combinados se describen en McCully et al, Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection, Am J Physiol 296, H94-H105. PMC2637784 (2009); y Masuzawa et al, Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury, Am J Physiol 304, H966-982. PMC3625892 (2013).

5 Métodos para preparar composiciones que comprenden mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados

Las mitocondrias aisladas y los agentes mitocondriales combinados se pueden mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye cualquier compuesto o composición útil para facilitar el almacenamiento, la estabilidad, la administración, el direccionamiento celular y/o el suministro de mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados, incluyendo, sin limitación, vehículos, diluyentes, disolventes, excipientes, modificadores de pH, sales, colorantes, modificadores de la reología, lubricantes, recubrimientos, cargas, agentes antiespumantes, polímeros, hidrogeles, tensioactivos, emulsionantes, adyuvantes, conservantes, fosfolípidos, ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos y sus derivados, ceras, aceites y agua adecuados. En algunas realizaciones, las mitocondrias aisladas se suspenden en agua, disolución salina, amortiguador, amortiguador de respiración, o amortiguador mitocondrial estéril, para la administración *in vivo*. Las sales, amortiguadores o sistemas de amortiguadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen, sin limitación, disolución salina, amortiguador de fosfato, disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) o amortiguador de respiración, pueden incluirse en una composición descrita aquí. Vehículos que tienen la capacidad de facilitar el suministro a una célula *in vivo*, tales como los liposomas, se pueden utilizar para facilitar el suministro de los agentes mitocondriales combinados a las células diana.

Los métodos para preparar composiciones, por ejemplo composiciones líquidas, semisólidas y sólidas (por ejemplo, líquidos, cremas, lociones, ungüentos, aceites, entre otros), son bien conocidos en la técnica. Los expertos apreciarán que dichos métodos conocidos pueden modificarse para añadir una o más etapas para añadir mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados y formar una composición descrita aquí. Los expertos apreciarán que, en algunos casos, una composición descrita aquí puede incluir más de un tipo de agente mitocondrial combinado. Por ejemplo, se incluyen composiciones que comprenden mitocondrias en las que esencialmente cada mitocondria está asociada con múltiples tipos de agentes. También se incluyen composiciones que comprenden mitocondrias en las que cada mitocondria está emparejada con un solo tipo de agente pero en las que la composición comprende una mezcla de parejas de mitocondrias/agente.

Métodos de uso

30 Administración

Las mitocondrias aisladas y los agentes mitocondriales combinados se pueden administrar a un paciente mediante inyección por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular y/o mediante infusión intraósea. En algunas realizaciones, las mitocondrias aisladas pueden administrarse mediante inyección directa o mediante infusión vascular.

Una vez que las mitocondrias se inyectan en un tejido, las células alrededor del sitio de inyección las absorberán. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sitio de inyección es el sitio diana. En algunas otras realizaciones, las mitocondrias se inyectan en un vaso sanguíneo que transporta la sangre al sitio diana, por ejemplo un órgano, un tejido o un sitio lesionado. Si bien no pretende limitarse a ninguna teoría, la evidencia sugiere que las mitocondrias administradas por inyección directa son internalizadas por las células a través de la endocitosis dependiente de actina. Sin embargo, la captación mitocondrial por vía vascular parece ser más complicada. La captación rápida y generalizada de las mitocondrias cuando se administran por infusión vascular sugeriría que están implicados los mecanismos que permiten el paso rápido de las mitocondrias a través de la pared vascular. Algunos estudios respaldan el concepto de que las células pueden escapar rutinariamente de la circulación. Se ha demostrado que ciertas células madre cardíacas y mesenquimatosas parecen ser expulsadas activamente de la vasculatura en un proceso diferente a la diapédesis (Cheng, K., Shen, D., Xie, Y., Cingolani, E., Malliaras, K., Marbán, E., 2012, Brief report: Mechanism of extravasation of infused stem cells. Stem Cells. 30, 2835-2842.; Allen, T.A., Gracieux, D., Talib, M., Tokarz, D.A., Hensley, M.T., Cores, J., Vandergriff, A., Tang, J., de Andrade, J.B., Dinh, P.U., Yoder, J.A., Cheng, K., 2017. Angiopellosis as an Alternative Mechanism of Cell Extravasation. Stem Cells. 35,170-180). La transmigración de células madre a través de la pared vascular requiere una extensa remodelación del endotelio. Las mitocondrias pueden utilizar un mecanismo de remodelación similar para atravesar la pared vascular. Otro posible mecanismo para la captación mitocondrial puede ser similar a la diapédesis. Algunas células escapan rutinariamente de la circulación. Por ejemplo, la extravasación de leucocitos (es decir, la diapédesis) entre las células endoteliales venosas es un proceso bien entendido que implica proteínas de adhesión celular. Además, también es posible que las mitocondrias infundidas se extravasen a través de la pared capilar a través del espacio entre las células del endotelio. Después de que las mitocondrias cruzan el endotelio de los vasos sanguíneos, las células tisulares absorben las mitocondrias a través de un proceso de internalización dependiente de la actina endosomal.

Las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se pueden administrar a un sujeto como un tratamiento excepcional, único, o alternativamente, tratamientos múltiples, por ejemplo un curso de tratamiento que continúa de forma intermitente o continua durante alrededor de 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 o 60 días, un año, indefinidamente, o hasta

que un médico determine que ya no es necesaria la administración de la mitocondria o el agente mitocondrial combinado.

5 En un método de administración, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se inyectan directamente en el tejido del órgano. La inyección se repite varias veces en diferentes sitios del órgano. En dicho método, se puede usar una jeringa de insulina estéril de 1 ml con una aguja pequeña (por ejemplo, calibre 28) para la inyección, y cada sitio de inyección puede recibir, por ejemplo, alrededor de $1,2 \times 10^6$ de mitocondrias.

10 Los expertos apreciarán que la cantidad de mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados, por ejemplo composiciones que comprenden mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados, que deben administrarse a un paciente variará dependiendo, por ejemplo, del tipo de trastorno que se esté tratando, la vía de administración, la duración del tratamiento, el tamaño de un área a tratar, y/o la ubicación del sitio de tratamiento en la patente, entre otros. Los médicos expertos podrán determinar las dosis que se administrarán dependiendo de estas y otras variables. Por ejemplo, puede administrarse un total de alrededor de 1×10^7 de mitocondrias en un vaso sanguíneo de un sujeto, por ejemplo para tratar isquemia localizada en el miocardio. Como otro ejemplo, en el caso de órganos más grandes o áreas afectadas, se pueden inyectar en el vaso sanguíneo mayor número de mitocondrias, por ejemplo 1×10^{10} a 1×10^{14} mitocondrias. Por el contrario, en el caso de lesiones focales pequeñas, se pueden infundir en el paciente 1×10^3 a 1×10^6 mitocondrias. Por lo tanto, una cantidad eficaz de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados (o composiciones que comprenden los mismos) es la cantidad total de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados suficiente para producir un efecto terapéutico deseado. Una cantidad efectiva puede ser, por ejemplo, al menos o alrededor de 1×10^2 mitocondrias o agentes mitocondriales combinados, por ejemplo, de alrededor de 1×10^3 a alrededor de 1×10^{14} , alrededor de 1×10^4 a alrededor de 1×10^{13} , alrededor de 1×10^5 a alrededor de 1×10^{12} , alrededor de 1×10^6 a alrededor de 1×10^{11} , alrededor de 1×10^7 a alrededor de 1×10^{10} , alrededor de 1×10^3 a alrededor de 1×10^7 , alrededor de 1×10^4 a alrededor de 1×10^8 , alrededor de 1×10^7 a alrededor de 1×10^{14} , o alrededor de 1×10^8 a alrededor de 1×10^{13} , alrededor de 1×10^9 a alrededor de 1×10^{12} , alrededor de 1×10^5 a alrededor de 1×10^8 , o al menos o alrededor de 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , o al menos o alrededor de 1×10^{14} , o por ejemplo, una cantidad superior a 1×10^{14} . Como se usa aquí, la expresión "cantidad total", en el contexto de la administración a un paciente, puede referirse a la cantidad total de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados en una sola administración (por ejemplo, una inyección, una dosis administrada en una infusión) o en múltiples administraciones (por ejemplo, inyecciones múltiples), dependiendo del régimen de dosificación que se esté realizando.

30 Las mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados se pueden administrar a un sujeto cada 12-24 horas por diversas vías, por ejemplo inyección directa, suministro vascular. En algunas realizaciones, las mitocondrias aisladas se pueden administrar a un sujeto cada 5-10 minutos (por ejemplo, cada 5 minutos, cada 10 minutos) por diversas vías, por ejemplo inyección directa, infusión vascular.

35 En algunas realizaciones, las mitocondrias aisladas pueden inyectarse directamente en tejidos u órganos mediante agujas de calibre 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 y 34. En algunos otros casos, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse en un sitio diana mediante un catéter.

40 Se observa que, en algunos casos, los efectos de las mitocondrias dependen de la duración del período de tiempo entre el momento del aislamiento y el momento del uso. Por lo tanto, en algunos casos, las mitocondrias están recién aisladas y son viables. Las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se pueden administrar a un sujeto en alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos, alrededor de 60 minutos, alrededor de 70 minutos, alrededor de 80 minutos, alrededor de 90 minutos, alrededor de 100 minutos, alrededor de 110 minutos, alrededor de 120 minutos después de aislar las mitocondrias. En algunos casos, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se administran a un sujeto en alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos, alrededor de 60 minutos, alrededor de 70 minutos, alrededor de 80 minutos, minutos, alrededor de 90 minutos, alrededor de 100 minutos, alrededor de 110 minutos, alrededor de 120 minutos después de comenzar el proceso de aislamiento de mitocondrias. Las mitocondrias y/o los agentes mitocondriales combinados pueden almacenarse en algunos casos durante un período de tiempo corto (por ejemplo, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos o alrededor de 60 minutos) antes de su uso.

También se observa que, en algunos casos, las mitocondrias congeladas y descongeladas no son viables ni eficaces para ciertos tratamientos descritos aquí, por ejemplo tratamiento de lesiones por isquemia/reperfusión. Por lo tanto, en algunos casos, las mitocondrias no se congelan ni se descongelan después del aislamiento de los tejidos y/o las células.

55 Las mitocondrias para el tratamiento se pueden aislar de células o tejidos de una fuente autógena, una fuente alogénica, y una fuente xenogénica. En algunos casos, las mitocondrias se recogen de células o tejidos cultivados de un sujeto, y estas mitocondrias se administran de nuevo al mismo sujeto. En algunos otros casos, las mitocondrias se recogen de células o tejidos cultivados de un segundo sujeto, y estas mitocondrias se administran a un primer sujeto. En algunos casos, las mitocondrias se obtienen de células o tejidos cultivados de una especie diferente (por ejemplo, ratones, cerdos, levaduras).

60

Tratamiento del corazón isquémico y otras enfermedades relacionadas con la isquemia

El corazón es un órgano altamente energético que requiere un suministro continuo de oxígeno para mantener su función normal. En condiciones aeróbicas, el corazón obtiene su energía principalmente de las mitocondrias, que constituyen el 30% del volumen total de células miocárdicas. Después del inicio de la isquemia, hay una rápida disminución de los niveles de fosfato de alta energía con alteraciones en la estructura mitocondrial, el volumen, el consumo de oxígeno, y la síntesis de ATP.

Los intentos de disminuir la necrosis del tejido miocárdico y mejorar la función posisquémica mediante intervenciones con sustratos exógenos y/o farmacológicos, ya sea solos o en combinación con técnicas de procedimiento, solo han proporcionado una cardioprotección limitada. A pesar de estas intervenciones, el daño y la disfunción mitocondrial continúan representando problemas importantes después de la isquemia miocárdica, y siguen siendo causas importantes de morbilidad y mortalidad.

El daño mitocondrial ocurre principalmente durante la isquemia más que durante la reperfusión, y la preservación de la función respiratoria mitocondrial mejora la recuperación contráctil y disminuye el tamaño del infarto de miocardio.

Los métodos descritos aquí se pueden usar para tratar el corazón isquémico. Por ejemplo, se puede inyectar una cantidad eficaz de mitocondrias aisladas en el vaso sanguíneo de un sujeto, por ejemplo la vasculatura coronaria del sujeto. Por ejemplo, puede administrarse alrededor de 1×10^7 de mitocondrias en la vasculatura coronaria del sujeto. Las mitocondrias inyectadas son internalizadas por los cardiomiocitos después del trasplante y proporcionan un mayor consumo de oxígeno, aumentan las quimiocinas que mejoran la función cardíaca posterior al infarto, y aumentan la expresión de las vías proteicas que son importantes para preservar la energía del miocardio. En otro ejemplo, se puede inyectar directamente una cantidad eficaz de mitocondrias en el área de riesgo (área isquémica regional). La inyección se puede repetir varias veces en diferentes sitios del corazón.

La lesión por reperfusión es el daño tisular por riego sanguíneo cuando la sangre regresa al tejido después de un período de isquemia o falta de oxígeno. La ausencia de oxígeno y nutrientes durante el período isquémico produce inflamación y daño oxidativo cuando se restablece el flujo sanguíneo. La respuesta inflamatoria conduce además a la lesión por reperfusión en el tejido. Por lo tanto, en algunos casos, un tratamiento también implica la administración de inmunosupresores al paciente. Los inmunosupresores se pueden administrar, por ejemplo, por separado, pero como un tratamiento concurrente con el agente mitocondrial. Alternativamente, o además, los inmunosupresores pueden unirse a las mitocondrias para formar un agente mitocondrial combinado, que puede usarse para el tratamiento. Los supresores inmunes particularmente útiles son los bisfosfonatos.

La lesión por isquemia/reperfusión en algunos otros órganos a menudo también se asocia con daño y disfunción mitocondrial. Estos órganos incluyen, pero no se limitan a, pulmón, riñón, hígado, músculo esquelético, cerebro, etc. Estas lesiones o enfermedades incluyen, pero no se limitan a, colitis isquémica, isquemia mesentérica, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular, isquemia aguda de las extremidades, cianosis y gangrena. El método descrito también se puede emplear para tratar lesiones por isquemia en estos órganos/tejidos. Para estos tratamientos, las mitocondrias aisladas y/o el agente mitocondrial combinado pueden inyectarse directamente en el tejido del órgano, o inyectarse en el vaso sanguíneo que lleva la sangre al órgano/tejido diana o al sitio lesionado del sujeto.

Vasodilatación y flujo sanguíneo

Se ha demostrado que la administración mitocondrial por infusión vascular aumenta significativamente el flujo sanguíneo coronario sin alterar la presión arterial media o la frecuencia cardíaca. La capacidad de aumentar el flujo sanguíneo sin aumentar la frecuencia cardíaca permite el uso clínico en lesiones de tipo angina y en lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión y en áreas de daño tisular en las que se necesitaría un mayor flujo sanguíneo y suministro de oxígeno. Por lo tanto, los métodos descritos aquí se pueden usar en intervenciones de la arteria coronaria para eliminar coágulos u obstrucciones en los vasos sanguíneos.

Los métodos descritos aquí también se pueden usar para aumentar el flujo sanguíneo y/o el suministro de oxígeno para diversos órganos o tejidos (por ejemplo, corazón, pulmón, riñón, cerebro, músculo esquelético). En algunos casos, los métodos descritos aquí se pueden usar para tratar la enfermedad vascular periférica. La enfermedad vascular periférica (PVD) es un trastorno de la circulación sanguínea que hace que los vasos sanguíneos fuera del corazón y el cerebro se estrechen, bloqueen o tengan espasmos. Esto puede suceder en las arterias o venas. La PVD generalmente causa dolor y fatiga, a menudo en las piernas, y especialmente durante el ejercicio. Se pueden inyectar mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados en un vaso sanguíneo. El flujo sanguíneo puede transportar mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados al sitio diana. En algunos casos, los métodos descritos aquí también se pueden usar para mejorar la función del músculo liso.

Los métodos descritos aquí también se pueden usar para la dilatación vascular en diversos órganos. En algunos casos, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados pueden usarse para disminuir la resistencia vascular en un órgano (por ejemplo, corazón, riñón, hígado, o pulmón). Se pueden usar mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados para aumentar el flujo sanguíneo para la angiografía. Las mitocondrias aisladas y/o los agentes mitocondriales combinados pueden añadirse a un agente de contraste y pueden usarse en la identificación y eliminación de bloqueos.

Los métodos descritos aquí se pueden usar para tratar vasos sanguíneos bloqueados. Los métodos implican, por ejemplo, las etapas de localizar coágulos sanguíneos, colocar un primer catéter en una jaula distante del coágulo, colocar un segundo catéter próximo al coágulo, inyectar mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados a través del catéter proximal, para provocar vasodilatación, recoger el coágulo en una canasta, y eliminar el coágulo.

- 5 Se observa que los efectos de la infusión vascular de mitocondrias dependen del tiempo transcurrido desde el aislamiento hasta el momento del uso. Los efectos vasodilatadores disminuyen a medida que se prolonga el tiempo de aislamiento. Si bien no pretende estar sujeto a ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que las mitocondrias recién aisladas tienen ciertas sustancias químicas que pueden aumentar el flujo sanguíneo. Por lo tanto, en algunos métodos, las mitocondrias están recién aisladas y son viables. Por ejemplo, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se administran a un sujeto en alrededor de 5 minutos, alrededor de 10 minutos, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos, alrededor de 60 minutos, alrededor de 70 minutos, alrededor de 80 minutos, alrededor de 90 minutos, alrededor de 100 minutos, alrededor de 110 minutos, alrededor de 120 minutos después del momento en que comienza el proceso de aislamiento de las mitocondrias, o después de que se aíslan las mitocondrias. En algunos casos, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se administran a un sujeto dentro de alrededor de 20 minutos a alrededor de 60 minutos (por ejemplo, alrededor de 20 minutos, alrededor de 30 minutos, alrededor de 40 minutos, alrededor de 50 minutos, alrededor de 60 minutos) después del momento cuando comienza el proceso de aislamiento de las mitocondrias, o después de que se aíslan las mitocondrias.

- 20 En algunos casos, no es deseable aumentar el flujo sanguíneo (por ejemplo, tratar la isquemia/reperfusión en los pulmones). En estos casos, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se pueden almacenar durante un breve período de tiempo (por ejemplo, alrededor de 30 a alrededor de 60 minutos) antes de su uso. Este método se puede utilizar para aumentar la viabilidad del tejido (por ejemplo, tratar la lesión por isquemia/reperfusión) sin provocar un aumento del flujo sanguíneo. En estos casos, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se administran a un sujeto durante al menos 60 minutos (por ejemplo, alrededor de 65 minutos, alrededor de 70 minutos, alrededor de 80 minutos, alrededor de 90 minutos, alrededor de 100 minutos, alrededor de 110 minutos, alrededor de 120 minutos) después del momento en que comienza el proceso de aislamiento de las mitocondrias, o después de que se aíslan las mitocondrias.

Cirugía de corazón

- 30 Las mitocondrias aisladas y/o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse al corazón para disminuir el aturdimiento y permitir la desconexión del corazón de un procedimiento quirúrgico (por ejemplo, cardioplejía) y la recuperación del corazón sin aumentar la frecuencia cardíaca o las demandas de oxígeno en el corazón. En algunos ejemplos, los métodos implican la inyección directa en el corazón de mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados. En algunos métodos, se inyectan mitocondrias aisladas y/o agentes mitocondriales combinados en una arteria coronaria.

35 Formación de imágenes

Los agentes de formación de imágenes se pueden unir a las mitocondrias, a menudo mediante la incubación conjunta de las mitocondrias con los agentes de formación de imágenes. Dichos agentes de formación de imágenes incluyen, pero no se limitan a, los fluoróforos MitoTracker y pHrodo de Thermo Fisher Scientific Inc., ¹⁸F-Rodamina 6G, y nanopartículas de óxido de hierro.

- 40 Los agentes mitocondriales combinados que incluyen un agente de formación de imágenes pueden inyectarse en el tejido o perfundirse a través de los vasos sanguíneos. Los tejidos que contienen las mitocondrias marcadas se pueden examinar mediante técnicas de formación de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía microcomputerizada (μCT), y formación de imágenes por resonancia magnética (RMI), microscopio de campo brillante, y la microscopía de superresolución 3-D, etc. Los médicos apreciarán que se pueden usar otras técnicas o modalidades de formación de imágenes. Incluyen, pero no se limitan a, rayos X, gammagrafía, fluorescencia y ultrasonido.

- 50 La tomografía por emisión de positrones es una técnica de formación de imágenes que produce una imagen tridimensional en el cuerpo, y puede usarse en los métodos descritos aquí. El sistema detecta pares de rayos gamma emitidos indirectamente por un radioisótopo emisor de positrones (trazador). Entonces se construyen imágenes tridimensionales de la concentración del marcador dentro del cuerpo mediante análisis por ordenador. Los grupos informadores útiles incluyen isótopos radiactivos, tales como ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁶⁸Ga, ⁸¹mKr, ⁸²Rb, ⁸⁶Y, ⁸⁹Zr, ¹¹¹In, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³³Xe, ²⁰¹Tl, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³H. En algunos métodos, las mitocondrias se pueden marcar con isótopos radiactivos, por ejemplo ¹⁸F, o por moléculas que incorporan isótopos radiactivos, por ejemplo ¹⁸F-Rodamina 6G, rodamina B marcada con ¹⁸F. Después de que las células diana internalicen las mitocondrias, se puede emplear la técnica de formación de imágenes PET, o una técnica similar, para visualizar las células diana.

- 55 La formación de imágenes por resonancia magnética es una técnica de formación de imágenes médicas para obtener imágenes de la anatomía y los procesos fisiológicos del cuerpo, y se puede usar en los métodos descritos aquí. En algunos casos, se puede usar en combinación con otras técnicas de imagen, por ejemplo PET. Las imágenes

adquiridas desde ambos dispositivos se pueden tomar secuencialmente, en la misma sesión, y combinarlas en una sola imagen superpuesta (registrada conjuntamente). Los barridos PET/MRI se pueden usar para diagnosticar una condición de salud en seres humanos y animales, por ejemplo con fines de investigación, médicos y agrícolas.

5 La microtomografía computarizada usa rayos X para crear secciones transversales de un objeto físico que se puede usar para recrear un modelo virtual sin destruir el objeto original, y se puede usar en los métodos descritos aquí. En algunos casos, se usa en combinación con otras técnicas de imagen, por ejemplo PET. Las imágenes adquiridas desde ambos dispositivos se pueden tomar secuencialmente, en la misma sesión, y combinarlas en una sola imagen superpuesta (registrada conjuntamente). Por lo tanto, las imágenes funcionales obtenidas por PET, que representan la distribución espacial de la actividad metabólica o bioquímica en el cuerpo, pueden alinearse o correlacionarse con mayor precisión con las imágenes anatómicas obtenidas por tomografía computarizada. La reconstrucción de imágenes bidimensionales y tridimensionales se puede representar como una función de un software y un sistema de control comunes.

15 La microscopía de iluminación estructurada 3D, 3D-SIM, o microscopía de superresolución 3D, permite una visualización 3D completa de estructuras dentro de las células, y se puede usar en los métodos descritos aquí. La microscopía de iluminación estructurada es un método de formación de imágenes capaz de duplicar la resolución espacial de la microscopía de fluorescencia de campo amplio convencional mediante el uso de luz de iluminación estructurada espacialmente. Mejora la resolución espacial al recopilar información del espacio de frecuencia fuera de la región observable.

20 Los métodos descritos, es decir, métodos que incluyen la administración de mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados, son útiles para diagnosticar una variedad de enfermedades, tales como cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cerebro, páncreas, melanoma, próstata, colon), enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio, aterosclerosis), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes, síndrome del intestino irritable, celiaquía, enfermedad de Crohn), y enfermedad inflamatoria.

25 Los métodos que usan agentes con fines de obtención de imágenes son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Bartholomä MD, He H, Pacak CA, Dunning P, Fahey FH, McGowan FX, Cowan DB, Treves ST y Packard AB, Biological characterization of F18-labeled Rhodamine B, a potential positron emission tomography perfusion tracer, Nucl Med Biol 40, 1043-1048, PMC3820364 (2013); Bartholomä MD, Zhang S, Akurathi V, Pacak CA, Dunning P, Fahey FH, Cowan DB, Treves ST y Packard AB, 18F-labeled rhodamines as potential myocardial perfusion agents: comparison of pharmacokinetic properties of several rhodamines, Nucl Med Biol 42, 796-803, PMC4567415 (2015); y Pacak CA, Hammer PE, MacKay AA, Dowd RP, Wang KR, Masuzawa A, Sill B, McCully JD y Cowan DB, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles function as a long-term, multi-modal imaging label for non-invasive tracking of implanted progenitor cells, PLoS ONE 9, e108695, PMC4177390 (2014). Cada uno de los anteriores puede ser útil en los métodos descritos aquí.

Administración de medicamentos

35 La presente memoria descriptiva proporciona métodos para administrar agentes farmacéuticos, por ejemplo a células y/o tejidos de un paciente. Las mitocondrias son absorbidas por las células de los tejidos a través de un proceso de internalización dependiente de actina, lo que proporciona una forma de administrar agentes farmacéuticos directamente en las células. Además, debido a que es más probable que los agentes mitocondriales combinados crucen el endotelio de los vasos sanguíneos cerca del sitio de inyección, en algunos casos, los agentes mitocondriales combinados pueden inyectarse en un vaso sanguíneo que lleva sangre al sitio diana. En algunos casos, los agentes mitocondriales combinados ingresan al tejido a través del endotelio de los capilares.

45 Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno se puede enlazar o unir a las mitocondrias. Los expertos apreciarán que el enlazamiento del fragmento de unión del anticuerpo o antígeno a las mitocondrias o al agente mitocondrial combinado puede permitir que las mitocondrias o el agente mitocondrial combinado se dirijan a sitios específicos, por ejemplo a células y/o tejidos diana. En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno están diseñados para dirigirse a tipos de células específicos, por ejemplo células del músculo liso en pulmón, células inmunitarias, macrófagos, etc.

Terapia génica

50 La terapia génica es la administración terapéutica de polímeros de ácido nucleico en las células de un paciente como un fármaco para tratar enfermedades. Las mitocondrias aisladas se pueden usar como vehículo para administrar polímeros de ácido nucleico en una célula. En algunos casos, los agentes mitocondriales combinados que incluyen polímeros de ácido nucleico se pueden administrar a un sujeto para reemplazar un gen mutado en el sujeto que causa la enfermedad, para inactivar o "noquear" un gen mutado, o para introducir un gen nuevo en el sujeto. Los ejemplos de polímeros de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, ADN bicatenario, ADN monocatenario, ARN bicatenario, ARN monocatenario, o moléculas de ácido nucleico de triple hélice. En ciertos casos, los polímeros de ácido nucleico son ADN, ARN de interferencia (siARN), y micro ARN. En el caso de las miopatías mitocondriales relacionadas con la disfunción del ADN mitocondrial, la terapia génica se puede llevar a cabo mediante la infusión directa de las

mitocondrias en un músculo o músculos esqueléticos. En el caso de miopatías mitocondriales relacionadas con el ADN nuclear, pueden ser beneficiosas o necesarias múltiples infusiones a lo largo del tiempo.

Minimización de la cardiotoxicidad

5 La quimioterapia es un tratamiento común para diversos tipos de cáncer; sin embargo, también causa varias complicaciones graves. La cardiotoxicidad inducida por quimioterapia es una complicación que limita el uso clínico de agentes quimioterapéuticos. Ciertos agentes quimioterapéuticos, tales como las antraciclinas, son altamente eficaces contra las leucemias linfoblásticas y mieloblásticas agudas, pero son particularmente dañinos para el corazón debido a sus efectos sobre las mitocondrias. El daño a las mitocondrias conduce además a cardiotoxicidad inducida por quimioterapia. Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:795602. doi: 10.1155/2015/795602 (2015); Guo S, Wong S. Cardiovascular toxicities from systemic breast cancer therapy, *Front Oncol*. 4:346. doi: 10.3389/fonc.2014.00346. eCollection (2014).

15 Un método útil para minimizar la cardiotoxicidad inducida por quimioterapia es administrar una cantidad eficaz de mitocondrias aisladas y/o un agente mitocondrial combinado a un paciente que actualmente se encuentra bajo un régimen de tratamiento de quimioterapia. Si el paciente necesita ser tratado con quimioterapia (por ejemplo, por prescripción médica o veterinaria), el paciente puede ser tratado con mitocondrias y/o un agente mitocondrial combinado, antes, durante y/o después de la administración de la quimioterapia. Por ejemplo, los pacientes pueden ser tratados con mitocondrias y/o agente mitocondrial combinado comenzando inmediatamente después de la administración, como un tratamiento excepcional, o continuado de forma intermitente, o continuamente durante 20 alrededor de 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 o 60 días, un año, indefinidamente, o hasta que un médico determine que ya no es necesaria la administración de las mitocondrias y/o el agente mitocondrial combinado.

Trasplante de órganos/tejidos

25 La presente descripción también presenta métodos para trasplantar órganos, tejidos, masas de células y/o células aisladas. Los métodos pueden incluir una etapa de exposición del órgano o órganos, tejidos, masa de células y/o células aisladas a mitocondrias o agentes mitocondriales combinados antes del trasplante. Tales exposiciones pueden ocurrir *in situ* y/o *ex vivo*. Los órganos, tejidos y/o células aisladas pueden exponerse a una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados.

30 La exposición de un órgano o tejido a composiciones que comprenden mitocondrias o agentes mitocondriales combinados se puede realizar *ex vivo* y/o *in situ* por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la exposición puede realizarse *ex vivo* en cualquier cámara o espacio que tenga volumen suficiente para sumergir el órgano o tejido, total o parcialmente, en la composición. Como otro ejemplo, el órgano puede exponerse a composiciones que comprenden mitocondrias o agentes mitocondriales combinados colocando el órgano en cualquier recipiente adecuado y haciendo que las composiciones que comprenden mitocondrias o agentes mitocondriales combinados “laven” el órgano, de modo que el órgano quede expuesto a un flujo continuo de la composición.

35 Alternativamente, el órgano puede perfundirse con una composición que comprenda mitocondrias o agentes mitocondriales combinados. El término “perfusión” es un término reconocido en la técnica, y se refiere al paso de un líquido, por ejemplo una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados, a través de los vasos sanguíneos de un órgano o tejido. Los métodos para perfundir órganos *ex vivo* e *in situ* son bien conocidos en la técnica. Un órgano puede ser perfundido con una composición *ex vivo*, por ejemplo por perfusión hipotérmica continua en máquina (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994). Opcionalmente, en perfusiones *in situ* o *ex vivo*, el órgano se puede perfundir con una disolución de lavado, por ejemplo disolución UW, antes de la perfusión con una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados, para eliminar la sangre del donante del órgano. Como otra opción, la disolución UW puede incluir mitocondrias o agentes mitocondriales combinados.

45 El órgano o tejido puede colocarse, por ejemplo sumergido, en un medio o disolución que incluya mitocondrias o agentes mitocondriales combinados. Alternativamente, o además, las mitocondrias o agentes mitocondriales combinados se pueden añadir al medio o disolución. Las exposiciones *in situ* se pueden llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante lavado *in situ* o perfusión del órgano con una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press, 1994).

50 La presente descripción contempla que cualquiera o todos los métodos anteriores para exponer un órgano o tejido a una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados, por ejemplo lavado, inmersión o perfusión, pueden usarse en un procedimiento de trasplante dado.

55 La presente descripción contempla además que se puede crear una composición sólida o semisólida. Por ejemplo, un líquido que es una composición que comprende mitocondrias o agentes mitocondriales combinados, como se describe anteriormente, se puede convertir en una composición sólida o semisólida, en la que se puede superponer o incrustar un órgano o tejido. Alternativamente, una composición semisólida se puede infundir en el órgano. Las composiciones

sólidas o semisólidas se pueden preparar, por ejemplo, añadiendo al líquido un agente solidificante, tal como un agente gelificante (por ejemplo, colágeno o alginato).

Los métodos descritos aquí se pueden usar para controlar el daño por isquemia/reperfusión de los órganos trasplantados. La lesión por isquemia-reperfusión es un problema muy importante durante el trasplante de órganos. Gran parte del daño en el trasplante de órganos parece estar inducido por la lesión por reperfusión. Los órganos usados para el trasplante a menudo se someten a períodos prolongados de almacenamiento isquémico en frío después de la desvascularización y la perfusión en frío, lo que da como resultado una mayor susceptibilidad al daño tras la reperfusión. La evidencia muestra que la lesión por isquemia/reperfusión a menudo conduce a daño oxidativo mitocondrial, lo que puede causar un retraso en la función del injerto. Dare AJ, Logan A, Prime TA, Rogatti S, Goddard M, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ, Murphy MP, Saeb-Parsy K. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model, *J Heart Lung Transplant*, 34(11):1471-80. doi: 10.1016/j.healun.2015.05.007 (2015); Liu Q, Krishnasamy Y, Rehman H, Lemasters JJ, Schnellmann RG, Zhong Z. Disrupted Renal Mitochondrial Homeostasis after Liver Transplantation in Rats. *PLoS One* 10(10):e0140906. doi: 10.1371/journal.pone.0140906 (2015). En algunos casos, el órgano trasplantado puede ser, por ejemplo, un corazón, un pulmón, un riñón, o un hígado. En un ejemplo, una cantidad eficaz (por ejemplo, 1×10^7 , 1×10^8) de mitocondrias o agentes de mitocondrias combinados se inyectan en los vasos sanguíneos (por ejemplo, arterias) del órgano trasplantado. En otros ejemplos, una cantidad eficaz (por ejemplo, 1×10^7 , 1×10^8) de mitocondrias o agentes de mitocondrias combinados se inyectan directamente en el tejido del órgano.

Una cantidad eficaz de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados es una cantidad que es eficaz para mejorar la supervivencia y/o mejorar la función de órganos o células *in vivo* y/o *in vitro*. En el contexto del trasplante de células individuales o masas de células, por ejemplo donantes y/o receptores de trasplantes, una cantidad eficaz de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados es una cantidad que se administra al donante y/o receptor del trasplante suficiente para mejorar la supervivencia de la célula o masa de células, por ejemplo para reducir la pérdida de la célula, o masa de células, y/o para mejorar el rendimiento funcional de una célula trasplantada o una masa de células. En el contexto del tratamiento de células fuera del cuerpo, por ejemplo células de los islotes para ser cultivadas y/o usadas para trasplante, una cantidad eficaz es una cantidad con la que las células se incuban o almacenan para mejorar la conservación de las células, y/o para reducir la pérdida de células, por ejemplo pérdida por apoptosis, y/o mejorar la función. En el contexto del trasplante de órganos y tejidos, por ejemplo donantes y/o receptores de trasplantes, una cantidad eficaz de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados es una cantidad que se administra al donante y/o receptor del trasplante en cantidad suficiente para mejorar la supervivencia del órgano, tejido o células de interés, por ejemplo para reducir la pérdida de células de las que está compuesto el órgano o tejido, y/o para mejorar el rendimiento funcional de un órgano.

En algunos casos, la inyección se realiza antes de que se recupere el órgano del donante. En algunos casos, la inyección se realiza en algún momento posterior a la recuperación del órgano, pero antes del trasplante. En algunos casos, la inyección se realiza después de trasplantar el órgano al receptor. En algunos casos, las inyecciones se realizan antes de la extracción del órgano, después de la recolección del órgano, y luego nuevamente después de la implantación en el receptor. En algunos casos, la inyección se realiza durante la cirugía de trasplante. En algunos ejemplos, el órgano trasplantado se conserva en una disolución que contiene una cantidad eficaz de mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados. En algunos casos, la disolución es la disolución de almacenamiento en frío de la Universidad de Wisconsin.

Una limitación importante para el trasplante de órganos es la disponibilidad de órganos de donantes. Con el fin de ampliar el número de órganos de donantes, los centros pueden usar órganos de donantes con criterios ampliados o donantes de muerte cardíaca. En estos casos, los métodos descritos pueden mejorar la calidad de los órganos, aumentando así la disponibilidad de órganos de donantes.

La descripción también proporciona métodos para mejorar la integración de células y/o tejidos trasplantados. En algunos ejemplos, el tejido es tejido de piel o médula ósea. En algunos ejemplos, las células son células madre. En estos casos, las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados pueden mejorar la integración del tejido y las células trasplantadas en el cuerpo del receptor.

Tratamiento del trastorno de disfunción mitocondrial

Debido a la función principal de las mitocondrias en el metabolismo celular, el daño y la disfunción en las mitocondrias pueden causar una variedad de enfermedades humanas. Las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt incluyen el síndrome de Kearns-Sayre, el síndrome de MELAS y la neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome de Pearson, y la oftalmoplejía externa progresiva. Otras enfermedades que implican disfunción mitocondrial incluyen, pero no se limitan a, miopatía mitocondrial, diabetes mellitus y sordera (DAD), síndrome de Leigh, "neuropatía, ataxia, retinitis pigmentosa, y ptosis" (NARP), encefalopatía gastrointestinal mioneurogénica (MNGIE), epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares (síndrome MERRF), encefalomiopatía, acidosis láctica, enfermedad de Parkinson, y síntomas similares a los de un accidente cerebrovascular (síndrome MELAS), etc.

Además, el daño y la disfunción en las mitocondrias también pueden ser causados por lesiones, toxicidad, quimioterapia, y cambios relacionados con la edad. La disfunción mitocondrial puede interferir además con la función adecuada del tejido o del órgano de un sujeto.

5 La descripción indica que el trasplante mitocondrial tiene potencial para rescatar la función celular y reemplazar las mitocondrias dañadas o disfuncionales. Como las mitocondrias pueden administrarse eficazmente a los tejidos a través de la infusión de vasos sanguíneos, los métodos descritos aquí se refieren a un método novedoso para tratar el trastorno de disfunción mitocondrial.

10 Las mitocondrias para el tratamiento pueden aislarse de células de una fuente autógena, una fuente alogénica, y una fuente xenogénica. El objetivo es administrar suficientes mitocondrias funcionales al sujeto para obtener el efecto terapéutico deseado. En una realización, las mitocondrias aisladas se administran a un paciente en una cantidad suficiente para tratar el trastorno de disfunción mitocondrial. Debido a que es más probable que los síntomas del trastorno de disfunción mitocondrial se manifiesten en un órgano que requiere un suministro continuo de energía, la administración puede dirigirse específicamente a estos órganos afectados, tal como el corazón, el cerebro y el hígado. En una realización, el sitio de inyección es el vaso sanguíneo que transporta la sangre al órgano diana. En otra realización, el tratamiento implica la administración sistémica.

15 Los métodos descritos aquí proporcionan una forma de tratar la diabetes mellitus. Algunas formas de diabetes son causadas por una disfunción mitocondrial en las células beta. A nivel de las células β de los islotes, la liberación aguda de insulina está regulada por la producción de ATP mitocondrial, y las ROS mitocondriales pueden contribuir al deterioro a largo plazo de la capacidad secretora de insulina que se observa en la diabetes tipo 2. La función mitocondrial también parece ser un determinante crítico de la sensibilidad a la insulina en el tejido muscular, hepático y adiposo. Sivitz, William I. y Mark A. Yorek. "Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities." *Antioxidants & redox signaling* 12.4 (2010): 537-577. El tratamiento de estos pacientes con mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados puede restaurar la función normal de las células beta, mejorando así la producción de insulina. En algunas realizaciones, los métodos implican la administración de una cantidad eficaz de una composición que comprende mitocondrias aisladas a pacientes. La composición se puede administrar al paciente por diversas vías, por ejemplo la composición se puede inyectar directamente en el tejido del páncreas; como alternativa, la composición se puede inyectar en un vaso sanguíneo que transporta la sangre al páncreas. En algunos casos, el vaso sanguíneo es una arteria pancreática, por ejemplo la arteria pancreática mayor. En algunas realizaciones, las células β de los islotes se tratan con mitocondrias aisladas. Estas células β de los islotes pueden provenir del mismo sujeto o de un sujeto diferente.

20 Además, los métodos descritos aquí proporcionan una forma de tratar la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson resulta de la disfunción o muerte de las células generadoras de dopamina en la sustancia negra. Las causas de la disfunción celular o de la muerte celular son poco conocidas. La evidencia sugiere que la actividad mitocondrial reducida o la disfunción mitocondrial pueden ser parte de las causas. Por lo tanto, la administración de una cantidad eficaz de mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados a pacientes con enfermedad de Parkinson puede restaurar la función normal de las células generadoras de dopamina en estos pacientes, mejorando así la producción de dopamina.

25 Además, las disfunciones mitocondriales se reconocen cada vez más como componentes clave en los trastornos mentales relacionados con el estrés (por ejemplo, el trastorno de estrés postraumático (TEPT)). La relación entre los trastornos mentales relacionados con el estrés y las disfunciones mitocondriales se describe, por ejemplo, en Flaquer, A., et al. "Mitochondrial genetic variants identified to be associated with posttraumatic stress disorder." *Translational psychiatry* 5.3 (2015): e524. Por lo tanto, en algunos casos, un trastorno mental relacionado con el estrés también es un trastorno de disfunción mitocondrial. Por lo tanto, los métodos descritos aquí también se pueden usar para tratar un trastorno mental relacionado con el estrés, por ejemplo TEPT.

45 Tratamiento de lesiones

Las lesiones a menudo se asocian con daño y disfunción mitocondrial. En algunos ejemplos, los métodos descritos aquí se pueden usar para tratar diversas lesiones, por ejemplo lesión cerebral traumática, conmoción cerebral, lesión por amputación, etc.

50 Las mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados se pueden usar para tratar heridas (por ejemplo, heridas abiertas, quemaduras y erupciones cutáneas). Una herida abierta es una lesión que implica una ruptura externa o interna en el tejido corporal (por ejemplo, piel, tejido muscular, huesos). En algunos casos, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados pueden inyectarse directamente en el tejido situado alrededor de las heridas. Alternativamente, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados se pueden aplicar tópicamente en el sitio de la herida. En algunos ejemplos, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse a un sujeto por infusión continua, o por aplicación directa en el sitio de la lesión periódicamente, por ejemplo cada dos horas, hasta que cicatrice la herida.

Tratamiento del cáncer

Los métodos descritos aquí también proporcionan tratamiento de cánceres. Las células cancerosas y las células tumorales necesitan un suministro de sangre dedicado para proporcionar el oxígeno y otros nutrientes esenciales para crecer más allá de cierto tamaño. A menudo inducen el crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) al segregar diversos factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF). A diferencia de los vasos sanguíneos normales, los vasos sanguíneos tumorales están dilatados con una forma irregular, y tienen vasculaturas más delicadas. A medida que las mitocondrias con agentes terapéuticos cruzan el endotelio de los vasos sanguíneos, la extensa estructura de los vasos sanguíneos tumorales proporciona un sitio diana natural para la administración del fármaco. Después de que los agentes mitocondriales combinados se inyectan en un vaso sanguíneo, es más probable que lleguen a los tejidos tumorales que a los tejidos normales. En un ejemplo, un agente citostático o un agente citotóxico se puede administrar al tumor para destruir las células cancerosas. En un ejemplo, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, por ejemplo antraciclina. En un ejemplo particularmente útil, los métodos descritos se usan para tratar el neuroblastoma y el cáncer de próstata pediátricos.

El término “cáncer” se refiere a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo. Los ejemplos de tales células incluyen células que tienen un estado o condición anormal caracterizados por un crecimiento celular de rápida proliferación. El término pretende incluir crecimientos cancerosos, por ejemplo tumores; procesos oncogénicos, tejidos metastáticos, y células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasividad. También se incluyen las neoplasias malignas de los diversos sistemas de órganos, tales como los sistemas respiratorio, cardiovascular, renal, reproductivo, hematológico, neurológico, hepático, gastrointestinal, y endocrino; así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón no microcítico, cáncer de intestino delgado, y cáncer de esófago. El cáncer que “surge naturalmente” incluye cualquier cáncer que no es inducido experimentalmente mediante la implantación de células cancerosas en un sujeto, e incluye, por ejemplo, cáncer que surge espontáneamente, cáncer causado por la exposición de un paciente a carcinógeno o carcinógenos, cáncer resultante de la inserción de un oncogén transgénico o de la desactivación de un gen supresor de tumores, y cáncer causado por infecciones, por ejemplo infecciones virales. El término “carcinoma” está reconocido en la técnica, y se refiere a neoplasias de tejidos epiteliales o endocrinos. El término también incluye carcinosarcomas, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un “adenocarcinoma” se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular, o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. El término “sarcoma” es reconocido en la técnica, y se refiere a tumores malignos de origen mesenquimatoso. La expresión “trastornos neoplásicos hematopoyéticos” incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético. Un trastorno neoplásico hematopoyético puede surgir de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o de células precursoras de los mismos.

Los cánceres que pueden tratarse usando los métodos y composiciones de la presente descripción incluyen, por ejemplo, cánceres de estómago, colon, recto, boca/faringe, esófago, laringe, hígado, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, próstata, testículos, vejiga, piel, huesos, riñones, cabeza, cuello, y garganta, enfermedad de Hodgkin, leucemia no de Hodgkin, sarcomas, coriocarcinoma, linfoma, cerebro/sistema nervioso central, y neuroblastoma (por ejemplo, neuroblastoma pediátrico), entre otros.

Además, en algunos ejemplos, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno se puede enlazar o unir a las mitocondrias. Los expertos apreciarán que la unión del fragmento de unión del anticuerpo o antígeno a las mitocondrias o agentes mitocondriales combinados puede permitir que las mitocondrias o los agentes mitocondriales combinados se dirijan a sitios específicos, por ejemplo a células y/o tejidos diana. En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno están diseñados para dirigirse a tipos de células específicos, por ejemplo células cancerosas.

Tratamiento de trastornos metabólicos

El tejido adiposo blanco o grasa blanca es uno de los dos tipos de tejido adiposo que se encuentran en los mamíferos. A menudo es usado por el cuerpo como reserva de energía, e incluye muchos adipocitos blancos. El otro tipo de tejido adiposo es el tejido adiposo marrón. La función del tejido adiposo marrón es transferir energía de los alimentos en calor.

Los adipocitos blancos a menudo contienen una sola gota de lípidos. Por el contrario, los adipocitos marrones contienen numerosas gotitas más pequeñas y un número mucho mayor de mitocondrias. Con el reconocimiento de que los seres humanos adultos tienen en el tejido adiposo marrón un órgano con una capacidad sustancial para disipar energía, ahora se considera que la termogénesis del tejido adiposo marrón es una forma de tratar o prevenir trastornos metabólicos, tales como obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas (por ejemplo, diabetes tipo II). El uso de tejido adiposo marrón para tratar la obesidad y la diabetes se describe, por ejemplo, en Cypess, Aaron M. y C. Ronald Kahn. “Brown fat as a therapy for obesity and diabetes.” *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17.2 (2010): 143.

Como una de las principales diferencias entre los adipocitos marrones y los adipocitos blancos es el número de mitocondrias en la célula, la presente descripción proporciona métodos para tratar y prevenir trastornos metabólicos. Estos trastornos metabólicos incluyen, pero no se limitan a, obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas (por ejemplo, diabetes tipo II). En algunas realizaciones, las mitocondrias aisladas pueden inyectarse directamente en el tejido adiposo blanco del sujeto. En algunas realizaciones, los métodos implican la identificación de un sujeto que tiene

o está en riesgo de sufrir un trastorno metabólico, y la administración de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados al tejido adiposo blanco por diversas vías (por ejemplo, inyección directa, o inyección de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados en un vaso sanguíneo, que lleva la sangre al tejido adiposo blanco). En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí pueden convertir adipocitos blancos en adipocitos marrones, convirtiendo así el tejido adiposo blanco en tejido adiposo marrón.

Las mitocondrias aisladas y/o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse a un sujeto mediante administración focal. En algunas realizaciones, los métodos implican localizar el sitio diana (por ejemplo, tejido adiposo debajo de la barbilla, y tejido adiposo del abdomen), e inyectar en el sitio diana una composición que comprende mitocondrias aisladas. En algunos casos, se administra una pequeña cantidad de la composición en cada inyección, pero la inyección se repite varias veces hasta que la cantidad es suficiente para lograr el efecto deseado.

Uso cosmético

Las pieles y los músculos envejecidos o dañados (por ejemplo, los músculos faciales) se asocian con daño y disfunción mitocondrial. Las mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados se pueden usar para mejorar la función mitocondrial en estos tejidos dañados o envejecidos, eliminando así las arrugas de la piel, cicatrices, o tratando la piel floja, quemaduras, heridas, lipoma, etc.

En algunos ejemplos, los métodos implican la administración de mitocondrias aisladas o agentes mitocondriales combinados a los tejidos envejecidos o dañados (por ejemplo, tejidos de la piel o músculos faciales). En algunos casos, la administración se realiza mediante agujas hipodérmicas de calibre 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, y 34. En algunos otros casos, las mitocondrias aisladas o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse a los tejidos envejecidos o dañados mediante administración tópica. Alternativamente, la parte del cuerpo (por ejemplo, manos, pies) con los tejidos envejecidos o dañados puede colocarse, por ejemplo sumergida, en un recipiente (por ejemplo, una bañera) lleno de un medio o disolución que incluya mitocondrias o agentes mitocondriales combinados. Además, las mitocondrias y/o los agentes mitocondriales combinados pueden administrarse en un flujo continuo de la composición, por ejemplo vertiendo la composición sobre los tejidos envejecidos o dañados.

La composición también puede incluir un agente abrasivo. El agente abrasivo puede eliminar eficazmente las células/tejidos envejecidos o dañados (por ejemplo, tejidos de piel envejecidos, células muertas en una herida) y exponer células o tejidos relativamente sanos debajo. Las mitocondrias aisladas y/o los agentes mitocondriales combinados en la composición pueden ser absorbidos por estas células o tejidos relativamente sanos, mejorando así la función mitocondrial en estas células o tejidos.

La presente descripción también contempla que se puede crear una composición líquida, pasta, crema, gel, sólida, semisólida. Estas composiciones comprenden agentes mitocondriales o mitocondriales combinados, y son adecuadas para aplicación externa. Por ejemplo, se pueden usar en un tratamiento tópico. Alternativamente, se pueden pulverizar sobre la piel o las heridas.

Fertilización in vitro

Los genes mitocondriales no se heredan por el mismo mecanismo que los genes nucleares. Por lo general, se heredan de un solo padre. En los seres humanos, las mitocondrias provienen del óvulo, por lo tanto, de la madre. La donación mitocondrial es una forma especializada de fertilización in vitro para evitar que los genes mitocondriales mutados de la madre se transmitan al bebé. Por lo general, el ADN mitocondrial del futuro bebé proviene de un óvulo de un tercero. Un problema destacado de dicho procedimiento es que da como resultado una descendencia humana con tres padres genéticos. Conduce a una controversia considerable en el campo de la bioética.

El método descrito proporciona un método para resolver este problema. En un ejemplo, las células del futuro padre se recolectan y se cultivan. A continuación, las mitocondrias se aíslan de las células cultivadas. Después, estas mitocondrias se coincuban con un óvulo sin mitocondrias, que se prepara para la fertilización in vitro. En otro ejemplo, las mitocondrias del padre se coincuban con el óvulo, y en algunos casos, con el embrión. En estos casos, aunque no se hayan eliminado las mitocondrias mutadas de la madre, siempre que haya una cantidad suficiente de mitocondrias funcionales y viables en el óvulo o en el embrión, el bebé puede recibir tratamiento para la enfermedad mitocondrial.

Cultivo celular

La presente descripción proporciona métodos para mantener o cultivar una célula animal *in vitro*. La célula animal puede cultivarse o simplemente mantenerse en presencia de mitocondrias o agentes mitocondriales combinados.

El experto apreciará que las condiciones de cultivo, por ejemplo la temperatura, se pueden seleccionar y/o variar dependiendo del tipo de célula a cultivar (véase, por ejemplo, Cells: A Laboratory Manual, Spector y Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997). Por ejemplo, la línea celular de insulinooma murino β TC3 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se puede incubar a 37°C en 5% de CO₂/95% de aire humidificado.

La célula animal puede disponerse, por ejemplo suspenderse o bañarse, en un medio líquido. El medio puede ser cualquier medio conocido por los expertos en la técnica como adecuado para cultivar, conservar o lavar las células de

- interés (véase, por ejemplo, Cells: A Laboratory Manual, Spector y Leinwand, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1997). Tales tipos de medios incluyen, pero no se limitan a, diversos amortiguadores, medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco/Vogt (DMEM), o medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Dichos medios también pueden comprender suplementos apropiados, por ejemplo suero fetal bovino (FBS), aminoácidos individuales, antibióticos, y/o vitaminas. Por ejemplo, el medio puede ser medio RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, N.Y.) suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina G, 100 U/ml de estreptomina y 10% de suero fetal de ternero (FCS) (Life Technologies). En esos ejemplos, en los que las células están en un medio líquido, las células pueden exponerse a una composición que comprende mitocondrias y/o agentes mitocondriales combinados.
- 10 La presente descripción también contempla una composición que comprende células, en la que las células comprenden agentes mitocondriales combinados, mitocondrias alogénicas, mitocondrias xenogénicas, o mitocondrias autógenas con la modificación genética apropiada. Estas células pueden ser cualquier célula conocida en la técnica, por ejemplo células madre, o células de reemplazo para diversos usos clínicos.

EJEMPLOS

- 15 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Aislamiento de mitocondrias a partir de muestras de tejido o células cultivadas

Se realizaron experimentos para aislar mitocondrias de muestras de tejido o células cultivadas.

Preparación

- 20 Las siguientes disoluciones se prepararon para aislar mitocondrias intactas, viables y competentes en respiración. Para aislar con éxito las mitocondrias usando los presentes métodos, las disoluciones y las muestras de tejido deben mantenerse en hielo para preservar la viabilidad mitocondrial. Incluso cuando se mantienen en hielo, las mitocondrias aisladas exhibirán una disminución en la actividad funcional con el tiempo (Olson et al., J Biol Chem 242:325-332, 1967). Estas disoluciones deben prepararse previamente si es posible.
- 25 disolución madre 1 M de K-HEPES (ajustar el pH a 7,2 con KOH).
disolución madre 0,5 M de K-EGTA (ajustar el pH a 8,0 con KOH).
disolución de reserva 1 M de KH_2PO_4 .
disolución de reserva 1 M de MgCl_2 .
- 30 Amortiguador de homogeneización (pH 7,2): sacarosa 300 mM, K-HEPES 10 mM, y K-EGTA 1 mM. Almacenado a 4°C.
Amortiguador de respiración: sacarosa 250 mM, KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 10 mM, amortiguador K-HEPES 20 mM (pH 7,2) y K-EGTA 0,5 mM (pH 8,0). Almacenado a 4°C.
Disolución madre de PBS 10X: se disolvieron 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na_2HPO_4 , y 2,4 g de KH_2PO_4 en 1 l de H_2O bidestilada (pH 7,4).
- 35 IX PBS se preparó pipeteando 100 ml de 10X PBS en 1 l de H_2O bidestilada
Se preparó un lote de subtilisina A pesando 4 mg de subtilisina A en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Almacenado a -20°C hasta su uso.
El lote de BSA se preparó pesando 20 mg de BSA en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Almacenado a -20°C hasta su uso.
- 40 Aislamiento de las mitocondrias a partir de tejido
En la FIG. 1 se muestran las etapas del procedimiento en el aislamiento de las mitocondrias mediante la disociación de tejidos y la filtración diferencial. Se transfirieron dos muestras de biopsia de 6 mm a 5 ml de amortiguador de homogeneización en un tubo C de disociación, y las muestras se homogeneizaron usando el programa de homogeneización de 1 minuto del disociador de tejidos (A). Se añadió una disolución madre de subtilisina A (250 μl) al homogeneizado en el tubo de disociación C, y se incubó en hielo durante 10 minutos (B). El homogeneizado se centrifugó a 750 x G durante 4 minutos (como una etapa opcional). El homogeneizado se filtró a través de un filtro de malla de 40 μm prehumedecido en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo, y después se añadieron 250 μl de disolución madre de BSA al filtrado (C). El filtrado se volvió a filtrar a través de un nuevo filtro de malla de 40 μm prehumedecido en una centrifuga cónica de 50 ml en hielo (D). El filtrado se volvió a filtrar a través de un nuevo filtro de malla de 10 μm prehumedecido en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo (E). El filtrado se volvió a filtrar

a través de un nuevo filtro de malla de 6 μm previamente humedecido en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo. El filtrado resultante se puede usar inmediatamente, o se puede concentrar por centrifugación. En el caso de la concentración, el filtrado se transfirió a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugó a 9000 g durante 10 minutos a 4°C (F). Se eliminó el sobrenadante, se volvieron a suspender los peletes que contenían mitocondrias, y se combinaron en 1 ml de amortiguador de respiración (G).

Inmediatamente antes del aislamiento, se disolvió subtilisina A en 1 ml de amortiguador de homogeneización. Inmediatamente antes del aislamiento, se disolvió BSA en 1 ml de amortiguador de homogeneización. Se recogieron dos muestras de tejido reciente usando un punzón de muestras de biopsia de 6 mm, y se almacenaron en IX PBS en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo. Los dos fragmentos de tejido de 6 mm se transfirieron a un tubo C de disociación que contenía 5 ml de amortiguador de homogeneización enfriado con hielo. El tejido se homogeneizó colocando el tubo de disociación C en el disociador de tejidos y seleccionando el ciclo de aislamiento mitocondrial preestablecido (60 segundos de homogeneización).

El tubo de disociación C se retiró a un cubo de hielo. Se añadió disolución madre de subtilisina A (250 μl) al homogeneizado, se mezcló por inversión, y el homogeneizado se incubó en hielo durante diez minutos. Se colocó un filtro de malla de 40 μm en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo, y el filtro se humedeció previamente con amortiguador de homogeneización, y el homogeneizado se filtró en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo.

Se añadió disolución madre de BSA recién preparada (250 μl) al filtrado, y se mezcló por inversión. (Esta etapa se omitió si se requería la determinación de proteínas mitocondriales). Se colocó un filtro de malla de 40 μm en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo, y el filtro se humedeció previamente con amortiguador de homogeneización, y el homogeneizado se filtró en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo. Se colocó un filtro de 10 μm en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo, y el filtro se humedeció previamente con amortiguador de homogeneización, y el homogeneizado se filtró en el tubo de centrifuga cónico de 50 ml en hielo. El filtrado se transfirió a dos tubos de microcentrifuga de 1,5 ml previamente enfriados, y se centrifugó a 9000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y los peletes se resuspendieron y combinaron en 1 ml de amortiguador de respiración enfriado con hielo.

Las mitocondrias que se aislaron de los tejidos deben usarse inmediatamente para inyección o para preparar agentes mitocondriales combinados.

Aislamiento de mitocondrias a partir de células cultivadas

Las mitocondrias también se aislaron de células cultivadas. El procedimiento fue esencialmente el mismo que el procedimiento para aislar mitocondrias de muestras de tejido, excepto que se usaron fibroblastos humanos en lugar de muestras de biopsia.

Número mitocondrial

El número de mitocondrias viables se determinó marcando una alícuota (10 μl) de mitocondrias aisladas con MitoTracker Orange CMTMRos (5 $\mu\text{mol/l}$; Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA). Se colocaron alícuotas de mitocondrias marcadas en portaobjetos, y se contaron usando un microscopio confocal de disco giratorio con un objetivo apocromático C de 63x (1,2 W Korr/0,17 NA, Zeiss). Las mitocondrias se contrastaron con el colorante MitoFluor Green específico de mitocondrias (Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA). Se escogieron longitudes de onda apropiadas para medir la autofluorescencia y la fluorescencia de fondo con el uso de células y tejidos no teñidos. Brevemente, se colocó 1 μl de mitocondrias marcadas en un portaobjetos de microscopio y se cubrió. El número de mitocondrias se determinó con un aumento bajo ($\times 10$) que cubría el área completa de la muestra usando el software MetaMorph Imaging Analysis.

Ejemplo 2: Preparación de agentes mitocondriales combinados

Se realizaron experimentos para combinar mitocondrias con ^{18}F -Rodamina 6G, nanopartículas de óxido de hierro, MitoTracker Orange CMTMRos (Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA).

45 Combinación de mitocondrias con ^{18}F -Rodamina 6G por potencial eléctrico

^{18}F -Rodamina 6G (40-100 μCi en un volumen de 20 μl) se diluyó con disolución de aislamiento mitocondrial A (amortiguador de homogeneización: sacarosa 300 mM, K-HEPES 10 mM y K-EGTA 1 mM, pH 7,2) a 4°C hasta un volumen de 1,0 ml, y entonces se mezcló completamente con mitocondrias aisladas (0,5 ml que contiene 1×10^7 - 1×10^8) en disolución de aislamiento mitocondrial A. En la mezcla, la ^{18}F -Rodamina 6G se distribuyó electroforéticamente en la matriz mitocondrial en respuesta al potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna, y por lo tanto fue secuestrado por las mitocondrias en funcionamiento. La mezcla se incubó en hielo durante 10-30 minutos. La mezcla se lavó 3 veces mediante centrifugación a 9.000 rpm (10.000 g) durante 10 minutos, y el pelete se resuspendió cada vez en disolución de aislamiento mitocondrial A. Después del lavado final, el pelete se resuspendió en amortiguador de respiración.

55 Combinación de mitocondrias con nanopartículas de óxido de hierro por membrana externa mitocondrial

5 Nanopartículas de óxido de hierro que contenían un éster de succinimidilo (10 mg) se suspendieron en amortiguador de respiración a 4°C, y entonces se mezclaron por completo con mitocondrias aisladas (1,0 ml que contenía 1×10^7 - 1×10^8). El óxido de hierro se unió a los grupos de amina mitocondrial en la membrana externa mitocondrial mediante una reacción de amina de éster de succinimidilo. La mezcla se incubó en hielo durante 10-30 minutos. La mezcla se lavó 3 veces mediante centrifugación a 9.000 rpm (10.000 g) durante 10 minutos, y el pelete se resuspendió cada vez en disolución de aislamiento mitocondrial A. Después del lavado final, el pelete se resuspendió en amortiguador de respiración.

Combinación de mitocondrias con dos agentes farmacéuticos

10 ^{18}F -Rodamina 6G (40-100 μCi en un volumen de 20 μl) y nanopartículas de óxido de hierro que contenían un éster de succinimidilo (10 mg) se combinaron y diluyeron con disolución de aislamiento mitocondrial A a 4°C hasta un volumen de 1,0 ml, y entonces se mezclaron por completo con mitocondrias aisladas (0,5 ml que contiene 1×10^7 - 1×10^8) en disolución de aislamiento mitocondrial. La mezcla se incubó en hielo durante 10-30 minutos. La mezcla se lavó 3 veces mediante centrifugación a 9.000 rpm (10.000 g) durante 10 minutos, y el pelete se resuspendió cada vez en disolución de aislamiento mitocondrial A. Después del lavado final, el pelete se resuspendió en amortiguador de respiración.

15 Combinación de mitocondrias a través de tioles

20 El fluoróforo MitoTracker[®] (5 $\mu\text{mol/l}$; Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA) se mezcló con mitocondrias aisladas (1,0 ml) en amortiguador de respiración. Cuando las sondas se mezclan con mitocondrias funcionales, se oxidan y entonces reaccionan con tioles en proteínas y péptidos en mitocondrias para formar conjugados. La mezcla se incubó en hielo durante 10 minutos a 4°C en la oscuridad. La mezcla se lavó 3 veces mediante centrifugación a 9.000 rpm (10.000 g) durante 10 minutos, y el pelete se resuspendió cada vez en disolución de aislamiento mitocondrial A. Después del lavado final, el pelete se resuspendió en amortiguador de respiración.

Ejemplo 3: Formación de imágenes

Se realizaron experimentos para mostrar el uso de formación de imágenes de agentes mitocondriales combinados.

Modelo animal

25 Se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda (Millbrook Farm, Amherst, MA) para los experimentos. Los experimentos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Medicina de Harvard, y se ajustaron a las pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) que regulan el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publicación No. 5377-3, 1996). Toda la investigación se realizó de acuerdo con los Principios Rectores en el Cuidado y Uso de Animales de la Sociedad Estadounidense de Fisiología.

30 Los conejos se sedaron con administración intramuscular de acepromacina (0,5 mg/kg im). Se insertó un catéter intravenoso (iv) de calibre 22 en la vena marginal de la oreja y se aseguró con cinta, y a los conejos se les administró una inyección de 35 mg/kg de ketamina y 2,5 mg/kg de xilazina iv. Esta vía intravenosa también se usó intraoperatoriamente para administrar heparina y disolución de Ringer lactada, a razón de $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Se inyectó heparina (3 mg/kg iv por vía intravenosa).

35 A continuación, se abrió la cavidad torácica mediante una esternotomía mediana. El saco pericárdico se expuso y se abrió para formar una cuna pericárdica, y los animales se sacrificaron bajo anestesia profunda mediante exanguinación después de la extracción del corazón.

40 El corazón extraído se colocó en un baño de Krebs-Ringer a 4°C (NaCl 100 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l, KH₂PO₄ 1,1 mmol/l, MgSO₄ 1,2 mmol/l, NaHCO₃ 25 mmol/l, CaCl₂ 1,7 mmol/l, glucosa 11,5 mmol/l, ácido pirúvico 4,9 mmol/l, y ácido fumárico 5,4 mmol/l). A continuación, los corazones se sometieron a perfusión retrógrada de Langendorff durante 10 minutos para lavar la sangre.

Isquemia y reperfusión

45 Se localizó la arteria descendente anterior izquierda (LAD) y se pasó un hilo de Prolene (3-0) (Ethicon, Somerville, NJ) alrededor de la arteria con una aguja cónica, y ambos extremos del lazo de Prolene se enhebraron a través de un pequeño tubo de vinilo, para formar una trampa. La arteria coronaria se ocluyó tirando de la trampa, que entonces se fijó sujetando el tubo con una pinza para mosquitos. La isquemia regional se confirmó visualmente por cianosis regional de la superficie del miocardio. La reperfusión se consiguió soltando el lazo.

Por el contrario, la isquemia global se consiguió mediante el pinzamiento cruzado de la línea de perfusión en el aparato de perfusión retrógrada de Langendorff. La reperfusión se logró mediante la liberación de la pinza cruzada.

50 Para la formación de imágenes, se indujo isquemia durante 20 min. Para la investigación sobre la función y el tamaño del infarto, se indujo isquemia regional durante 30 min.

Administración

Se inyectaron corazones de conejo Langendorff en el área de riesgo, o se perfundieron en la arteria coronaria con 1×10^8 mitocondrias doblemente marcadas.

5 Al comienzo de la reperfusión, los corazones de conejo Langendorff recibieron varias inyecciones de amortiguador de respiración estéril (Grupo de Control) en el área de riesgo, o varias inyecciones de amortiguador de respiración estéril que contenía 1×10^7 /ml de mitocondrias (Grupo Inyectado). Se inyectó un total de 1×10^8 mitocondrias en el área de riesgo. Las inyecciones se realizaron usando una jeringa de insulina estéril de 1 ml con una aguja de calibre 28. Para los grupos de control, se inyectó en el área de riesgo amortiguador de respiración sin mitocondrias.

En el tercer grupo, se perfundió al comienzo de la reperfusión un total de 1×10^8 mitocondrias en la arteria coronaria (Grupo Perfundido).

10 PET

La formación de imágenes se realizó usando un escáner Siemens Focus 120 MicroPET. Los datos se adquirieron durante 60 minutos, y se reconstruyeron en una sola imagen. La reconstrucción se realizó utilizando OSEM2D no ponderado, generando una imagen. El análisis de imágenes se realizó utilizando el paquete de software ASIPro (Siemens Medical Solutions).

15 MRI

20 Para adquirir imágenes y tiempos de relajación $T2^*$, los corazones se colocaron en un sistema de MRI BioSpec 70/30 USR 7T (Bruker) que ejecuta el software ParaVision versión 5.1, o un sistema de MRI BioSpec 4.7T (Bruker) que ejecuta el ParaVision versión 4.0. Después de un barrido de posicionamiento inicial, se adquirieron imágenes de cine FLASH de múltiples cortes. Las imágenes se reconstruyeron, y los datos de intensidad se analizaron utilizando el software ImageJ.

Micro-CT

25 La micro-CT se realizó con un sistema de formación de imágenes peclínicas Albira (Bruker), con la versión 1.530 de Albira Software Suite. Los corazones extirpados se barrieron con un voltaje de tubo de rayos X y una corriente de 45 kV y 400 μ A, respectivamente, usando 600 proyecciones por barrido. Las imágenes reconstruidas fueron $512 \times 512 \times 512$ vóxeles, con un tamaño de vóxel isotrópico de 125 μ m. Las imágenes de gradiente SPIO se analizaron usando el paquete de software Amide (<http://amide.sourceforge.net>). Se crearon imágenes renderizadas de sección transversal y de volumen usando VolView, versión 3.4 (Kitware).

Tinción fluorescente del tejido cardíaco

30 Las muestras de tejido para estudios histoquímicos y microscópicos se recogieron alrededor de 30 minutos después del inicio de la isquemia.

35 Las muestras transmiciólicas se disecaron del área de riesgo en la pared libre del ventrículo izquierdo y tras la inclusión, y las muestras de tejido se seccionaron completamente (de 5 a 7 μ m de grosor), y entonces se montaron en portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se cocieron durante la noche a 65°C, se desparafinaron en xilenos, se rehidrataron a través de una serie de etanol graduado, y se sometieron a recuperación de antígeno calentándolos tres veces durante 5 min en ácido etilendiaminotetraacético 1 mmol/l (pH 8,0) usando un horno de microondas de 700 W ajustado a alto. Los portaobjetos se tiñeron inmunohistoquímicamente con los siguientes anticuerpos.

40 Las secciones de corazón inyectadas se inmunoteñeron fluorescentemente para desmina (verde) y el marcador mitocondrial específico para humanos MTC02 (rojo) (anticuerpo monoclonal de ratón anti-mitocondria [MTC02] (específico para humanos), Abcam, Cambridge, MA), aglutinina de germen de trigo (rojo), el marcador mitocondrial humano 113-1 (verde). Los núcleos se identifican usando el colorante de unión al ADN 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (azul) (Invitrogen, Carlsbad, CA, ahora Thermo-Fisher Scientific, Cambridge, MA). Los corazones perfundidos se inmunoteñeron con α -actinina (rojo) y MTC02 (verde) (anticuerpo monoclonal de ratón anti-mitocondria [MTC02] (específico para humanos), Abcam, Cambridge, MA), o tinción con lectina (verde) y 113-1 (rojo), o tinción con azul de Prusia para hierro (azul) y una contratinción de pararosanilina (rosa). Algunos corazones se perfundieron con lectina antes de la fijación, para revelar superficies vasculares lumbales. MTC02 y la tinción nuclear se mostraron con iluminación de contraste de fase.

50 Otros anticuerpos usados fueron el anticuerpo policlonal de conejo anti-MTC02 específico para humanos (ab91317, Abcam, Cambridge, MA), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-mitocondria específico para humanos [113-1] (ab92824, Abcam, Cambridge, MA) y el anticuerpo monoclonal de conejo anti-MTC02 [EPR3314] (ab79393, Abcam, Cambridge, MA).

Resultados

A corazones de conejo con isquemia regional (FIG. 2A) o perfundidos (FIG. 2B) se inyectaron 1×10^8 mitocondrias doblemente marcadas al inicio de la reperfusión, respectivamente. La fila superior en las FIG. 2A y FIG. 2B muestra

las representaciones volumétricas de cada corazón, y la tomografía microcomputarizada (μ CT), la tomografía por emisión de positrones (PET) y las representaciones combinadas se muestran de izquierda a derecha. Una sutura de metal (señal brillante en μ CT) indica el sitio de la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). Las filas centrales en las FIG. 2A y FIG. 2B son cortes coronarios individuales de los corazones, y las imágenes de resonancia magnética (MRI), PET e imágenes combinadas se representan de izquierda a derecha. Las filas inferiores de imágenes en las FIG. 2A y FIG. 2B son cortes transversales individuales de corazones inyectados o perfundidos, y las imágenes de MRI, PET y combinadas se muestran de izquierda a derecha. Las regiones de las señales de MRI T2' hipointenso del hierro se correlacionan con las señales de PET de ^{18}F -Rodamina 6G. Estas cifras también muestran que la perfusión de mitocondrias exógenas en la arteria coronaria dio como resultado una distribución amplia de estos orgánulos por todo el corazón.

Los corazones de conejo sometidos a isquemia global exhibieron una distribución similar de mitocondrias marcadas con ^{18}F -Rodamina 6G.

Las FIG. 3A y FIG. 3B muestran tinción histológica de corazones isquémicos inyectados y perfundidos con mitocondrias humanas, respectivamente. Secciones de corazón inyectadas (FIG. 3A) se inmunotñeron fluorescentemente para desmina (verde) y el marcador mitocondrial específico humano MTC02 (rojo) (fila superior). La fila central izquierda muestra la tinción con aglutinina de germen de trigo (rojo) y el marcador mitocondrial humano MTC02 (verde). Los núcleos se identifican usando el colorante de unión al ADN 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (azul). MTC02 y la tinción nuclear se muestran con iluminación de contraste de fase (fila inferior). Las mitocondrias trasplantadas asociadas con las membranas de los miocitos cardíacos se indican con flechas (izquierda); sin embargo, la mayoría de los orgánulos inyectados permanecieron en los espacios intersticiales. Corazones perfundidos (Fig. 3B) se inmunotñeron con α -actinina (rojo) y MTC02 (verde) (fila superior). Las mitocondrias trasplantadas se indican con flechas. Algunos corazones se perfundieron con lectina antes de la fijación, para revelar superficies vasculares lumenales. La fila central derecha muestra la tinción de lectina (verde) y 113-1 (roja); mientras que la fila inferior muestra la tinción con azul de Prusia para el hierro (azul) y una contratinción de pararosanilina (rosa). Estas figuras muestran que las mitocondrias se encontraban típicamente en los espacios intersticiales; sin embargo, algunas mitocondrias perfundidas se asociaron con la vasculatura o se internalizaron en los cardiomiocitos.

Ejemplo 4: Uso terapéutico de agentes mitocondriales combinados

Se realizaron experimentos adicionales en los modelos animales descritos en el Ejemplo 3 usando mitocondrias de hígado derivadas de forma autóloga, no marcadas, para determinar el efecto cardioprotector de la administración de agentes mitocondriales combinados a corazones isquémicos.

Ensayo de tetrazolio (TTC) y medida del tamaño del infarto

Se usó cloruro de trifeniltetrazolio para diferenciar entre tejidos metabólicamente activos e inactivos. En un ensayo típico de tetrazolio, el compuesto blanco se reduce enzimáticamente a TPF rojo (1,3,5-trifenilformazano) en tejidos vivos debido a la actividad de diversas deshidrogenasas (enzimas importantes en la oxidación de compuestos orgánicos, y por lo tanto en el metabolismo celular), mientras que permanece como TTC blanco en áreas de necrosis, ya que estas enzimas se han desnaturalizado o degradado. Por esta razón, el TTC se ha empleado en la patología de autopsias para ayudar en la identificación post-mortem de infartos de miocardio. El músculo cardíaco sano y viable se tiñe de rojo intenso debido a la lactato deshidrogenasa cardíaca; mientras que las áreas de posibles infartos serán más pálidas.

Se recogieron muestras de tejido para estudios histoquímicos y microscópicos alrededor de 150 minutos después del inicio de la isquemia. El área de riesgo (AAR) se delineó mediante inyección de pigmento azul de monastyl en la aorta. El corazón se extrajo rápidamente, y se cortó a lo largo del eje longitudinal del LV, desde el vértice hasta la base, en secciones transversales de 1 cm de grosor, y se trazó sobre una lámina de acetato transparente sobre una placa de vidrio, bajo luz ambiental. Los corazones cortados se incubaron en cloruro de trifeniltetrazolio al 1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en amortiguador de fosfato (pH 7,4) a 38°C durante 20 min. Se trazó una copia de los cortes de corazón teñidos en una hoja de acetato transparente sobre una placa de vidrio bajo la luz ambiental. El AAR en el LV y el área de tamaño del infarto (IS) se midieron por planimetría. Los volúmenes de la zona infartada y el AAR se calcularon multiplicando las áreas planimétricas por el grosor del corte. Se calculó la relación entre el AAR y el peso del LV. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje de AAR para cada corazón (IS/AAR). Un método detallado se describe en Wakiyama H, Cowan DB, Toyoda Y, Federman M, Levitsky S, McCully JD. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis, Eur J Cardiothorac Surg.21:424-433. doi: 10.1016/S1010-7940(01)01156-3 (2002).

Resultado

El trasplante mitocondrial a través de la infusión de vasos sanguíneos antes de la reperfusión redujo significativamente la necrosis de los miocitos y mejoró significativamente la función postisquémica (FIG. 4). Para cuantificar la extensión de la lesión miocárdica, se midió bioquímicamente el tamaño del infarto con tinción con TTC. La medida absoluta del tamaño del infarto por tinción con TTC reveló que no había una diferencia significativa en el tamaño del área en riesgo (es decir, la región sujeta a isquemia por la oclusión de la LAD) entre el grupo de control y el grupo perfundido. (FIG.

4); el tamaño del infarto de miocardio, expresado como porcentaje del área en riesgo, disminuyó significativamente ($P < 0,05$) en los corazones tratados con mitocondrias en comparación con los controles (FIG. 4). La FIG. 5 muestra la función miocárdica regional en el área isquémica evaluada por acortamiento sistólico segmentario usando tres transductores ultrasónicos piezoeléctricos. Confirma que las mitocondrias pueden proporcionar protección cardiovascular contra la isquemia y la lesión por reperfusión.

Ejemplo 5: Rescate de la función mitocondrial y reemplazo de ADNmt

Se realizaron experimentos para determinar si la administración de mitocondrias a las células puede rescatar la función mitocondrial y reemplazar el ADN mitocondrial dañado.

Método

10 Las células HeLa p^0 son capaces de generar energía a través de la fermentación, pero carecen de la capacidad de consumo de oxígeno debido al agotamiento de las proteínas de la cadena de transporte de electrones codificadas por el ADNmt. El experimento está diseñado para restaurar la función mitocondrial en células HeLa p^0 .

15 Las mitocondrias se aislaron de células HeLa que contenían ADNmt intacto, y entonces se marcaron con ^{18}F -Rodamina 6G y nanopartículas de óxido de hierro de 30 nm. A continuación, las células HeLa p^0 se coincubaron con estas mitocondrias.

El método detallado se describe en Pacak CA, Preble JM, Kondo H, Seibel P, Levitsky S, del Nido PJ, Cowan DB y McCully JD, Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. Biol Open 4, 622-626. PMC4434813 (2015).

Resultado

20 El contenido de ATP aumentó significativamente en células HeLa p^0 tras la coincubación con mitocondrias a las 24, 48, 72 horas y 1 y 2 semanas. El contenido de ATP intracelular mejorado correspondió a aumentos significativos en las tasas de consumo de oxígeno de células HeLa p^0 tras la internalización mitocondrial.

25 El análisis de PCR demostró el reemplazo de ADNmt en células HeLa p^0 tras el trasplante mitocondrial. Si bien los resultados muestran que la cantidad absoluta de ADNmt en células HeLa p^0 coincubadas con mitocondrias de células HeLa (que contienen ADNmt intacto) es significativamente menor que la observada en células HeLa, el ADNmt presente es suficiente para mejorar significativamente el contenido de ATP intracelular y la tasa de consumo de oxígeno en comparación con células HeLa p^0 sin tratar.

En resumen, el resultado sugiere que el trasplante mitocondrial tiene potencial para rescatar la función celular y reemplazar el ADN mitocondrial dañado.

Ejemplo 6: Tratamientos de pacientes humanos

35 Se administró una cantidad eficaz de mitocondrias aisladas a dos pacientes en estado crítico con oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) o soporte vital extracorpóreo (ECLS) para evaluar los efectos terapéuticos de dicho tratamiento. En cada caso, se administraron en el área de riesgo (anterior y posterior) del ventrículo izquierdo alrededor de 8 ~ 10 inyecciones separadas, de aproximadamente 100 microlitros (que contienen 1×10^7 mitocondrias en amortiguador de respiración). Todos estos procedimientos han sido revisados y aprobados por la Junta de Revisión Institucional. En cada caso, se ha determinado que el riesgo asociado con estos procedimientos puede justificarse por el beneficio anticipado.

Informe de Caso 1

40 Un paciente masculino de 9 días de edad con comorbilidades significativas se colocó en oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) debido a complicaciones quirúrgicas de insuficiencia coronaria. El día 9 de la ECMO, el paciente recibió tratamiento quirúrgico para la reparación de la arteria coronaria. Después de la reparación quirúrgica, el paciente regresó a la Unidad de Cuidados Intensivos Cardíacos (UCIC) con soporte ECMO.

45 El paciente continuó con el apoyo de ECMO, pero no pudo desconectarse de la ECMO. El día 19 de vida (DOL), se extrajo músculo recto para el aislamiento mitocondrial autólogo. Las mitocondrias se inyectaron en el miocardio a lo largo de las caras anterior y lateral del ventrículo izquierdo (LV) y en el área de hipocinesia. El paciente toleró tanto el procedimiento como la colocación de los cables de marcapasos. Se dejó el tórax abierto y se aplicaron vendajes. El paciente permaneció estable durante la noche en ECMO. No se pudo decanular al paciente, y se completó un segundo trasplante de mitocondrias en el DOL 21. Se volvió a realizar una biopsia del músculo recto, y se procesó en busca de mitocondrias. Posteriormente, las mitocondrias se inyectaron en 10 inyecciones separadas de aproximadamente 100 microlitros. Cada inyección (0,1 ml que contiene 1×10^7 mitocondrias en amortiguador de respiración) se administró al área de riesgo del ventrículo izquierdo.

50 Al día siguiente, el paciente pudo tolerar una prueba de destete ECMO con un ecocardiograma epicárdico que mostró una función del RV vigorosa y una función del LV buena, con flujos bajos de 50 ml/kg/min. Sin embargo, el paciente

no podía tolerar un pinzamiento completo del circuito, y continuaba la preocupación por la insuficiencia de órganos pulmonares, renales y hepáticos. El DOL 23, después de una discusión con la familia, se tomó la decisión de redirigir la atención.

Informe de Caso 2

5 Un segundo paciente era una niña de dos años con antecedentes de síndrome VACTERL (defectos vertebrales, atresia anal, defectos cardíacos, fístula traqueo-esofágica, anomalías renales, y anomalías de las extremidades), atresia tricuspídea 1B con estenosis pulmonar (EP) y defecto septal ventricular (VSD) con antecedentes quirúrgicos cardíacos complejos presentados para paliación por etapas de su circulación de ventrículo único. El curso
10 intraoperatorio se complicó por numerosas ejecuciones de derivación cardiopulmonar (CPB) por mala oxigenación y ventilación y disminución del flujo sanguíneo de la arteria pulmonar derecha (RPA). El ecocardiograma transesofágico (ETE) posoperatorio reveló una función ventricular que variaba entre normal y moderadamente deprimida. Fue estabilizada y trasladada a la unidad de cuidados intensivos cardíacos (UCIC) con tórax abierto y ventilación mecánica.

En el día postoperatorio (POD) 1, la función miocárdica se deterioró y fue canulada a oxigenador de membrana extracorpórea (ECMO). La angiografía reveló que la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) estaba casi completamente ocluida con un estrechamiento significativo. La intervención quirúrgica restauró el flujo coronario. La paciente regresó a la UCIC con soporte ECMO de flujo completo, y permaneció crítica aunque estable. En el POD
15 3, la paciente regresó al laboratorio de cateterismo para repetir la evaluación de LCA. De nuevo, no se observó un flujo significativo a través de la coronaria principal izquierda (LMA). Se colocó una endoprótesis en la LMA y se expandió, y la angiografía repetida reveló la restauración del flujo hacia la LMA y la LAD. En el POD 4, un ecocardiograma reveló insuficiencia mitral leve, insuficiencia aórtica (AR) leve, y disfunción global grave del LV. La paciente permaneció crítica pero estable con soporte ECMO.

En el POD 5, la paciente todavía presentaba una disfunción grave del LV en el ecocardiograma. Se tomó la decisión de seguir adelante con el trasplante autólogo de mitocondrias junto con el lavado torácico, la evacuación del hematoma, y la colocación de un nuevo cable auricular. Después de todos los procedimientos clínicos, se completó
25 un ETE para confirmar la disfunción del LV, principalmente a lo largo de la pared libre posterior. Se realizó una biopsia del músculo recto, y se recogieron las mitocondrias del tejido. Las mitocondrias se dividieron en alícuotas en 10 inyecciones separadas de 100 microlitros cada una, con 1×10^7 mitocondrias por inyección. Las inyecciones en el miocardio disfuncional se realizaron en varias posiciones: cinco inyecciones en la parte anterior y cinco inyecciones a lo largo del ventrículo izquierdo posterior. La paciente toleró bien las inyecciones sin signos de alteraciones eléctricas
30 determinadas por electrocardiograma (ECG) o de hematoma intramural, o signos de arritmia determinada por ecocardiograma.

En el POD 7, se repitió el cateterismo y mostró una disfunción del LV al menos moderada; cabe destacar que la endoprótesis de la LCA era estable y había buenos flujos a través de ambas coronarias. La paciente se decanuló de ECMO al día siguiente con disfunción moderada estable. En el POD 14, se observó una mejoría de la función a una
35 disfunción leve sin regurgitación mitral (MR) o AR, con buenos flujos continuos a través de la endoprótesis. La función cardíaca se mantuvo estable en disfunción leve hasta el alta de la paciente en el POD 38.

Ejemplo 7: Microscopía de alta resolución

Se realizaron experimentos para obtener imágenes de la fusión mitocondrial en células cardíacas, y para demostrar los mecanismos de fusión. Se usó microscopía de superresolución 3D para estudiar la internalización de mitocondrias
40 en cardiomiocitos humanos derivados de iPS y fibroblastos cardíacos humanos primarios.

Las mitocondrias en fibroblastos humanos se marcaron usando un vector de baculovirus específico mitocondrial para la proteína fluorescente verde (GFP). Las mitocondrias en células cardíacas iPS humanas se marcaron usando un vector de baculovirus específico mitocondrial para la proteína fluorescente roja (RFP).

A continuación, mitocondrias marcadas con GFP se aislaron de fibroblastos humanos infectados con BacMam 2.0, y estos orgánulos se incubaron con fibroblastos cardíacos que contenían mitocondrias marcadas con RFP. Las mitocondrias aisladas conservaron su potencial de membrana según lo determinado por la incubación con MitoTracker Red CMXRos, y fueron reactivas con un anticuerpo antimitocondrias humanas. Los experimentos confirmaron que las mitocondrias aisladas producen ATP y son competentes para la respiración, lo cual es un requisito para su
45 internalización y función. Después de 2 o 4 horas, las células se fijaron y montaron para evaluar si la microscopía de iluminación estructurada de superresolución (SR-SIM) podía resolver la posición intracelular de las mitocondrias internalizadas. Los experimentos demostraron que las mitocondrias exógenas se internalizaron rápidamente en los fibroblastos cardíacos humanos (HCF) y se co-localizaron con la red mitocondrial de los fibroblastos receptores. Para establecer si las mitocondrias sometidas a endocitosis se fusionaron con la red mitocondrial en los fibroblastos cardíacos receptores, se realizaron experimentos comparables en fibroblastos cardíacos humanos usando 3 de las 4
50 líneas láser disponibles.

La rotación de la representación volumétrica de las imágenes SR-SIM reveló lo que parecían ser mitocondrias exógenas que se fusionaban con la red mitocondrial endógena de células de fibroblastos receptoras. Análisis más extensos de experimentos similares usando cardiomiocitos iCell® (iCell-CM) (FIGS. 6A-6D) confirmaron la fusión de

mitocondrias exógenas derivadas de fibroblastos que contienen una GFP específica con la red de orgánulos endógenos a las 4 horas. Las FIGS. 6A-6D muestran las representaciones volumétricas tridimensionales de un cardiomiocito que expresa RFP dirigido a mitocondrias que se trató durante 0,5, 1, 2 y 4 horas con mitocondrias con GFP aisladas. La fusión de las mitocondrias exógenas con la red mitocondrial endógena es evidente (la FIG. 6A muestra el canal rojo, la FIG. 6B muestra el canal verde, la FIG. 6C muestra canales azules, y la FIG. 6D muestra la imagen fusionada).

Estos resultados proporcionaron pruebas convincentes del potencial del uso de SR-SIM para determinar claramente la ubicación de las mitocondrias internalizadas en las células, y confirmaron la fusión de mitocondrias exógenas con mitocondrias endógenas.

Para confirmar y cuantificar las observaciones, se usó la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Después de verificar que las mitocondrias aisladas mediante citometría de flujo podían analizarse, mitocondrias marcadas con GFP de HCF infectados se añadieron a los iCell-CM que contenían mitocondrias marcadas con RFP durante 4 horas. Al lavar estas células y aislar después toda la población de mitocondrias, se observaron mitocondrias que emitían fluorescencia tanto roja como verde (FIGS. 7A-7D). En las FIGS. 7A-7D, la fluorescencia verde se muestra en el eje X, y la fluorescencia roja se muestra en el eje Y (logarítmico), respectivamente. El grupo de control representa mitocondrias no marcadas, y los grupos de mitocondrias marcadas con GFP y con RFP se aislaron de HCF infectados. Las mitocondrias totales se aislaron de los iCell-CM que expresaban mitocondrias marcadas con RFP (endógenas) tratadas durante 4 horas con mitocondrias aisladas marcadas con GFP de HCF (exógenas). La fusión mitocondrial fue evidente en orgánulos que eran fluorescentes en los canales verde y rojo. Estos experimentos mostraron que el 18,1% de las mitocondrias exógenas se fusionaban con las mitocondrias endógenas a las 4 horas. Obviamente, las mitocondrias endógenas (tanto marcadas como no marcadas) superan en gran medida a las mitocondrias exógenas; sin embargo, los experimentos han demostrado que se requieren pocos orgánulos para provocar una mejora en la función cardíaca.

Debido a que los resultados indicaron que un número significativo de mitocondrias exógenas se fusionaron con la red mitocondrial endógena, se examinaron otros compartimentos celulares para comprender el punto en el que estos orgánulos escapan del sistema endosomal-lisosomal. Para maximizar la información obtenida a través de SR-SIM, se usaron las 4 líneas láser disponibles. Para probar la capacidad de interpretar los canales rojo, verde, azul, y rojo lejano en una sola adquisición, los iCell-CM se infectaron con mitocondrias marcadas con RFP BacMam 2.0 CellLight™, y se trató a estas células durante 4 horas con 1×10^7 mitocondrias de HCF marcadas con GFP. Después del tratamiento, los cardiomiocitos se lavaron y tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y un anticuerpo contra α -actinina (ACTN), que se detectó con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 633. Este estudio mostró que al usar una combinación de expresión de proteínas fluorescentes y detección de anticuerpos, se puede extraer mucha información de cada adquisición, y se puede determinar la identidad de diversos compartimentos y estructuras celulares.

Esta estrategia se usó para investigar el escape endosomal mediante el tratamiento de cardiomiocitos con mitocondrias aisladas durante 1 hora. Los iCell-CM se infectaron por primera vez con reactivos RFP-Early Endosome o RFP-Late Endosome CellLight™, y se trataron después con mitocondrias marcadas con GFP aisladas de los HCF. Las mitocondrias exógenas internalizadas se sometieron a endocitosis a través de un mecanismo dependiente de actina en un compartimento celular ácido. Además de emplear reactivos CellLight™, se usó un anticuerpo antimitocondrias humanas (MTC02) para garantizar que las esferas fluorescentes verdes sean mitocondrias internalizadas.

Los resultados mostraron que, en 1 hora, las mitocondrias internalizadas habían pasado a través de los endosomas tempranos y estaban contenidas dentro de los endosomas tardíos. La microscopía de superresolución de cuatro canales reveló el escape de las mitocondrias marcadas con GFP de los endosomas tardíos, y todas estas mitocondrias reaccionaron bien con el anticuerpo MTC02.

Mediante el uso de SR-SIM y citometría de flujo, se ha creado un modelo propuesto de las rutas endosómicas implicadas en la internalización mitocondrial. La FIG. 8 es una representación esquemática de los destinos intracelulares de las mitocondrias exógenas. Las mitocondrias aisladas ingresan a las células cardíacas (HCF e iCell-CM) a través de endocitosis dependiente de actina. Los orgánulos internalizados avanzan rápidamente desde los endosomas tempranos (< 0,5 horas) hacia endosomas tardíos, endolisosomas y lisosomas (0,5 a 4 horas). Cada uno de estos compartimentos se puede identificar usando perfiles de expresión de proteínas establecidos (parte superior de la figura). El escape mitocondrial parece ocurrir principalmente desde el compartimento endosómico tardío. Las mitocondrias exógenas escapadas se fusionan entonces con las mitocondrias endógenas (indicadas por puntas de flecha). Otras mitocondrias exógenas internalizadas se dirigen hacia la degradación a través de la ruta fagolisosomal.

En resumen, los resultados demostraron que las mitocondrias ingresan a la célula por endocitosis. Estos orgánulos escapan de los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los endolisosomas, o se degradan a través de la ruta lisosomal y fagolisosomal. Las mitocondrias exógenas que escapan de los compartimentos endosómicos se fusionan con la red mitocondrial de los cardiomiocitos endógenos. El marco de tiempo para la captación ocurre en >30 minutos. Los resultados demostraron además que la microscopía de iluminación estructurada de superresolución 3-D se puede usar junto con mitocondrias marcadas para diversos fines de obtención de imágenes.

Ejemplo 8: Infusión vascular coronaria y flujo sanguíneo

Los ejemplos de esta descripción han demostrado que las mitocondrias pueden administrarse a través de la vasculatura hasta el corazón. El suministro vascular de mitocondrias a través de las arterias coronarias da como resultado el suministro y la captación de mitocondrias en todo el corazón entre 10 y 30 minutos después de la inyección. Esto contrasta con la inyección directa de mitocondrias en el corazón mismo, en la que las mitocondrias permanecen en el área en la que fueron inyectadas. Por lo tanto, la administración vascular de mitocondrias proporciona un método rápido para permitir la distribución de mitocondrias en todo el corazón y proporcionar energía y recuperación a todo el corazón, pero existen algunas preocupaciones. Cuando el corazón se lesiona, la vasculatura cambiará. Estos cambios pueden afectar la administración o la absorción de las mitocondrias inyectadas. Es posible que las mitocondrias, en lugar de pasar a las células del corazón, se atasquen en la vasculatura debido a su estado alterado y obstruyan la vasculatura. Esto dañaría el corazón al detener el flujo de sangre al corazón, y podría causar la muerte. Para abordar estas preocupaciones, se realizaron experimentos para demostrar que las mitocondrias no alteran el flujo sanguíneo en el corazón.

En este ejemplo, todos los experimentos se realizaron en el modelo porcino clínicamente relevante. Se midió el flujo sanguíneo en el corazón, y entonces se administraron mitocondrias u otros agentes mediante infusión vascular coronaria. Después, se volvió a medir el flujo sanguíneo para determinar si hay algún cambio en el flujo sanguíneo. Como se muestra en la FIG. 9, las arterias coronarias se contrajeron con vasopresina y entonces con epinefrina (Epi) para inducir un aumento de la frecuencia cardíaca. Se usó adenosina para demostrar la reactividad de los vasos sanguíneos. Estos experimentos se realizaron tanto en el corazón normal como en el corazón dañado. También se usaron perlas de poliestireno para el control positivo. Se usaron perlas de poliestireno de 3 μm , 10 μm y 150 μm para bloquear el flujo sanguíneo. No se observaron reacciones inmunes o autoinmunes en todos los experimentos.

Los resultados muestran que el suministro mitocondrial por infusión vascular coronaria no altera el flujo vascular ni la perfusión miocárdica en el corazón normal o vasoconstruido. Las FIGS. 10A-10C y FIGS. 11A-11D muestran que no hay cambios en la frecuencia cardíaca o la conductancia con la administración vascular de las mitocondrias. Estos resultados demostraron que no hay bloqueos coronarios tras la infusión coronaria de mitocondrias. Estos resultados confirman que la infusión coronaria de mitocondrias puede usarse fácilmente en cirugía cardíaca.

Además, la administración mitocondrial por infusión vascular aumentó significativamente el flujo sanguíneo coronario sin alterar la tensión arterial media o la frecuencia cardíaca. Las FIGS. 12A-12B son un conjunto de gráficos que muestran el porcentaje de acortamiento sistólico tras la infusión coronaria de diversos agentes. Las FIGS. 13A-13B son un conjunto de gráficos que muestran el flujo sanguíneo coronario tras la infusión coronaria de diversos agentes. Las FIGS. 12A-12B y FIGS. 13A-13B muestran que la infusión coronaria de mitocondrias aumenta el flujo sanguíneo coronario. Esta respuesta fue mayor que la respuesta al fármaco que puede aumentar el flujo sanguíneo, tal como la adenosina, y superó la vasoconstricción inducida por la vasopresina. La capacidad de aumentar el flujo sanguíneo sin aumentar la frecuencia cardíaca permite el uso clínico en lesiones de tipo angina y en lesiones relacionadas con isquemia/reperfusión y en áreas de daño tisular, en las que se necesitaría un mayor flujo sanguíneo y suministro de oxígeno.

El aumento en el flujo coronario también fue dependiente de la concentración, y duró aproximadamente 5 min. La FIG. 14 muestra que las mitocondrias prolongaron la vasodilatación más allá de la de la adenosina, y los efectos vasodilatadores de la infusión de mitocondrias fueron inmediatos. Los efectos también dependieron de la duración del período de tiempo entre el momento del aislamiento de las mitocondrias y el momento del uso. Los efectos vasodilatadores disminuyeron a medida que se prolongó el tiempo desde el aislamiento (por ejemplo, se almacenó durante 30-60 minutos). Por lo tanto, las mitocondrias deben estar recién aisladas y viables. Las mitocondrias muertas y desvitalizadas no son eficaces para aumentar el flujo sanguíneo coronario (FIGS. 13A-13B y FIG. 14).

Las FIGS. 15A-15B muestran además el flujo sanguíneo coronario en respuesta a diferentes dosis de mitocondrias. El flujo coronario óptimo se logró usando 1×10^9 mitocondrias

Ejemplo 9: Infusión vascular coronaria para el tratamiento de daños miocárdicos

También se realizaron experimentos para demostrar la eficacia del suministro mitocondrial mediante infusión vascular para limitar el daño miocárdico y mejorar la función miocárdica tras isquemia miocárdica reversible inducida experimentalmente en el modelo porcino clínicamente relevante.

Los cerdos recibieron 15 minutos (aturdimiento) o 30 minutos (lesión por isquemia/reperfusión) de isquemia regional, y 120 minutos de reperfusión (FIG. 16). La comparación entre estos grupos proporcionó un medio para determinar los efectos de la infusión de mitocondrias en modelos de tejido vivo (aturdimiento) en comparación con una población heterogénea de células mixtas (vivas y muertas) (isquemia/lesión por reperfusión).

Se investigaron tres grupos en aturdimiento e isquemia/reperfusión: dos grupos de isquemia regional con isquemia regional de LAD, y un grupo de control simulado en el que el lazo en los animales no estaba apretado ni fijo y no había isquemia regional presente. Después de 15 o 30 minutos de isquemia regional, se liberaba el lazo, y los corazones recibían una sola inyección de 10 ml de amortiguador de respiración estéril (vehículo RI y Control Simulado) o una

sola inyección de amortiguador de respiración estéril (10 ml) que contenía mitocondrias ($1,7 \times 10^7$, RI-Mitocondria) administrado anterógrado a través del catéter de angiografía en el ostium coronario izquierdo.

5 El catéter se enjuagó con 10 ml de disolución salina. Los animales permanecieron bajo anestesia durante dos horas para permitir la reperusión del área de riesgo. Estos experimentos confirmaron que la infusión vascular de mitocondrias redujo el tamaño del infarto y mejoró la recuperación funcional posisquémica en el modelo porcino clínicamente relevante. (FIGS. 17A-17B, FIGS. 18A-18B).

Ejemplo 10: Respuesta inmune

Se realizaron experimentos para demostrar que no hay respuesta inmune de células B o células T a inyecciones únicas o múltiples de mitocondrias auto- o alogénicas a cualquier concentración.

10 Para demostrar la inmunogenicidad de las mitocondrias auto- y alogénicas, se usaron ratones hembra de 5 a 8 semanas de edad, BALB/cJ (receptor y donante) y C57BL/6J (donante).

15 El primer experimento se diseñó para determinar la respuesta inmune a inyecciones únicas y múltiples de mitocondrias. Se investigaron tres grupos. Los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal (ip) (0,5-1,0 ml) que contenía 1×10^5 (n=10); 1×10^6 (n=10) o 1×10^7 (n=10) de mitocondrias. Se aislaron mitocondrias autógenas de ratones BALB/cJ. Se aislaron mitocondrias alogénicas de ratones C57BL/6J. Para proporcionar un control positivo, los ratones recibieron una única inyección de esplenocitos alogénicos aislados de ratones C57BL/6J. Como control, se usó un grupo separado de ratones (BALB/cJ, n=10) que recibieron una única inyección intraperitoneal (0,5-1,0 ml) de medios de respiración estériles.

20 Para una sola inyección, los ratones recibieron inyecciones el Día 0, y después se les permitió recuperarse durante 10 días. El Día 10, se evaluó la respuesta inmunitaria. Para inyecciones múltiples, los ratones BALB/cJ recibieron inyecciones el Día -6, el Día -3 y el Día 0, y después se les permitió recuperarse durante 10 días. El Día 10, se evaluó la respuesta inmunitaria. Las FIGS. 19A-19B muestran la respuesta de las células T a dosis únicas y múltiples de mitocondrias. Los resultados muestran que no hubo respuesta de células T a dosis únicas o múltiples de mitocondrias a ninguna concentración. La FIG. 20 muestra la respuesta de las células B a dosis únicas y múltiples de mitocondrias ($P < 0,01$ esplenocitos frente a mitocondrias autógenas). La concentración de mitocondrias fue 1×10^7 orgánulo/ml, y la concentración de esplenocitos fue 2×10^7 célula/ml. El control fue una disolución de amortiguador. Estos resultados demostraron que no hay respuesta de células B a dosis únicas o múltiples de mitocondrias.

30 El segundo experimento se realizó para determinar el rechazo y la alo-respuesta. Ratones hembra de 5 - 8 semanas de edad, BALB/cJ (receptor y donante) y C57BL/6J (donante), recibieron inyecciones interperitoneales únicas y múltiples de mitocondrias como se describe en el primer experimento. El Día 10, los ratones recibieron un injerto de piel de ratones C57BL/6J. Después del injerto de piel, se siguió a los ratones durante 20 días para determinar el rechazo del injerto de piel y la respuesta inmunitaria. Si las mitocondrias pudieran provocar una respuesta inmunitaria, el ratón receptor rechazaría la piel injertada antes que el ratón receptor de los vehículos (control). Los resultados mostraron que los ratones que recibieron dosis únicas o múltiples de mitocondrias no rechazaron la piel injertada antes que los ratones del grupo de control. Por lo tanto, dosis únicas o múltiples de mitocondrias no provocan una respuesta de rechazo.

Ejemplo 11: Administración intracelular de fármacos

Se realizaron experimentos para determinar la concentración óptima de rodamina 6G, el tiempo de incubación, y las temperaturas para que las mitocondrias aisladas absorbieran rodamina 6G.

40 En este ejemplo, 2×10^7 mitocondrias se incubaron con rodamina 6G 0,325 μM , 0,65 μM , 1,25 μM y 2,5 μM . Las fracciones unidas y no unidas de rodamina 6G se determinaron tras 15, 30, 45 y 60 min de incubación a 4°C o 26°C. (FIG. 21).

45 Las FIGS. 22A-22B, 23A-23B, 24A-24B, y 25A-25B muestran que cuando las mitocondrias se incuban con rodamina 6G 2,5 μM a 26°C, 60 minutos es significativamente peor que 15 minutos. Cuando las mitocondrias se incuban con rodamina 6G 1,25 μM a 5°C, 30 minutos, 45 minutos y 60 minutos son significativamente mejores que 15 minutos. Además, para la incubación de mitocondrias con rodamina 6G 2,5 μM o 1,25 μM durante 30 o 60 minutos, la diferencia entre la temperatura de incubación de 4°C y 26°C es significativa. La fracción unida de Rodamina 6G a 4°C es 9-13%, y la fracción unida de Rodamina 6G a 26°C es 3-8%. En resumen, en condiciones óptimas, para 1,25 μM de rodamina 6G, alrededor de 0,15 μM de rodamina 6G se unen en 2×10^7 mitocondrias, y para 2,5 μM de rodamina 6G, alrededor de 0,3 μM de rodamina 6G se unen en 2×10^7 mitocondrias.

Además, para 2×10^7 mitocondrias, la condición óptima es Rodamina 6G 2,5 μM , incubada a 4°C durante 30 min.

Este ejemplo demostró la capacidad de las mitocondrias para ser usadas como vehículo para la administración intracelular de fármacos.

Ejemplo 12: La transferencia adoptiva de mitocondrias mejora el injerto de células endoteliales

La integración y la vascularización de las células madre es un obstáculo importante para el potencial terapéutico de las células madre. Se realizaron experimentos para mostrar que la transferencia adoptiva de mitocondrias mejora el injerto de células endoteliales.

Aislamiento y cultivo de células endoteliales humanas formadoras de colonias (ECFC)

- 5 ECFC humanas se aislaron de muestras de sangre del cordón umbilical de acuerdo con un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional como se describe en Melero-Martin, J. M., Melero-Martin, J. M., Khan, Z. A., Khan, Z. A., Picard, A., Picard, A., et al. (2007). In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*, 109(11), 4761-4768. Las ECFC se cultivaron en placas recubiertas de gelatina al 1% usando medio ECFC: EGM-2 (excepto hidrocortisona; Lonza) suplementado con 20% de FBS, 1 x GPS. Todos los experimentos se llevaron a cabo con las ECFC entre las pasadas 5-8.

Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimatosas humanas (MSC)

- 15 Las MSC humanas se aislaron de tejido adiposo blanco subcutáneo descartado normal obtenido durante procedimientos clínicamente indicados de acuerdo con un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional, como se describe en Lin, R.-Z., Moreno-Luna, R., Moreno-Luna, R., Muñoz-Hernandez, R., Muñoz-Hernandez, R., Li, D., et al. (2013). Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis*, 16(4), 735-744. Las MSC humanas se cultivaron en placas sin recubrir usando medio MSC: MSCGM (Lonza) suplementado con 10% de FBS calificado para MSC (Hyclone), 1x glutamina-penicilina-estreptomicina (GPS; Invitrogen). Todos los experimentos se llevaron a cabo con MSC entre las pasadas 4-6.

Aislamiento de mitocondrias a partir de las ECFC

- 20 Las ECFC (9×10^6 células) se recogieron del cultivo y se resuspendieron en 800 μ l de reactivo A del kit de aislamiento de mitocondrias para células cultivadas (Thermo Scientific). Las células se lisaron en hielo usando homogeneización Dounce (VWR) durante 30 segundos. Los lisados celulares se mezclaron con 800 μ l de Reactivo C, y luego se centrifugaron a 700 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, el precipitado se resuspendió en 500 μ l de Reactivo C, y se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. El pelete final contiene mitocondrias aisladas listas para transferirlas.

Transferencia de mitocondrias a las ECFC

- 30 Las mitocondrias aisladas se resuspendieron en 1 ml de medio ECFC y se añadieron directamente a las ECFC en cultivo. Las mitocondrias aisladas de 9×10^6 ECFC se usaron para transferir a 3×10^6 células (relación de donante a receptor de 3:1). Cinco horas después de la transferencia de mitocondrias, los medios se renovaron con un nuevo medio ECFC, y las ECFC receptoras se usaron inmediatamente para experimentos de trasplante *in vivo*. Las ECFC receptoras se denominan ECFC-Mito, y las ECFC de control que no recibieron mitocondrias exógenas se denominan ECFC-Control.

Trasplante *in vivo* de las ECFC en ratones atímicos inmunodeficientes

- 35 Los experimentos con animales se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales en el Children's Hospital Boston, en una instalación aprobada por AAALAC. ECFC humanas (2×10^5 células; con o sin transferencia de mitocondrias) y MSC (3×10^5 células), resuspendidas en 200 μ l de gel de colágeno-fibrina-laminina, se inyectaron por vía subcutánea en la espalda de ratones nu/nu atímicos macho de 6 semanas de edad (Massachusetts General Hospital, Boston, MA). Se sacrificó a los ratones, y los implantes se recogieron después de 7 días.

Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

- 45 Los implantes se recolectaron después de 7 días. Los injertos explantados se fijaron durante la noche en formalina amortiguada al 10%, se embebieron en parafina, y se seccionaron (7 μ m de grosor). Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) se examinaron para determinar la presencia de estructuras vasculares usando el software ImageJ 1.47v (National Institutes of Health). Las secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) se examinaron para determinar la presencia de vasos sanguíneos que contenían glóbulos rojos. Para la inmunotinción, las secciones se desparafinaron, y la recuperación del antígeno se llevó a cabo con amortiguador tris-EDTA (Tris-Base 10 mM, EDTA 2 mM, Tween-20 al 0,05%, pH 9,0). A continuación, las secciones se bloquearon durante 30 min en suero bloqueador al 5-10%, y se incubaron con un anticuerpo primario de ratón anti-CD31 humano (1:50; abcam) durante 1 h a temperatura ambiente. Se usaron anticuerpos secundarios de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:200; Vector Laboratories) y 3,3'-diaminobencidina (DAB) para la detección de hCD31, seguido de la contratinción con hematoxilina y montaje Permount. La tinción fluorescente se realizó usando UEA-1 conjugado con rodamina (1:200), seguido de contratinción con DAPI (Vector Laboratories).

Densidad de microvasos

La densidad de microvasos se dio a conocer como el número promedio de vasos llenos de eritrocitos (vasos/mm²) en secciones teñidas con H&E de la mitad de los implantes. Se analizó toda el área de cada sección. Los valores dados a conocer para cada condición experimental corresponden a la media \pm error estándar de la media (SEM), obtenidos de cuatro implantes individuales.

5 Microscopía

Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) y software AxioVision Rel. 4.8. Las imágenes fluorescentes se tomaron con un sistema de corte óptico ApoTome.2 (Carl Zeiss) y una lente de objetivo de aceite de 40x/1.4. Las imágenes no fluorescentes se tomaron con una cámara AxioCam MRc5 usando una lente de aceite de objetivo 40x/1.4.

10 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Las medias se compararon usando pruebas de la t de Student para datos no apareados. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc). $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

15 Las mitocondrias se aislaron de las ECFC donantes, y se transfirieron a las ECFC receptoras con una relación de donante a receptor de 3:1. Se permitió que las mitocondrias aisladas fueran absorbidas por las ECFC receptoras durante 5 horas. Las ECFC receptoras que recibieron mitocondrias exógenas (ECFC-Mito) se trasplantaron a ratones para evaluar su capacidad vasculogénica (FIG. 26).

20 Las ECFC y MSC se resuspendieron en un hidrogel de colágeno, y entonces se inyectaron por vía subcutánea en la parte posterior de ratones atímicos inmunodeficientes (FIG. 27A). La FIG. 27A muestra el ensayo de vasculogénesis *in vivo*. La FIG. 27B muestra explantes cosechados 7 días después del trasplante. Las imágenes superiores corresponden a implantes que contenían ECFC-Mito (2×10^5 células) y MSC (3×10^5 células). Los implantes que contienen ECFC-Control (2×10^5 células) y MSC (3×10^5 células) sirvieron como control.

25 Las imágenes de H&E muestran que los vasos sanguíneos llenos de eritrocitos eran abundantes en los implantes que contenían ECFC-Mito, pero no en los implantes que contenían ECFC-Control (FIG. 28A). La densidad de microvasos reveló una mayor densidad vascular en los implantes que contenían ECFC-Mito que en los implantes que contenían ECFC-Control (FIG. 28B). En la FIG. 28B, las barras representan la media \pm SEM ($n = 4$), y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

30 Las ECFC receptoras que reciben las mitocondrias exógenas (ECFC-Mito) recubren los lúmenes de los vasos humanos perfundidos recién formados. La unión de lectina UEA-1 conjugada con rodamina demostró la formación de lúmenes vasculares específicos humanos en implantes que contenían ECFC-Mito (FIG. 29A). Cabe destacar que la lectina UEA-1 se une al endotelio humano con gran afinidad, pero no se une al endotelio murino. La inmunotinción de CD31 (h-CD31) específico humano confirmó que los lúmenes de los vasos sanguíneos fueron ensamblados por las ECFC-Mito humanas trasplantadas (FIG. 29B).

35 Estos experimentos muestran que el tratamiento de células con mitocondrias mejora el injerto celular. Mejora la formación de vasos sanguíneos en las células madre, y mejora la supervivencia celular *in vivo*.

Ejemplo 13: lesión por isquemia/reperfusión pulmonar

Se realizaron experimentos para mostrar que las mitocondrias administradas por infusión vascular a través de la arteria pulmonar están localizadas dentro del pulmón.

40 Un ratón se anestesió, y se ventiló. Se inyectaron mitocondrias de ratón marcadas con ¹⁸F-rodamina 6G en la arteria pulmonar principal (visualizadas a través de una esternotomía). Las imágenes se obtuvieron 20 minutos más tarde mediante PPET y μ CT usando un sistema de imágenes Alvira PET/SPECT/CT (Bruker, Billerica, MA). Las imágenes muestran que la administración de mitocondrias en la arteria pulmonar de un ratón da como resultado una distribución en todos los pulmones (FIGS. 30A-30B).

45 En un experimento separado, los lóbulos medio e inferior del pulmón derecho en ratones se pinzaron durante 1 h (medio) y 2 h (inferior) de isquemia. Después de la liberación (reperusión), los ratones se trataron con amortiguador o con mitocondrias aisladas. Los ratones se evaluaron 48 h después de la reperusión. El resultado muestra que la administración de mitocondrias viables intactas redujo la lesión por reperusión de isquemia pulmonar en el modelo de ratón, y las mitocondrias conservaron la estructura y función pulmonar después de la isquemia/reperusión.

50 En otro experimento, los ratones también fueron anestesiados y ventilados. La estructura hilar izquierda se pinzó durante 2 h. Se inyectaron amortiguador o 3 cc (centímetros cúbicos) de disolución de mitocondrias en la arteria pulmonar izquierda, y los ratones se sacrificaron al día siguiente. El resultado muestra que la administración de mitocondrias viables intactas reduce la lesión por reperusión de isquemia en el pulmón izquierdo (FIGS. 31A-31B).

Estos resultados demuestran que las mitocondrias pueden usarse para ayudar en el rescate de pulmones dañados por isquemia, reperfusión, humo o toxinas; también pueden usarse en la conservación de pulmones para uso en trasplantes de pulmón.

Ejemplo 14: Miopatías mitocondriales

- 5 Se realizaron experimentos para demostrar que las mitocondrias se pueden administrar al nervio óptico inyectando mitocondrias en la arteria carótida común del ratón. La imagen de barrido PET muestra que las mitocondrias inyectadas están ubicadas en el nervio óptico (FIG. 32).

Estos resultados demuestran que la infusión mitocondrial se puede usar para el tratamiento de la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y otras miopatías mitocondriales.

10 Ejemplo 15: Trasplante mitocondrial autólogo para la disfunción después de una lesión por isquemia y reperfusión

- 15 El tratamiento actual para los pacientes pediátricos que han sufrido una lesión por isquemia-reperfusión miocárdica incluye soporte circulatorio inotrópico y mecánico. La recuperación de la función miocárdica después del soporte de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) es inconsistente, como lo refleja el 40% de fracasos en separarse de ECMO. El daño y la disfunción mitocondrial contribuyen significativamente a la disfunción miocárdica en estos
20 pacientes con lesión por isquemia-reperfusión. Se ha desarrollado una estrategia novedosa para reparar y reponer las mitocondrias dañadas, denominada "autotrasplante mitocondrial", en la que se trasplantan mitocondrias autólogas sanas extraídas de músculo esquelético no isquémico al miocardio lesionado. Los ejemplos de esta descripción han demostrado que las mitocondrias trasplantadas restauran la función y viabilidad mitocondrial, y mejoran la función miocárdica posisquémica mediante mecanismos internos y extracelulares que incluyen síntesis de alta energía, alteración transcrip-tómica y proteómica, y reparación del ADN.

Pacientes y métodos

- 25 Los pacientes pediátricos que requirieron soporte ECMO central debido a una disfunción miocárdica asociada a la isquemia-reperfusión después de un procedimiento quirúrgico cardíaco fueron elegibles para el autotrasplante mitocondrial. Los pacientes se incluyeron si experimentaron un evento isquémico miocárdico después de la cirugía cardíaca que no mejoró con la intervención quirúrgica y el soporte ECMO. Los pacientes fueron excluidos si se les realizó la canulación de ECMO a través de los vasos periféricos (cervicales o femorales), ya que el acceso para las inyecciones miocárdicas no es posible con este enfoque.

- 30 La recolección y el aislamiento mitocondrial se pueden realizar en 20 a 30 minutos durante el mismo procedimiento, e implican una manipulación mínima del tejido muscular. La revisión de la terapia propuesta estuvo a cargo de dos médicos independientes que no estaban implicados en la atención del paciente, y se asesoró ampliamente a las familias sobre los riesgos potenciales del procedimiento. El tratamiento se proporcionó bajo un protocolo de Terapias Innovadoras desarrollado por la Junta de Revisión Institucional del Boston Children's Hospital.

- 35 En todos los pacientes se accedió al mediastino, y se realizó un ecocardiograma epicárdico para identificar regiones de acinesia o hipocinesia miocárdica. Se cosechó una pieza de 6 mm x 6 mm de músculo recto abdominal sano de la parte inferior del campo mediante disección aguda. Se aislaron mitocondrias autólogas ($1 \times 10^8 \pm 1 \times 10^5$) en condiciones estériles, y se suspendieron en 1 ml de amortiguador de respiración. Diez inyecciones de 100 μ l que contienen cada una $1 \times 10^7 \pm 1 \times 10^4$ mitocondrias se administraron mediante inyección directa con una jeringa de tuberculina de 1 ml (aguja de calibre 28) al miocardio afectado por isquemia-reperfusión, identificado por ecocardiograma epicárdico. Se realizó un ecocardiograma epicárdico al final del procedimiento, para evaluar la presencia de hematoma miocárdico
40 relacionado con las inyecciones.

Los ecocardiogramas se leyeron de forma enmascarada por un revisor para los segmentos de disfunción tanto global como regional durante el tiempo informado.

Resultados

- 45 Las características y resultados (mortalidad y función cardíaca global y segmentos de hipocinesia regional) de los pacientes sometidos a autotrasplante mitocondrial se describen en Tabla 1. El esquema de segmentación cardíaca para la Tabla 1 se muestra en la FIG. 33. Ninguno de los pacientes experimentó arritmias o hemorragia relacionadas con las inyecciones epicárdicas. Cuatro de cada cinco sujetos demostraron una mejora en la función ventricular, y se separaron con éxito del soporte ECMO.

- 50 Este ejemplo describe el uso del autotrasplante mitocondrial para la recuperación del miocardio en pacientes pediátricos que requieren soporte ECMO debido a una lesión por isquemia-reperfusión. Los pacientes no experimentaron complicaciones adversas a corto plazo relacionadas con la inyección mitocondrial (arritmia, hematoma intramiocárdico, o cicatrización), y todos demostraron una mejoría en la función ventricular varios días después del tratamiento. La terapia mitocondrial es más ventajosa si se administra tan pronto como sea posible después de la
55 lesión isquémica, como lo demuestran los estudios en modelos animales. Los pacientes de esta serie se seleccionaron

debido a que no mostraron recuperación de la función miocárdica a pesar de 1-2 días de apoyo con ECMO y no parecía probable la recuperación espontánea de la función ventricular.

La dosis de mitocondrias y el método de administración se basaron en experimentos con animales, y se extrapolaron a la masa cardíaca de pacientes humanos. Aunque en este estudio se utilizó la inyección epicárdica, también son posibles métodos de administración alternativos, incluyendo la administración transcoronaria.

5

Además, no hubo una diferencia detectable en los marcadores antes y después de la inyección del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (como lo demuestra el estado respiratorio y renal estable), de acuerdo con los datos de estudios en animales. La autopsia del Paciente 1 no reveló signos de inflamación o rechazo en los sitios de inyección, y los recuentos de glóbulos blancos no tuvieron cambios clínicamente relevantes.

10 Este ejemplo demuestra la primera aplicación clínica de una nueva técnica de autotrasplante mitocondrial que puede ser útil para pacientes con lesión por isquemia-reperusión.

Tabla 1

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Sexo	Masculino	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino
Edad	4 días	2 años	6 días	6 meses	25 días
Diagnóstico	D-TGA	Atresia tricuspídea 1B	HLHS	LVOTO	D-TGA
Reparación quirúrgica	ASO	Fontan	Estadio 1 Norwood y RmBTS	Procedimiento de Ross	ASO
Causa de la lesión isquémica	Oclusión de la LCA reimplantada	Oclusión de la sutura LCA s/t en el apéndice de LA	Compresión externa de DKS y RCA por agente hemostático	LCA pequeña y tortuosa	Distensión del LV/isquemia subendocárdica
Intervención de la lesión isquémica	Revisión de anastomosis aorto-coronaria	Eliminación de suturas con restauración exitosa del flujo	Eliminación de agente hemostático y trombo de compresión mediastínica	Eliminación de agente hemostático y movilización de la LCA	Ventilación de LA
Duración entre la canulación de ECMO y el tratamiento	15 días	4 días	2 días	3 días	4 días
Tiempo desde el tratamiento hasta la decanulación	n/a	3 días	6 días	3 días	4 días
Sitio de inyección	Segmentos 1,2	Segmento 3	Segmentos 4,5,6	Segmentos 2,3	Segmentos 1,2,3
Función ventricular previa al tratamiento, mediante ecocardiograma	<i>Global:</i> Disfunción sistólica moderada del LV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica grave del LV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica grave del RV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica moderada - grave del LV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica grave del LV
	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 1, 2, 3	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 3, 4	<i>Hipocinesia Regional:</i> Segmentos 4, 5, 6	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 2, 3, 4	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 1,2, 3
Función ventricular 24	<i>Global:</i> Disfunción	<i>Global:</i> Disfunción	n/a	<i>Global:</i> Disfunción	<i>Global:</i> Disfunción

horas después del tratamiento, mediante ecocardiograma	sistólica leve del LV	sistólica moderada del LV		sistólica grave del LV	sistólica leve del LV
	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 1, 2, 3	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 3,4		<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 2, 3, 4	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmento 2
Función ventricular 48 horas después del tratamiento, a través de ecocardiograma	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve del LV	n/a	n/a	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve-moderada del LV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve del LV
	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmento 2			<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 2, 3	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 2, 3
Función ventricular 4-6 días después del tratamiento, mediante ecocardiograma	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve del LV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve del LV	<i>Global:</i> Función sistólica normal del RV	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve a moderada del LV	<i>Global:</i> disfunción sistólica límite - leve del LV
	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmento 2	<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna	<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna	<i>Hipocinesia regional:</i> Segmentos 2, 3	<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna
Función ventricular 10 días después del tratamiento, mediante ecocardiograma	n/a	<i>Global:</i> Disfunción sistólica leve del LV	n/a	<i>Global:</i> Función sistólica normal del LV	<i>Global:</i> Función sistólica normal del LV
		<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna		<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna	<i>Hipocinesia regional:</i> ninguna
Mortalidad	Fallecido	Viva	Fallecida	Viva	Vivo
Estado actual	A pesar de la recuperación de la función miocárdica, el paciente no toleró la decanulación por insuficiencia pulmonar, renal y hepática persistente	Paciente dada de alta el POD 38. El ecocardiograma 403 días después de la terapia mostró una disfunción global moderada.	En el POD 30, la paciente tenía una disfunción leve del LV. La paciente finalmente falleció por insuficiencia respiratoria después de BDG a los 4 meses de edad.	Paciente dada de alta el POD 52. El ecocardiograma 119 días después de la terapia mostró disfunción límite global	Paciente dado de alta el POD 30. El ecocardiograma 34 días después de la terapia mostró una disfunción global leve

Abreviaturas:

D-TGA: dextrotransposición de las arterias grandes

HLHS: síndrome del corazón izquierdo hipoplásico

5 LVOTO: obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo

ASO: operación de cambio arterial

RmBTS: derivación de Blalock-Taussig modificada derecha

LCA: arteria coronaria izquierda

POD: día postoperatorio

DKS: procedimiento de Damus-Kaye-Stansel

ECMO: oxigenación por membrana extracorpórea

LV: ventrículo izquierdo

5 RV: ventrículo derecho

BDG: Glenn bidireccional

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno metabólico, que comprende administrar una composición que comprende mitocondrias aisladas a tejido adiposo blanco del sujeto en una cantidad suficiente para tratar el trastorno metabólico.

5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el trastorno metabólico es obesidad o diabetes tipo II.

3. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que la composición se administra inyectando la composición en el tejido adiposo blanco.

4. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que el tejido adiposo blanco está ubicado debajo de la barbilla o en el abdomen del sujeto.

10