

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 392 521**

(21) Número de solicitud: 201130772

(51) Int. Cl.:

A61K 35/16 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

13.05.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

11.12.2012

Fecha de la concesión:

31.10.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

13.11.2013

(73) Titular/es:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES;
FUNDACIÓN INSTITUTO MEDITERRÁNEO PARA
EL AVANCE DE LA BIOTECNOLOGÍA Y LA
INVESTIGACIÓN SANITARIA (IMABIS) (33.3%) y
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (33.3%)

(72) Inventor/es:

RODRÍGUEZ LOSADA, Noela;
DE TERESA GALVÁN, Eduardo y
JIMÉNEZ NAVARRO, Manuel Francisco

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: **MÉTODOS DE REGENERACIÓN CELULAR POST-INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO.**

(57) Resumen:

Métodos de regeneración celular post-infarto agudo de miocardio.

La presente invención describe el uso de plasma aislado de muestras de sangre del seno coronario de pacientes que han sufrido una patología cardiaca, preferentemente un infarto agudo de miocardio para estimular la supervivencia, regeneración y/o reparación del órgano dañado. Además, la presente invención también describe el uso de dicho plasma aislado para la obtención de factores de crecimiento y/o para la elaboración de una composición farmacéutica que comprenda dicho plasma destinada a estimular la supervivencia, regeneración y/o reparación de órganos, específicamente del corazón. En la presente invención también se describe un método de tratamiento de pacientes aquejados de enfermedad cardiaca que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprenda plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen dicha enfermedad cardiaca.

ES 2 392 521 B1

DESCRIPCIÓN**MÉTODOS DE REGENERACIÓN CELULAR POST-INFARTO AGUDO DE
MIOCARDIO****CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5

La presente invención se refiere a métodos específicos de regeneración celular, tisular y de órganos, especialmente el corazón, tras sufrir los pacientes una patología cardíaca, preferentemente un infarto agudo de miocardio. Dichos métodos están basados en el uso de plasma aislado del seno coronario de pacientes que han sufrido dicho infarto agudo de miocardio.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los infartos agudos de miocardio (IAM) son una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Son producidos por un riego sanguíneo insuficiente del corazón producido por una oclusión u obstrucción en los vasos sanguíneos coronarios. La isquemia o suministro deficiente de oxígeno que resulta de tal obstrucción produce la angina de pecho, que si se recanaliza precozmente no produce muerte del tejido cardíaco, mientras que si se mantiene esta anoxia se produce la lesión del corazón y finalmente la necrosis, es decir, el infarto. El IAM afecta a la función del corazón y, particularmente, a su electrofisiología dando como resultado la fibrilación ventricular o la taquicardia, que pueden provocar una mayor isquemia y un infarto más extenso y conllevar finalmente una muerte súbita cardiaca.

La isquemia que acompaña al IAM tiene como consecuencia la necrosis cardíaca de la zona infartada del corazón. El propio organismo, para reparar dicha necrosis cardíaca, comienza un proceso de remodelación vascular que incluye procesos de angiogénesis, liberando al torrente circulatorio gran cantidad de factores inductores de proliferación y quimioatractantes que estimulan la migración de las células madre residentes en el corazón hacia la zona dañada y, además, estimula su multiplicación y diferenciación en músculo cardíaco y microvasculatura coronaria. Dicho procedimiento angiogénico es llevado a cabo principalmente por inductores de proliferación como: el factor inducible por hipoxia (HIF-1), el factor estimulante de granulocitos (G-CSF) (Engelmann MG et al 2006, J Am Coll Cardiol. Oct 17;48(8):1712-21., Lapidot T et al, Blood. 2005 Sep 15;106 (6):1901-10. May 12), el factor de crecimiento placentario (P1GF) y sus receptores (Khurana 2005, Circulación 111: 2828-2836), diferentes miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y sus

receptores (van Laake 2006, circulación, 114:2288 - 2297 de ALK; Bobik 2006, Biol 26 del florero de Arterioscler Thromb: 1712-1720; Bertolino 2005, tórax suplementa 128: 585-590), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), y factores de crecimiento angiogénicos, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor derivado del estroma (SDF-1), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), (Hiasa K et al 2004 Circulation 109: 2454-2461; Dar A et al, 2006, Exp Hematol. Aug; 34(8):967-75), además de citoquinas y metaloproteininas de matriz, que han sido también descritas como potentes factores angiogénicos (Nyberg F, 1990. FEBS Lett. 1990 Jul 2;267(1):75-7).

10

Las investigaciones de nuevas terapias en pacientes con infarto agudo de miocardio tratan de alcanzar la regeneración intrínseca de los cardiomiositos para reparar los daños producidos por el infarto, así como en identificar los diferentes factores de crecimiento también implicados en dicha regeneración como una posible solución para la regeneración del corazón tras un IAM. En este sentido, uno de los tratamientos más utilizados, hasta la fecha, en el estado de la técnica, para reparar los daños producidos por el IAM es el transplante de cardiomiositos o de células progenitoras, ya sean pluripotentes o multipotentes, es decir, aquellas células con capacidad intrínseca de diferenciarse a cardiomiosito y que son capaces de anclarse, implantarse (engraftment) ó fusionarse con el tejido preexistente sin ocasionar cambios en el control eléctrico del corazón, o arritmias ventriculares. Los principales problemas que presenta este tipo de tratamiento es que no se ha conseguido estandarizar un método específico para el transplante de dichos cardiomiositos o células progenitoras ya que en los diferentes estudios existentes en el estado de la técnica, tanto el modo, como el número y como la capacidad de implantación de dichas células es muy heterogénea (Leone AM et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. Eur Heart J. 2009 Apr; 30(8):890-9).

15

20

25

30

Además, existen estudios que demuestran que la implantación de células progenitoras, que pueden dar lugar a cardiomiositos, por vía periférica, hace que la mayoría de dichas células no sean viables, o acaben acumulándose en el bazo o en órganos reservorios, como los pulmones, e incluso cuando dichas células han sido implantadas directamente en el músculo cardiaco tampoco se ha llegado a una normalización o estandarización en cuanto al número de células que deben implantarse, el vehículo en el que están inmersas para realizar la implantación de las mismas o incluso el lugar del implante o el momento después de sufrir el IAM (M. Hristov et al. Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function

35

after acute myocardial infarction: a meta-analysis. J. Cell. Mol. Med. Vol 10, No 3, 2006 pp; Abdel-Latif A, et al., Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. Arch Intern Med. 2007 May 28;167(10):989-97; Yousef M et al., The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. Journal of the American College of Cardiology 2009; 53(24):2262-9). Otros ensayos llevados a cabo también con células progenitoras procedentes de muestras de sangre periférica extraída de pacientes que han sufrido un IAM y que poseen el marcador CXCR4, que le permite el anclaje al tejido, tampoco han mostrado mejorías en los pacientes (Tendera M, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. European Heart Journal. 2009; 30(11):1313-21).

15

Otra de las terapias utilizadas actualmente en el estado de la técnica para la regeneración de los daños producidos en los pacientes post-IAM es el tratamiento combinado de factores estimulantes de la proliferación junto con células progenitoras. En este sentido, en el ensayo clínico MAGIC trial se administró a los pacientes el factor de proliferación G-CSF junto con células derivadas de la médula ósea aisladas de muestras de sangre periférica obtenida de dichos pacientes. Los resultados pusieron de manifiesto que a pesar de la mejora de la fracción de eyeción del ventrículo izquierdo, es decir, de la capacidad de eyecionar sangre al torrente sanguíneo, que presentaban los pacientes tratados con dicha terapia, se observó que se producía una seria restenosis del stent implantado. Es decir, las células implantadas recubrían al stent obstruyendo e impidiendo el flujo sanguíneo, por lo que dicha terapia tampoco es aconsejable para el tratamiento de pacientes que han sufrido un IAM (Kang HJ et al., Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction:the MAGIC cell randomised clinical trial. Lancet. 2004; 363(9411):751-6).

Por lo tanto, hasta la fecha, no se ha encontrado un tratamiento estandarizado capaz de inducir la regeneración del miocardio dañado tras un IAM, ya sea mediante transplante directo de células progenitoras o mediante la implantación de factores inductores de proliferación o crecimiento. Existen estudios clínicos que demuestran que el tratamiento con el factor de

proliferación G-CSF, puede mejorar la regeneración del miocardio de dichos pacientes, pero aún no se ha obtenido un tratamiento estandarizado para los mismos (Ellis SG, et al. Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial. American Heart Journal.2006; 152(6):1051
5 e9-14; Takano H, et al., Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction. The American Journal of Cardiology. 2007; 122(1):41-7; Zohlnhofer D, et al., Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. JAMA. 2006; 295(9):1003-10).

10

En este sentido, todos los estudios, realizados hasta la actualidad, en el estado de la técnica para averiguar cuales eran los factores de crecimiento capaces de inducir la regeneración del corazón tras un IAM, se han basado en análisis de muestras de sangre periférica de pacientes con IAM. Hasta el momento, no se conoce cuales son los factores de crecimiento específicos
15 o una combinación de los mismos, presentes en dichas muestras de sangre periférica que son capaces de inducir y estimular la migración de las células madre residentes en el corazón hacia la zona dañada y, además, estimular su multiplicación y diferenciación en músculo cardiaco y microvasculatura coronaria.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

Para solventar el problema existente en el estado de la técnica en cuanto a cuales son los factores de crecimiento implicados en la estimulación de la supervivencia, regeneración y/o reparación de órganos dañados, así como los métodos alternativos a los conocidos en el estado de la técnica, capaces de inducir una mayor estimulación y capacidad de supervivencia, regeneración y/o reparación de órganos dañados tras una patología, preferentemente cardiaca, la presente invención describe el uso del plasma aislado del seno coronario (SC) de pacientes que han padecido una enfermedad cardiaca, más específicamente, un IAM, como medicamento.
25
30

Además, la presente invención también describe el uso de dicho plasma aislado del seno coronario de pacientes que han sufrido una patología cardiaca, para la obtención de factores de crecimiento y/o para la elaboración de una composición farmacéutica destinada a la
35

estimulación de la supervivencia, regeneración y/o reparación de órganos, específicamente del corazón. Como se describe a lo largo de la presente invención, el plasma aislado del seno coronario de pacientes que han padecido una enfermedad cardiaca y más específicamente un IAM posee una mayor capacidad de quimioatracción de células importantes para la regeneración celular y de órganos, en general, que el plasma aislado de muestras de sangre periférica de pacientes que también han padecido una enfermedad cardiaca, y más específicamente un IAM.

La presente invención también demuestra que las células dañadas tras sufrir una patología cardiaca, como por ejemplo un IAM, liberan a dicho SC gran cantidad de factores de crecimiento y factores quimiotácticos, implicados en la reparación y proliferación de células progenitoras, como por ejemplo, las células progenitoras derivadas de médula ósea (HSC), las células progenitoras endoteliales (EPC) o las células progenitoras mesenquimales (MSC), entre otras.

También la presente invención describe un método *in vitro* para estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos, caracterizado por la aplicación de plasma aislado del seno coronario de pacientes que han sufrido una patología cardiaca, preferentemente un IAM, en dichos órganos.

Tanto el plasma aislado del seno coronario de pacientes que han padecido una patología cardiaca, como los métodos descritos en la presente invención, son capaces de inducir una mayor regeneración de los órganos, particularmente del corazón tras el daño sufrido, sin presentar problemas de histocompatibilidad como sucede en el caso de los transplantes de células cardíacas. Además, los métodos basados en el transplante de células además de presentar la desventaja mencionada previamente, son muy caros, tanto desde el punto de vista económico, como en el uso de recursos materiales y humanos. Si en lugar de realizar transplantes celulares en pacientes que han sufrido un IAM o cualquier otra patología cardiaca, se utilizan factores de crecimiento, el proceso sería rápido, barato y asequible a la mayoría de enfermos que lo necesitan.

A efectos de la presente invención, el término seno coronario se refiere a un conducto venoso ubicado en la pared posterior del corazón que recibe toda la sangre venosa de éste y la traslada a la aurícula derecha.

A los efectos de la presente invención el término factor de crecimiento se refiere a un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica, que, junto con las hormonas y los neurotransmisores, desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. Su función principal es estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, además de mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular y la diferenciación celular. Dichos factores de crecimiento son transportados por el suero y producidos por gran número de células. Entre los factores de crecimiento incluidos en la presente invención destacan: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), proteínas morfogénicas del hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y relacionados (TGF-alfa), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO), y trombopoyetina (TPO), entre otros.

A los efectos de la presente invención el término factor quimiotáctico o quimioatrayente hace referencia a sustancias capaces de atraer, preferentemente, a células. Dicho concepto se refiere especialmente a aquellos factores liberados como resultado de un daño tisular, invasión o actividad inmunológica, capaces de atraer a leucocitos, macrófagos, células progenitoras u otras células, al sitio del daño o en el que se está produciendo una infección. Entre los factores quimiotácticos o quimioatrayentes incluidos en la presente invención destacan: distintos tipos de interferones (α , β , δ , κ , γ , ε , etc), interleucinas, VEGF, SDF-1, TSP-1, IGF-1, BMP (péptidos natriuréticos), secretagogos de la hormona del crecimiento (GH): Ghrelina, TGF-beta y metaloproteininas de matriz, entre otros.

A efectos de la presente invención, el término vehículo hace referencia a la sustancia o medio, preferentemente líquido, junto con el cuál se deben administrar las células progenitoras aisladas de sangre periférica de pacientes que presenten una enfermedad cardiaca o cualquier otro tipo de patología en la que sea necesaria la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de algún órgano o tejido, como por ejemplo, enfermedades que se den lugar a la producción de fistulas cutáneas, enfermedad de Chron, enfermedades en las que sea necesario la regeneración de células endoteliales, o de tejido óseo, o de tejido dérmico, etc. En la presente invención, el término vehículo hace referencia al plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca y más preferentemente, enfermos que han

sufrido un IAM. El plasma de la invención utilizado como vehículo puede además comprender otras sustancias terapéuticamente y/o farmacéuticamente aceptables, conocidas en el estado de la técnica y que obviamente sean compatibles con dichas células progenitoras.

- 5 A efectos de la presente invención el término célula progenitora se refiere a aquella célula capaz de generar uno o más tipos de células diferenciadas y que además posee la capacidad de autorrenovación. Las células progenitoras pueden seleccionarse de entre cualquiera del grupo que comprende: HSC, EPC, MSC, células derivadas de médulas ósea (BMDC), células endoteliales derivadas de cordón umbilical (HUVEC), células madre embrionarias (ESC),
10 células madre embrionarias KDR+ (*Kinase insert domain receptor* también denominado VEGFR2: receptor 2 del factor VEGF) y células pluripotentes inducidas (iPS), entre otras.

A los efectos de la presente invención el término sustancias o excipientes farmacéuticamente aceptables se refiere excipientes que no producen ningún efecto tóxico cuando son administrados a animales, incluyendo los seres humanos. Dichos excipientes pueden seleccionarse de entre cualquiera de la lista o una combinación de los mismos: aglutinantes, rellenos, disgregantes, lubricantes, recubridores, edulcorantes, saborizantes y colorantes, entre otros.
15

- 20 A los efectos de la presente invención el término cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad necesaria para conseguir el resultado deseado, es decir, es la cantidad mínima efectiva, por encima de la cuál una composición, fármaco o principio activo, inicia su efecto terapéutico.

- 25 A los efectos de la presente invención el término enfermedad cardiaca se refiere a la presencia de afectación miocárdica de cualquier etiología. Entre las enfermedades cardíacas referidas en la presente invención se encuentran la cardiopatía isquémica (IAM), la cardiopatía hipertensiva, valvulopatías (enfermedades relacionadas con las válvulas del corazón), cardiopatías familiares, miocarditis, enfermedad miocárdica infiltrativa, miocardiopatía
30 dilatada, entre otras y cualquiera de sus combinaciones.

Descripción de las figuras

Figura 1. Fotografías obtenidas mediante citometría de flujo (Dako cytometry, Dako, USA) en las que se muestran las células progenitoras endoteliales circulantes que expresan los marcadores CD133+ y KDR+, obtenidas de muestras de plasma periférico de pacientes con enfermedad cardiaca y que han sido cultivadas durante 5 días (A) y 7 días (B) en medio de cultivo Endothelial Basal Medium EBM-2 (Cambrex, Lonza, Switzerland) suplementado con factores de crecimiento. Las células progenitoras endoteliales circulantes se han incubado en presencia de los anticuerpos monoclonales CD133 unido a ficoeritrina (CD-133-PE) (clon AC133, Milteny Alemania) y KDR unido a alofícocianina (KDR-APC) (clon 89106 R&D, USA). En el eje X se muestran las células que expresan el marcador CD133 expresado como unidades de emisión de fluorescencia al estar unidas al anticuerpo CD133-PE. En el eje Y se muestran las células que expresan el marcador KDR expresado como unidades de emisión de fluorescencia al estar unidas al anticuerpo KDR-APC.

Figura 2. Ensayo de migración. La gráfica muestra el incremento en el número de células mononucleares (eje Y) procedentes del plasma obtenido de muestras de sangre periférica (PP) y sangre del seno coronario (PSC) de pacientes con IAM que han pasado a través de la membrana de fluoroblock (BD Bioscience, USA) en presencia de los diferentes factores quimiotácticos utilizados en el ensayo (eje X) respecto al control positivo (10% se suero bovino fetal, FBS). En la gráfica se muestran la media ± desviación estándar de las células del seno coronario vs sangre periférica. TSP-1: trombospondina-1, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial, SDF-1: factor derivado de estroma 1, PP: plasma periférico procedente de pacientes con IAM diluido a una concentración del 10% en medio de cultivo EBM-2, PSC: plasma del seno coronario procedente de pacientes con IAM diluido a un concentración del 10% en medio de cultivo EBM-2. (Lonza Cambrex, Switherland). La significación estadística se expresa como p<0,05 del PSC respecto al resto de quimioatractantes.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la presente invención, divulga el uso de plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca como medicamento.

Otro de los objetos de la presente invención se refiere al uso de plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca para la obtención de una

composición farmacéutica destinada a estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos, como por ejemplo, tejido endotelial, óseo, dérmico, etc.

Otro de los objetos de la presente invención se refiere al uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca para la obtención de factores de crecimiento y/o quimiotácticos destinados a la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos. Entre los factores de crecimiento y/o quimiotácticos presentes en dicho plasma destacan, el HGF, IGF-1, TGF-beta, TGF-alfa, BMPs, PDGF, VEGF, IGF-1, Interferon-gamma, interleucinas, secretagogo de la hormona del crecimiento 10 Ghrelin, FGF, KGF, EGF, NGF, G-CSF, GM-CSF, EPO, TPO, SDF-1 y TSP-1, entre otros y cualquiera de sus combinaciones.

Otro de los objetos de la presente invención se refiere al uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca como vehículo para la administración de células progenitoras destinadas a la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos. En este sentido, las células progenitoras se aíslan preferentemente de sangre periférica bien del propio paciente que padece una enfermedad cardiaca o bien de cualquier paciente que padece una enfermedad en la que sea necesaria la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejido dañado, como por ejemplo, la enfermedad de Chron, enfermedades que se desarrollan con la aparición de fistulas cutáneas, entre otras. Además, las células progenitoras aisladas de dicha sangre periférica se seleccionan preferentemente de entre cualquiera de la lista: HSC, 20 EPC, MSC, BMDC, HUVEC, ESC, KDR+, y/o iPS o combinaciones de las mismas.

25 En una realización preferida de la presente invención, los pacientes a los que se les extraen las muestras de sangre del seno coronario para obtener el plasma, son pacientes que han sufrido un IAM.

En otra realización preferida de la invención, el órgano preferido capaz de regenerarse y/o 30 repararse tras una lesión es el corazón.

En otra realización preferida de la invención, los tejidos preferidos capaces de regenerarse y/o repararse tras una lesión son preferentemente el tejido óseo, el tejido dérmico y el tejido epitelial.

Otro de los objetos de la presente invención se refiere a una composición que comprende plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca, siendo preferentemente dicha enfermedad cardiaca IAM. En una realización preferida, la composición descrita en la presente invención es una composición farmacéutica. En una
5 realización más preferida, la composición de la invención, además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización aún más preferida, la composición, además comprende células progenitoras, que se seleccionan de entre cualquiera de la lista: HSC, EPC, MSC, BMDC, HUVEC, ESC, KDR+ y/o iPS o combinaciones de las mismas.

10 La composición descrita en la presente invención, puede ser usada para la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de tejidos y/o órganos, siendo el órgano preferido el corazón.

15 Otra realización preferida de la invención consistiría en una composición para conservación de órganos extraídos que comprenda plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca, preferentemente IAM.

20 Otro de los objetos de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos extraídos extra-corpóreamente caracterizado por la aplicación del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca, preferentemente IAM, o una composición que comprenda dicho plasma, a dichos órganos mencionados.

25 En una realización preferida, el método *in vitro* descrito en la presente invención se caracteriza por que el órgano es preferentemente el corazón.

30 Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca, preferentemente IAM, para ser usado en la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

35 Otro de los objetos de la presente invención se refiere al plasma descrito en la presente invención para ser usado como vehículo para la administración de células progenitoras destinadas a la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

Otro de los objetos de la presente invención se refiere a un método de tratamiento de pacientes aquejados de enfermedades que necesitan para su tratamiento la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en la presente invención. A efectos de la presente invención, las enfermedades que necesitan para su tratamiento la estimulación de la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos se seleccionan preferentemente de entre cualquiera de las comprendidas en la lista: enfermedad de Chron, enfermedades que se desarrollan con la aparición de fistulas cutáneas, enfermedades en las que es necesario la regeneración del tejido endotelial, y/o del tejido óseo y/o del tejido dérmico, entre otras.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere a un método de tratamiento de pacientes aquejados de enfermedad cardiaca que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones descritas en la presente invención. En una realización preferida, el método de tratamiento descrito en la presente invención se caracteriza por que la enfermedad cardiaca es IAM.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1. Obtención y procesamiento de las muestras sangre de pacientes con IAM.

Se han tomado muestras de sangre tanto periférica como del seno coronario de pacientes con IAM ($n=6$), previo consentimiento informado durante la intervención quirúrgica no invasiva a la que fueron sometidos. Dichas muestras de sangre fueron procesadas por separado, aislando en ambas muestras de sangre, periférica y del seno coronario, por un lado el plasma, utilizando para ello ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante y, por otro lado, las células progenitoras endoteliales, utilizando heparina (BD vacutainer, USA) como anticoagulante.

Para la obtención del plasma, las muestras de sangre periférica y de sangre del seno coronario se centrifugaron, inmediatamente a su extracción, a 3000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación para la eliminación

de los posibles restos plaquetarios residuales que quedasen en dicha muestra de plasma. Las condiciones de la segunda centrifugación fueron 10000 rpm a una temperatura de 4° C durante 10 minutos. Las muestras de plasma obtenidas se almacenaron a una temperatura de -80°C hasta el momento de realizar los ensayos de migración.

- 5 Para la obtención de las células progenitoras endoteliales de las muestras de sangre periférica y del seno coronario de los pacientes con IAM, dichas muestras de sangre fueron sometidas a un proceso de centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll (Sigma-Aldrich, USA) a 800g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células mononucleares obtenidas de la primera centrifugación se lavaron con buffer fosfato (PBS) al 1% de suero bovino fetal (FBS, 10 Cambrex, Lonza, Switzerland). Posteriormente, se sembraron en placas de cultivo recubiertas con fibronectina según el método descrito por Hill y colaboradores (Hill JM et al 2003, N Engl J Med 348: 593-600) y se mantuvieron durante 7 días en medio de cultivo específico para el crecimiento de células endoteliales el Endothelial Basal Medium EBM-2 (Cambrex, Lonza, Switzerland) suplementado con diferentes factores de crecimiento para potenciar el 15 crecimiento de las células progenitoras circulantes periféricas. Mediante ensayos de citometría, usando el marcado primitivo CD133+ que está asociado a regeneración celular, se comprobó que el tiempo óptimo de cultivo para obtener las células progenitoras endoteliales fueron 7 días (Figura 1). Por tanto, durante dichos 7 días, las células se mantuvieron en cultivo para obtener las células progenitoras endoteliales.
- 20 Entre los factores de crecimiento adicionados al medio de cultivo EBM-2 se encuentran el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento endotelial (EGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF). Además, se añadió al medio EBM-2: glucagón, anfotericina D, penicilina-estreptomicina y 20% de FBS (Cambrex, Lonza, Switzerland). El cultivo se llevó a cabo en cámaras de cultivo a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera húmeda al 25 5% de CO₂. Esté método de cultivo permite en una primera fase de cultivo de 48 horas de incubación, descartar las células circulantes maduras como son células endoteliales adultas y los monocitos, que se adhieren a la placa de cultivo recubierta por fibronectina. En una segunda fase de cultivo se siembran las células no adheridas en el medio de cultivo especificado con anterioridad, permaneciendo 7 días en incubación, recambiando el medio 30 cada 3 días. De esta manera, las posibles contaminaciones con células no adherentes que preexisten en la fase mononucleada de la sangre, como linfocitos, contaminaciones con eritrocitos, etc. son descartadas, y se favorece el crecimiento de las células progenitoras endoteliales circulantes (Figura 1).

Transcurrido dicho tiempo las células fueron tripsinizadas en una solución de Tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich, USA) durante 3 minutos en la cámara de cultivo a una temperatura de 37°C y en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. A continuación, las células se recogieron y se resuspendieron en una solución de medio de cultivo EBM-2 al 10% de FBS y se centrifugaron. El pellet celular formado por células progenitoras circulantes CD133+ se resuspendió en 1ml de medio de cultivo EBM suplementado con 10% de FBS y que además contenía 5µM de calceína AM (Invitrogen, España), manteniéndose posteriormente en cultivo durante 12 horas en cámara de cultivo a una temperatura de 37°C, en atmósfera húmeda con un 5% CO₂. La calceína AM es un marcador de viabilidad celular, que permite la identificación de las células vivas al dar lugar a una tinción verde fluorescente en las células que lo incorporan en su metabolismo, lo cual solo puede suceder cuando las células están vivas. Mediante dicho procedimiento de viabilidad celular se puso de manifiesto que el 100% de las células cultivadas se encontraban teñidas con calceína AM (Invitrogen, España) a través del empleo del microscopio invertido Nikon modelo TE2000-U y se tomaron imágenes con la cámara Nikon modelo DS5MC. Posteriormente las células fueron lavadas y resuspendidas en medio EBM-2 al 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, España) para llevar a cabo los ensayos de migración.

Ejemplo 2. Ensayos de migración celular.

Para la realización de los ensayos de migración celular se sembraron 100.000 células, 20 cultivadas según se ha explicado en el Ejemplo 1, en la parte superior de una cámara de cultivo modificada de Boyden con membrana de fluoroblock (BD Bioscience, USA) de 8 µm de diámetro en medio de cultivo EBM-2 al 0,1% de BSA. El tamaño de las células que son investigadas determina el tamaño del poro de la membrana, y esto es esencial para elegir un diámetro que permita una transmigración activa. En este sentido se ha seleccionado un diámetro de 8 µm para permitir el paso a través del mismo de las células progenitoras endoteliales presentes en las muestras de plasma de sangre periférica y de seno coronario de los pacientes con IAM descritos en la presente invención. En la parte inferior de la cámara de Boyden se sembraron las diferentes sustancias quimiotácticas que se testaron en el presente ensayo a las concentraciones previamente descritas para las mismas en el estado de la técnica. 25 Las sustancias quimioatractantes testadas fueron: solución de FBS diluido al 10% en medio de cultivo EBM-2 (control positivo), trombospondina-1 (TSP-1, RD USA) a una concentración de 200ng/ml (Maier KG 2009, Am J Surg. Nov; 198(5):664-9); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a una concentración de 50ng/ml (Yu JX 2009 J Vasc Surg. Sep;

50(3):608-16); factor derivado de células estromales-1 (SDF-1) a una concentración de 100ng/ml (Yu JX 2009 J Vasc Surg. Sep; 50(3):608-16), solución diluida en medio de cultivo EBM-2 al 10% de plasma procedente del seno coronario de pacientes con IAM y solución diluida en medio de cultivo EBM-2 al 10% de sangre periférica de pacientes con IAM. Las 5 células se mantuvieron en cultivo en presencia de los diferentes factores quimioatractantes mencionados, así como del plasma obtenido de las muestras de sangre periférica y del seno coronario de pacientes que han padecido un IAM, en la cámara de Boyden durante 24 horas a una temperatura de 37°C y en atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Transcurrido dicho tiempo se realizaron las lecturas en un fluorímetro de placa modelo FLX800 BT (Izasa, España) (480-10 530nm) para averiguar la capacidad de migración de dichas células aisladas en presencia de cada una de las sustancias testadas.

Para la cuantificación del número total de células por pocillo se utilizó una recta de calibración con rangos que variaron de 150.000 células a 1000 células marcadas con calceína-15 AM en medio EBM-2. Los resultados se expresaron como el incremento del número de células que pasan a través de la membrana de fluoroblock relativizados con respecto al control positivo del estudio (10% de FBS). Como puede observarse en la Figura 2 el plasma proveniente de las muestras de sangre extraídas del seno coronario de pacientes con IAM posee una mayor capacidad quimioatractante tanto de células mononucleares periféricas, 20 como, más aún, de células del seno coronario, más incluso que los factores SDF-1 y VEGF, ampliamente conocidos en el estado de la técnica como unos de los principales y mayores quimiotractantes presentes en el plasma (Zaruba MM et al, 2010, Expert Opin Biol Ther. Mar; 10 (3):321-35). Sin embargo y, como se muestra en la Figura 2, el plasma proveniente del seno coronario (PSC) de pacientes que han padecido IAM presenta una mayor capacidad de 25 quimioatracción tanto para las células endoteliales progenitoras obtenidas de la sangre periférica, como, más aún, para las células endoteliales progenitoras obtenidas de la sangre del seno coronario de los pacientes que han sufrido un IAM. Por lo tanto la presente invención pone de manifiesto que el seno coronario es un nicho importante para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el "homing" celular de células progenitoras, es decir, para la 30 capacidad que presentan las células progenitoras para migrar desde reservorios alejados de la zona afectada o dañada del paciente, hacia las zonas isquémicas, infartadas o dañadas y para la quimiatracción celular.

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca para la fabricación de un medicamento.

5

2.- Uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca para la obtención de una composición farmacéutica destinada a estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

10 3.- Uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca para la obtención de factores de crecimiento y/o quimiotácticos destinados a estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

15 4.- Uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca como vehículo para células progenitoras destinadas a estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

5.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por que la enfermedad cardiaca es preferentemente infarto agudo de miocardio.

20

6.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por que el órgano es el corazón.

25 7.- Uso según las reivindicaciones 4 a 6 caracterizado por que las células progenitoras se seleccionan de entre cualquiera de la lista: HSC, EPC, MSC, BMDC, HUVEC, ESC, KDR+ y/o iPS o combinaciones de las mismas.

8.- Composición que comprende plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca.

30

9- Composición según la reivindicación 8 que es una composición farmacéutica.

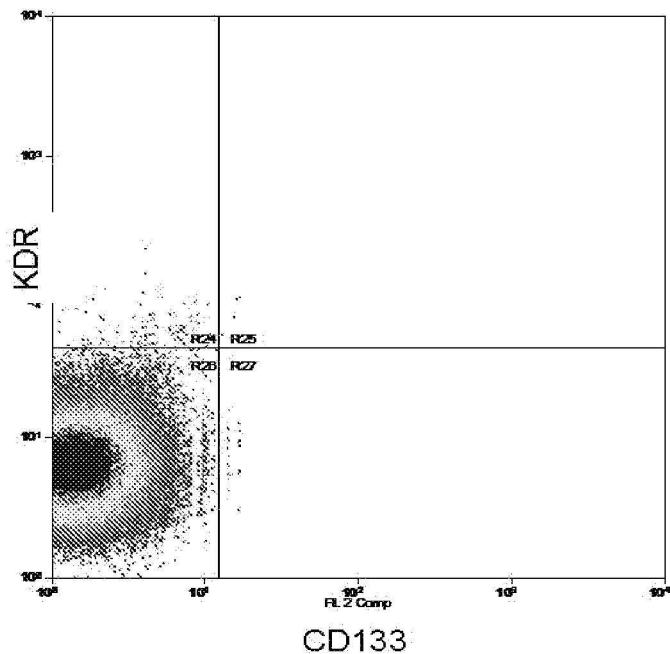
10.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

35

- 11.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que además comprende células progenitoras.
- 12.- Composición según la reivindicación 11, donde las células progenitoras se seleccionan de 5 entre cualquiera de la lista: HSC, EPC, MSC, BMDC, HUVEC, ESC, KDR+ y/o iPS o combinaciones de las mismas.
- 13.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso en estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.
10
- 14.- Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para la conservación de órganos extraídos extra-corpóreamente.
- 15.- Método *in vitro* para estimular la supervivencia, reparación y/o regeneración de órganos extraídos extra-corpóreamente caracterizado por la aplicación de plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca o de una composición que comprenda dicho plasma, según se define en las reivindicaciones 8 a 12, a dichos órganos.
15
- 16.- Método según la reivindicación 15 caracterizado por que la enfermedad cardiaca es infarto agudo de miocardio.
20
- 17.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 caracterizado por que el órgano es el corazón.

Figura 1

A



B

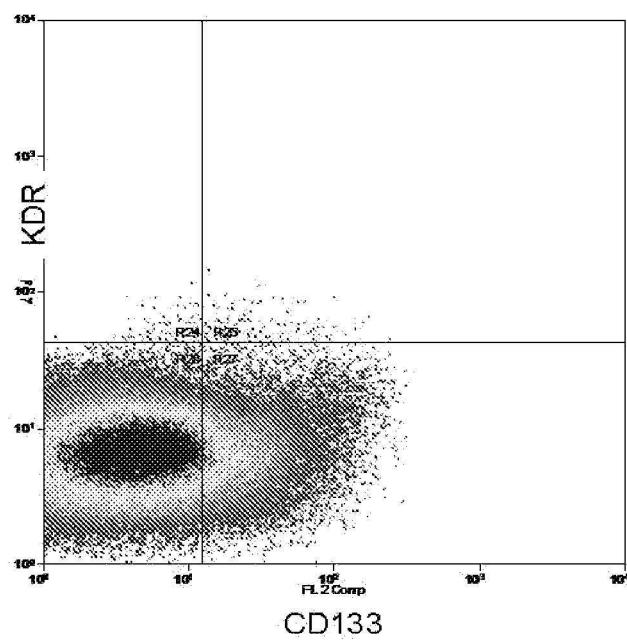
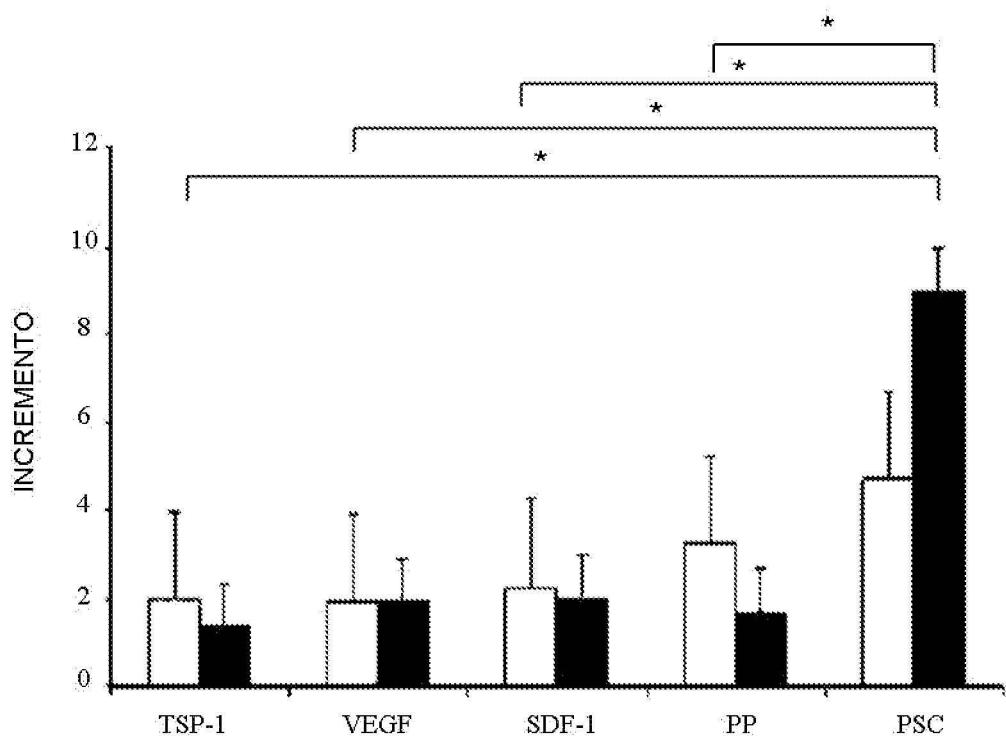


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130772

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: **A61K35/16** (2006.01)
A61P9/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HARTMANN J R et al. Chemotactic activity in the coronary sinus after experimental myocardial infarction: effects of pharmacologic interventions on ischemic injury. The American journal of cardiology UNITED STATES Oct 1977. Vol. 40, No. 4, Páginas: 550-555. ISSN 0002-9149 (Impreso). Ver resumen; página 551, columna 1, párrafo [7] – página 552, columna 1, párrafo [1].	1-3,5,6,8-10,13-17	
Y	DIMMELER STEFANIE et al. Cell-based therapy of myocardial infarction. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology United States Feb 2008. Vol. 28, No. 2, Páginas: 208-216. ISSN 1524-4636 (Electrónico). Ver todo el documento.	4,7,11,12	
X	NEUMANN F J et al. Cardiac release of chemoattractants after ischaemia induced by coronary balloon angioplasty. British heart journal ENGLAND Jul 1993. Vol. 70, No. 1, Páginas: 27-34. ISSN 0007-0769 (Impreso). Ver todo el documento.	1-3,5,6,8-10,13-17	
Y	LAFLAMME MICHAEL A et al. Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. Annual review of pathology United States 2007. Vol. 2, Páginas: 307-339. ISSN 1553-4006 (Impreso). Ver todo el documento.	4,7,11,12	
X	OGAWA H et al. Platelet-derived growth factor is released into the coronary circulation after coronary spasm. Coronary artery disease UNITED STATES May 1993. Vol. 4, No. 5, Páginas: 437-442. ISSN 0954-6928 (Impreso). Ver resumen, introducción, página 441, columna 1.	1-3,5,6,8-10,13-17	
Y	AMADO L C et al. Multimodality Noninvasive Imaging Demonstrates In Vivo Cardiac Regeneration After Mesenchymal Stem Cell Therapy. Journal of the American College of Cardiology - Cardiac Imaging. 21.11.2006. Vol. 48, No. 10, Páginas: 2116-2124. ISSN 0735-1097 (Impreso). Ver todo el documento.	4,7,11,12	
Y		4,7,11,12	
		4,7,11,12	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 28.06.2012	Examinador B. Pérez Esteban	Página 1/5
--	--------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones 1-17	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HARTMANN J R et al. The American journal of cardiology UNITED STATES Oct 1977. Vol. 40, No. 4, Páginas: 550-555. ISSN 0002-9149 (Impreso).	Oct 1977
D02	DIMMELER STEFANIE et al. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology United States Feb 2008. Vol. 28, No. 2, Páginas: 208-216. ISSN 1524-4636 (Electrónico).	Feb 2008
D03	NEUMANN F J et al. British heart journal ENGLAND Jul 1993. Vol. 70, No. 1, Páginas: 27-34. ISSN 0007-0769 (Impreso).	Jul 1993
D04	LAFLAMME MICHAEL A et al. Annual review of pathology United States. 2007. Vol. 2, Páginas: 307-339. ISSN 1553-4006 (Impreso).	2007
D05	OGAWA H et al. Coronary artery disease UNITED STATES. May 1993. Vol. 4, No. 5, Páginas: 437-442. ISSN 0954-6928 (Impreso).	May 1993
D06	AMADO L C et al. Journal of the American College of Cardiology - Cardiac Imaging. 21.11.2006. Vol. 48, No. 10, Páginas: 2116-2124. ISBN: ISSN 0735-1097 (Impreso).	21-11-2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica el uso del plasma aislado del seno coronario de pacientes que padecen una enfermedad cardiaca, preferentemente infarto agudo de miocardio, para la fabricación de un medicamento destinado a estimular la supervivencia, reparación o regeneración de órganos, concretamente de corazón. También reivindica el uso del plasma aislado para la obtención de factores de crecimiento y/o quimiotácticos, y como vehículo de células progenitoras destinadas a estimular la supervivencia, reparación o regeneración de órganos. Y por último, se reivindica un método *in vitro* para estimular la supervivencia, reparación o regeneración de órganos extraídos extracorpóreamente mediante la aplicación del mencionado plasma.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa el uso del plasma aislado de sangre de seno coronario de pacientes que padecen enfermedad cardiaca, por lo que la invención se considera nueva según el artículo 6 de la ley 11/1986 de Patentes.

Sin embargo, existen en el estado de la técnica varios documentos que, solos o en combinación con otros, afectan la actividad inventiva de todas las reivindicaciones de la solicitud, por lo que ésta no cumpliría el requisito del artículo 8 de la mencionada ley de patentes.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un aumento de la actividad quimiotáctica en el plasma de seno coronario tras la inducción experimental de un infarto agudo de miocardio por ligamiento coronario. Por tanto, resultaría evidente para el experto en la materia utilizar esa plasma para obtención de factores de quimiotácticos, para la fabricación de un medicamento que estimule la supervivencia, reparación o regeneración de órganos, y como vehículo para células con este mismo fin, así como para el resto de las composiciones y usos de las reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8-10 y 13-17. Por consiguiente, ninguna de estas reivindicaciones de la presente solicitud cumple el requisito de actividad inventiva según el artículo 8 de la ley de patentes.

La diferencia fundamental entre D01 y la solicitud reside en que en D01 el efecto quimiotáctico del plasma aislado se mide sobre neutrófilos, y no sobre células progenitoras. Es sobradamente conocido en el estado de la técnica la utilización de células madre para regeneración de tejido cardiaco, como se puede apreciar en el documento D02, que es una revisión de las terapias génicas utilizadas para la recuperación funcional del corazón tras un infarto de miocardio. El experto en la materia combinaría de manera evidente los documentos D01 y D02 para aprovechar la capacidad quimiotáctica del plasma del seno coronario de la invención y utilizarlo como vehículo de células madre progenitoras destinadas a regeneración cardiaca. Por tanto, estos dos documentos en conjunto afectan la actividad inventiva de las reivindicaciones 4, 7, 11 y 12 de la presente solicitud, según el artículo 8 de la ley de patentes.

También en el documento D03 se divulga la liberación de factores quimioatrayentes a la sangre de seno coronario tras isquemia de miocardio inducida artificialmente. Mediante el mismo razonamiento que el desarrollado para el documento D01, se concluye que este documento afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8-10 y 13-17 de la solicitud, según el artículo 8 de la ley de patentes. Como en D01, en el documento D03 las células sobre las que se mide la capacidad quimiotáctica del plasma aislado son neutrófilos, y no células progenitoras. De nuevo, resultaría evidente para el experto en la materia aprovechar esa propiedad del plasma reivindicado para atraer células madre, y combinar la información del documento D03 con la de D04, que describe el uso de células progenitoras para el tratamiento del infarto de miocardio. De este modo, la combinación obvia de los documentos D03 y D04 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 4, 7, 11 y 12 de la presente solicitud de patente.

Por último, en el documento D05 se describe la liberación de factores de crecimiento (concretamente el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF) a la sangre del seno coronario tras espasmo de la arteria coronaria, que provoca isquemia aguda de miocardio. Como en los casos citados anteriormente, la información divulgada en el documento D05 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-3, 5, 6, 8-10 y 13-17 de la solicitud de patente, según el artículo 8 de la ley de patentes (para una explicación más detallada, ver arriba). Y, también como en el caso de los documentos anteriores, la actividad inventiva de las reivindicaciones 4, 7, 11 y 12 quedaría afectada por la combinación (evidente para el experto en la materia) del documento D05 con un documento en el que se describa la utilización de células progenitoras en regeneración cardiaca, como en el documento D06.