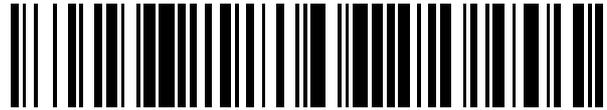


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 965**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2003 E 03731044 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1622645**

54 Título: **Composiciones y métodos para administrar células madre**

30 Prioridad:

23.04.2002 US 374929 P

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

21.01.2014

73 Titular/es:

**ROGER WILLIAMS HOSPITAL (100.0%)
825 CHALKSTONE AVENUE
PROVIDENCE, RI 02908, US**

72 Inventor/es:

**LUM, LAWRENCE G. y
LEE, RANDALL J.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 438 965 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

Composiciones y métodos para administrar células madre

La presente solicitud reivindica la prioridad del documento de EE.UU. nº de serie 60/374.929, presentado el 23 de abril de 2002.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva se citan diversas referencias.

Antecedentes de la invención

10 La era de la plasticidad comenzó con la publicación de un manuscrito titulado "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo" por Bjornson y colegas (1). Impulsaban una hipótesis basada en observaciones realizadas por Valtz et al., que demostraron la capacidad de una sola célula neuroectodérmica (de la línea celular de cerebelo de rata ST15A) para formar células neuronales, gliales y musculares (2). Desde entonces, se ha publicado una enorme cantidad de artículos sobre plasticidad.

15 Inicialmente, aparecieron informes sobre células musculares que daban lugar a hematopoyesis (3) y después una variedad de informes sobre células de origen medular que daban lugar a músculo (4-6), hepatocitos (7-9) y miocitos cardíacos (10,11). Esto apuntaba a que la plasticidad jerárquica es la norma y que el microentorno local determina la elección de las rutas de diferenciación.

20 Aunque la mayoría de estos estudios se han realizado con poblaciones de células completas, en varios diseños experimentales se han usado células madre hematopoyéticas de médula altamente purificadas, lo que demuestra que los hepatocitos y los miocitos cardíacos podrían surgir de estas células. Sin embargo, aun en este caso, los resultados no resolvían la cuestión de si las células de repoblación eran células con potencial tanto hematopoyético como no hematopoyético o si coexistían células madre de linaje definido distintas en la población purificada obtenida de forma experimental. El trabajo de Verfaillie y colegas proporciona respaldo al concepto de que en la médula residen varios tipos de células madre. En sus estudios *in vitro*, descubrieron una clase de células madre que pueden dar lugar a células neuronales, mesenquimales, musculares y adipocitos, pero no a linajes hematopoyéticos. La cuestión del origen solo se puede responder con estudios de poblaciones clonales. Se ha informado de un estudio de este tipo, con el uso de técnicas de dilución limitante, e indica el origen clonal de muchos tipos de células no hematopoyéticas provenientes de células madre hematopoyéticas de médula (12).

30 Otro problema sin resolver es si el potencial hematopoyético demostrado en tejido no hematopoyético surgía de células madre de tejido no hematopoyético o de células madre hematopoyéticas, que coexistían en el tejido no hematopoyético. Los informes iniciales sobre células musculares que generan hematopoyesis implicaban que las células madre musculares eran responsables. Sin embargo, el reciente trabajo de Kawada y Ogawa (13) indica que estos informes iniciales simplemente demuestran la existencia de células madre hematopoyéticas, que se sabe que circulan en la sangre, dentro del tejido muscular. Ese estudio demuestra que después de la reconstitución de ratones irradiados con células de médula ósea marcadas genéticamente, todas las células del tejido muscular que tenían progenie hematopoyética reconstituida provenían del donante.

35 Las observaciones *in vivo* de plasticidad de células madre se han extendido a células humanas. Almeida-Porada y colaboradores (14), con el uso de un modelo de injerto de oveja fetal preinmunitario permisivo, han demostrado que las células cerebrales humanas fetales no purificadas (células de "neuroesfera") pueden dar lugar a células hematopoyéticas, hepáticas, renales e intestinales. Estos datos indican claramente que los diferentes tejidos albergan células con potencial de linaje para muchos otros tejidos, y que la médula es una fuente particularmente abundante estas células. Indican además la importancia capital de los microentornos específicos y sus señales de diferenciación asociadas. Desafortunadamente, no establecen aún si existe una auténtica plasticidad jerárquica o si coexisten varias células madre en diversos tejidos.

45 Evidentemente, este modelo puede funcionar para muchos otros tejidos, independientemente de si tienen un único tipo de células madre o varios. Cuando las células madre migran o se inyectan en un tejido, la diferenciación la determinaría el entorno local. Así, el tejido cardíaco podría albergar, al menos de forma temporal, todo tipo de células madres, pero solo se diferenciarían y producirían células cardíacas las células madre de tipo cardíaco. De forma alternativa, puede estar implicada una célula madre de potencial abierto y entonces el destino de su diferenciación se determinaría por señales inductoras suministradas por el entorno local.

50 Existe otra posibilidad curiosa, que es que la médula podría ser en realidad el tejido suministrador para todas las demás poblaciones de células madre locales. En esta situación, las células madre con potencial general circulan continuamente y estas células circulantes sería la fuente de células madre locales en el intestino, la piel, el hígado o el cerebro. Por tanto, la médula sería la fuente última de todas las células madre y suministraría al tejido células madre. Esto seguiría siendo coherente con el hecho de que haya una célula madre de médula con potencial plástico total o muchas células madre individuales con potenciales de linaje específico.

55 A pesar de los mecanismos de biología de células madre que se están estudiando, existe la necesidad de proporcionar una tecnología que permita la administración y la fijación de células madre a tejidos diana en particular.

Actualmente, sin embargo, todavía no se ha desarrollado adecuadamente esta tecnología.

Maletz et al en Int. J. Cancer 93, 409-146 (2001) describe anticuerpos monocatenarios biespecíficos como herramientas eficaces para eliminar células epiteliales cancerosas de preparaciones de células madre humanas redirigiendo la citotoxicidad celular. Broudy et al en los documentos US591991 1 y US2002/0018775A1 describen anticuerpos monoclonales frente a receptores de factores de células madre.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana para su uso en la administración y/o fijación de la célula madre al tejido diana en el sujeto.

La presente invención proporciona también un ácido nucleico que codifica un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula en un tejido diana.

La presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende el presente ácido nucleico y una célula huésped que comprende el presente vector de expresión.

La presente invención proporciona además un método de producción de un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, método que comprende (a) cultivar la presente célula huésped en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y (b) recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

La invención proporciona además una composición que comprende (a) un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en un tejido diana; y (b) una célula madre unida a la primera porción de unión a antígeno para su uso en la administración y/o la fijación de la célula madre a los tejidos diana en el sujeto.

Por último, la presente invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana e instrucciones para el uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal como se usa en la presente solicitud, excepto que se disponga expresamente lo contrario en el presente documento, cada uno de los términos siguientes tendrá el significado establecido a continuación.

"Administrar" significará administrar de una manera que se efectúa o realiza usando cualquiera de los diversos procedimientos y sistemas de administración conocidos por los expertos en la técnica. La administración se puede realizar, por ejemplo, por vía tópica, intravenosa, pericárdica, oral, a través de un implante, transmucosa, transdérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intratecal, intralinfática, intralesional o epidural. También se puede realizar la administración, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más periodos prolongados.

El término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos naturales (p. ej., IgG, IgM, IgE e IgA) como anticuerpos no naturales. El término "anticuerpo" incluye también anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de los mismos (p. ej., porciones de unión a antígeno). Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos sintéticos completos, anticuerpos humanos y humanizados y fragmentos de los mismos.

Las "células huésped" incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, células de levadura, células fúngicas, células de insecto y células de mamífero. Las células de mamífero se pueden transfectar por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como la precipitación en fosfato de calcio, la electroporación y la microinyección.

"Célula de mamífero" significará una célula de cualquier mamífero. Las células de mamífero incluyen, sin limitación, células sanas, anómalas y que están transformadas, y se ejemplifican por neuronas, células epiteliales, células musculares, células sanguíneas, células inmunitarias, células madre, osteocitos, células endoteliales y blastocitos.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "secuencia de ácidos nucleicos" se usan de manera intercambiable

en el presente documento y cada uno de ellos se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos y/o ribonucleótidos. Los desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos pueden ser naturales o análogos sintéticos de los mismos.

5 Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,8 %. Adicionalmente, estos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Son ejemplos de disolventes no acuosos el propilenglicol, el polietilenglicol, los aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y los ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones y suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios tamponados y solución salina. 10 Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento y cada uno de ellos significa un polímero de residuos de aminoácido. Los residuos de aminoácido pueden ser naturales o análogos químicos de los mismos. Los polipéptidos, péptidos y proteínas también pueden incluir modificaciones tales como glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, hidroxilación ADP-ribosilación.

20 "Se une específicamente" significará que, con respecto a la unión de un resto a la superficie de una célula, el resto se une a esa célula con una afinidad mayor que con la que se une a la superficie de la mayoría o todas las demás células.

En el modo de realización preferente, el resto se une a esa célula con una afinidad mayor que con la que se une a la superficie de todas las demás células.

25 "Célula madre" significará, sin limitación, una célula que da lugar a un linaje de células de progenie. Los ejemplos de células madre incluyen linfocitos CD34+ y linfocitos CD45+. Las moléculas de adhesión de superficie presentes en las células madre incluyen, sin limitación, el receptor de IL-3, el receptor de IL-6, el receptor de IL-11, c-kit, VLA-4, VLA-5, L-selectina, PECAM-1 e integrina beta-1.

"Sujeto" significará cualquier animal, tal como un mamífero o un ave, incluidos, sin limitación, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, un roedor tal como un ratón o una rata, un pavo, un pollo y un primate. En el modo de realización preferente, el sujeto es un ser humano.

30 "Tejido diana" significará cualquier tejido biológico al que se desea administrar y/o unir la célula madre. El tejido diana incluye, sin limitación, tejido sano, lesionado y enfermo.

"Vector" significará cualquier vector de ácido nucleico conocido en la técnica. Estos vectores incluyen, pero sin limitación, vectores plasmídicos, vectores cosmidicos y vectores bacteriófagos.

Modos de realización de la invención

35 La presente invención proporciona dos composiciones de interés. La primera composición de interés es para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana y comprende un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana.

40 La segunda composición de interés es para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana que comprende (a) un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana y (b) una célula madre unida a la primera porción de unión a antígeno, para su uso en la administración y/o la fijación de la célula madre a los tejidos diana en el sujeto. 45

Las porciones de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab.

Los anticuerpos biespecíficos pueden comprender una sola cadena polipeptídica que comprende el primer y el segundo resto. Además, las presentes composiciones pueden comprender una cadena polipeptídica producida de forma recombinante.

50 En las presentes combinaciones, la célula madre puede ser cualquier célula madre. En un modo de realización, la célula madre es de mamífero. Las células madre de mamífero incluyen, por ejemplo, células madre de una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, un roedor y un primate. Preferentemente, la célula madre es humana. Las células madre usadas en la presente invención incluyen también, a modo de ejemplo, linfocitos CD34+.

En las presentes composiciones, el tejido diana puede ser cualquier tejido diana adecuado, incluidos, por ejemplo,

- tejido hepático, piel, tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido articular, tejido óseo (que incluye, por ejemplo, la médula ósea y otras células hematopoyéticas), tejido muscular, tejido neuronal y tejido cardíaco. En un modo de realización, el tejido diana es tejido cardíaco. En otro modo de realización, el tejido diana es piel. El tejido cardíaco puede presentar anomalías e incluye, sin limitación, tejido miocárdico enfermo, tejido miocárdico lesionado, tejido valvular enfermo, tejido valvular lesionado, tejido cardiovascular enfermo y tejido cardiovascular lesionado. Del mismo modo, la piel puede presentar anomalías e incluye, sin limitación, piel enferma y lesionada. Además, las características bioquímicas del tejido diana reconocidas por los restos de unión al tejido diana de las presentes composiciones incluyen, a modo de ejemplo, miosina, troponina T cardíaca, troponina 1 cardíaca, actina, cadena pesada de la beta-miosina, tropomiosina o cualquier otra característica a la que se puedan dirigir estos restos.
- 5
- En otro modo de realización de las presentes composiciones, las composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
- La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a la superficie de una célula madre. En un modo de realización, el ácido nucleico es ADN o ARN y en otro modo de realización el ácido nucleico es ADN.
- 15
- El presente ácido nucleico puede ser un vector de expresión. En un modo de realización, el vector se selecciona de entre un plásmido, un cósmido, un bacteriófago y un virus eucariota. Los virus eucariotas incluyen, por ejemplo, adenovirus y retrovirus.
- La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende el presente vector de expresión.
- 20
- La presente invención proporciona además un método para producir un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, método que comprende (a) cultivar la presente célula huésped en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
- También se divulga un primer artículo de fabricación para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana por yuxtaposición del artículo al tejido diana, que comprende un sustrato sólido que tiene unida de forma funcional una composición de interés que comprende un resto que se une específicamente a la superficie de la célula madre.
- 25
- En un modo de realización preferente de la presente invención, el sustrato sólido es biodegradable. En otro modo de realización, el sustrato sólido comprende un polímero, tal como teflón. En otro modo de realización, el sustrato sólido comprende un agente seleccionado de entre fibrina, Vicryl, ácido hialurónico, polietilenglicol, poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-coglicólico), colágeno, trombospondina, teflón, osteopontina y fibronectina.
- 30
- El presente artículo puede estar en cualquier forma física adecuada, incluidas, por ejemplo, gasa, una venda, material de sutura, una endoprótesis, un implante o una matriz polimérica.
- Preferentemente, la composición de interés fijada al sustrato sólido comprende además un segundo resto que se une específicamente a la superficie de una célula del tejido. En un modo de realización, el resto es una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab. En otro modo de realización, la composición comprende un anticuerpo biespecífico. En un modo de realización adicional, la composición comprende una sola cadena polipeptídica que comprende el primer y el segundo resto. En otro modo de realización más, la composición comprende una cadena polipeptídica producida de forma recombinante.
- 35
- En el presente artículo, se pueden fijar el primer y el segundo resto por cualquier medio adecuado, tal como a través de un resto químico y a través de un resto polipeptídico.
- 40
- En el presente artículo, la célula madre puede ser cualquier célula madre. En un modo de realización, la célula madre es de mamífero. Las células madre de mamífero incluyen, por ejemplo, células madre de una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, un roedor y un primate. En otro modo de realización, la célula madre es de ave. Las células madre de ave incluyen, por ejemplo, células madre de pavo y de pollo. Preferentemente, la célula madre es humana.
- 45
- En el presente artículo, el tejido diana puede ser cualquier tejido diana adecuado, incluidos, por ejemplo, tejido hepático, piel, tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido articular, tejido óseo, tejido muscular, tejido neuronal y tejido cardíaco. En un modo de realización, el tejido diana es tejido cardíaco.
- También se divulga un segundo artículo de fabricación destinado a la fijación de células madre a la superficie del artículo, que comprende un sustrato sólido que tiene en su superficie un resto que está unido específicamente por una composición de interés que también se une específicamente a una célula madre.
- 50
- Los diversos modos de realización del primer artículo de fabricación, tal como la naturaleza y la forma física del sustrato, se contemplan, según sea aplicable, para el segundo artículo de fabricación.
- También se describen tres métodos para administrar y/o fijar una célula madre al tejido diana de un sujeto. El primer método comprende poner en contacto el tejido con la célula madre y una composición de interés que comprende un primer resto que se une específicamente a la superficie de la célula madre fijada de forma funcional a un segundo

resto que se une específicamente a la superficie de una célula del tejido.

En un modo de realización del primer método, la puesta en contacto se realiza *ex vivo*. En otro modo de realización, la puesta en contacto se realiza *in vivo*.

5 En otro modo de realización del primer método, en primer lugar se ponen en contacto entre sí la célula madre y la composición de interés para permitir la formación de un complejo entre ellas, y el complejo resultante se pone en contacto con el tejido diana. El complejo se puede poner en contacto con el tejido diana a través de cualquier medio adecuado, tal como por administración tópica o intravenosa.

10 En el primer método, el primer y el segundo resto pueden ser de cualquier tipo. En un modo de realización, el primer y el segundo resto son porciones de unión a antígeno de un anticuerpo. Las porciones de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab.

También en el primer método, la composición puede comprender un anticuerpo biespecífico. Por otro lado, esta composición puede comprender una sola cadena polipeptídica que comprende el primer y el segundo resto. Además, la composición puede comprender una cadena polipeptídica producida de forma recombinante.

15 En el primer método, el primer y el segundo resto se pueden fijar por cualquier medio adecuado. En un modo de realización, el primer y el segundo resto se fijan a través de un resto químico. En otro modo de realización, el primer y el segundo resto se fijan a través de un resto polipeptídico.

20 El segundo método para administrar y/o fijar una célula madre al tejido diana de un sujeto comprende, sin un orden en particular, las etapas de (a) yuxtaponer al tejido un artículo de fabricación que comprende un sustrato sólido que tiene unida de forma funcional una composición de interés que comprende un resto que se une específicamente a la superficie de la célula madre y (b) poner en contacto el artículo con la célula madre.

En un modo de realización del primer método, el artículo se pone en contacto con la célula madre a través de la administración intravenosa de la célula madre. En un modo de realización del segundo método, el artículo se pone en contacto con la célula madre a través de la administración tópica de la célula madre.

25 El tercer método para administrar y/o fijar una célula madre al tejido diana de un sujeto comprende yuxtaponer al tejido un artículo de fabricación que comprende (a) un sustrato sólido que tiene unida de forma funcional una composición de interés que comprende un resto que se une específicamente a la superficie de la célula madre y (b) la célula madre unida al artículo a través de la composición de interés unida al mismo.

En los presentes métodos, el artículo puede estar en cualquier forma física adecuada, incluidas, por ejemplo, gasa, una venda, material de sutura, una endoprótesis, un implante o una matriz polimérica.

30 Preferentemente, en los presentes métodos, la composición de interés fijada al sustrato sólido comprende además un segundo resto que se une específicamente a la superficie de una célula del tejido. En un modo de realización, el resto es una porción de unión a antígeno de un anticuerpo, tal como un fragmento Fab. En otro modo de realización, la composición comprende un anticuerpo biespecífico. En un modo de realización adicional, la composición comprende una sola cadena polipeptídica que comprende un primer y un segundo resto que se unen específicamente a la superficie de la célula madre y a la superficie de la célula del tejido, respectivamente. En otro modo de realización más, la composición comprende una cadena polipeptídica producida de forma recombinante.

35 En los presentes métodos, se pueden fijar el primer y el segundo resto por cualquier medio adecuado, tal como a través de un resto químico y a través de un resto polipeptídico.

40 En los presentes métodos el sujeto puede ser cualquier sujeto. Del mismo modo, la célula madre puede ser una célula madre de cualquier sujeto. En un modo de realización, el sujeto es un mamífero. Los mamíferos incluyen, por ejemplo, una vaca, un caballo, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, un roedor y un primate. En otro modo de realización, el sujeto es un ave. Las aves incluyen, por ejemplo, pavos y pollos. Preferentemente, el sujeto es humano y la célula madre es humana.

45 En los presentes métodos, el tejido diana puede ser cualquier tejido diana adecuado, incluidos, por ejemplo, tejido hepático, piel, tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido articular, tejido óseo, tejido muscular, tejido neuronal y tejido cardíaco. En un modo de realización, el tejido diana es tejido cardíaco.

50 Por último, la presente invención proporciona además un kit que comprende un anticuerpo biespecífico, instrucciones o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención e instrucciones de uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana.

La presente invención se entenderá mejor a partir de los ejemplos que figuran a continuación. No obstante, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los métodos y resultados analizados son meramente ilustrativos de la invención como se describe con más detalle en las reivindicaciones que los siguen.

Ejemplos**Ejemplo 1****Ejemplos de indicaciones terapéuticas para tratamiento con células madre****Estados de insuficiencia orgánica**

- 5 Trastornos cardíacos (p. ej., infarto de miocardio, valvulopatías, enfermedades hipertróficas/restrictivas, miocarditis y miocardiopatía); insuficiencia renal, aguda y crónica; insuficiencia hepática, aguda y crónica; insuficiencia pulmonar, aguda y crónica; EPOC y SDRA; y problemas de la piel tales como trastornos dermatológicos, úlceras diabéticas, quemaduras, lesiones por quimioterapia o radiación y lesiones epiteliales relacionadas con el cáncer.

Trastornos neurológicos

- 10 Alzheimer y otros trastornos degenerativos; lesiones estructurales en el cerebro o la médula espinal por apoplejías o traumatismos; neuropatías periféricas; y trastornos degenerativos (p. ej., esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig) y síndrome de Guillain-Barré).

Malignidades

Trastornos primarios de la médula ósea (p. ej., leucemia, síndrome mielodisplásico); y tumores sólidos.

- 15 **Enfermedades autoinmunitarias**

Lupus sistémico eritematoso, eccema, psoriasis y PTI.

Enfermedades de base genética

Anemia drepanocítica, talasemia, hemoglobinopatías y hemofilia.

Todas la enfermedades de células madre conocidas

- 20 Leucemia mielógena crónica; la mayoría de las leucemias agudas; policitemia rubra vera, trombocitosis primaria; mielofibrosis con metaplasia mielocítica, anemia aplásica; hemoglobinuria paroxística nocturna; la mayoría de los linfomas y el mieloma múltiple; muchas neutropenias crónicas; eritroblastopenia y anemia de Fanconi; y neutropenias cíclicas y síndrome de Shwachman-Diamond.

Ejemplo 2

- 25 **El potencial de las células madre que se originan en la médula ósea**

Introducción

- Se han descrito una serie de sistemas de células madre de tejidos. El sistema hematopoyético es quizá el que se ha caracterizado más ampliamente. Se cree que la célula madre hematopoyética es una célula con un amplio potencial proliferativo, de renovación y de diferenciación para linajes de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. De forma similar, también se ha demostrado que las células madre de las criptas intestinales, el hipocampo, la zona subventricular, la cresta neural y la conjuntiva del ojo producen los principales tipos celulares en sus órganos correspondientes. Se ha informado de sistemas de células madre peor caracterizados para el músculo y el hígado. Las células madre de la protuberancia de los folículos pilosos producen células epiteliales y células para la matriz y la vaina externa de la raíz, así como glándulas sebáceas productoras de lípidos. Las células madre epidérmicas de la piel se han caracterizado parcialmente por sus marcadores celulares de superficie, su tamaño y sus características de adhesión *in vitro*. Se han descrito poblaciones que mantienen la marca y se amplifican de forma transitoria. Recientemente se ha descrito el aislamiento de células madre de la piel por el uso de exclusión por tamaño y por tinción roja/azul de Hoechst. Esta técnica es una adaptación de un procedimiento bien caracterizado para aislar células madre hematopoyéticas. En un estudio reciente, también se han descrito células madre en la dermis de la piel.

- Recientemente, se ha apreciado que las células madre pueden mostrar una enorme plasticidad y que una célula madre de un tejido puede quedar comprometida a un destino diferente cuando se sitúa en un tejido diferente. Se han publicado después gran cantidad de informes que demuestran que las células musculares y hepáticas pueden convertirse en células sanguíneas, que las células adiposas se pueden diferenciar en linajes condrocíticos, miógenos y osteógenos y que las células de médula pueden producir una amplia variedad de tipos celulares. Ahora se ha demostrado que la médula es capaz de producir, *in vitro* e *in vivo*, células hepáticas, renales, pulmonares, gastrointestinales, neuronales, condrocitos, adipocitos, cardíacas y del músculo esquelético, así como óseas. Dos estudios particularmente impresionantes han demostrado que las células madre murinas altamente purificadas son capaces de producir células hepáticas o miocitos cardíacos y de invertir manifestaciones de enfermedades en estos órganos. Recientemente, Ogawa y colegas han publicado datos que indican que las células madre del músculo

esquelético, de las que se había informado que tenían potencial hematopoyético, podrían derivar originalmente de la médula.

Estos estudios plantean cuestiones importantes sobre el origen de muchas, o posiblemente todas las células madre de tejidos. Una posibilidad es que la médula pudiera ser este origen. Las células madre de la médula están presentes continuamente en la sangre periférica y se sabe que las células de la médula parecen tener la capacidad de generar muchos otros tipos de células cuando residen en un tejido específico. Las células de la médula pueden renovar continuamente las células madre de tejidos a lo largo de la vida de un animal. La renovación de células madre residentes puede ser necesaria para el mantenimiento de un órgano y para la reparación de las lesiones debidas a daños. Esto puede ser de especial importancia en órganos muy regenerativos, tales como el hígado o la piel, que son tejidos muy familiarizados con daños debidos a agresiones tóxicas o heridas. De hecho, se cree que las heridas son un mecanismo por el que la piel recluta células madre.

La incapacidad de las heridas crónicas de cicatrizar se puede deber en parte a la pérdida o el mal funcionamiento de las células madre residentes en la piel. Este concepto no requiere un gran acto de fe, ya que estudios recientes (datos no mostrados) han demostrado que las células derivadas de heridas crónicas presentan alteraciones en su capacidad de crecimiento y en su capacidad de respuesta frente a determinadas citocinas. Los fibroblastos dérmicos cultivados se muestran en senescencia, como se demuestra por la disminución de su capacidad de someterse a la duplicación de la población y por otros parámetros. En las extremidades inferiores de pacientes con arteriopatías y/o flebopatías avanzadas también se ha observado una disminución del número de folículos pilosos, que son el origen predominante de células madre epidérmicas en la piel en ese lugar del cuerpo. Esta reducción de los folículos representaría por tanto una pérdida de células madre residentes en la proximidad de las heridas crónicas.

Por lo general, se cree que la capacidad de llevar células jóvenes nuevas a la herida explica la eficacia de la piel bioartificial en el tratamiento de heridas crónicas. Un trabajo reciente (datos no mostrados) ha demostrado que la administración de células madre de médula ósea a heridas invierte la incapacidad de las heridas crónicas de cicatrizar y promueve la reconstrucción de las estructuras dérmicas.

Muchas de estas observaciones nuevas se han producido debido a la disponibilidad de marcadores específicos para rastrear poblaciones celulares y técnicas de marcaje para identificar la naturaleza de las células donantes en un ratón trasplantado. Por ejemplo, desde hace poco están disponibles marcadores para secuencias repetitivas del cromosoma Y, lo que permite rastrear células masculinas en huéspedes femeninos, especialmente en cepas que no muestran inmunorreactividad HY. En esos experimentos se usaron tanto transferencia de bandas de Southern como hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La disponibilidad de ratones transgénicos con marcadores específicos ha permitido un rápido avance en este campo. Los sistemas usados más comúnmente han sido los marcadores para la proteína verde fluorescente o para la expresión de la β -galactosidasa. En muchos estudios se han usado ratones ROSA transgénicos para la expresión de la β -galactosidasa, mientras que también se han usado una serie de transgénicos para GFP.

Resultados

En el pasado, se demostró que las células de la médula eran capaces de dar lugar a células óseas al infundirlas a concentraciones relativamente altas (más de 80 millones) en ratones huéspedes no sometidos a ablación. Se usaron morfología y FISH sobre secciones seriadas de médula. En este caso, las secciones de médula se prepararon de una única forma usando ratones anestesiados e infusión de paraformaldehído a baja presión a través de la aorta descendente.

Más recientemente, se evaluó un modelo para trasplantar células de médula transgénicas positivas para la proteína verde fluorescente (GFP) en huéspedes y evaluar la migración inmediata y el destino final de la célula en la piel y en otros tejidos. En estos estudios, se usaron ratones transgénicos GFP+ como donantes y ratones C57BL/6J (del mismo sexo) como huéspedes. Los ratones huésped fueron expuestos a 400 cGy de irradiación del cuerpo entero y después se les infundieron 25 millones de células de médula GFP+. En algunos experimentos CFDA-SE, también se usó una sonda fluorescente inespecífica citoplásmica para marcar las células de médula. Se mantuvieron las cohortes de ratones durante 3 meses y se evaluó el quimerismo de la sangre periférica a diferentes intervalos. Se alcanzó un quimerismo estable de entre el 70 % y el 80 %.

Tres meses después de la infusión de células de médula, se dividió a los ratones en 3 grupos. Un grupo no se trató más. A los otros dos grupos se les hicieron dos heridas por escisión (por ratón) en el lomo. Estos grupos con heridas se diferenciaban en que a un grupo se le dio G-CSF dos veces al día durante 4 días consecutivos antes de hacer las heridas y en el día en que se hicieron las heridas (un total de 5 días). El momento en que se hicieron las heridas se contó como día 0 para todos los grupos. En el día 2, se realizó una biopsia de piel en el lomo al grupo sin heridas y se recogió una de las heridas por escisión de los dos grupos con heridas para su análisis. En el día 21, se realizó una biopsia de piel en el lomo al grupo sin heridas y se recogieron las heridas por escisión restantes de los dos grupos con heridas para su análisis. Se evaluaron la presencia de células donantes en los tejidos y el fenotipo de las células donantes.

En la dermis de los ratones sin heridas trasplantados se observaron varias células GFP+ en ambos puntos

- temporales. Este descubrimiento respalda el concepto de que existe un tráfico constante de células de la médula ósea hasta la dermis. Las morfologías fusiformes y redondas de estas células podrían indicar que estas células pueden ser de naturaleza inflamatoria. Sin embargo, las secciones que las acompañaban teñidas con H-E no revelaron un infiltrado inflamatorio significativo. En su lugar, estas células parecían tener una morfología de tipo fibroblasto o de macrófago tisular. El número de células dérmicas GFP+ en ratones trasplantados sin heridas era significativamente mayor que la de las secciones preparadas a partir de la piel de ratones GFP+ donantes. Este descubrimiento podría ser un efecto secundario de la radiación a la que se expuso a los ratones trasplantados. El efecto de la radiación podría haber sido la reducción local del número de células progenitoras residentes. Esto puede haber dejado "espacio" para que las células de médula ósea repoblaran la zona.
- 5
- 10 En los ratones heridos en el día 2, se observó un infiltrado inflamatorio significativo en ambos grupos. En el grupo tratado con G-CSF, el infiltrado inflamatorio era mucho mayor que en el grupo no tratado con G-CSF. La cantidad de GFP presente en la herida debido al infiltrado y las células inflamatorias rotas obliteraron el campo de la herida con fluorescencia en muchos casos. La interpretación de estas secciones para el injerto de células fue difícil en ambos grupos heridos debido al alto nivel de señal presente.
- 15 En el día 21, se había resuelto la mayor parte de la cantidad de inflamación. No parecía existir una diferencia significativa en el número de células GFP+ en ambos grupos heridos. Se observaron varios vasos sanguíneos maduros (e inmaduros) GFP+ en la dermis de ambos grupos heridos. Se observaron células GFP+ en el músculo estriado de la dermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y la epidermis en ambos grupos heridos. Sin embargo, parecía que había más células GFP+ en la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas de los ratones tratados con G-CSF. También se demostró que las células GFP+ de los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y la epidermis doblaban la marca para los anticuerpos frente a la queratina y la GFP. Estos descubrimientos respaldan firmemente la idea de que la médula ósea pueden suministrar células madre y/o progenitoras necesarias a los tejidos cutáneos heridos.
- 20
- 25 Recientemente, se trataron úlceras crónicas de más de un año de duración con células autólogas derivadas de médula ósea. Los pacientes seleccionados habían fracasado en una serie de sofisticados tratamientos de cura de heridas en una clínica puntera en cura de heridas. Estos tratamientos anteriores incluían injertos autólogos de piel e injertos con piel bioartificial. Las biopsias obtenidas de estos pacientes indican que las células de médula ósea se injertaban en las heridas. Hasta el momento, todos los pacientes tratados con células de médula ósea están curados en la actualidad. Como se describe anteriormente, es bien sabido que las heridas crónicas tienen un entorno local modificado con pruebas de senescencia celular y eliminación de células madre y/o progenitoras residentes. El presente trabajo ilustra la relevancia de la médula ósea en la administración de células madre y/o progenitoras a las heridas.
- 30

Ejemplo 3

Migración y transdiferenciación de células madres en relación con el ciclo celular

35 Introducción

Estudios recientes han indicado que las células madre derivadas de la médula tienen la capacidad de migrar hacia y diferenciarse en tejidos no hematopoyéticos, produciendo células con linajes no hematopoyéticos típicos de ese tejido, es decir, la llamada transdiferenciación. En varios estudios, se demostró que las células madre murinas de médula altamente purificadas repueblan tejido hepático y cardíaco enfermo o dañado, respectivamente, y también se demostró que restablecen o mejoran la función en esos tejidos. Por tanto, las células madre de médula muestran una notable plasticidad con respecto a la producción de células no hematopoyéticas.

40

Otros han estudiado un tipo diferente de plasticidad de células madre de médula; la de los cambios en el injerto o el fenotipo de diferenciación de la célula madre relacionados con el ciclo celular. Estos estudios apuntaban a que cuando en células madre de médula purificadas se induce el recorrido del ciclo celular, modifican de forma reversible su perfil de proteínas de adhesión que, a su vez, afecta a la migración. Esta migración determina después los resultados del injerto medular.

45

Datos

La secuencia de acontecimientos descrita anteriormente se demostró cuando se cultivó médula con interleucina (IL)-3, IL-6, IL-11 y factor Steel. Se estudiaron células de médula en condiciones de cultivo estático de tejido estándar y en microgravedad simulada usando recipientes de cultivo de tejidos giratorios suministrados por la NASA. Estos estudios investigaron tanto el impacto del avance del ciclo inducido por el cóctel de citocinas IL-3, IL-6, IL-11 y el factor Steel o, de forma alternativa, por la trombopoyetina (TPO), el ligando de FLT-3 (FLT-3L) y el factor Steel en injertos y diferenciación de células de médula.

50

Los resultados de estos estudios fueron los siguientes. (1) El crecimiento en condiciones de microgravedad parece favorecer el soporte de células relativamente diferenciadas. (2) Se observaron cambios en el fenotipo de los injertos al inducir el recorrido del ciclo celular por citocinas en condiciones normales y de microgravedad. (3) Estos cambios en el fenotipo de los injertos eran reversibles y, en cada caso, parecían ligados al ciclo celular. (4) Se observaron

55

5 cambios en el fenotipo de diferenciación en puntos del ciclo celular diferentes de los cambios del fenotipo de los injertos y que también eran reversibles. Estas últimas observaciones son especialmente importantes, en cuanto que sugieren la presencia de "puntos calientes" de diferenciación en diferentes puntos del ciclo celular. En determinados puntos del ciclo celular, las células purificadas (linaje^{negativo (-)} Rodamina (Rho) ^{bajo}Hoechst (Ho) 33342^{bajo}) presentan el fenotipo de una célula madre primitiva, mientras que en otros momentos el fenotipo es el de una progenitora. Esto sugiere también que no existe una jerarquía de células madre/progenitoras, sino un espectro continuo fluctuante con cambios continuos y reversibles en el fenotipo ligados a la fase del ciclo celular.

Ejemplo 4

Dirección de células madre con anticuerpos biespecíficos a tejidos no hematopoyéticos

10 Antecedentes y resultados

Se pueden construir anticuerpos biespecíficos por técnicas de ingeniería genética o de conjugación química. En estudios recientes, se conjugaron químicamente anticuerpos biespecíficos que enlazan CDS y HER2/neu lo que una selectivamente linfocitos T con células tumorales que expresan HER2/neu. Se demostró que estos resultados de unión aumentaban significativamente las funciones citotóxicas de los linfocitos T contra células de cáncer de mama. El trabajo posterior en ingeniería molecular de anticuerpos biespecíficos ha demostrado que los linfocitos T armados con la proteína recombinante que contienen únicamente las porciones scFv de dos anticuerpos se pueden dirigir específicamente a las células tumorales y destruirlas.

20 Estudios recientes indican que las células madre de médula pueden dar lugar a una variedad de tipos de células en diferentes tejidos y corregir rápidamente la disfunción del tejido *in vivo*, y sugieren que dirigir células madre de médula a tejidos en particular podría aumentar la eficacia de la transdiferenciación de origen medular en estos tejidos.

Proyecto 1

El propósito de este proyecto es producir un anticuerpo monoclonal biespecífico (AcBs), anti-VCAM-1 x anti-c-Kit (llamado VK-Bi), que dirigirá células madre de médula a la piel.

25 Se crean anticuerpos biespecíficos que enlazan células madre linfematopoyéticas murinas primitivas (población lateral Lin^{Rho}^{bajo}Ho^{bajo}, Lin-Sca-1+ o Lin-Hoechst) a células de la piel que expresan los siguientes ligandos de daños; VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, IL-8 o P63. Se ha seleccionado C-kit para el epítipo de la célula madre porque en estudios recientes, se demostró que tiene presencia universal en células madre hematopoyéticas de médula murinas Lin^{Rho}^{bajo}Ho^{bajo} y Ho^{bajo} y Lin-Sca+ y porque lo han usado una serie de investigadores para aislar células madre migradas e injertadas, es decir, la unión del anticuerpo a c-kit no parece interferir con la migración y el injerto de la célula madre. Por tanto, el primer anticuerpo biespecífico que se prepara, caracteriza y valida como reactivo es un heteroconjugado que se une en un extremo a c-kit y en el otro extremo a VCAM-1.

35 Estos dos anticuerpos se conjugan por medio de dos reactivos, Traut y SMCC. El procedimiento de producción de AcBs está bien establecido. Esta reacción de heteroconjugación incluye dos etapas: (1) se entrecruza el anti-c-Kit con un exceso molar de 10 veces de reactivo Traut (2-iminotiolano HCl, Pierce) y (2) anti-VCAM-1 con un exceso molar de 4 veces de SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo, Pierce). El tampón Traut contiene NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, a pH 8,0 y el tampón SMCC, fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M a pH 7,2. La reacción de entrecruzamiento se produce a temperatura ambiente durante una hora. El anticuerpo entrecruzado se purifica después en una columna PD-10 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en PBS para eliminar el agente de entrecruzado no unido. En la segunda etapa, se mezclan los anticuerpos entrecruzados de inmediato en una proporción molar igual y se conjugan a 4 °C durante la noche en un agitador. También se crean anticuerpos biespecíficos de control para evaluar la especificidad de la unión. En este caso, se usan anti-c-kit y anti-anticuerpos no pertinentes, p. ej., anti-CD2.

45 Los productos de la heteroconjugación se confirman mediante geles de SDS PAGE no reductores. Se comprueban las especificidades del producto de anticuerpo biespecífico mediante estudios de la capacidad del anticuerpo biespecífico de unir células madre a células que expresan VCAM-1.

50 Las preparaciones no fraccionadas de anti-c-Kit x anti-VCAM-1 contienen monómeros, dímeros y multímeros. Solo del 20-30 % de los productos de la heteroconjugación están en forma de dímero. Se evalúa la mezcla de anticuerpos total, que incluyen los multímeros, dímeros y monómeros. Esta mezcla se ha usado de forma eficaz en los estudios de anticuerpo biespecífico OKT3/HER2/neu mencionados anteriormente. También se evalúa la eficacia de las fracciones de dímero/multímero purificadas por cromatografía por tamaño. Evidentemente, esto da un reactivo caracterizado más purificado, pero a costa de una pérdida significativa de anticuerpo (aproximadamente el 80-90 % basado en la experiencia previa). Este reactivo debería ser lo suficientemente puro. El aislamiento del dímero sin multímero se puede lograr con el uso de cromatografía de intercambio iónico, pero esto supondría una pérdida significativa adicional de anticuerpo. Puede que la observación clave en este caso sea que la preparación original de anticuerpo biespecífico frente a OKT3/HER2/neu, que tenía multímeros, dímeros y monómeros, une de forma eficaz linfocitos T a células de líneas celulares de cáncer de mama. Además, en estudios en los que separaron los

multímeros, los dímeros y los monómeros, se descubrió actividad en las fracciones de dímeros y multímeros.

Proyecto 2

El propósito de este proyecto es evaluar la función de anti-c-Kit x anti-VCAM-1 *in vitro* usando líneas celulares de piel y biopsias de tejidos de la piel, y usando el modelo de ratón *in vivo*.

5 Específicamente, este trabajo pretende determinar si un anticuerpo biespecífico se une a c-kit en poblaciones laterales purificadas Lin⁻Rho^{bajo}Ho^{bajo} o Lin-Sca+ o Lin-Hoechst de células madre de médula de ratones macho BALB/c o ROSA positivos para beta-galactosidasa, y si media la unión incrementada de las células madre a células epiteliales que expresan los ligandos de daños VCAM-1, ICAM-1, P63, E-selectina e IL-8.

10 Se evalúa la unión del anticuerpo biespecífico anti-c-kit x anti-VCAM-1 a diferentes células de la piel y a poblaciones c-kit+ de diferente origen. En estudios *in vitro*, se cuantifican los anticuerpos biespecíficos en células VCAM-1+ de piel dañada (que no expresan c-kit) y a células madre c-kit+ (que no expresan VCAM-1). Como control se usa un anticuerpo biespecífico no pertinente.

15 Se realiza un seguimiento de la migración *in vivo* de células c-kit marcadas con el tinte fluorescente inespecífico, CFDA-SE y con anticuerpo biespecífico unido a piel sana, sometida a biopsia o irradiada localmente. Estos estudios incluyen la migración, el posterior destino de la célula y la determinación de la transdiferenciación.

20 Con el uso de modelos animales de trasplante establecidos, se determina si el anticuerpo biespecífico puede aumentar el proceso de migración de las células madre y potenciar la diferenciación en el entorno objetivo (la piel dañada). En resumen, se usan ratones ROSA positivos para beta-galactosidasa como donantes de células madre de médula y se usan ratones C57BL/6J (mismo sexo) como huéspedes. Para los estudios de migración, se usa el tinte citoplásmico CFDA-SE en secciones de tejido y se enumeran los acontecimientos fluorescentes.

25 Con el fin de seguir el destino de las células y la posible "transdiferenciación", se emplean las marcas celulares intrínsecas e invariables de ADN masculino (el modelo de trasplante de médula de macho a hembra BALB/c) o beta-galactosidasa (el modelo de trasplante de médula de ROSA a C57BL/6J). Este enfoque es necesario, porque la marca fluorescente CFDA-SE se perderá al continuar la proliferación. En estos estudios, se llevan a cabo estudios de marcaje doble. Para el ADN masculino, la presencia de ADN del cromosoma Y se determina en primer lugar usando FISH para la secuencia masculina. Estas preparaciones se fotografían y después se tiñen de nuevo para marcadores específicos de tipo celular, principalmente citoqueratinas. Estas preparaciones también se fotografían y se emparejan las fotos para determinar el marcaje doble. Con el sistema de la beta-galactosidasa, se invierte la secuencia, en primer lugar se determina la tinción del anticuerpo y después la presencia de beta-galactosidasa por tinción con x-gal o por tinción de anticuerpos anti-beta-galactosidasa.

35 Estos estudios permiten determinar la capacidad de las células madre murinas de origen medular con anticuerpo biespecífico unido de migrar hacia la piel y producir después células epiteliales u otras asociadas con la piel. En estos estudios, también se determinan la migración y el destino de las células cuando las células madre no se tratan o se unen a un anticuerpo biespecífico no pertinente. La migración y el destino de las células se determinan en ratones sanos o en ratones a los que se les ha hecho una herida en la piel o sometidos a irradiación local de la piel (500-2000 cGy). Estos daños se producirán de un día a dos semanas antes de la infusión de las células.

Ejemplo 5

Modelo de daño cardíaco

Proyecto 1

40 Se estableció un modelo de ligadura miocárdica en ratones y se usó para estudiar la reparación del daño tisular. Se sometió a animales C57BL/6 a una ligadura de la arteria coronaria seguida de la inyección de 40×10^6 células de médula ósea 24, 48 y 72 horas después del daño. Se evaluó a los animales para determinar la transdiferenciación de células GFP+ en secciones de corazón en diferentes puntos temporales después del daño (hasta un mes). No había pruebas de células miocárdicas GFP+. En un conjunto de experimentos diferente, se expuso a animales 45 C57BL/6 a 500 cGy, seguido de la infusión de 25 millones de células de médula ósea provenientes de ratones transgénicos para GFP. Dos meses después, se ligaron las arterias coronarias anteriores y, después de cuatro días, se inyectó a los animales G-CSF para movilizar sus células madre de médula ósea. Los datos muestran que en los animales movilizados, se pueden identificar células miocárdicas GFP+ (datos no mostrados).

Proyecto 2

50 Se realizaron estudios para ver si armar las células de médula con anticuerpo biespecífico anti-c-kit x anti-VCAM1 ayuda a dirigir las células de médula hacia un corazón dañado y para determinar qué población celular c-kit+ sería la población apropiada para la migración cardíaca. Estos estudios compararon el comportamiento de migración de células Lin- y células Lin-Sca+ armadas con control y anticuerpo biespecífico.

En estudios que usan células Lin-Sca+ purificadas (250.000 células inyectadas), no había diferencias entre el control

y el anticuerpo biespecífico 14 horas después de la infusión. Sin embargo, al usar células Lin- (450.000 células inyectadas), se observó un aumento significativo de la migración de células de médula armadas con anti-c-kit x anti-VCAMI al corazón dañado (datos no mostrados).

5 Esto ilustra que en una población de células de médula parcialmente purificadas en un momento específico después de la infusión se potencia su dirección hacia el corazón dañado al armar la célula de médula con un anticuerpo biespecífico anti-c-kit x anti-VCAMI.

Proyecto 3

10 Se realizaron estudios para determinar si las células Lin- Sca+ purificadas armadas con anticuerpo biespecífico anti-c-kit x anti-VCAMI se mantendrían después de las inyecciones intramiocárdicas directas o migrarían hacia miocardio dañado tras la inyección intravenosa en ratones C57BL/6 después de una intervención quirúrgica por infarto de miocardio. Se anestesió a dos ratones con inyecciones intraperitoneales de ketamina y xilazina, se intubaron y se les aplicó ventilación mecánica usando un respirador para roedores de Harvard. Se realizó una esternotomía media y se usó un hilo de sutura recubierto de 7-0 Ticron para atar y ocluir la parte apical de la arteria descendente anterior izquierda (DAI). Se cerraron el esternón y la piel con suturas interrumpidas. Se dejó que los ratones se recuperaran durante 3 días. Al tercer día, con anestesia de isoflurano, a los ratones se les realizaron cortes hacia abajo en la vena yugular interna derecha (i.y.). Un ratón recibió 200.000 células Lin-Sca+ purificadas armadas con 500 ng de anti-c-kit x anti-VCAM-1/millón de células y el segundo ratón recibió 200.000 células Lin-Sca+ purificadas sin armar. Antes de la inyección i.y. se marcaron tanto las células Lin-Sca+ armadas como las no armadas con CFDA-SE.

20 Se sometió a otros dos ratones a la misma intervención quirúrgica por infarto descrita anteriormente. Uno de los últimos dos ratones recibió una inyección intramiocárdica directa de 200.000 células Lin-Sca+ marcadas con CSFDA-SE armadas con anti-c-kit x anti-VCAM1 y uno recibió una inyección intramiocárdica directa de 200.000 células Lin-Sca+ marcadas con CSFDA-SE no armadas. Los cuatro ratones fueron sacrificados 6 días después de provocarles los infartos y se les extirparon los corazones, se lavaron en solución salina, se congelaron en OCT y se crioseccionaron, se montaron en portaobjetos Superfrost plus y se observaron con microscopía de fluorescencia.

25 En la inyección directa de células Lin-Sca+ armadas, los resultados muestran un aumento del número de células fluorescentes en el sitio de inyección en la zona del infarto con respecto al fondo de auto-fluorescencia a gran aumento (datos no mostrados). En el ratón que recibió células Lin- Sca+ marcadas con CSFDA-SE armadas a través de una inyección i.y., se observó una fluorescencia claramente potenciada con un aumento del número de células en la zona del infarto que se concentraba en las capas del endocardio que se extienden hacia capas del epicardio (datos no mostrados). En contraste, había mucha menos fluorescencia en la zona del infarto en el ratón que recibió células Lin-Sca+ marcadas con CSFDA-SE no armadas a través de una inyección i.y.

30 Esto demuestra que las células Lin-Sca+ armadas inyectadas a través de la vena yugular interna pueden migrar hacia el miocardio dañado, mientras que las Lin-Sca+ no armadas no migran hacia el miocardio dañado.

Proyecto 4

35 Se realizaron estudios usando linfocitos T humanos armados con OKT3 (anti-CD3 humana) x anti-ICAM1 de rata para confirmar el tráfico mediado por el anticuerpo director. Esto fue una prueba del principio del experimento que obviaba la necesidad de purificar y clasificar grandes cantidades de células madre Lin-Sca+ purificadas a partir de la médula ósea de treinta ratones. Solo se pueden obtener 1-2 millones de células Lin-Sca+ a partir de un procedimiento de purificación de un día de duración. Por otro lado, se pueden obtener grandes cantidades de linfocitos T anti-CD3 homogéneos activados cultivados en dosis bajas de IL-2 y usarse como "marcadores" vivos de la migración al tejido diana que se pueden identificar fácilmente por tinción de los linfocitos T usando fluorocromo CY3.

45 El propósito de este proyecto es doble: (1) averiguar si armar las células con anticuerpos específicos de diana ayuda a administrar células al órgano diana por inyección intravenosa y (2) ver si armar las células con anticuerpos específicos de diana conduce a una mayor retención de las células después de la inyección directa en el órgano diana.

50 Para este estudio se usaron cuatro grupos de ratas atómicas que sufrieron un infarto de 17 minutos seguido de reperfusión 1 día antes de la inyección de las células. El infarto se provocó por la ligadura temporal de la porción descendente anterior izquierda (DAI) de la arteria coronaria izquierda. Después de 17 minutos, se detuvo la ligadura para permitir la reperfusión. Se inyectó a los animales como sigue: (1) inyección i.y. de linfocitos T humanos activados armados con anticuerpo biespecífico de ratón anti-ICAM1 de rata x ratón anti-OKT3 humano; (2) inyección i.y. de linfocitos T humanos activados armados con anticuerpo biespecífico de hámster anti-ICAM1 de ratón x ratón anti-OKT3 humano (control); (3) inyección miocárdica directa de linfocitos T humanos activados armados con anticuerpo biespecífico de ratón anti-ICAM1 de rata x ratón anti-OKT3 humano; y (4) inyección miocárdica directa de linfocitos T humanos activados armados con anticuerpo biespecífico de hámster anti-ICAM1 de ratón x ratón anti-OKT3 humano (control). Después, los animales fueron sacrificados 1 día más tarde. Se crioseccionaron muestras recién congeladas de sus ventrículos y después se tiñeron con anticuerpos inmunofluorescentes anti-IgG de ratón conjugados con Cy3 para marcar las células armadas con anticuerpos derivados de ratón.

5 Había una notable diferencia entre los dos grupos de inyecciones i.y. El grupo experimental (linfocitos T humanos activados armados con anticuerpo biespecífico de ratón anti-ICAM1 de rata x ratón anti-OKT3 humano) mostró un aumento significativo de la inmunofluorescencia y la celularidad con relación al grupo de control (datos no mostrados). Estos descubrimientos demuestran que armar las células con anticuerpos específicos de diana ayuda notablemente al aumento de la administración i.y. de las células armadas al órgano diana. Sin embargo, a diferencia de las inyecciones i.y., armar las células con anticuerpos específicos de diana no conduce a una mayor retención de células armadas después de las inyecciones miocárdicas directas (datos no mostrados).

Referencias

10 1. Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L., Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999, 283:534-537.

2. Valtz N.L., Hayes T.E., Norregaard T., Liu S.M., McKay R.D., An embryonic origin for medulloblastoma. *New Biologist* 1991, 3:364-71.

3. Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A., Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 19 99, 96:14482-14486.

15 4. Ferrari G., Cusella-DeAngelis G., Coletta M., et al., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998, 279:1528-1530.

5. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., et al., Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999, 401:390-394.

20 6. Wakitani S., Saito T., Caplan A., Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995, 18:1417-1426.

7. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., et al., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999, 284:1168-1170.

8. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., et al., Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000, 6:1229-1234.

25 9. Theise N.D., Badve S., Saxena R., et al., Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloblastosis. *Hepatology* 2000, 31:235-240.

10.Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., et al., Transplanted hematopoietic stem cells repair myocardial infarcts [resumen]. *Blood* 2000, 96:221a.

11.Orlic D., Hematopoietic cells Regenerate Infarcted Myocardium. *Exp Hematol* 2001 (Suppl) 29:4.

30 12.Krause D.S., Theise N.D., Collector M., Henegariu O, Hwang S., Gardner R., Neutzel S., Sharkis S.J., Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem. *Cell* 2001, 105:369-377.

13.Kawada, H. y Ogawa, M., Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001, 98:2008-2013.

35 14.Almeida-Porada G., Crapnell K., Porada C., et al., Transplantation of human neuronal stem cells into fetal sheep give rise to hematopoietic cells in vivo [resumen]. *Blood* 1999, 94:129a.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre; y
- 5 una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana.
para su uso en un método de tratamiento en la administración y/o fijación de la célula madre, que no es una célula madre embrionaria humana, al tejido diana en un sujeto.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, que es una sola cadena polipeptídica.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión a antígeno comprende un fragmento Fab.
- 15 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de la superficie de la célula madre se selecciona del grupo que consiste en CD34, CD45, receptor de IL-3, receptor de IL-6, receptor de IL-11, c-kit, VLA-4, VLA-5, L-selectina, PECAM-1, Sca-1 e integrina beta-1.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el primer y el segundo resto se fijan por un resto químico.
- 20 7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de la superficie de la célula del tejido diana se selecciona del grupo que consiste en miosina, troponina T cardíaca, troponina 1 cardíaca, actina, cadena pesada de la beta-miosina y tropomiosina.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antígeno de la superficie de la célula del tejido diana se selecciona del grupo que consiste en VCAM-1, ICAM-1, P-selectina, IL-8 y P63.
- 25 9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tejido diana se selecciona del grupo que consiste en tejido hepático, piel, tejido epitelial, tejido conjuntivo, tejido articular, tejido óseo, tejido muscular, tejido neuronal, tejido endotelial y tejido cardíaco.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9, en el que el tejido óseo es médula ósea.
- 30 11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un ser humano.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la primera porción de unión a antígeno se une específicamente a CD45 y la segunda porción de unión a antígeno se une específicamente a miosina.
- 35 13. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.
- 40 16. Un método de producción de un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 15 en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y (b) recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
17. Una composición que comprende:
 - (a) un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una primera porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula madre y una segunda porción de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno en la superficie de una célula de un tejido diana; y
 - 45 (b) una célula madre unida a la primera porción de unión a antígeno, para su uso en un método de tratamiento en la administración y/o fijación de la célula madre, que no es una célula madre embrionaria humana, al tejido diana en un sujeto.

18. Un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 e instrucciones de uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para administrar y/o fijar una célula madre a un tejido diana.