

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 791**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2007 E 07795647 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2035549**

54 Título: **Células madre mesenquimales positivas para ABCB5 como moduladoras de inmunidad**

30 Prioridad:

**31.05.2006 US 809407 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2014**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION  
(100.0%)  
300 LONGWOOD AVENUE  
BOSTON, MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**FRANK, MARKUS H.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 511 791 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Células madre mesenquimales positivas para ABCB5 como moduladoras de inmunidad

Campo del invento

5 La presente solicitud describe unas células madre mesenquimales moduladoras de inmunidad que son positivas para ABCB5 y a su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada inmunológicamente.

Antecedentes del invento

10 Las estrategias moduladoras de inmunidad basadas en células madre constituyen una nueva frontera terapéutica en un alotrasplante clínico (Frank y colaboradores Lancet 363:1411 (2004)). Se ha encontrado, por ejemplo, que unas células madre mesenquimales que se derivan de la médula ósea de un adulto (BM-MSC, acrónimo de bone marrow derived mesenchymal stem cells) pueden inhibir *in vitro* la proliferación de células T como respuesta a mitógenos y a aloantígenos (Le Blanc y colaboradores Scand. J. Immunol. 57:11 (2003); Rasmusson y colaboradores Exp. Cell Res. 305:33 (2005)). A causa de su fácil accesibilidad, la piel es una fuente potencial particularmente atractiva de unas células madre que son útiles terapéuticamente. Sin embargo, la identificación de unos marcadores moleculares para el aislamiento y la expansión de células madre dérmicas puras es un importante problema, y son ampliamente desconocidos los efectos biológicos que son específicos para estas células.

15 Recientemente, se clonó una nueva glicoproteína P ABCB5 transportadora con una casete de fijación de ATP (ABC, acrónimo de ATP-binding cassette) humana, y se ha sugerido que esta proteína puede servir como una marcadora para el aislamiento de una subpoblación de células madre (Frank y colaboradores J. Biol. Chem. 278:47156 (2003); Frank y colaboradores Cancer Res. 65:4320 (2005); documento de patente de los EE.UU. US 6,346,833).

20 Sumario del invento

25 El presente invento está basado en parte en el descubrimiento de que unas células madre mesenquimales dérmicas que expresan la ABCB5 tienen unas propiedades moduladoras de inmunidad y pueden ser útiles para el tratamiento de unas enfermedades mediadas inmunológicamente. La proteína ABCB5 es expresada sobre la superficie de unas células madre y se puede usar tanto en su identificación, p.ej. usando una inmunofluorescencia, y una purificación, p.ej. usando unos anticuerpos inmovilizados sobre un substrato inerte.

En un primer aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 1)

En un segundo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 4)

En un tercer aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 5)

En un cuarto aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 6)

30 En un quinto aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 11)

En un sexto aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 12)

En un séptimo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 13)

En un octavo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 14)

En un noveno aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 15)

35 En un décimo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 16)

En un undécimo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 17)

En un duodécimo aspecto del invento se proporciona (introducir el texto de la reivindicación 19)

40 Se describen en la presente memoria varios métodos de administrar a un individuo una composición para el tratamiento de una condición particular. Ha de entenderse que esto incluye específicamente, también, la composición destinada a su uso en el tratamiento de esa condición particular, así como el uso de la composición para la producción de un medicamento destinado al tratamiento de esa condición particular.

Otras ventajas y nuevas particularidades del presente invento resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de diversas formas de realización del invento no limitativas, cuando ésta se considere en conjunción con las figuras anejas.

5 Este invento no está limitado en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de componentes que se exponen en la siguiente descripción o se ilustran en los dibujos. El invento es capaz de otras formas de realización y de ser practicado o de ser llevado a cabo de diversas maneras. También la fraseología y la terminología que aquí se utilizan se presentan con una finalidad de descripción y no deberán ser consideradas como limitativas. Se entiende que el uso de los términos “que incluye”, “que comprende” o “que tiene”, “que contiene”, “que implica” y de unas variaciones de estas palabras en el presente texto abarca los detalles enumerados después de  
10 esto y los equivalentes de los mismos así como unos detalles adicionales.

Breve descripción de los dibujos

No se pretende que los dibujos adjuntos estén dibujados a escala. En estos dibujos, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en diversas figuras es representado por número similar. Para unas finalidades de claridad, cualquiera de los componentes puede ser marcado en cada uno de los dibujos. En estos dibujos:

15 **Figura 1.** Unos gráficos que representan unos análisis por citometría de flujo en un único color de la expresión de ABCB5 en la superficie de unos cultivos derivados de una piel de Balb/c murino en subcultivos tempranos (A) y después de > 40 subcultivos (B), línea de color gris claro ABCB5; sombreada: testigo de isotipo; línea de color negro oscuro: no teñida

20 **Figura 2.** Un gráfico de barras que representa la pauta de expresión de unos marcadores de MSC en unas MSC dérmicas no separadas (barras macizas) frente a la de unas MSC dérmicas ABCB5<sup>-</sup> (barras punteadas) o ABCB5<sup>+</sup> (barras rayadas), determinada por una citometría de flujo de doble color.

25 **Figura 3.** Unos gráficos de Kaplan-Meier que representan la supervivencia de un injerto en (A) unos recipientes B6 de corazones de donantes Balb/c, tratados con unas MSC que se derivan de los donantes, y (B) con y sin un bloqueo concurrente de CD40L, usando el mAAb (anticuerpo monoclonal) anti-CD40L, MR1. (C) unos gráficos de Kaplan-Meier que representan la supervivencia de un injerto en unos recipientes B6 de corazones de donantes C3H, tratados con unas MSC que se derivan de una tercera parte, y en (D) recipientes Balb/c de corazones de donantes B6, tratados con unas MSC que se derivan de los recipientes. Las diferencias estadísticas, tal como se indican por unos valores de P para cada combinación de raza, se averiguaron usando el ensayo de log-rango.

30 **Figura 4.** Unas representaciones gráficas de puntos que describen unos análisis por citometría de flujo en doble color de unos cultivos derivados de una piel murina de Balb/c para la expresión de ABCB5 (FITC, fluorescencia FL1) y para los marcadores PD-1, PD-L1, PD-L2 (PE, fluorescencia FL2). Unas células ABCB5<sup>+</sup> que expresan concomitantemente los respectivos marcadores de superficie son halladas en el cuadrante derecho superior de cada representación gráfica de fluorescencia.

35 **Figura 5.** Unos gráficos de barras que representan la expresión in vivo de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup> de recipientes plenamente mal emparejados a los 7 días después de un alotrasplante de  $3 \times 10^6$  MSC, que es determinada por una citometría de flujo. Los testigos no tratados (en barras macizas), los con tratamiento con MSC (en barras punteadas), los con tratamiento con esplenocitos (en barras rayadas); NS: no significativos; El o los valor(es) de P indican unos cambios estadísticamente significativos.

40 **Figura 6.** Un gráfico de barras que representa la expresión de CD40 (% de positividad, media  $\pm$  SEM) (SEM es el acrónimo de Standard Error of the Mean = error típico de la media) determinado por una citometría de flujo en doble color en unos subconjuntos de esplenocitos APC CD11c<sup>+</sup> que se derivan de los bazos o bien de unos animales tratados con MSC (a los 7 días después de una inyección i.v. (intravenosa) de  $3 \times 10^6$  MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup>) (barra de color gris, marcada con TRATAMIENTO CON MSC) o de unos animales testigos no tratados (barra de color negro, marcada con SIN TRATAMIENTO). **B** y **C.** Unos gráficos que representan la absorción de <sup>3</sup>H-timidina de unas células T purificadas procedentes de ratones C57BL6 o bien tratados con MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> (a los 7 días después de una inyección i.v. de  $3 \times 10^6$  MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup>) o no tratados, después de una aloestimulación durante 120 horas en unas típicas reacciones con linfocitos mezclados (MLR) en una vía, con esplenocitos de Balb/c  
45 (**B**) o de C3H/HeJ (**C**) ingenuos irradiados (con 1.750 rad). Se ilustran los valores de la media  $\pm$  SEM representados gráficamente en función de unas relaciones crecientes de estimuladores a respondedores. **D.** Un gráfico de barras que representa la absorción de <sup>3</sup>H-timidina por células T que se derivan de los bazos de unos ratones C57BL6 o bien tratados con MSC (a los 7 días después de una inyección i.v. de  $3 \times 10^6$  MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup>) (barra de color gris, marcada con TRATAMIENTO CON MSC) o no tratados (barra de color negro, marcada con SIN TRATAMIENTO). Después de una estimulación con mitógenos (ConA) durante 72 horas, se ilustran los valores de la media  $\pm$  SEM.  
50

## Descripción detallada

La presente solicitud está basada en parte en el desarrollo de unos métodos para aislar una subpoblación de células madre mesenquimales dérmicas, los cuales están caracterizados por la expresión de la glicoproteína P ABCB5 en la superficie de sus células y por la expresión del regulador de inmunidad PD-1. Se ha encontrado que unas células madres mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> prolongan marcadamente *in vivo* la supervivencia de unos aloinjertos cardíacos murinos heterotópicos, y, con un concurrente bloqueo de la ruta concomitantemente estimuladora positiva CD40-CD40L, inducen la supervivencia de los aloinjertos a largo plazo. El mecanismo exacto que es responsable de la reducción del rechazo inmunitario de órganos trasplantados no ha sido determinado con certidumbre, pero parece ser que las células madre dérmicas expresan el PD-1, que es un factor del que se cree que inhibe la activación de linfocitos T. Los resultados obtenidos sugieren que unas células madre mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> son más eficaces como moduladoras *in vivo* del rechazo de aloinjertos que unas células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSC, acrónimo de bone marrow-mesenchymal stem cells) de las que se ha mostrado hasta la fecha que inducen solamente una prolongación modesta de la supervivencia de aloinjertos (Bartholomew y colaboradores, Exp. Hematol. 30:42 (2002)). Sin embargo, las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser por lo demás comparables con las BM-MSC en el hecho de que ellas despliegan una similar capacidad de diferenciación y muestran un perfil casi idéntico con respecto a otros marcadores de superficie (Fernandes y colaboradores, Nat. Cell Biol. 6:1082 (2004); Shih, y colaboradores, Stem Cells 23:1012 (2005)). La promesa potencial de unas células madres mesenquimales dérmicas clonales para su uso en estrategias terapéuticas moduladoras de inmunidad que se basan en células, en un alotrasplante y en las otras enfermedades que aquí se describen, es subrayada por la ventaja adicional de una fácil accesibilidad de la piel como una fuente de tejido para el aislamiento de células madre. Las células madre mesenquimales dérmicas que aquí se describen son aisladas y expandidas con facilidad. Unas células madre mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> pueden ser purificadas, clonadas, propagadas y expandidas entre unos cultivos diferenciadores que se derivan por clonación, para un número de pasadas mayor que 50.

Una activación de células T dependiente de un antígeno requiere dos señales distintas: al encuentro con un antígeno, unas células T ingenuas reciben una señal 1 por medio de un compromiso de un receptor de células T con el complejo de péptido antigénico MHC-plus, y una señal 2 a través de unas rutas concomitantemente estimuladoras positivas que conducen a una plena activación. Unas señales concomitantemente estimuladoras de células T negativas, en la otra banda, funcionan para regular en sentido descendente las respuestas inmunitarias (Rothstein y colaboradores, Immunol. Rev. 196:85 (2003)). Ya se ha mostrado que el PD-1, que es un constituyente de la nueva ruta concomitantemente estimuladora negativa PD-1-(PD-L1/PD-L2) (Carter y colaboradores, Eur. J. Immunol. 32:634 (2002); Freeman y colaboradores, J. Exp. Med. 192:1027 (2000); Ito y colaboradores, J. Immunol. 174:6648 (2005)), es expresado en unas BM-MSC e inhibe la activación *in vitro* de linfocitos (Augello y colaboradores, Eur. J. Immunol. 35:1482 (2005)). Aunque no se está restringido a ninguna teoría particular, se cree que unas células madres mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> pueden funcionar similarmente para regular en sentido descendente *in vivo* unas respuestas aloinmunitarias a través de una señalización concomitantemente estimuladora negativa mediada por PD1-(PD-L1/PD-L2) y que unas células madre mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> aloinjertadas pueden por lo tanto sinergizarse con un bloqueo concomitantemente estimulador de CD40-CD40L para suprimir en mayor grado un rechazo de aloinjerto en comparación con una terapia cualquiera a solas.

El concepto de "células madres mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5" como se usa en el presente contexto, se refiere a unas células de la piel que tienen la capacidad de renovarse por sí solas y de diferenciarse en la forma de células maduras de múltiples linajes de células de adultos tales como las de hueso, grasa y cartílago. Estas células están caracterizadas por la expresión de la ABCB5 sobre la superficie de las células. En una fase de cultivo, unas células madres mesenquimales pueden ser guiadas para diferenciarse en la forma de células de hueso, grasa, cartílago o músculo, usando unos medios específicos. (Hirschi KK y Goodell MA. Gene Ther. 2002; 9: 648-652. Pittenger MF y colaboradores Science. 1999; 284: 143-147. Schwartz RE y colaboradores J Clin Invest. 2002; 109: 1291-1302. Hirschi K y Goodell M. Differentiation [Diferenciación]. 2001; 68: 186-192.)

Se ha mostrado que unas células madre mesenquimales ejercen unas funciones reguladoras de inmunidad: por ejemplo, unas BM-MSC de adultos pueden inhibir una proliferación de células T para cognar *in vitro* antígenos, aloantígenos y mitógenos y atenuar *in vivo* la enfermedad de un injerto frente a un anfitrión (GVHD, acrónimo de graft-versus-host disease), un rechazo de aloinjerto y una autoinmunidad *in vivo* mediada por células, unas células madre mesenquimales expresan antígenos MHC de la clase I y pueden ser inducidos a expresar moléculas de MHC de la clase II por exposición al interferón  $\gamma$ , lo que indica una capacidad de proporcionar una señal 1 en un entorno proinflamatorio. Mientras que unas células madre mesenquimales no expresan los miembros de la ruta concomitantemente estimuladora positiva CD80, CD86, CD40 o CD40L para proporcionar una señal 2, ellas pueden expresar el PD-1, que es un constituyente de la nueva ruta concomitantemente estimuladora negativa para PD-1-(PD-L1/PD-L2), la cual, después de un compromiso con sus ligandos en unas células inmunitariamente competentes dianas, puede ser responsable de la activación *in vitro* de linfocitos mediada por células madre mesenquimales. Estos hallazgos hacen surgir la posibilidad de que unas células madre mesenquimales alogeneicas o autólogas puedan ejercer sus efectos reguladores de inmunidad en unos sitios con inflamación mediante la provisión de unas señales concomitantemente estimuladoras inhibitorias a unas células T reactivas con antígenos, puesto que dichas señales pueden ser proporcionadas como *cis* o *trans* conduciendo a una desactivación de las

5 células T. Por lo demás unas células madre mesenquimales pueden ejercer unos efectos reguladores de inmunidad y retener unos privilegios inmunológicos en el entorno inflamatorio mediante una secreción de unos mediadores reguladores de inmunidad solubles: Unos miembros de la superfamilia de los TGF- $\beta$ , que son producidos por unas células madre mesenquimales pueden suprimir *in vitro* unas respuestas de antígenos mediadas por células T, y la producción de la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2, acrónimo de bone morphogenetic protein) por unas células madre mesenquimales puede mediar en la supresión de inmunidad por medio de la generación de TREG's CD8<sup>+</sup>. Por lo tanto, son similarmente operativos diversos mecanismos distintos, mediante los cuales unas células madre mesenquimales modulan la activación de una respuesta inmunitaria, incluyendo la inducción de una anergia de células T y B, la inhibición de una maduración de APC tal como se evidencia por una regulación en sentido descendente de CD40, y la generación de TREG's.

Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 se pueden obtener a partir de una piel. La piel se puede derivar de cualquier individuo que contenga piel, pero en algunas formas de realización es preferiblemente una piel humana. La piel se puede derivar de un individuo de cualquier edad, pero en algunas formas de realización es preferiblemente la piel de un adulto, en lugar de la piel de un adolescente o de un niño.

15 Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 se pueden derivar de un individuo aislando una muestra de piel y luego purificando las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5. Resultará evidente para los que tienen una experiencia ordinaria en la especialidad que esa piel puede ser enriquecida en cuanto a las células que contengan ABCB5 de un cierto número de maneras. Por ejemplo, las células pueden ser seleccionadas por medio de una fijación de la ABCB5 sobre las moléculas superficiales de células con unos anticuerpos u otras moléculas que se fijan. Unos ejemplos de métodos se exponen en los Ejemplos que se dan más adelante. Unas muestras de piel se pueden obtener directamente a partir de un donante o se pueden recuperar a partir de un almacenamiento por conservación criogénica. Las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser aisladas, por ejemplo, usando unos anticuerpos contra la ABCB5 y mantenidas en el cultivo usando una metodología clásica o congeladas, p.ej. en nitrógeno líquido, para un posterior uso.

25 Para estudiar las propiedades moduladoras de inmunidad de unas células madre mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup> murinas, se puede usar un protocolo para aislar, clonar, propagar y expandir *in vitro* esta población de células madre en unas definidas condiciones del medio, tales como las que se indican en los Ejemplos que se dan más adelante. Dicho brevemente, una piel murina fue cosechada a partir de unos ratones de la raza Balb/c o C57BL/6, disecada en pequeños trozos y disociada con una colagenasa, seguido por un aislamiento de células ABCB5<sup>+</sup> usando unos mAb anti-ABCB5, unas microperlas revestidas con una Ig anti-ratón de cabra y unas columnas de separación MiniMACS y una subsiguiente clonación de las células por una dilución limitadora. La expresión en la superficie de una ABCB5 murina se determinó en unas sucesivas pasadas de células que han sido derivadas por clonación usando una tinción de inmunofluorescencia con unos mAb anti-ABCB5 y una citometría de flujo.

35 La presente solicitud considera cualquier método apropiado de emplear unos anticuerpos monoclonales para separar células madre mesenquimales con respecto de otras células. Correspondientemente, se incluye en la presente solicitud un método de producir una población de células madre mesenquimales, que comprende las etapas de proporcionar una suspensión de células de una piel que contiene células madre mesenquimales, poner en contacto la suspensión de células con un anticuerpo monoclonal o una combinación de anticuerpos monoclonales que reconozcan a un epítipo, que incluya a la ABCB5, en las células madre mesenquimales; y luego separar y recuperar desde la suspensión de células las células que han sido fijadas por los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden estar engarzados a una fase sólida y se pueden utilizar para capturar células madre mesenquimales a partir de unas muestras de piel. Las células fijadas pueden luego ser separadas a partir de la fase sólida por unos métodos conocidos, que dependen de la naturaleza del anticuerpo y de la fase sólida.

45 Unos sistemas basados en una monoclonación, que son apropiados para preparar la deseada población de células, incluyen una columna de perlas magnéticas y partículas paramagnéticas, que utiliza unos anticuerpos para una selección o bien positiva o negativa; una separación basada en la afinidad para biotina o para estreptavidina, y una clasificación por citometría de flujo de alta velocidad de unas células madre mesenquimales teñidas con inmunofluorescencia, que están mezcladas en una suspensión de otras células. Por lo tanto, la presente solicitud incluye el aislamiento de una población de células madre mesenquimales y una intensificación usando unos anticuerpos monoclonales suscitados contra el antígeno de superficie ABCB5.

55 Se aíslan preferiblemente las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5. El concepto de "una célula madre mesenquimal dérmica positiva para ABCB5 aislada" como se usa en el presente contexto, se refiere a una preparación de células que están puestas en unas condiciones distintas de las de su entorno natural. El término "aislada" no excluye el posterior uso de estas células después de ello en unas combinaciones o unas mezclas con otras células o en un entorno *in vivo*.

Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 pueden ser preparadas como unas preparaciones sustancialmente puras. El término "sustancialmente puras" significa que una preparación está

5 sustancialmente libre de unas células de piel que sean distintas de las células madre positivas para ABCB5. Por ejemplo, las células ABCB5 deberían constituir por lo menos un 70 por ciento de las células totales que están presentes, siendo preferidos unos mayores porcentajes, p.ej. por lo menos los de 85, 90, 95 o 99 por ciento. Las células pueden ser envasadas en un recipiente farmacéutico acabado, tal como un vial para inyección, una ampolla, o una bolsa para infusión juntamente con cualesquiera otros componentes que se pueden desear, p.ej. unos agentes para conservar células o para reducir el crecimiento de las bacterias. La composición debería estar en una forma de dosificación unitaria.

10 Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 son útiles para tratar unas enfermedades mediadas inmunitariamente. Las enfermedades mediadas inmunitariamente son unas enfermedades que están asociadas con una respuesta inmunitaria perjudicial, es decir una que daña a un tejido. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a un trasplante, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad del hígado, una enfermedad de los riñones y una enfermedad neurodegenerativa.

15 Se ha descubierto que unas células madre mesenquimales se pueden usar en un trasplante para mejorar una respuesta por el sistema inmunitario de manera tal que sea reducida o eliminada una respuesta inmunitaria a uno o varios antígeno(s). Un trasplante es el acto o proceso de trasplantar un tejido o un órgano desde un cuerpo o una parte del cuerpo a otro u otra. Las células madre mesenquimales pueden ser autólogas para el anfitrión (es decir que se obtienen del mismo anfitrión) o no autólogas para éste, tales como unas células que son alogeneicas o singeneicas para el anfitrión. Unas células no autólogas se derivan de alguien distinto del paciente o del donante del órgano. Alternativamente, las células madre mesenquimales se pueden obtener a partir de una fuente que es xenogeneica para el anfitrión.

20 El concepto de "alogeneicas" se refiere a unas células que son genéticamente diferentes aunque pertenecen a, o se obtienen a partir de, la misma especie que la del anfitrión o donante. Por lo tanto, una célula madre mesenquimal humana alogeneica es una célula madre mesenquimal que se ha obtenido a partir de un individuo humano distinto del deseado recipiente de las células madre mesenquimales o del donante del órgano. El concepto de "singeneicas" se refiere a unas células que son genéticamente idénticas o que están relacionadas estrechamente y son inmunológicamente compatibles con el anfitrión o el donante, es decir que proceden de unos individuos o tejidos que tienen unos idénticos genotipos. El concepto de "xenogeneicas" se refiere a unas células que se derivan o se obtienen de un organismo de una especie que es diferente de la del anfitrión o donante.

25 Por lo tanto, las células madre mesenquimales se usan para suprimir o mejorar una respuesta inmunitaria a un trasplante (de un tejido, de un órgano, de células, etc) por medio de una administración al recipiente del trasplante de unas células madre mesenquimales en una cantidad que es eficaz para suprimir o mejorar una respuesta inmunitaria frente al trasplante.

30 De un modo correspondiente, los métodos se pueden ejecutar poniendo en contacto al recipiente del tejido del donante con unas células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales se pueden administrar al recipiente antes de, o al mismo tiempo que, el trasplante o subsiguientemente al trasplante. Cuando se administran las células madre antes del trasplante, típicamente las células madre deberán ser administradas hasta 14 días y preferiblemente hasta 7 días antes de la operación quirúrgica. La administración puede ser repetida sobre una base regular después de esto (p.ej. una vez por semana).

35 Las células madre mesenquimales se pueden administrar también al recipiente como una parte del trasplante. Por ejemplo, las células madre mesenquimales pueden ser perfundidas dentro del órgano o tejido antes del trasplante. Alternativamente, el tejido puede ser trasplantado y luego tratado durante la operación quirúrgica.

40 El tratamiento de un paciente que ha recibido un trasplante, con el fin de reducir la gravedad de, o de eliminar, un episodio de rechazo contra el trasplante, se puede ejecutar también administrando al recipiente del tejido del donante unas células madre mesenquimales después de que el tejido del donante haya sido trasplantado dentro del recipiente.

45 La reducción de una respuesta inmunitaria por un tejido, un órgano o unas células de un donante frente a un recipiente, es decir una respuesta de un injerto frente a un anfitrión, se puede conseguir tratando ex vivo al tejido, al órgano o a las células de un donante con unas células madre mesenquimales antes del trasplante del tejido, del órgano o de las células dentro del recipiente. Las células madre mesenquimales reducen la sensibilidad de una célula T en el trasplante, que puede ser activada subsiguientemente frente a unas células que presentan un antígeno del recipiente de manera tal que el trasplante pueda ser introducido en el cuerpo del recipiente (del anfitrión) sin la aparición de, o con una reducción en, una respuesta desfavorable del trasplante al anfitrión. Por lo tanto, se puede prevenir lo que es conocido como una enfermedad de "un injerto frente a un anfitrión".

50 Las células madre mesenquimales pueden ser obtenidas a partir del recipiente o donante, por ejemplo, antes del trasplante. Las células madre mesenquimales pueden ser aisladas y almacenadas en un estado congelado hasta

que se las necesite. Las células madre mesenquimales pueden también ser expandidas en un cultivo hasta las cantidades que se deseen y almacenadas hasta que se las necesite. Alternativamente, ellas se pueden obtener inmediatamente antes del uso.

5 Las células madre mesenquimales son administradas al recipiente en una cantidad efectiva para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria desfavorable en curso que sea causada por el trasplante desde el donante frente al anfitrión. La presentación de las células madre mesenquimales al anfitrión que está sufriendo una respuesta inmunitaria desfavorable causada por un trasplante inhibe la respuesta en curso e impide la reestimulación de las células T, reduciendo o eliminando de esta manera una respuesta desfavorable de células T activadas a un tejido del anfitrión.

10 Como una parte de un proceso de trasplante, las células madre mesenquimales pueden también ser modificadas para expresar una molécula destinada a intensificar el efecto protector, tal como una molécula que induzca la muerte celular. Tal como se describe seguidamente con más detalle, las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser tratadas por ingeniería genética para producir proteínas usando unos ácidos nucleicos añadidos exógenamente. Por ejemplo, las células madre mesenquimales se pueden usar para suministrar al sistema inmunitario una molécula  
15 que induzca una apoptosis o unas células T activadas que sean portadoras de un receptor para la molécula. Esto da como resultado la delección de linfocitos T activados y la supresión de una indeseada respuesta inmunitaria a un trasplante. Por lo tanto, unas células madre mesenquimales dérmicas pueden ser modificadas para expresar una molécula inductora de muerte celular. En unas formas preferidas de realización de los métodos que aquí se describen, las células madre mesenquimales expresan el ligando Fas o el ligando TRAIL de una molécula inductora  
20 de muerte celular.

En todos los casos se debería administrar a un paciente una dosis efectiva de células (es decir, un número suficiente para prolongar la supervivencia de un aloinjerto). El número de células administradas debería estar situado generalmente en el intervalo de  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^{10}$  y, en la mayor parte de los casos, debería estar situado entre  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^9$ . Las dosificaciones y los esquemas de dosificación reales se determinarán sobre la base de caso  
25 por caso por el médico de cabecera usando unos métodos que son clásicos en la especialidad de la medicina clínica y tomando en cuenta unos factores tales como la edad, el peso y la condición física del paciente. En unos casos en los que un paciente está exhibiendo unos signos de un rechazo de trasplante, se pueden aumentar las dosificaciones y/o la frecuencia de la administración. Las células serán administradas usualmente por una inyección o infusión intravenosa, aunque se pueden usar de igual manera unos métodos de implantar células, p.ej. cerca del  
30 sitio del implante de un órgano.

Las células madre mesenquimales se pueden administrar a un paciente de trasplante o bien como el único modulador de inmunidad o como una parte de un plan de tratamiento que incluye de igual manera otros moduladores de inmunidad. Por ejemplo, a los pacientes se les pueden administrar también: unos anticuerpos monoclonales u otros compuestos que bloqueen la interacción entre el CD40 y el CD40L; unos agentes inhibidores  
35 de la activación y de la subsiguiente proliferación de los linfocitos, tales como ciclosporina, tacrolimus y rapamicina; o con unos agentes supresores de la inmunidad que actúan por otros mecanismos distintos, tales como metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, o unos compuestos anti-inflamatorios (p.ej. unos esteroides adrenocorticales tales como dexametasona y prednisolona).

Las células madre mesenquimales dérmicas son útiles también para tratar y prevenir una enfermedad autoinmunitaria. Una enfermedad autoinmunitaria es una clase de enfermedades en la que unos anticuerpos propios del individuo reaccionan con un tejido del anfitrión o en las que unas células T de efectores inmunitarios son autorreactivas para péptidos propios endógenos y causen la destrucción de un tejido. Por lo tanto se monta una respuesta inmunitaria contra unos antígenos propios del individuo, que se citan como auto antígenos. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a: la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la  
40 esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico (SLE = acrónimo de systemic lupus erythematosus), la encefalomiелitis autoinmunitaria, la miastenia grave (MG), la tiroiditis de Hashimoto, el síndrome de Goodpasture, un pénfigo (p.ej. el pemphigus vulgaris), la enfermedad de Grave, una anemia hemolítica autoinmunitaria, la púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, un escleroderma con anticuerpos anti-colágeno, una enfermedad mixta de tejido conjuntivo, la polimiositis, la anemia perniciosa, la enfermedad de Addison idiopática, una infertilidad asociada con una autoinmunidad, una glomerulonefritis (p.ej., la glomerulonefritis crescética, la glomerulonefritis proliferativa), el  
50 penfigoide ampolloso, el síndrome de Sjögren, una resistencia a insulina y una diabetes mellitus autoinmunitaria. Un "auto-antígeno", tal como se usa en el presente contexto, se refiere a un antígeno de un tejido de un anfitrión normal. Un tejido de un anfitrión normal no incluye a células cancerosas.

Un ejemplo de una enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad anti - membrana basal glomerular (GBM, acrónimo de glomerular basement membrane). Una enfermedad de la GBM resulta a partir de una respuesta autoinmunitaria que está dirigida contra el dominio no colagenoso 1 de la cadena 3 del colágeno del tipo IV (3 (IV)NC 1) y que causa una glomerulonefritis (GN) que progresa rápidamente y finalmente una insuficiencia renal en los pacientes afligidos. Tal como se describe en los Ejemplos siguientes, ha sido demostrada la efectividad de unas células madre mesenquimales dérmicas en un modelo de GBM. Unos anticuerpos autorreactivos que

reconocen al 3(IV)NC1 son considerados como una marca de contraste de la enfermedad. Por lo demás, el autorreactivo T helper (Th= acrónimo de T helper) 3(IV)NC1 de una inmunidad celular mediada por células T cooperadoras ha sido implicado en su patogénesis. Una enfermedad anti-GBM puede ser inducida experimentalmente en unas razas de ratones susceptibles por una inmunización con unas preparaciones de antígenos que contienen el 3(IV)NC1 recombinante (r3(IV)NC1), que proporcionan un valioso sistema modelo de enfermedad para estudiar las respuestas a una modulación terapéutica de inmunidad. Una activación de células T dependientes de antígenos y una resultante producción de interleucina 2 (IL-2) requieren dos señales distintas: Al encontrarse con un antígeno, unas células T ingenuas reciben una señal 1 por medio del compromiso de un receptor de células T con el complejo de péptido antigénico positivo para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC = acrónimo de Major Histocompatibility Complex)-plus en células que presentan antígenos (APC's = acrónimo de antigen presenting cells), y una señal 2 a través de rutas concomitantemente estimuladoras positivas, que conduce a una activación plena. El cometido clínico de una de tales rutas concomitantemente estimuladoras positivas, la interacción de CD40 expresado por las APC con su ligando de Th CD40L, para el desarrollo de una enfermedad en una GN autoinmunitaria anti-GBM experimental ha sido demostrado recientemente y se ha encontrado que el bloqueo de la ruta de CD40-CD40L impide el desarrollo de una GN autoinmunitaria autoinmune. Unas señales concomitantemente estimuladoras de células T negativas, por otra parte, funcionan para regular en sentido descendente a las respuestas inmunitarias, Unas células T reguladoras (TREG's de Regulatory T cells) y unos mediadores de citocinas solubles, tales como la interleucina 10 y unos miembros de la familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), pueden atenuar también la activación de células T y las respuestas de efectores inmunitarios.

Otra enfermedad autoinmunitaria es la enfermedad de Crohn. Se han realizado unas pruebas clínicas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn usando unas células madre mesenquimales. La enfermedad de Crohn es una condición crónica que está asociada con una inflamación de los intestinos y del tracto gastrointestinal. Basándose en las pruebas realizadas se manifiesta como prometedor el uso de unas células madre mesenquimales para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Cuando se usan en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, las células madre mesenquimales positivas para ABCB5 serán administradas preferiblemente por inyección intravenosa y una dosis efectiva será la cantidad que se necesita para decelerar la progresión de la enfermedad o para aliviar uno o más de los síntomas que están asociados con la enfermedad. Por ejemplo, en el caso de una esclerosis múltiple relapsa o recidivante, una dosis efectiva debería ser por lo menos la cantidad que se necesita para reducir la frecuencia o la severidad de los ataques. En el caso de una artritis reumatoide, una cantidad efectiva sería por lo menos el número de células que se necesitan para reducir el dolor y la inflamación que se experimentan por los pacientes. Una dosis unitaria individual de células debería estar situada típicamente entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^{10}$  células y la dosificación debería ser repetida a intervalos regulares (p.ej. semanalmente, mensualmente, etc.) según se determine como apropiado por el médico de cabecera.

Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 son también útiles en el tratamiento de una enfermedad del hígado. Una enfermedad del hígado incluye una enfermedad tal como una hepatitis que da como resultado un daño para el tejido hepático. Más generalmente, las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 se pueden usar para el tratamiento de enfermedades, trastornos o condiciones hepáticas/os que incluyen pero no se limitan a: una enfermedad hepática alcohólica, una hepatitis (A, B, C, D, etc.), lesiones hepáticas focales, un carcinoma hepatocelular primario, lesiones císticas grandes del hígado, a enfermedad hepática granulomatosa con una hiperplasia nodular focal, granulomas hepáticos tales como una hemocromatosis hereditaria, unos síndromes de sobrecarga con hielro, un hígado graso agudo, "hyperemesis gravidarum". Una enfermedad hepática intercurrente durante el embarazo, una colestasis intrahepática, una insuficiencia del hígado, una insuficiencia hepática fulminante, una ictericia o una hiperbilirrubinemia asintomática, un perjuicio para hepatocitos, el síndrome de Crigler-Najjar, la enfermedad de Wilson, una deficiencia de alfa-1-antitripsina, el síndrome de Gilbert, una hiperbilirrubinemia, la esteatohepatitis no alcohólica, unas porfirias, una hipertensión portal no cirrótica, una hipertensión portal no cirrótica, una fibrosis portal, una esquistosomiasis, la cirrosis biliar primaria, el síndrome de Budd-Chiari, una enfermedad veno-oclusiva hepática a continuación de un trasplante de médula ósea, etc.

Un estrés sobre el cuerpo puede desencadenar que unas células madre adultas cambien a la forma de unas células especializadas que emigran a la zona dañada y ayudan a reparar el perjuicio. Por ejemplo, un hígado dañado puede enviar señales a unas células madre que responden creando unas células hepáticas para el hígado dañado. (Journal of Clinical Investigation 15 de Julio de 2003 15;112 (2):160-169)

Se ha descrito también el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa con unas células madre mesenquimales dérmicas. En algunos casos, la solicitud considera el tratamiento de unos individuos que tienen una enfermedad neurodegenerativa, o un perjuicio para células nerviosas que puede conducir a una degeneración de las neuronas. Las células neuronales son categorizadas predominantemente basándose en sus conexiones sinápticas locales o regionales (p.ej. interneuronas de circuitos locales frente a neuronas de proyecciones de Langrange) y conjuntos de receptores, y sistemas de segundos mensajeros asociados. Las células neuronales incluyen tanto neuronas del sistema nervioso central (CNS, acrónimo de central nervous system) como neuronas del sistema

nervioso periférico (PNS, acrónimo de peripheral nervous system). Hay muchos tipos diferentes de células neuronales. Unos ejemplos de ellas son, pero no se limitan a, neuronas sensoriales y simpáticas, neuronas colinérgicas, neuronas de ganglios de las raíces dorsales, neuronas propioceptivas (en el núcleo mesencefálico trigeminal), neuronas de ganglios ciliares (en el sistema nervioso parasimpático), etc. Una persona que tenga una experiencia ordinaria en la especialidad será capaz de identificar con facilidad unas células neuronales y de distinguirlas con respecto de unas células no neuronales tales como células gliales, utilizando típicamente unas características morfológicas de células; una expresión de marcadores específicos para las células, la secreción de ciertas moléculas, etc.

Un “trastorno neurodegenerativo” o “una enfermedad neurodegenerativa” se define en el presente texto como un trastorno en el que sucede una pérdida progresiva de neuronas o bien en el sistema nervioso periférico o bien en el sistema nervioso central. Unos ejemplos no limitativos de trastornos neurodegenerativos incluyen: (i) unas enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como esclerosis lateral amiotrófica familiar y esporádica (FALS y ALS, acrónimos de familiar and sporadic amyotrophic lateral sclerosis), la enfermedad de Parkinson familiar y esporádica, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, atrofia olivopontocerebelar, atrofia de sistemas múltiples, parálisis supranuclear progresiva, una enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, una degeneración corticodentatonigral, una epilepsia mioclónica familiar progresiva, una degeneración estrionigral, una distonía por torsión, temblor familiar, el síndrome de Down, el síndrome de Gilles de la Tourette, síndrome de Hallervorden-Spatz, neuropatía periférica diabética, demencia pugilística, demencia asociada SIDA, demencia relacionada con la edad, un desvinculación de la memoria asociada con la edad y unas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la amiloidosis tales como las causadas por la proteína prión (PrP) que está asociada con una encefalopatía espongiiforme transmisible (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, escrapia y kuru), y las causadas por una acumulación de cistatina C en exceso (angitopatía de cistatina C hereditaria); y (ii) unos trastornos neurodegenerativos agudos tales como un perjuicio traumático del cerebro (p.ej. un perjuicio del cerebro relacionado con una operación quirúrgica), edema cerebral, un daño de nervios periféricos, un perjuicio de la médula espinal, la enfermedad de Leigh, el síndrome de Guillain-Barre, unos trastornos del almacenamiento de lisosomas tales como lipofuscinosis, la enfermedad de Alper, un vértigo como resultado de una degeneración del CNS, unas patologías que surgen con un abuso crónico de alcohol o fármacos, incluyendo, por ejemplo una degeneración de neuronas en el locus coeruleus (lugar cerúleo) y el cerebelo; unas patologías que surgen con un envejecimiento que incluyen una degeneración de neuronas cerebelares y neuronas corticales, que conduce a perjuicios cognitivos y motrices; y unas patologías que surgen con un abuso crónico de anfetaminas incluyendo una degeneración de neuronas de ganglios basales que conducen a perjuicios motrices; unos cambios patológicos que resultan de un trauma focal, tal como un ictus, una isquemia focal, una insuficiencia vascular, una encefalopatía hipóxica-isquémica, una hiperglucemia, una hipoglucemia o un trauma directo; unas patologías que surgen como un efecto colateral negativo de fármacos y de tratamientos terapéuticos (p.ej. una degeneración de neuronas del cortex cingulado y entorrinal como respuesta a unas dosis anticonvulsivas de agentes antagonistas de la clase NMDA del receptor de glutamato), y la demencia relacionada de Wernicke-Korsakoff. Unas enfermedades neurodegenerativas que afectan a neuronas sensoriales incluyen la ataxia de Friedreich, diabetes, una neuropatía periférica y una degeneración neuronal retinal. Unas enfermedades neurodegenerativas de los sistemas límbicos y corticales incluyen una amiloidosis cerebral, la atrofia de Pick y el síndrome de Retts. Se pretende que los precedentes ejemplos no se entiendan como amplios sino que sirvan meramente como una ilustración del término “trastorno neurodegenerativo” o “enfermedad neurodegenerativa”.

La mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas crónicas son tipificadas por un comienzo durante los años adultos medianos y conducen a una degeneración rápida de subconjuntos específicos de neuronas dentro del sistema neural, dando como resultado a fin de cuentas una muerte prematura. Unas composiciones que comprenden células madre mesenquimales dérmicas pueden ser administradas a un individuo con el fin de tratar una enfermedad neurodegenerativa a solas o en combinación con la administración de otros compuestos terapéuticos para el tratamiento o la prevención de estos trastornos o de estas enfermedades. Muchos de estos fármacos son conocidos en la especialidad. Por ejemplo unos agentes antiparkinsonianos incluyen pero no se limitan a: mesilato de benzotropina; biperideno; hidrocloreuro de biperideno; lactato de biperideno, carmantadina; hidrocloreuro de ciladopa; dopamantina; hidrocloreuro de etopropazina; lazabemida; levodopa; hidrocloreuro de lometralina, hidrocloreuro de mofegilina; hidrocloreuro de naxagolida; sulfato de pareptido; hidrocloreuro de prociclidina; hidrocloreuro de quinelorano; hidrocloreuro de ropinirol; hidrocloreuro de selegilina; tolcapona; e hidrocloreuro de trihexifenidilo. Unos fármacos para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica incluyen pero no se limitan a riluzol. Unos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Paget incluyen pero no se limitan a tiludronato disódico.

Ha sido descrita la utilidad de unas células madre de adultos en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. Se ha demostrado que unas células madre mesenquimales pueden cambiarse a la forma de células similares a neuronas en ratones que han experimentado unos ictus. Journal of Cell Transplantation volumen 12, páginas 201-213, 2003. Adicionalmente, unas células madre que se derivan de la médula ósea se desarrollaron en la forma de células neuronales que mantienen la promesa de tratar a los pacientes con la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), y perjuicios de la médula espinal o espina dorsal).

Los métodos precedentes son también útiles en el tratamiento de unos trastornos que están asociados con una enfermedad de los riñones. Se ha demostrado que una inyección realizada previamente de unas células madre mesenquimales dentro de los riñones da como resultado una mejoría casi inmediata en la función de los riñones y en la renovación de células por los riñones. Resnick, Mayer, Stem Cells Brings Fast Direct Improvement, Without Differentiation, in Acute Renal Failure [Las células madre proporcionan una mejoría rápida directa], EurekAlert!, 15 de Agosto de 2005. Por lo tanto, unas células madre mesenquimales dérmicas pueden ser administradas a un individuo que tiene una enfermedad renal a solas o en combinación con otras terapias o procesos terapéuticos tales como una diálisis, para mejorar la función de los riñones y la renovación de células por ellos.

Otras enfermedades que pueden ser tratadas incluyen enfermedades de la córnea y de los pulmones. Unas terapias basadas en la administración de células madre mesenquimales en estos tejidos han demostrado unos resultados positivos. Por ejemplo, se han usado células madre mesenquimales humanas para reconstruir córneas dañadas. Ma Y y colaboradores, Stem Cells [Células madre], 18 de Agosto de 2005. Adicionalmente, se encontró que unas células madre que se derivan de la médula ósea son importantes para una reparación de los pulmones y para una proyección contra el perjuicio de los pulmones. Rojas, Mauricio y colaboradores American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, volumen 33, páginas 145-152, 12 de Mayo de 2005. Unas células madre mesenquimales dérmicas se pueden usar también en la reparación de un tejido córneo o un tejido pulmonar.

Unas células madre mesenquimales procedentes de unas fuentes tales como la médula ósea se han usado también en unas terapias para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular. Unas células madre de médula ósea pueden ayudar a reparar un músculo cardíaco dañado ayudando a que el corazón desarrolle un tejido funcional nuevo. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow [Plasticidad de células madre en músculos y médula ósea]. Ann N Y Acad Sci. Junio de 2001; 938:208-18. Unas células madre de médula ósea colocadas en un corazón dañado después de un infarto de miocardio mejoraban en un 80 % la capacidad de bombeo del corazón. Nature Medicine Journal Septiembre 2003 volumen 9 nº 9: 1195-1201.

El concepto de una enfermedad cardiovascular se refiere a una clase de enfermedades que implican al corazón y/o a los vasos sanguíneos. Aunque el término se refiere técnicamente a unas enfermedades que afectan al corazón y/o a los vasos sanguíneos, otros órganos, tales como, por ejemplo, los pulmones y las articulaciones, pueden ser afectados o implicados en la enfermedad. Unos ejemplos de unas enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis, arterioesclerosis, aneurismas, angina, angina de pecho estable crónica, angina de pecho inestable, isquemia del miocardio (MI), síndrome coronario agudo, una enfermedad de la arteria coronaria, un ictus, una reestenosis de la coronaria, una reestenosis con stent en la coronaria, re-trombosis con stent en la coronaria, revascularización, una remodelación posterior a un infarto de miocardio (MI) (p.ej. una remodelación post MI del ventrículo derecho), una hipertrofia del ventrículo derecho post MI, una angioplastia, un ataque isquémico transitorio, una embolia pulmonar, una oclusión vascular, trombosis venosas, arritmias, cardiomiopatías, una insuficiencia cardíaca congestiva, una enfermedad cardíaca congénita, una miocarditis, una enfermedad de válvulas, una cardiomiopatía dilatada, una disfunción diastólica, una endocarditis, una fiebre reumática, una hipertensión (alta presión sanguínea), una cardiomiopatía hipertrófica, aneurismas y un prolapso de la válvula mitral.

Una aterosclerosis es una enfermedad de arterias musculares de tamaño grande y mediano y está caracterizada por una disfunción endotelial, una inflamación vascular y la acumulación de lípidos, colesterol, calcio y/o desperdicio celulares dentro de la capa íntima de la pared de un vaso sanguíneo. Esta acumulación da como resultado la formación de una placa (placa ateromatosa), una remodelación vascular, una obstrucción luminal aguda y crónica, anomalías de la circulación sanguínea y un suministro disminuido de oxígeno a unos órganos diana.

Una aterosclerosis puede causar dos problemas principales. En primer lugar las placas ateromatosas pueden conducir a rupturas de las placas y una estenosis (un estrechamiento) de la arteria y, por lo tanto, un suministro insuficiente de sangre al órgano que ella alimenta. Alternativamente, resulta un aneurisma. Estas complicaciones son crónicas, lentamente progresivas y acumulativas. Del modo más corriente, la(s) placa(s) se rompe(n) repentinamente ("placa vulnerable") causando la formación de un trombo que rápidamente decelerará o detendrá la circulación de la sangre (p.ej. durante unos pocos minutos) conduciendo a una muerte de los tejidos que son alimentados por la arteria. Éste suceso es denominado infarto. Uno de los escenarios reconocidos más corrientes es denominado trombosis coronaria de una arteria coronaria que causa un infarto de miocardio (MI) (corrientemente conocida como un ataque de corazón). Otro escenario corriente en una enfermedad muy avanzada es una claudicación a partir de un suministro insuficiente de sangre a las piernas, típicamente debido a una combinación tanto de una estenosis como de segmentos de aneurisma estrechados con coágulos. Puesto que una aterosclerosis es un proceso amplio del cuerpo se producen sucesos similares también en las arterias del cerebro, de los intestinos, de los riñones, de las piernas, etc.

Una aterosclerosis puede comenzar en la adolescencia y típicamente es hallada en la mayor parte de las arterias mayores, además es asintomática y no es detectada por la mayor parte de los métodos de diagnóstico durante una vida. Del modo más corriente se vuelve gravemente sintomática cuando ella interfiere con la circulación coronaria que abastece al corazón o la circulación cerebral que abastece al cerebro, y es considerada como la causa

subyacente más importante de ictus, ataques de corazón, diversas enfermedades del corazón que incluyen una insuficiencia cardíaca congestiva y la mayor parte de las enfermedades cardiovasculares en general. Aunque puede estar implicada cualquier arteria en el cuerpo, usualmente solamente se reconocen un estrechamiento o una obstrucción grave de algunas arterias, las que suministran a los órganos que son más importantes críticamente. Una obstrucción de las arterias que abastecen al músculo cardíaco da como resultado un ataque de corazón. Una obstrucción de las arterias que abastecen al cerebro da como resultado un ictus. Las placas ateromatosas en las arterias de brazos o piernas que producen una circulación sanguínea disminuida causan la enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (PAOD, acrónimo de peripheral artery occlusive disease).

Un ensayo de estrés cardíaco es uno de los métodos de ensayo no invasivos realizados del modo más corriente para una limitación de la circulación sanguínea. Éste detecta generalmente un estrechamiento del lumen de ~75 % o mayor. Unas zonas con estenosis grave detectable por una angiografía, y en una menor extensión un "ensayo de estrés" han sido durante largo tiempo el foco de técnicas de diagnóstico de seres humanos acerca de una enfermedad cardiovascular, en general. Los sucesos más graves se producen en lugares con una placa pesada. Una rotura de placa puede conducir a una oclusión del lumen arterial en el transcurso de desde unos segundos hasta unos minutos, y a un potencial daño tisular permanente y algunas veces a una muerte repentina.

Se conocen diversos factores de riesgo anatómicos fisiológicos y conductuales para una aterosclerosis. Estos factores de riesgo incluyen una edad avanzada, el género masculino, una diabetes, una dislipidemia (niveles elevados de colesterol o triglicéridos en el suero), una alta concentración en el suero de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL, "colesterol malo"), de lipoproteínas(a) (una variante de LDL) y/o de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), una baja concentración en el suero de partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL, "colesterol bueno") en funcionamiento, fumar tabaco, una hipertensión, una obesidad (p.ej. una obesidad central, también citada como obesidad abdominal o de tipo masculino), una historia familiar de enfermedades cardiovasculares (p.ej. enfermedad cardíaca coronaria o ictus), unos niveles elevados de marcadores de inflamación (p.ej. una proteína C reactiva (CRP o hs-CRP), sCD40L, sICAM, etc.), unos niveles elevados en suero de homocisteína, unos niveles elevados en suero de ácido úrico y unas concentraciones elevadas de fibrinógeno en el suero.

El término infarto de miocardio (MI) se deriva de *myocardium* (músculo cardíaco) y de infarto (muerte tisular debida a una privación de oxígeno). Un MI es un estado de enfermedad que aparece cuando es interrumpido el suministro de sangre a una parte del corazón. Un MI agudo (AMI) es un tipo de síndrome coronario agudo, que es con la máxima frecuencia (pero no siempre) una manifestación de una enfermedad de la arteria coronaria. El suceso desencadenador más corriente es la rotura de una placa aterosclerótica en una arteria coronaria epicárdica, que conduce a una cascada de coagulación, dando como resultado algunas veces una oclusión total de la arteria. La resultante isquemia o escasez de oxígeno causa un daño y una potencial muerte de tejido cardíaco.

Unos importantes factores de riesgo para un MI o AMI incluyen una previa historia de una enfermedad vascular tal como una enfermedad cardíaca coronaria aterosclerótica y/o una angina, un previo ataque de corazón o ictus, cualesquiera previos episodios de ritmos cardíacos anormales o de sincopes, una edad avanzada (p.ej. varones por encima de los 40 y mujeres por encima de 50), fumar tabaco, un consumo excesivo de alcohol, altos niveles de triglicéridos, alto nivel de LDL ("Low-density lipoprotein" = lipoproteína de baja densidad) y bajo nivel de HDL (acrónimo de "High density lipoprotein" = lipoproteína de alta densidad), diabetes, hipertensión, obesidad y estrés.

Unos síntomas de MI o AMI incluyen dolor de pecho, deficiencia de respiración, náuseas, vómitos, palpitaciones, sudoración y ansiedad o una sensación de pérdida inminente. Los individuos se sienten frecuentemente enfermos. Aproximadamente un tercio de todos los infartos de miocardio son silenciosos, sin dolor de pecho ni otros síntomas.

Un individuo sospechoso de tener un MI recibe un cierto número de ensayos de diagnóstico, tales como un electrocardiograma (ECG, EKG), unos ensayos con rayos X del pecho y de la sangre para detectar unos niveles elevados de creatina cinasa (CK) o de troponina (marcadores liberados por tejidos dañados, especialmente por el miocardio). Un angiograma de la coronaria permite visualizar los estrechamientos o las obstrucciones de los vasos del corazón.

Un infarto de miocardio causa una pérdida irreversible de células en el músculo cardíaco conduciendo a una delgada costra fibrótica que no puede contribuir a la función del corazón. Una terapia con células madre proporciona un posible enfoque para el tratamiento de una insuficiencia cardíaca después de un infarto de miocardio así como de una aterosclerosis asociada con una remodelación. El concepto básico de una terapia con células madre es aumentar el número de células funcionales del músculo cardíaco por inyección de células inmaduras del músculo cardíaco directamente dentro de la pared del corazón dañado. Un infarto de miocardio conduce a la pérdida de cardiomiocitos, seguida por una remodelación patológica y una progresión hasta una insuficiencia cardíaca. Una meta de una terapia con células madre es reemplazar la pérdida de cardiomiocitos después de una isquemia, inducir una revascularización de la región lesionada. Otra meta es prevenir una remodelación patológica perjudicial después de un infarto de miocardio y que está asociada con una aterosclerosis. Se considera que unas células madre

mesenquimales autólogas o alogeneicas son una de las potenciales fuentes de células para una terapia con células madre. Por lo tanto, las células madre mesenquimales dérmicas se pueden usar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

5 Otro uso para las células madre mesenquimales dérmicas se encuentra en la regeneración de tejidos. Las células positivas para ABCB5 se usan para generar un tejido por inducción de una diferenciación. Las células madre mesenquimales aisladas y purificadas se pueden hacer crecer en un estado no diferenciado por medio de una expansión mitótica en un medio específico. Estas células pueden luego ser cosechadas y activadas para diferenciarse en la forma de un tejido de hueso, cartílago y otros tipos diferentes de tejidos conjuntivos por un cierto número de factores, incluyendo unos estímulos mecánicos, celulares y bioquímicos. Unas células madre mesenquimales humanas poseen el potencial de diferenciarse en la forma de unas células tales como osteoblastos y condrocitos, que producen una amplia variedad de células de tejidos mesenquimales, así como tendones, ligamentos y dermis, y este potencial es retenido después de un aislamiento y de varias expansiones de la población en un cultivo. Por lo tanto, al ser capaces de aislar, purificar, multiplicar grandemente y luego activar a unas células madre mesenquimales para diferenciarse en la forma de los tipos específicos de células mesenquimales que se desean, tales como tejidos del esqueleto y tejidos conjuntivos tales como huesos, cartílagos, tendones, ligamentos, músculos y tejidos adiposos, existe un proceso para tratar trastornos de tejidos del esqueleto y otros tejidos conjuntivos. El término tejido conjuntivo es usado de modo que incluye los tejidos del cuerpo que soportan a los elementos especializados, e incluyen tejidos de huesos, cartílagos, ligamentos, tendones, estromas, músculos y tejidos adiposos.

20 Los métodos y dispositivos utilizan unas células progenitoras mesenquimales dérmicas aisladas que, en ciertas condiciones, pueden ser inducidas a diferenciarse en la forma de, y producir, diferentes tipos de tejido conjuntivo deseado, tal como en células que forman huesos o cartílagos.

25 La presente solicitud describe un método para reparar un daño para un tejido conjuntivo. El método comprende las etapas de aplicar la célula madre mesenquimal dérmica a una zona de daño para un tejido conjuntivo en unas condiciones apropiadas para diferenciar las células para dar el tipo de tejido conjuntivo que es necesario reparar.

30 El término “defectos de tejido conjuntivo” se refiere a unos defectos que incluyen cualquier daño o irregularidad en comparación con un tejido conjuntivo normal, que pueda aparecer debido a un trauma, una enfermedad, la edad, un defecto de parto, una intervención quirúrgica, etc. El concepto de defectos de tejido conjuntivo se refiere también a unas zonas no dañadas en las que solamente se desea la formación de hueso, por ejemplo para un aumento cosmético.

35 Las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser administradas directamente a un individuo por cualquier modo de administración que se conozca o pueden ser sembradas sobre una matriz o un implante. Las matrices o los implantes incluyen unas matrices poliméricas tales como unos dispositivos fibrosos o que están basados en hidrogeles. Se usan corrientemente dos tipos de matrices para soportar a las células madre mesenquimales cuando ellas se diferencian en la forma de un cartílago o hueso. Una forma de matriz es la de una malla o esponja polimérica; la otra es la de un hidrogel polimérico. La matriz puede ser biodegradable o no biodegradable. El término biodegradable, tal como se usa en el presente contexto, significa un polímero que se disuelve o degrada dentro de un período de tiempo que es aceptable en la aplicación deseada, de menos que aproximadamente seis meses y de una manera sumamente preferible de menos que aproximadamente doce semanas, una vez que ha sido expuesto a una solución fisiológica con un pH de 6-8 que tiene una temperatura comprendida entre aproximadamente 25°C y 40 38°C. Una matriz puede ser biodegradable durante un cierto período de tiempo, por ejemplo de menos que un año, de manera más preferible de menos que seis meses, de manera sumamente preferible durante dos a diez semanas.

45 Las matrices fibrosas pueden ser producidas o construidas usando unos materiales comercialmente disponibles. Las matrices son formadas típicamente a base de un polímero natural o sintético. Se prefieren unos polímeros biodegradables, de manera tal que el cartílago formado de nuevas se pueda mantener espontáneamente por sí sólo y funcionar normalmente bajo el soporte de carga que está presente junto a las articulaciones sinoviales. Son preferibles unos polímeros que se degradan en un período de desde una hasta veinticuatro semanas. Se prefieren unos polímeros sintéticos a causa de que su velocidad de degradación se puede determinar con más exactitud y ellos tienen más consistencia de un lote a otro lote y menos inmunogenicidad que los polímeros. Unos polímeros naturales que se pueden usar incluyen unas proteínas tales como colágeno, albúmina y fibrina; y unos polisacáridos tales como alginatos y unos polímeros de ácido hialurónico. Unos polímeros sintéticos incluyen unos polímeros tanto biodegradables como no biodegradables. Unos ejemplos de polímeros biodegradables incluyen unos polímeros de hidroxí ácidos tales como un poli(ácido láctico) (PLA), un poli(ácido glicólico) (PGA), y un poli(ácido láctico-ácido glicólico) (PLGA), unos poli(ortoésteres), unos poli(anhídridos), unos poli(fosfazenos) y unas combinaciones de los mismos. Unos polímeros no biodegradables incluyen unos poli(acrilatos), unos poli(metacrilatos), unos copolímeros de etileno y acetato de vinilo y unos poli(alcoholes vinílicos). Éstos deberán ser evitados puesto que su presencia en el cartílago conducirá inevitablemente a un daño mecánico y a una descomposición del cartílago.

Preferiblemente, los polímeros forman unas fibras que son entrelazadas, tejidas o enredadas para formar una matriz que tiene una distancia intersticial situada entre 100 y 300 micrómetros. Unas mallas de poli(ácido glicólico) que se pueden usar pueden ser obtenidas a partir de unas compañías de suministro de artículos quirúrgicos tales como Ethicon, N.J. Se pueden usar también unas esponjas. Como se usa en el presente contexto, el término "fibroso" se refiere o bien a una matriz entrelazada, tejida o enredada o a una matriz de esponja.

La matriz es preferiblemente conformada para rellenar el defecto. En la mayor parte de los casos, esto se puede conseguir arreglando las fibras poliméricas con unas tijeras o una cuchilla; alternativamente la matriz puede ser moldeada por colada a partir de una solución del polímero, que se ha formado por calentamiento o por disolución en un disolvente volátil.

Las células madre mesenquimales son sembradas sobre la matriz por aplicación de una suspensión de células a la matriz. Esto se puede conseguir empapando la matriz dentro de un recipiente para un cultivo celular, o por inyección o por otra aplicación directa de las células a la matriz.

La matriz sembrada con células es implantada en el sitio del defecto usando unas técnicas quirúrgicas clásicas. La matriz puede ser sembrada y cultivada in vitro antes de la implantación, sembrada e implantada inmediatamente, o implantada y luego sembrada con células. En la forma de realización preferida, las células son sembradas sobre y dentro de la matriz y cultivadas in vitro durante un período de tiempo comprendido entre aproximadamente dieciséis horas y dos semanas. Solamente es crítico que las células puedan ser fijadas a la matriz. Dos semanas es un período de tiempo preferido para el cultivo de las células, aunque éste puede ser más largo. La densidad de las células en el momento de la siembra o implantación debería ser de aproximadamente 25.000 células/mm<sup>3</sup>.

Unos polímeros que pueden formar unos hidrogeles iónicos o reticulados covalentemente que son maleables, se usan para encapsular las células. Por ejemplo, un hidrogel se produce reticulando la sal aniónica de un polímero tal como uno de ácido algínico, un polímero de hidratos de carbono aislado a partir de algas marinas, con unos cationes de calcio, cuya fuerza aumenta o bien con concentraciones crecientes de iones de calcio o de alginato. La solución de alginato es mezclada con las células que han de ser implantadas, para formar una suspensión de alginato. Luego la suspensión es inyectada directamente dentro de un paciente antes de que se produzca un endurecimiento de la suspensión. Luego la suspensión se endurece durante un breve período de tiempo debido a la presencia in vivo de unas concentraciones fisiológicas de iones de calcio.

El material polimérico que es mezclado con las células para su implantación dentro del cuerpo debería formar un hidrogel. Un hidrogel es definido como una sustancia que se forma cuando un polímero orgánico (natural o sintético) es reticulado por medio de enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno para crear una estructura de rejilla abierta tridimensional que atrapa a las moléculas de agua para formar un gel. Unos ejemplos de materiales que se pueden usar para formar un hidrogel incluyen unos polisacáridos tales como un alginato, poli(fosfazinas) y poli(acrilatos), que son reticulados iónicamente, o unos copolímeros de bloques tales como Pluronics.TM. o Tetronics.TM., (TM es una marca registrada), unos copolímeros de bloques de poli(óxido de etileno y poli(propileno glicol)) que son reticulados por la acción de la temperatura o el pH, respectivamente. Otros materiales incluyen unas proteínas tales como fibrina, unos polímeros tales como una poli(vinilpirrolidona), ácido hialurónico y un colágeno.

En general, estos polímeros son solubles por lo menos parcialmente en unas soluciones acuosas, tales como agua, unas soluciones de sales tamponadas o unas soluciones acuosas de alcoholes, que tienen grupos laterales cargados o una sal iónica monovalente de los mismos. Unos ejemplos de polímeros con grupos laterales de carácter ácido, que se pueden hacer reaccionar con cationes, son poli(fosfazenos) poli(ácidos acrílicos), poli(ácidos metacrílicos), unos copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, un poli(acetato de vinilo) y unos polímeros sulfonados, tales como un poliestireno sulfonado. Se pueden usar también unos copolímeros que tengan grupos laterales de carácter ácido formados por reacción de ácido acrílico o metacrílico y de monómeros o polímeros de éteres vinílicos. Unos ejemplos de grupos de carácter ácido son grupos de ácidos carboxílicos, grupos de ácidos sulfónicos, grupos de alcoholes halogenados (preferiblemente fluorados), grupos OH fenólicos y grupos OH de carácter ácido.

Unos ejemplos de polímeros con grupos laterales de carácter básico que se pueden hacer reaccionar con aniones son unas poli(vinil aminas), una poli(vinil piridina), un poli(vinil imidazol) y algunos poli(fosfazenos) sustituidos con imino. La sal de amonio o cuaternaria de los polímeros puede ser formada también a partir de los nitrógenos de la cadena principal o de los grupos imino colgantes. Unos ejemplos de grupos laterales de carácter básico son grupos amino e imino.

Un alginato puede ser reticulado iónicamente con cationes divalentes, en agua, a la temperatura ambiente, para formar una matriz de hidrogel. Debido a estas condiciones suaves, el alginato ha sido el polímero más corrientemente usado para la encapsulación de células de hibridoma, tal como se describe por ejemplo, en la patente de los EE.UU. US 4.352.883 otorgada a Lim. En el procedimiento de Lim, una solución acuosa, que contiene los materiales biológicos que han de ser encapsulados, es suspendida en una solución de un polímero soluble en

agua, la suspensión es conformada en forma de gotitas que son configuradas a la forma de microcápsulas discretas por contacto con unos cationes multivalentes, luego la superficie de las microcápsulas es reticulada con poli(aminoácidos) para formar una membrana semipermeable alrededor de los materiales encapsulados.

5 Los poli(fosfazenos) son unos polímeros con unas cadenas principales que consisten en nitrógeno y fósforo y están separadas por enlaces simples y dobles que se alternan. Los poli(fosfazenos) apropiados para una reticulación tienen una mayoría de grupos de cadenas laterales que son de carácter ácido y son capaces de formar unos puentes salinos con unos cationes di- o trivalentes. Se pueden sintetizar unos polímeros que se degradan por hidrólisis incorporando unos monómeros que tienen grupos laterales de imidazol, ésteres de aminoácidos o de glicerol. Por ejemplo, se puede sintetizar un poli[bis(carboxilatofenoxi)]fosfazeno polianiónico (PCPP), que es reticulado con unos cationes multivalentes disueltos en unos medios acuosos a la temperatura ambiente o por debajo de ella para formar unas matrices de hidrogeles.

15 El polímero soluble en agua con grupos laterales cargados es reticulado iónicamente haciendo reaccionar al polímero con una solución acuosa que contiene iones multivalentes de la carga opuesta, o bien cationes multivalentes si el polímero tiene grupos laterales de carácter ácido o aniones multivalentes si el polímero tiene grupos laterales de carácter básico. Los cationes preferidos para la reticulación de los polímeros con grupos laterales de carácter ácido para formar un hidrogel son unos cationes divalentes y trivalentes tales como cationes de cobre, calcio, aluminio, magnesio, estroncio, bario, zinc y estaño, aunque se prefieren unos cationes di-, tri- o tetra-funcionales orgánicos tales como los de sales de alquil-amonio. Unas soluciones acuosas de las sales de estos cationes son añadidas a los polímeros para formar unos hidrogeles blandos, altamente hinchados y unas membranas blandas y altamente hinchadas. Cuanto más alta sea la concentración de un catión o más alta sea la valencia, tanto mayor será el grado de reticulación del polímero. Se ha demostrado que unas concentraciones tan bajas como las de 0,005 M reticulan al polímero. Unas concentraciones más altas son limitadas por la solubilidad de la sal.

25 Preferiblemente, el polímero es disuelto en una solución acuosa, de manera preferible una solución de fosfato de potasio 0,1 M, a un pH fisiológico, hasta una concentración que forma un hidrogel polimérico, por ejemplo para un alginato, de entre 0,5 y 2 % en peso, preferiblemente de 1 %, de alginato. Las células aisladas son suspendidas en la solución del polímero hasta una concentración comprendida entre 1 y 10 millones de células/ml, de manera sumamente preferible entre 10 y 20 millones de células/ml.

30 Las células son mezcladas con la solución de hidrogel e inyectadas directamente en el sitio en donde se desea implantar estas células, antes de realizar un endurecimiento del hidrogel. Sin embargo, la matriz puede también ser moldeada e implantada en una o más diferentes zonas del cuerpo para adaptarse a una aplicación particular. Esta aplicación es particularmente relevante cuando se desea un diseño estructural específico o cuando la zona dentro de la que se han de implantar las células carece de una estructura o un soporte específica/o para facilitar el crecimiento y la proliferación de las células.

35 El sitio, o los sitios, donde se han de implantar las células se determina(n) basándose en una necesidad individual, tal como lo es el número requerido de células. Se podría también emplear un molde externo para conformar a la solución inyectada. Adicionalmente, controlando la velocidad de la polimerización, es posible moldear el implante inyectado en el hidrogel con células.

40 Alternativamente, la mezcla se puede inyectar dentro de un molde, se puede permitir que el gel se endurezca y luego se puede implantar el material.

45 La suspensión puede ser inyectada a través de una jeringa y de una aguja directamente dentro de una zona específica dondequiera que se desee un agente de voluminosidad, especialmente en defectos de tejidos blandos. La suspensión puede también ser inyectada como un agente de voluminosidad para defectos de tejidos duros, tales como defectos de huesos o cartílagos, o bien unos estados de enfermedad congénitos o adquiridos, o de un modo secundario a un trauma, quemaduras o similares. Un ejemplo de esto podría ser una inyección dentro de la zona que rodea al cráneo en donde existe una deformidad ósea de modo secundario a un trauma. La inyección en estos casos puede hacerse directamente dentro de la zona que se necesita con el uso de una aguja y una jeringa bajo una anestesia local o general.

50 Las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser modificadas para expresar unas proteínas que también son útiles en las indicaciones terapéuticas, tal como se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, las células pueden incluir un ácido nucleico que produce por lo menos un factor bioactivo que induce o acelera aun más la diferenciación de las células madre mesenquimales en la forma de un linaje diferenciado. En el caso de que se esté formando un hueso, el factor bioactivo puede ser un miembro de la superfamilia de los TGF-beta, que comprende diversos factores de crecimiento tisular, particularmente proteínas morfogenéticas óseas, tales como una que se selecciona entre el conjunto que se compone de BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 y BMP-7.

55

Las células pueden ser útiles en un método para inducir *in vitro* una anergia de células T. La inducción de una anergia de células T implica cultivar las células madre mesenquimales dérmicas en la presencia de un antígeno en unas condiciones que son suficientes para inducir la formación de células T y/o de progenitores de células T y para inhibir la activación de las células T y/o de los progenitores de células T que se han formado. Una anergia es definida como un estado no responsivo de células T (esto es que ellas no son capaces de producir IL-2 al efectuarse una reestimulación, o de proliferar cuando han sido reestimuladas) (Zamoyska R, Curr Opin Immunol. 1998, 10(1):82-87; Van Parijs L, y colaboradores, Science, 1998, 280(5361):243-248; Schwartz RH, Curr Opin Immunol, 1997, 9(3):351-357; Immunol Rev; 1993, 133:151-76). Una anergia puede ser medida tomando las células T tratadas y reestimulándolas con un antígeno en la presencia de APC's. Si las células son anérgicas, ellas no responderán a un antígeno en una concentración apropiada en el contexto de las APC's.

Como se usa en el presente contexto, un individuo es un ser humano, un primate no humano, una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato o un roedor. Las células madre mesenquimales dérmicas humanas y los individuos humanos constituyen unas formas de realización particularmente importantes.

Las células madre mesenquimales que aquí se describen pueden ser tratadas por ingeniería genética (o bien transducidas o transfectadas) con un gen que interesa. Las células transducidas pueden ser administradas a un paciente que necesita de ellas, por ejemplo para tratar unos trastornos o unas enfermedades genéticos/as.

Las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, y la progenie de las mismas, se pueden alterar genéticamente. Una alteración genética de una célula madre mesenquimal dérmica positiva para ABC5 incluye todos los cambios transitorios y estables del material genético celular que son creados mediante la adición de un material genético exógeno. Unos ejemplos de alteraciones genéticas incluyen cualquier proceso de terapia génica, tal como la introducción de un gen funcional para reemplazar a un gen mutado o no expresado, la introducción de un vector que codifica un producto genético negativo dominante, la introducción de un vector tratado genéticamente para expresar una ribozima y la introducción de un gen que codifica un producto génico terapéutico. No se incluyen dentro de este concepto unos cambios genéticos naturales, tales como la reorganización espontánea de un gen de receptor de células T sin la introducción de agentes de ningún tipo. Un material genético exógeno incluye unos ácidos nucleicos o unos oligonucleótidos, ya sean naturales o sintéticos, que se introducen en las células madre mesenquimales dérmicas. El material genético exógeno puede ser una copia del que se halla de un modo natural en las células o pueden no ser hallado de modo natural en las células. Él típicamente es por lo menos una porción de un gen que se presenta de un modo natural que ha sido puesto bajo el control operativo de un promotor en una construcción artificial de vector.

Se pueden emplear diversas técnicas para introducir ácidos nucleicos dentro de células. Dichas técnicas incluyen una transfección de precipitados de un ácido nucleico y CaPO<sub>4</sub>, una transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, una transfección con un retrovirus que incluye el ácido nucleico que interesa, una transfección mediada por liposomas y otras similares. Para ciertos usos, se prefiere dirigir al ácido nucleico hacia unas células particulares como diana. En dichos casos un vehículo usado para suministrar un ácido nucleico de acuerdo con el invento dentro de una célula (p.ej. un retrovirus u otro virus; un liposoma) puede tener una molécula de diana fijada a él. Por ejemplo, una molécula tal como un anticuerpo que es específico para una proteína de membrana superficial situada en la célula diana o un ligando para un receptor situado en la célula diana puede ser unida al, o incorporada dentro del, vehículo de suministro de ácido nucleico. Por ejemplo, cuando se emplean unos liposomas para suministrar los ácidos nucleicos del invento, las proteínas que se fijan a una proteína de membrana superficial asociada con una endocitosis pueden ser incorporadas dentro de la formulación de liposomas para dirigirse a una diana y/o para facilitar la absorción y recogida. Dichas proteínas incluyen unas proteínas o unos fragmentos de las mismas que son trópicos para un particular tipo de células, unos anticuerpos para proteínas que experimentan una internalización al realizar un proceso cíclico, unas proteínas que se dirigen como diana a una localización intracelular intensifican la vida mitad intracelular, y similares. Se han usado con éxito también unos sistemas de suministro poliméricos para suministrar ácidos nucleicos a células, tal como es conocido por los expertos en la especialidad. Dichos sistemas permiten incluso un suministro de ácidos nucleicos por vía oral.

Un método de introducir un material genético exógeno dentro de las células madre mesenquimales dérmicas se realiza por transducción de las células usando unos retrovirus que son deficientes en replicación. Los retrovirus deficientes en replicación son capaces de dirigir la síntesis de todas las proteínas de viriones, pero son incapaces de producir partículas infecciosas. Conforme a ello, estos vectores retrovirales alterados genéticamente tienen una utilidad general para una transducción con alta eficiencia de genes en células cultivadas. Los retrovirus se han usado extensamente para transferir un material genético dentro de células. Se proporcionan en la especialidad unos protocolos clásicos para producir unos retrovirus deficientes en replicación (que incluyen las etapas de incorporación de un material genético exógeno dentro de un plásmido, transfección de un linaje de células empaquetadoras con un plásmido, producción de unos retrovirus recombinantes mediante el linaje de células empaquetadoras, recogida de partículas víricas a partir de unos medios de cultivo de tejidos, e infección de las células dianas con las partículas víricas).

La ventaja principal de usar los retrovirus consiste en que los virus introducen eficientemente una única copia del gen que codifica el agente terapéutico dentro del genoma de una célula anfitriona, permitiendo de esta manera que el material genético exógeno sea hecho pasar sobre la progenie de la célula cuando él se divide. Además, se ha informado de que unas secuencias promotoras de genes en la región LTR intensifican la expresión de una secuencia de codificación insertada en una diversidad de tipos de células. Las desventajas principales de usar un vector de expresión de retrovirus son (1) una mutagénesis insercional, es decir la inserción del gen terapéutico en una posición indeseable en el genoma de las células dianas que, por ejemplo, conduce a un crecimiento irregular de las células y (2) la necesidad de una proliferación de las células dianas con el fin de que el gen terapéutico llevado por el vector sea integrado dentro del genoma diana. A pesar de estas limitaciones aparentes, el suministro de una cantidad eficaz terapéuticamente de un agente terapéutico pasando por un retrovirus puede ser eficaz si es alta la eficiencia de transducción y si es alto el número de las células dianas que están disponibles para transducción.

Todavía otro candidato vírico que es útil como un vector de expresión para la transformación de células madre mesenquimales dérmicas es el adenovirus, que es un virus de ADN de doble hebra. De modo similar al retrovirus, el genoma del adenovirus es adaptable para su uso como un vector de expresión para la transducción de genes, a saber por eliminación de la información genética que controla la producción del virus propiamente dicho. A causa de que el adenovirus funciona usualmente de una manera extracromosomal, el adenovirus recombinante no tiene el problema teórico de una mutagénesis insercional. Por otro lado, una transformación mediante adenovirus de una célula madre mesenquimal dérmica diana puede no dar como resultado una transducción estable. Sin embargo, más recientemente se ha informado de que ciertas secuencias de adenovirus confieren una especificidad para la integración intracromosomal a unas secuencias portadoras, y por lo tanto dan como resultado una transducción estable del material genético exógeno.

Por lo tanto, tal como resultará evidente a una persona que tiene experiencia ordinaria en la especialidad, están disponibles una diversidad de vectores apropiados para transferir un material genético exógeno dentro de células madre mesenquimales dérmicas. La selección de un vector apropiado para suministrar un agente terapéutico para una condición particular adaptable a una terapia por reemplazo de genes y la optimización de las condiciones para la inserción del vector de expresión seleccionado dentro de la célula, se encuentran dentro del alcance de una persona con experiencia ordinaria en la especialidad sin la necesidad de una experimentación indebida. El promotor tiene característicamente una específica secuencia de nucleótidos, que es necesaria para iniciar la transcripción. Opcionalmente el material genético exógeno incluye por lo demás unas secuencias (esto es, unos intensificadores) adicionales que se requieren para obtener la deseada actividad de transcripción de genes. Para la finalidad de este debate, un "intensificador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que trabaja en un lugar contiguo a la secuencia de codificación (en cis) para cambiar el nivel de transcripción basal que es dictado por el promotor. Preferiblemente, el material genético exógeno es introducido dentro del genoma de las células madre mesenquimales dérmicas inmediatamente secuencia abajo con respecto del promotor, de manera tal que el promotor y la secuencia de codificación están engarzados operativamente de manera tal que permiten la transcripción de la secuencia de codificación. Un preferido vector de expresión de retrovirus incluye un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno introducido. Dichos promotores exógenos incluyen unos promotores tantos constitutivos como inducibles.

Los promotores constitutivos que se presentan de modo natural controlan la expresión de unas esenciales funciones de las células. Como resultado de ello, un gen es expresado bajo el control de un promotor constitutivo en todas condiciones del crecimiento de las células. Unos promotores constitutivos ilustrativos incluyen los promotores para los siguientes genes que codifican ciertas funciones constitutivas o "domésticas": una hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), una dihidrofolato reductasa (DHFR) (Scharfmann y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4626-4630 (1991)), una adenosina desaminasa, una fosfoglicerol cinasa (PGK), una piruvato cinasa, una fosfoglicerol mutasa, el promotor de actinas (Lai y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10006-10010 (1989)), y otros promotores constitutivos que son conocidos por los que tienen experiencia en la especialidad. Por lo demás, muchos promotores víricos funcionan de una manera constitutiva en células eucarióticas. Éstos incluyen: los promotores temprano y tardío de SV40; las repeticiones terminales largas (LTRS) del Virus de la Leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de timidina cinasa del Virus del Herpes Simple. De un modo correspondiente, cualquiera de los promotores constitutivos a los que más arriba se ha hecho referencia se puede usar para controlar la transcripción de un injerto de gen heterólogo.

Los genes que están puestos bajo el control de unos promotores inducibles son expresados solamente, o en un mayor grado, en la presencia de un agente inductor, (p.ej. una transcripción bajo el control del promotor de metalotioneina, es aumentada en gran manera en la presencia de ciertos iones de metales). Unos promotores inducibles incluyen unos elementos responsivos (RE's de responsive elements) que estimulan la transcripción cuando sus factores inductores están fijados. Por ejemplo, hay unos RE's para factores de suero, hormonas esteroides, ácido retinoico y AMP cíclico. Unos promotores que contienen un RE particular se pueden escoger con el fin de obtener una respuesta inducible y, en algunos casos, el RE propiamente dicho puede ser fijado a un promotor diferente, confiriendo de esta manera una inducibilidad al gen recombinante. Por lo tanto, por selección del apropiado promotor (constitutivo frente a inducible; fuerte frente a débil) es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de un agente terapéutico en la célula madre mesenquimal dérmica que ha sido modificada

genéticamente. Se estima que una selección y una optimización de estos factores para el suministro de una dosis efectiva terapéuticamente de un agente terapéutico particular están dentro del alcance de una persona con experiencia ordinaria en la especialidad sin ninguna experimentación indebida, tomando en cuenta los factores más descritos y el perfil clínico del individuo.

5 Además de por lo menos un promotor y de por lo menos un ácido nucleico heterólogo que codifica el agente terapéutico, el vector de expresión incluye preferiblemente un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a la neomicina, para facilitar la selección de unas células madre mesenquimales dérmicas que han sido transfectadas o transducidas con el vector de expresión. Alternativamente, las células madre mesenquimales dérmicas son transfectadas con dos o más vectores de expresión, por lo menos un vector que contiene el (los) gen(es) que  
10 codifica(n) el (los) agente(s) terapéutico(s), conteniendo el otro vector un gen de selección. Se estima que la selección de un promotor, de un intensificador, de un gen de selección y/o de una secuencia de señal apropiado/a están dentro del alcance de una persona con experiencia ordinaria en la especialidad sin ninguna experimentación indebida.

15 La selección y la optimización de un vector de expresión particular para expresar un producto génico específico en una célula madre mesenquimal dérmica aislada se consigue obteniendo el gen, de manera preferible con una o más apropiadas regiones de control (p.ej. el promotor, la secuencia de inserción); preparando una construcción artificial de vector que comprende el vector dentro del cual se ha insertado el gen; transfectando o transduciendo las células madre mesenquimales dérmicas cultivadas *in vitro* con la construcción artificial de vector; y determinando si el producto génico está presente en las células cultivadas.

20 Por lo tanto, es posible tratar por ingeniería genética a unas células madre mesenquimales dérmicas de una manera tal que ellas produzcan unos polipéptidos, unas hormonas y proteínas que no se producen normalmente en células madre humanas en unas cantidades biológicamente significativas o que se producen en pequeñas cantidades, pero solamente en unas situaciones en las que una sobreproducción podría conducir a un beneficio terapéutico. Estos productos serían entonces secretados dentro del torrente sanguíneo o de otras zonas del cuerpo, tales como el  
25 sistema nervioso central. Las células madre humanas que se forman de esta manera pueden servir como unos sistemas de suministro continuo de fármacos para reemplazar a los actuales regímenes, que requieren una administración periódica (por ingestión, inyección, infusión de depósito (con liberación retardada), etc) de la sustancia necesaria. Esto tiene una aplicabilidad para proporcionar hormonas, enzimas y fármacos a unos seres humanos que tienen necesidad de dichas sustancias. Esto es particularmente valioso para proporcionar dichas  
30 sustancias, tales como unas hormonas, (p.ej. la hormona paratiroidea, insulina) que se necesitan en dosis sostenidas y prolongadas durante extensos períodos de tiempo.

Para dar unos ejemplos, esto se puede usar para proporcionar un suministro continuo de insulina y, como resultado de ello, no habría necesidad de efectuar inyecciones diarias de insulina. Unas células madre mesenquimales humanas tratadas por ingeniería genética se pueden usar también para la producción de unos factores de  
35 coagulación tales como el factor VIII, o para el suministro continuo de distrofina a las células de músculos para curar una distrofia muscular.

La incorporación de un material genético que interesa dentro de células madre mesenquimales dérmicas es particularmente valiosa en el tratamiento de una enfermedad heredada y adquirida. En el caso de unas enfermedades heredadas, este enfoque se usa para proporcionar células madre mesenquimales humanas modificadas genéticamente y otras células que se pueden usar como un sumidero metabólico. Esto quiere decir que  
40 dichas células madre mesenquimales dérmicas podrían servir para degradar a una sustancia potencialmente tóxica. Por ejemplo, esto se podría usar en el tratamiento de unos trastornos del catabolismo de aminoácidos que incluyen las hiperfenilalaninemias, debidas a un defecto en fenilalanina hidroxilasa; las homocisteinemias, debidas a un defecto en cistationina beta-sintasa.

45 Las células madre mesenquimales dérmicas pueden ser modificadas adicionalmente para expresar una molécula inductora de muerte celular con el fin de intensificar la eliminación de células T activadas, en el tratamiento de un trasplante de órgano o de tejido. Por ejemplo, la molécula inductora de muerte celular puede ser expresada por las células madre mesenquimales que han sido tratadas genéticamente para expresar la molécula inductora de muerte celular exógena. Como se utiliza en el presente contexto, una "molécula inductora de muerte celular" es una  
50 molécula que interactúa o se fija con su receptor cognado (es decir relacionado en sangre) en una célula T estimulada que induce la muerte o apoptosis de células T. El Fas media en la apoptosis de unas células T recientemente activadas que ya están expuestas a una estimulación (van Parijs y colaboradores, Immunity 4: 321-328 (1996)). El Fas es un receptor de membrana del tipo I que, cuando ha sido reticulado por su ligando cognado, induce una apoptosis en una amplia diversidad de células. La interacción entre la molécula de Fas (CD95) en unas  
55 células T dianas y su ligando Fas L en unas células madre mesenquimales da como resultado una agregación del receptor, que transduce unas señales que conducen a una apoptosis de la célula diana. Se ha mostrado que el sistema de Fas está implicado en un cierto número de funciones de células in vivo que incluyen una selección negativa de timocitos, manteniendo unos sitios de privilegio inmunitario dentro del cuerpo, y una citotoxicidad

mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL, acrónimo de Cytotoxic T Lymphocyte) (Green y Ware, Proc Natl Acad Sci, 94(12):5986-90 (1997)).

5 Otros miembros de la familia de los receptores de factores de necrosis tumoral (TNFR, acrónimo de Tumor Necrosis Factor Receptors) tienen ciertos cometidos en una muerte celular programada. El ligando TRAIL, que interactúa con su receptor DR4, puede inducir una apoptosis en diversidad de linajes de células transformadas (G. Pan y colaboradores Science, 277:815-818 (1997)); y la expresión de CD27 y de su ligando CD70 (Prasad y colaboradores, Proc Natl Acad Sci, 94:6346-6351 (1997)) también inducen una apoptosis. La expresión del Fas está restringida a unas células T estimuladas y a unos sitios de privilegio inmunitario. El TRAIL es detectado en muchos tejidos normales.

10 Tanto el ligando de Trail como el CD27, pero no el ligando de Fas son expresados en células madre mesenquimales humanas no manipuladas. Unas células T activadas, pero no en reposo, expresan el receptor de Trail y el CD70. La mayor parte de las células T encontradas en el cuerpo están en un estado de reposo; las células T son activadas cuando ellas se encuentran con unas células tanto en el contexto de las MHC como de la apropiada molécula concomitantemente estimuladora tal como B7-1 o B7-2.

15 Por lo tanto el compromiso de receptores de muerte celular en unas células T activadas con sus ligandos expresados en las madres mesenquimales da como resultado una muerte de células T a través de una apoptosis. Los ligandos y sus receptores distintos de los que se han mencionado anteriormente de manera específica, que o bien están presentes dentro de la célula madre mesenquimal o han sido introducidos dentro de la célula madre mesenquimal pueden desempeñar esta función. Por lo tanto, unas células madre mesenquimales administradas a un individuo delecionan (suprimen) a las células T activadas, reduciendo la gravedad o la incidencia de una enfermedad causada por el rechazo de un trasplante.

20 La dosis de las células madre mesenquimales dérmicas varía dentro de amplios límites y, desde luego, será ajustada a los requisitos individuales en cada caso particular. El número de las células que se usan dependerá del peso y de la condición del recipiente y de otras variables que son conocidas por los que poseen experiencia en la especialidad.

25 Las células pueden ser administradas por una ruta que es apropiada para el tejido u órgano particular que ha de ser tratado. Unos modos de administración de la preparación de células madre mesenquimales incluyen, pero no están limitados a, una inyección intravenosa sistémica y una inyección realizada directamente en el pretendido sitio de la actividad. La preparación puede ser administrada por cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolos, y puede ser administrada conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración se realiza preferiblemente por vía sistémica, es decir por vía parenteral, mediante una inyección intravenosa. En algunos casos, las células madre mesenquimales dérmicas son suministradas al sitio del tratamiento o de la terapia que se desea y pueden ser dirigidas hacia un tejido u órgano particular como diana.

30 En general, en el caso de una administración por vía parenteral, se acostumbra administrar desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del recipiente. El número de las células que se usan dependerá del peso y de la condición del recipiente, del número o de la frecuencia de las administraciones, y de otras variables que son conocidas por los que poseen experiencia en la especialidad. Las células madre mesenquimales pueden ser administradas por una ruta que es apropiada para el tejido, el órgano o las células que se ha(n) de trasplantar. Ellas pueden ser administradas por vía sistémica, es decir por vía parenteral, mediante una inyección intravenosa o pueden ser dirigidas a un tejido u órgano particular como diana, tal como una médula ósea. Las células madre mesenquimales humanas se pueden administrar pasando por una implantación de células por vía subcutánea o por una inyección de células madre mesenquimales dentro de un tejido conjuntivo, por ejemplo un músculo.

35 Las células pueden ser suspendidas en un diluyente apropiado, en una concentración de desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml. Unos excipientes apropiados para soluciones inyectables son los que son compatibles biológica y fisiológicamente con las células y con el recipiente, tales como una solución salina tamponada u otros excipientes apropiados. La composición para administración debe ser formulada, producida y almacenada de acuerdo con unos métodos normalizados que cumplan con una esterilidad y una estabilidad apropiadas. Otros excipientes incluyen agua, una solución isotónica, unas soluciones de sal común, unos alcoholes, unos polioles, glicerol y unos aceites vegetales. La composición para administración debe ser formulada, producida y almacenada de acuerdo con unos métodos normalizados que cumplan con una esterilidad y una estabilidad apropiadas.

40 La célula madre mesenquimal puede ser administrada a solas, pero en unas formas de realización preferidas las células madre mesenquimales son utilizadas en la forma de unas composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad efectiva terapéuticamente de las células madre mesenquimales dérmicas

y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo incluye, pero no se limita a, una solución salina, una solución salina tamponada, dextrosa, agua y combinaciones de éstas.

5 Preferiblemente, la preparación o composición de células madre mesenquimales es formulada de acuerdo con unos procesos rutinarios como una composición farmacéutica que está adaptada para una administración por vía intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones destinadas a una administración por vía intravenosa son unas soluciones en un tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un anestésico local para dar mejoría a cualquier dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes son suministrados o bien por separado o mezclados conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un concentrado conservado criogénicamente dentro de un recipiente cerrado herméticamente, tal como una ampolla que indica la cantidad del agente activo. Cuando la composición ha de ser administrada por infusión, ella puede ser dispensada con una botella para infusión que contiene agua o una solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición es administrada por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o una solución salina de manera tal que los ingredientes puedan ser mezclados antes de su administración.

15 También se describen unos envases farmacéuticos previamente llenados (p.ej. unos viales de inyección, unas ampollas, unas bolsas de infusión, etc.) que contienen una dosis unitaria de células (a saber, el número de células que se han de administrar de una sola vez a un paciente). Las células pueden ser suspendidas en una solución (p.ej., una solución salina isotónica estéril) conjuntamente con unos agentes que ayuden a su conservación (p.ej. glicerol). Se pueden incluir también otros agentes, tales como antibióticos, sales farmacéuticamente aceptables, tampones y excipientes. Los envases farmacéuticos previamente llenados en una forma de dosis unitaria pueden ser mantenidos en estado refrigerado o pueden ser almacenados en un estado congelado. Ellos se pueden suministrar también como una parte de un estuche que tiene unas instrucciones para la administración de las células a unos pacientes de trasplantes o a unos pacientes con una enfermedad autoinmunitaria.

25 El presente texto se refiere también a cualquiera de las composiciones más arriba mencionadas dentro de unos estuches, que incluyen opcionalmente unas instrucciones para el uso de la composición destinada al tratamiento de una condición que aquí se describe. Esto quiere decir que el estuche puede incluir una descripción del uso de la composición para su participación en cualquier mecanismo biológico o químico que aquí se haya descrito. Los estuches pueden incluir además una descripción de la actividad de la condición en el tratamiento de la patología, en vez de los síntomas de la condición. Esto quiere decir que el estuche puede incluir una descripción del uso de las composiciones que se debaten aquí. El estuche puede incluir también unas instrucciones para el uso de una combinación de dos o más composiciones como aquí se describen o unas instrucciones para el uso de una combinación de una composición como aquí se describe y de uno o más otros compuestos que estén indicados para el tratamiento de las enfermedades. Se pueden proporcionar también unas instrucciones para administrar la composición por cualquier técnica apropiada como ha sido descrita con anterioridad, por ejemplo, por vía oral, por vía intravenosa, por bombeo o por un dispositivo de suministro implantable o pasando por otra ruta conocida para el suministro de fármacos. Los estuches pueden comprender también uno o más reactivos asociados con el aislamiento y la purificación de las células madre mesenquimales dérmicas, es decir anticuerpos de ABCB5 e instrucciones para el aislamiento y/o la purificación de las células.

40 Los estuches que aquí se describen pueden contener también uno o más envases que pueden contener la composición y otros ingredientes que más arriba se han descrito. Los estuches pueden contener también unas instrucciones para mezclar, diluir y/o administrar las composiciones del invento en algunos casos. Los estuches pueden incluir también otros envases con uno o más disolventes, agentes tensioactivos, conservantes y/o diluyentes (p.ej. una solución salina (NaCl al 0,9 %), o dextrosa al 5 %), así como unos envases destinados a mezclar, diluir o administrar los componentes en una muestra o a un individuo que tiene necesidad de dicho tratamiento.

45 Las composiciones del estuche pueden ser proporcionadas como cualquier forma apropiada, por ejemplo como unas soluciones líquidas o como unos polvos secos. Cuando la composición proporcionada es un polvo seco, la composición puede ser reconstituida por la adición de un disolvente apropiado, que también se puede proporcionar. Cuando se usan unas formas líquidas de la composición, la forma líquida puede ser concentrada o estar presta para el uso. El disolvente dependerá de la composición y del modo de uso o de administración. Unos apropiados disolventes para composiciones de fármacos son bien conocidos, por ejemplo como se han descrito con anterioridad, y están disponibles en la bibliografía. El disolvente dependerá de la composición y del modo de uso o administración.

50

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

#### A. La ABCB5 marca a MSC dérmicas murinas

La glicoproteína P ABCB5 humana marca a una subpoblación de células madre que expresan el fenotipo de MSC en una piel fisiológica y en melanomas malignos (Frank y colaboradores J. Biol. Chem. 278:47156 (2003); Frank y colaboradores, Cancers Res. 65:4320 (2005)). La ABCB5 murina, de la que se encontró en unos experimentos de transfección que es reconocida por el mAb anti-ABCB5 3C2-1D12 que está dirigido contra un epítipo extracelular conservado en cuanto a la especie de la molécula (Frank, y colaboradores, J. Biol. Chem 278:47156 (2003)), marca a unas subpoblaciones de MSC dérmicas idénticas, tal como se determina por una tinción inmunoenzimática con HRP para la ABCB5, cuando unas secciones de tejido congeladas se comparan a través de la anastomosis de xenoinjertos de piel de seres humanos y de ratones SCID.

#### B. Clonación y caracterización de células madre mesenquimales dérmicas ABCB5<sup>+</sup>

Se desarrolló un protocolo para estudiar las propiedades moduladoras de inmunidad de las MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup>. El protocolo incluía aislar, clonar, propagar y expandir *in vitro* esta población de células madre en unas condiciones definidas del medio, que han sido descritas con anterioridad (Frank, y colaboradores, J Biol. Chem. 278:47156 (2003)). Dicho brevemente, una piel murina se cosechó a partir de ratones de raza Balb/c o C57BL/6 adultos (con una edad de 6-10 semanas) (unos ratones de los tipos silvestres C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) y BALB/c (H-2<sup>d</sup>) se obtuvieron de la entidad Taconic Farms, Germantown NY), se disecó en forma de pequeños trozos y se disoció con una colagenasa, seguido por el aislamiento de células ABCB5<sup>+</sup> usando unos mAb anti-ABCB5, unas microperlas magnéticas revestidas con Ig anti-ratón de cabra y unas columnas de separación MiniMACS, y por una subsiguiente clonación de las células por medio de una dilución limitadora. La expresión en la superficie de la ABCB5 murina se determinó en sucesivas pasadas de células que se habían derivado por clonación usando una tinción de inmunofluorescencia con unos mAb anti-ABCB5 y una citometría de flujo (Fig. 1A, B).

Mientras que la ABCB5 fue expresada en pasadas tempranas por la mayoría de las células (Fig. 1A), hemos hallado ABCB5 expresada por el 5-15 % de las células en sucesivos cultivos derivados de células individuales (Fig. 1B), lo que indica que unas células madre ABCB5<sup>+</sup> dan lugar en cultivo a una progenie ABCB5<sup>+</sup> más diferenciada. No obstante, unas células dérmicas ABCB5<sup>+</sup> mantuvieron unas relaciones constantes de abundancia relativa en comparación con unas poblaciones ABCB5<sup>+</sup> en mayoría durante una expansión en cultivo a largo plazo, demostrando una capacidad de auto-renovación de este subconjunto de células. Una caracterización fenotípica adicional de cultivos derivados de células individuales Balb/c murinas reveló una expresión significativa de los marcadores asociados con las MSC CD29 (98,1±0,1 %; media ±SD [desviación típica]), CD44 (95,6±4,7 %), CD49e (95,2±3,5 %), CD166 (14,5±2,4 %), y CD133 (4,0±1,4 %) entre todas las células incluso en pasadas posteriores (> 30, n = 3), siendo observada una expresión preferente de los más primitivos marcadores de células madres CD133 y CD166 en subpoblaciones ABCB5<sup>+</sup> comparadas con unas subpoblaciones ABCB5<sup>-</sup> (76,4±18,5 % frente a 0,7±0,9 % y 70,7±17,9 % frente a 10,8±2,8 %, respectivamente media ±SD) (Fig. 2). Se encontró que unas MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> derivadas por clonación poseen un potencial de diferenciación multipotente, que es además indicativo de su fenotipo de MSC, en distintas condiciones de cultivo *in vitro*, con una capacidad de generar miocitos, osteocitos y adipocitos multinucleados que expresan la cadena pesada de miosina cuando están teñidos con unos marcadores de linajes apropiados (mAb anti-cadena pesada de miosina conjugados con FITC, tinción con Alizarin Red S, tinción con Oil Red, respectivamente).

### Ejemplo 2:

#### Efecto modulador de inmunidad de MSC dérmicas positivas para ABCB5

A. La función moduladora de inmunidad de unas MSC dérmicas derivadas por clonación de ABCB5<sup>+</sup> se estudió *in vivo*, usando un modelo de alotrasplante cardiaco heterotópico murino como ha sido descrito con anterioridad (Yamada, y colaboradores, J. Immunol. 167:140 (2001)). En una combinación de razas plenamente mal emparejadas, el tratamiento de recipientes C57BL/6 de aloinjertos cardiacos Balb/c con unas MSC dérmicas del tipo de donante (3x10<sup>6</sup> células *i.v.*, día -7) dio como resultado una significativa prolongación de la supervivencia de los aloinjertos en comparación con unos recipientes testigos o bien tratados con esplenocitos del tipo del donante o no tratados (supervivencia mediana de los injertos durante 29,5 días frente a 10 días ( $P = 0,012$ ) o 7,5 días ( $P = 0,006$ ), respectivamente), (Fig. 3A) demostrando la eficacia *in vivo* de las MSC dérmicas para retrasar un rechazo de injerto.

B. La supervivencia de los aloinjertos a largo plazo durante > 100 días se consiguió en n = 4/4 animales cuando un tratamiento con MSC dérmicas se combinó con un bloqueo concomitantemente estimulador dirigido hacia el CD40L usando el mAb anti-CD40L MR1 (250 mg/kg i.p. q.o.d. (cualquier otro día) desde el día 0-10) como anteriormente se ha descrito (Ozkaynak y colaboradores, J. Immunol. 169: 6546 (2002); Kishimoto y colaboradores, J. Clin. Invest. 106:63 (2000)) (Fig. 3B). Unas MSC dérmicas de raza Balb/c de una tercera parte, también prolongaban la supervivencia de aloinjertos cardiacos en unos recipientes C57BL/6 de corazones de C3H/HeJ en comparación con unos testigos sin tratar (supervivencia mediana de los injertos 28 días, frente a 7,5 días,  $P=0,016$ ) (Fig. 3C). Unos recipientes Balb/c de aloinjertos de corazones de C57BL/6 tratados con unas MSC de la raza del recipiente, sin embargo, rechazaron los corazones de los donantes con el mismo tempo que unos ratones testigos no tratados (Fig. 3D). Los resultados sugieren que una administración de MSC para conseguir una prolongación de la supervivencia de los aloinjertos es sumamente efectiva en estas condiciones en la presencia de un estímulo alogeneico dependiente de células madre. Esto, sin embargo, no excluye una actividad en condiciones más rigurosas con células no alogeneicas.

### Ejemplo 3:

15 *Unas MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> expresan concomitantemente in vivo el PD-1 y después de un alotrasplante activan la expresión del ligando PD-L2 de PD-1 en células T del recipiente*

La ruta concomitantemente estimuladora negativa para PD-1-(PD-L1/PD-L2) ha sido implicada recientemente en la regulación in vitro de la inmunidad mediada por BM-MSC (Augello y colaboradores, Eur. J. Immunol. 35:1482 (2005)). El mecanismo que subyace en una prolongación, mediada por unas MSC dérmicas, de la supervivencia de aloinjertos cardiacos, fue estudiado analizando sistemáticamente la expresión de unos conocidos receptores concomitantemente estimuladores y de sus ligandos (Rothstein, y colaboradores, Immunol. Rev. 196:85 (2003)) en unas MSC dérmicas que se derivan de ABCB5<sup>+</sup> de Balb/c.

Entre > (= más de) 20 moléculas concomitantemente estimuladoras examinadas, una doble tinción de inmunofluorescencia y una citometría de flujo revelaron una expresión concomitante de ABCB5 con la molécula concomitantemente estimuladora negativa PD-1, (Fig. 4F) pero no con sus ligandos, PD-L1 (Fig. 4G) y PD-L2 (Fig. 4H), que no son expresados por MSC dérmicas, y se compararon con los testigos (Fig. 4A, E, B-D). No se detectó ninguna expresión significativa de moléculas concomitantemente estimuladoras positivas. Un examen de la expresión in vivo de moléculas concomitantemente estimuladoras en células inmunitarias periféricas de recipientes C57BL/6 a los 7 días a continuación de una inyección i.v. de  $3 \times 10^6$  MSC dérmicas de Balb/c alogeneicas, antes de un alotrasplante cardiaco, revelaron que un tratamiento con MSC dérmicas había activado de una manera específica y significativa ( $P < 0,01$ ) la expresión del ligando de PD-1 PD-L2 en  $12,5 \pm 3,8$  % de las células T CD4<sup>+</sup> del recipiente (media  $\pm$  SD) y en  $12,9 \pm 2,4$  % de células T CD8<sup>+</sup> del recipiente, pero no en APC's CD11c<sup>+</sup> del recipiente cuando se compararon con unos animales testigos tratados con esplenocitos de Balb/c o ingenuos (Fig. 5C). Por lo demás, la expresión de células T del recipiente por el ligando PD-L1 de PD-1 fue conservada en animales tratados con MSC dérmicas, a diferencia de en ratones tratados con esplenocitos de Balb/c alogeneicos, en donde la expresión de PD-L1 estaba marcadamente regulada en sentido descendente (Fig. 5B). No se detectó una pauta de expresión diferencial de PD-1 en células inmunitarias del recipiente (Fig. 5A).

Estos hallazgos sugieren que el efecto supresor de inmunidad de unas MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> en un alotrasplante está vinculado estrechamente con una expresión concomitante específica del estimulador concomitante negativo PD-1. Además la inducción específica, mediada por MSC dérmicas, de la expresión de PD-L2 en células T del recipiente sugiere un cometido funcional de estas poblaciones celulares que no habían sido reconocidas con anterioridad en la prolongación de una supervivencia de aloinjertos cardiacos.

### Ejemplo 4:

*Función moduladora de inmunidad in vivo de MSC dérmicas murinas ABCB5<sup>+</sup>.*

45 Cuando  $3 \times 10^6$  MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> murinas derivadas por clonación, autólogas, fueron injertadas por vía intravenosa (i.v.) en unos ratones C57/BL6, una administración de MSC dérmicas ABCB5<sup>+</sup> dio como resultado una reducción de 3,4 veces en la expresión en la superficie del miembro CD40 de la ruta concomitantemente estimuladora en unas APC's CD11c<sup>+</sup> aisladas a los 7 días después del trasplante a partir de los bazo de unos animales tratados con MSC en comparación con unas APC's CD11c<sup>+</sup> que se derivan de unos testigos no tratados (48,71  $\pm$  11,43 % frente a 14,34  $\pm$  4,53 %,  $P < 0,05$ , media  $\pm$  SEM) (Fig. 6A), lo que indica que un trasplante in vivo de MSC dentales que se derivan de ABCB5<sup>+</sup> puede inhibir a una señal concomitantemente estimuladora positiva expresada en APC que está implicada críticamente en la activación de células T. Las células T que se derivan de unos animales tratados con MSC autólogos exhibieron una proliferación significativamente perjudicada en comparación con las que se derivaban de unos animales testigos sin tratar, o bien para una estimulación alogeneica en unas clásicas reacciones de linfocitos mezclados en una vía (MLR) con esplenocitos de Balb/c o C3H/HeJ ingenuos irradiados (inhibición 82 %  $\pm$  9 % para unos estimuladores de Balb/c y de 84 %  $\pm$  5 % para unos

estimuladores de C3H/HeJ con unas relaciones de estimuladores a respondedores de 1:1, media  $\pm$  SD,  $P < 0,001$ , respectivamente) (Fig. 6B y 6C), o para una estimulación mitogénica con ConA (Fig. 6D). Estos hallazgos muestran que unas MSC dérmicas murinas ABCB5<sup>+</sup> pueden ejercer unos distintos efectos moduladores tanto sobre la maduración de APC como sobre la activación de células T in vivo.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método de obtener una preparación sustancialmente pura aislada de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 a partir de una muestra de piel que se había obtenido a partir de un donante humano, que comprende:
- 5 (i) aislar células dérmicas positivas para ABCB5 a partir de la muestra de piel usando un anticuerpo contra ABCB5;
- (ii) expandir las células dérmicas positivas para ABCB5 por una clonación de diluciones limitadoras o una
- 10 (iii) formular las células dérmicas positivas para ABCB5 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde las células dérmicas positivas para ABCB5 constituyen por lo menos un 95 % de la preparación sustancialmente pura aislada de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células dérmicas positivas para ABCB5 son aisladas usando un anticuerpo inmovilizado contra ABCB5.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que unas células dérmicas positivas para ABCB5, son aisladas usando un anticuerpo que ha sido inmovilizado sobre perlas y luego expandido por clonación de diluciones limitadoras.
4. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en una terapia.
- 20 5. Una composición de una preparación sustancialmente pura aislada de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 **caracterizada por** la expresión de ABCB5 en la superficie de sus células, formulada en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que es un tampón acuoso isotónico estéril, en la que las células dérmicas positivas para ABCB5 constituyen por lo menos un 95 % de la preparación sustancialmente pura aislada de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5.
- 25 6. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de un individuo que tiene un trasplante de órgano para favorecer la supervivencia de un aloinjerto, opcionalmente en donde el aloinjerto está seleccionado entre el conjunto que consiste en: corazón, cerebro, pulmones; hígado; y riñón.
7. La composición destinada a su uso en el tratamiento de un individuo de acuerdo con la reivindicación 6, en la que las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 son singeneicas.
- 30 8. La composición destinada a su uso en el tratamiento de un individuo de acuerdo con la reivindicación 6, en la que las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 son alogeneicas.
9. La composición destinada a su uso en el tratamiento de un individuo de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 son administradas al individuo al menos en un momento seleccionado entre
- 35 a) antes del trasplante de los órganos;
- b) al mismo tiempo que los trasplantes de los órganos; o
- c) después del trasplante de los órganos.
- 40 10. La composición destinada a su uso en el tratamiento de un individuo de acuerdo con la reivindicación 6, en la que las células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 tienen como exógeno un ácido nucleico que es opcionalmente un vector.
11. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, opcionalmente en la que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del conjunto que consiste en: esclerosis múltiple; artritis reumatoide; lupus sistémico eritematoso; escleroderma; psoriasis; miastenia grave; la enfermedad de Grave; la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.
- 45 12. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad de hígado, opcionalmente en la que la enfermedad de hígado es una hepatitis.
13. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en la que la enfermedad neurodegenerativa está asociada con

una respuesta inmunitaria contra células del anfitrión y opcionalmente en la que la enfermedad neurodegenerativa es la esclerosis lateral amiotrófica.

5 14 Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular está asociada con una remodelación de tejido, opcionalmente en donde la enfermedad cardiovascular es una aterosclerosis o un infarto de miocardio.

15. Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5 destinada a su uso en el tratamiento de un daño para un tejido en un individuo que necesita de éste, en donde el tejido es un hueso o un cartílago.

10 16 Una composición de células madre mesenquimales dérmicas positivas para ABCB5, destinada a su uso en el tratamiento de una enfermedad de riñón.

17. Una preparación aislada de células madre mesenquimales dérmicas moduladoras de inmunidad, **caracterizada por** la expresión de ABCB5 en la superficie de sus células, opcionalmente en donde la preparación aislada de células madre mesenquimales dérmicas moduladoras de inmunidad es sustancialmente pura.

15 18. Un vial de inyección previamente llenado, una ampolla o una bolsa de infusión que comprende, en una forma de dosificación unitaria, las células madre mesenquimales dérmicas aisladas de la reivindicación 17.

20 19. Un estuche que comprende un vial de inyección previamente llenado, una ampolla o una bolsa de infusión en una forma de dosificación unitaria que comprende unas células madre mesenquimales dérmicas moduladoras de inmunidad aisladas que expresan ABCB5 en la superficie de sus células, opcionalmente en donde el vial de inyección, la ampolla o la bolsa de infusión comprende  $1 \times 10^8$  -  $5 \times 10^9$  células madre mesenquimales dérmicas conjuntamente con unas instrucciones acerca de la administración de las células madre mesenquimales dérmicas o bien a un individuo que ha sido sometido, o que está presto para ser sometido, a un trasplante de órgano, o a un individuo que tiene una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad de hígado, una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad cardiovascular.

25

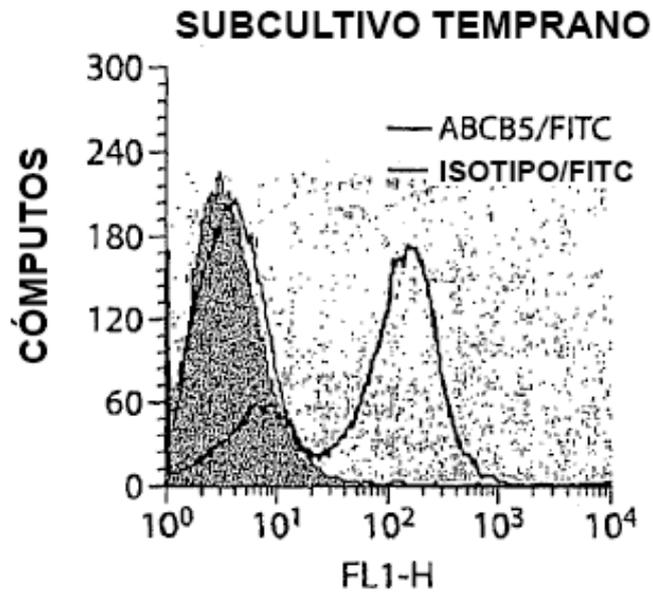


Fig. 1A

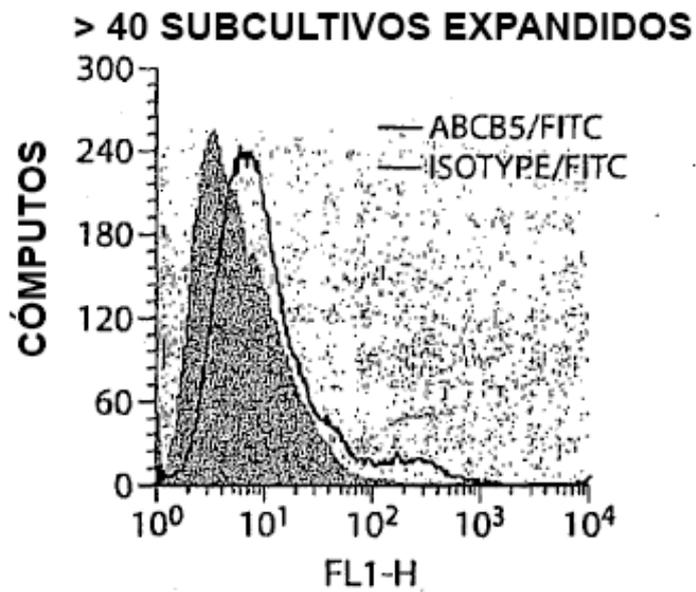


Fig. 1B

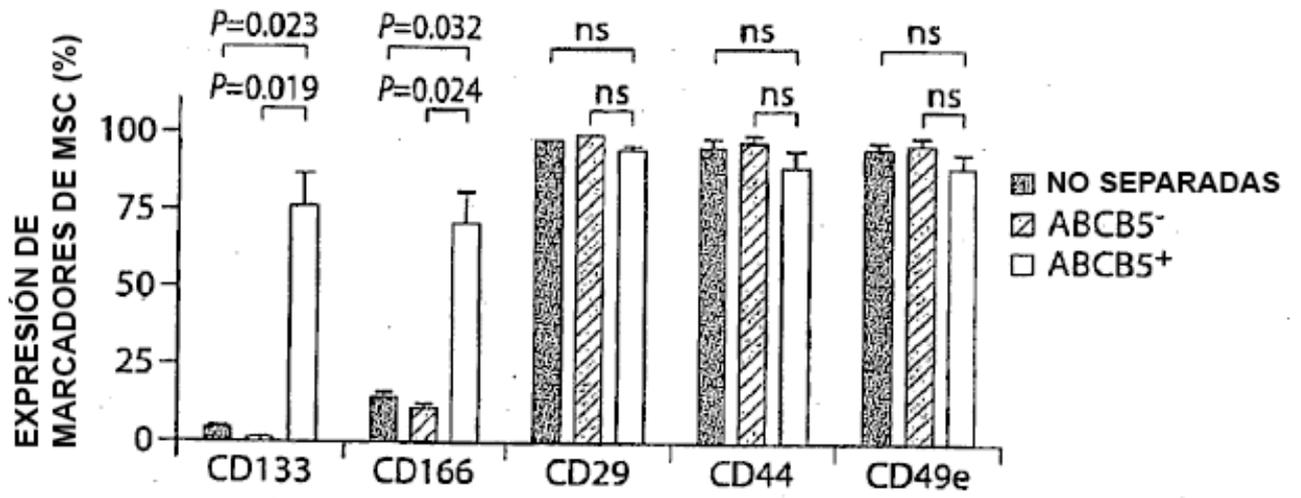


Fig. 2

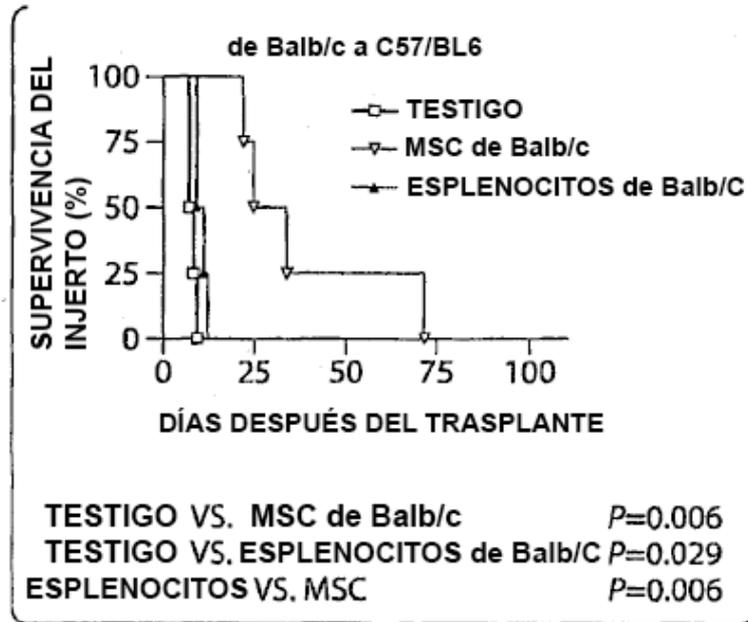


Fig. 3A

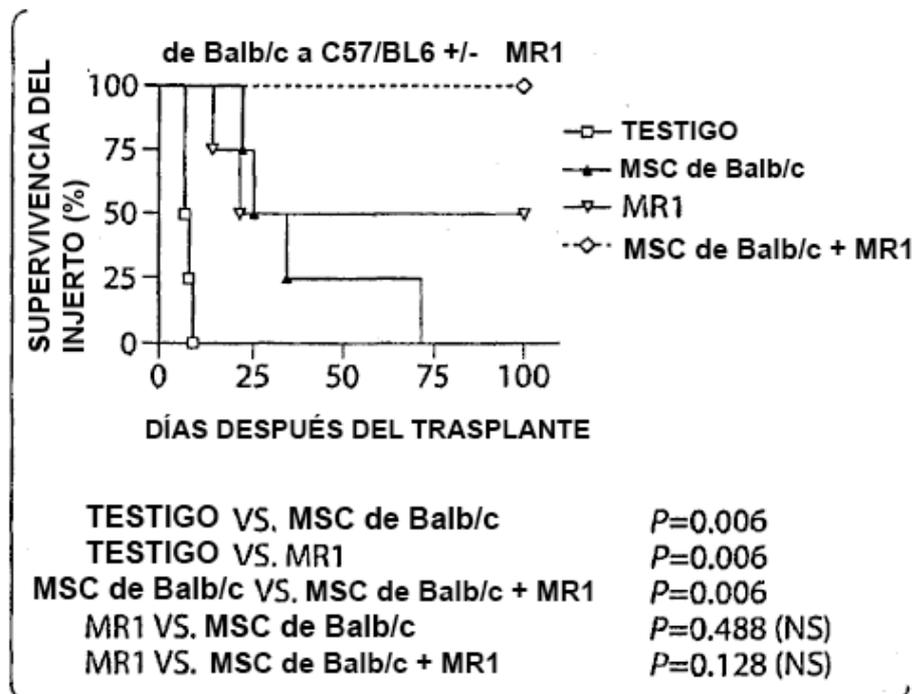


Fig. 3B

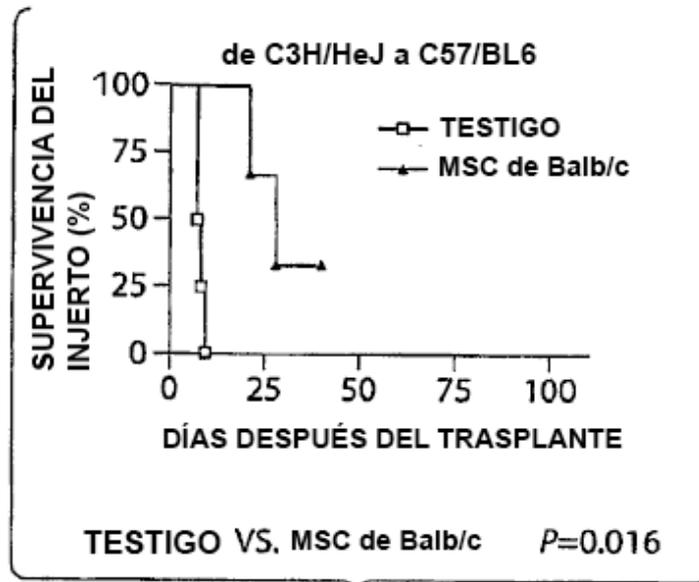


Fig. 3C

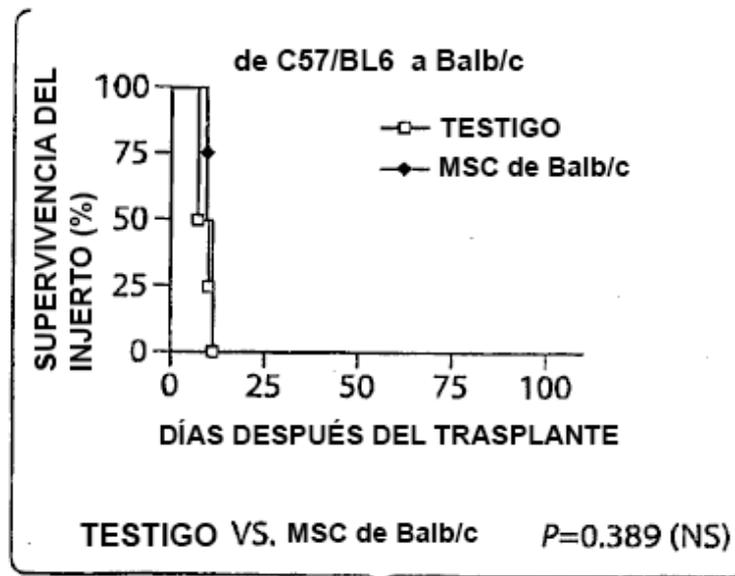
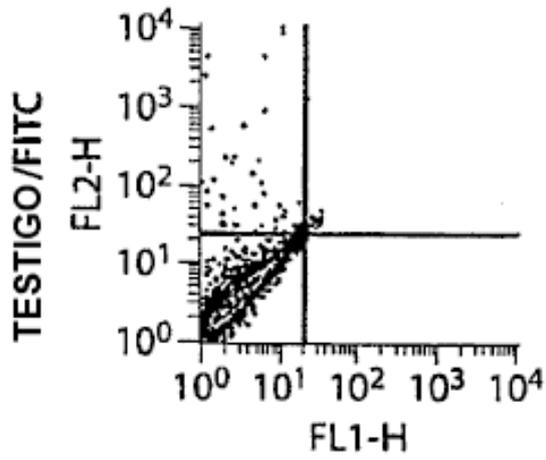
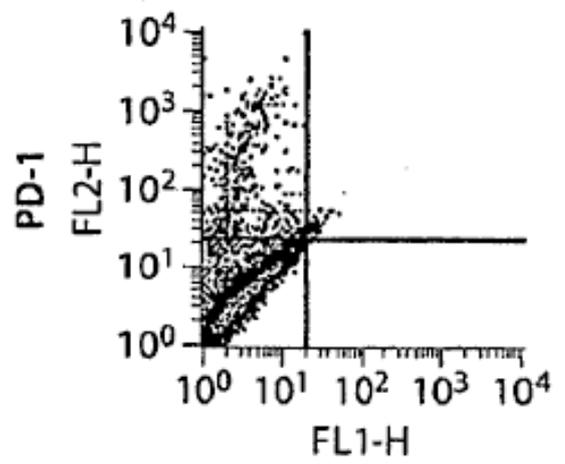


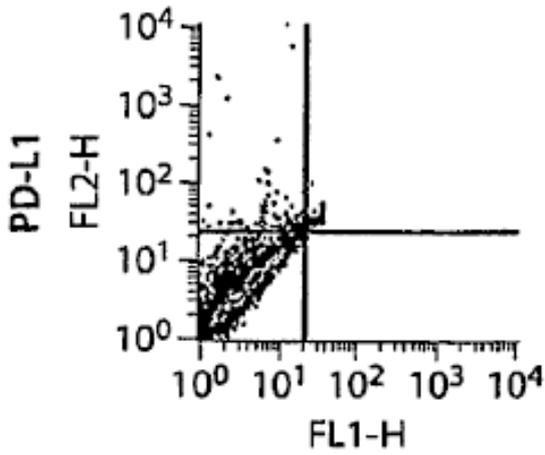
Fig. 3D



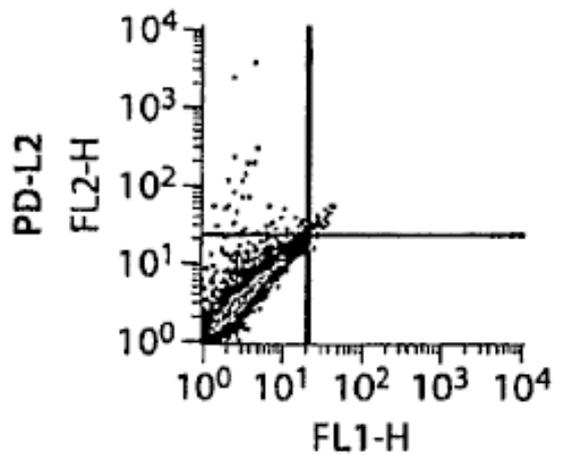
TESTIGO/FITC  
Fig. 4A



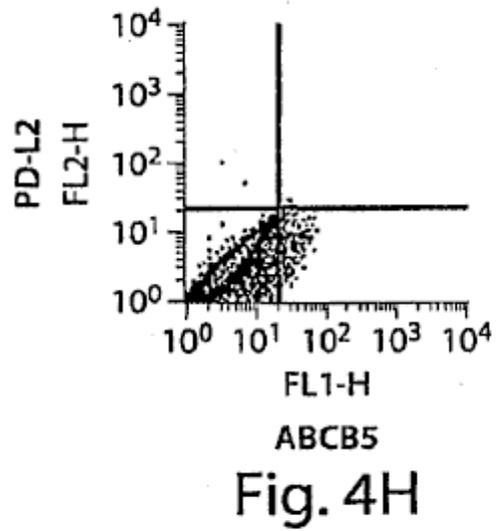
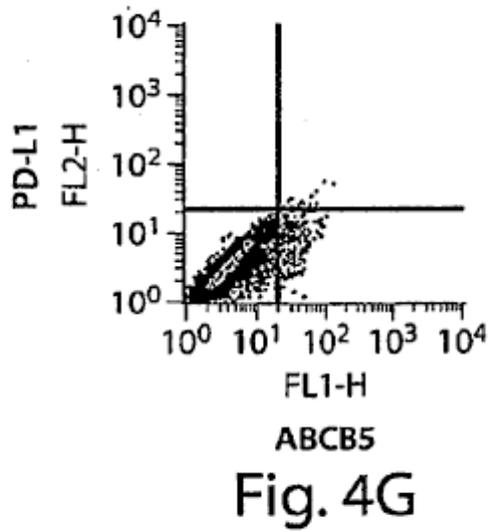
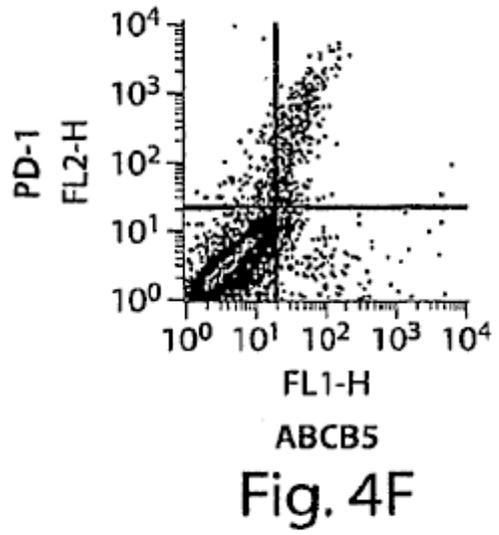
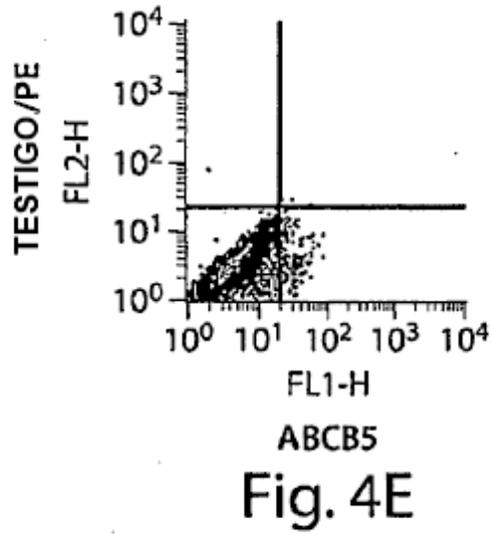
TESTIGO/FITC  
Fig. 4B



TESTIGO/FITC  
Fig. 4C



TESTIGO/FITC  
Fig. 4D



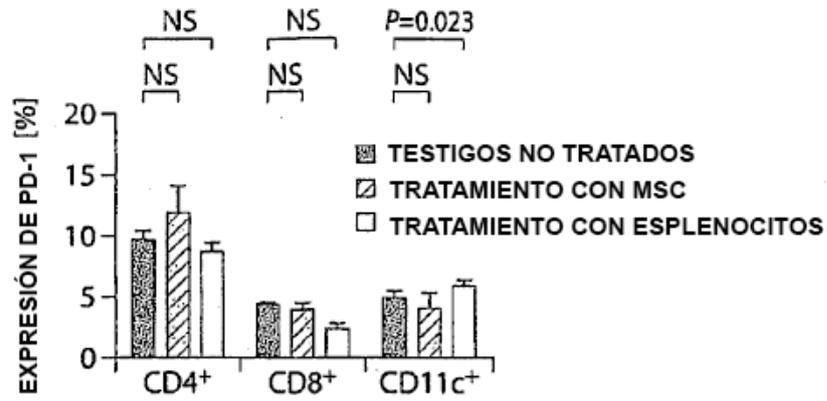


Fig. 5A

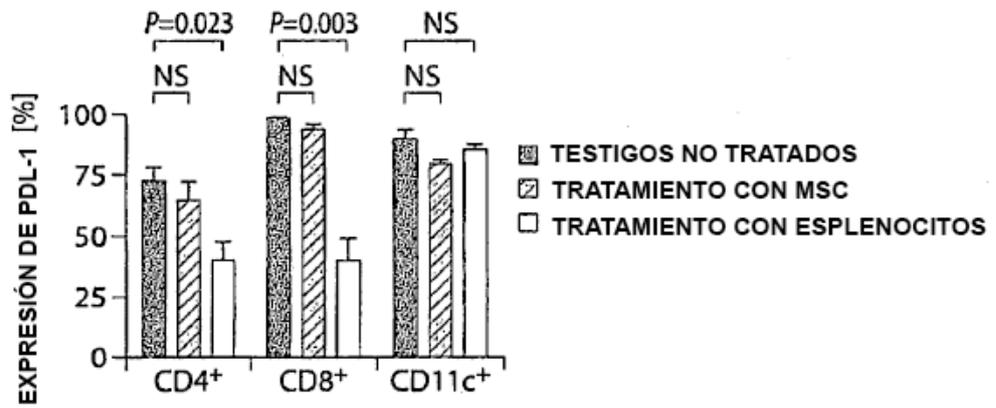


Fig. 5B

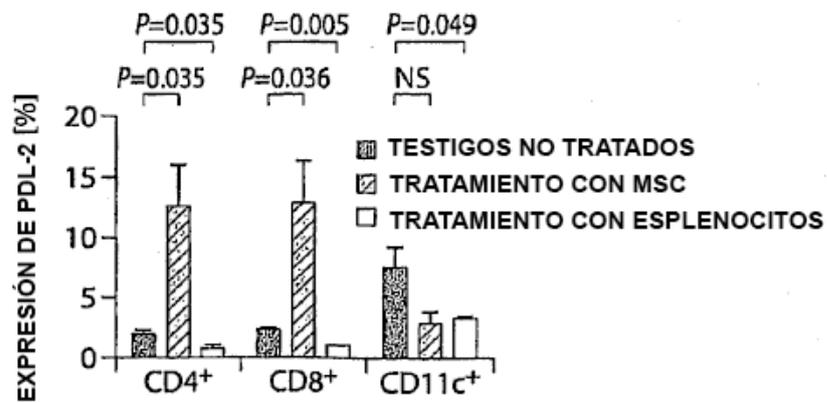


Fig. 5C

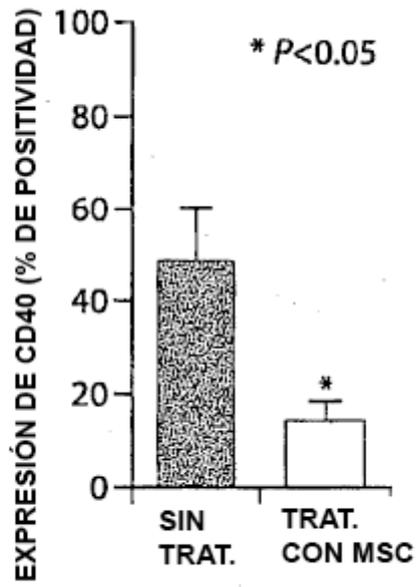


Fig. 6A

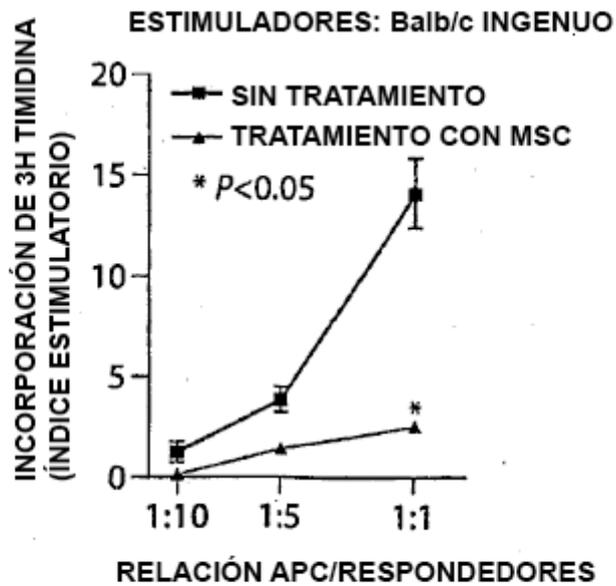


Fig. 6B

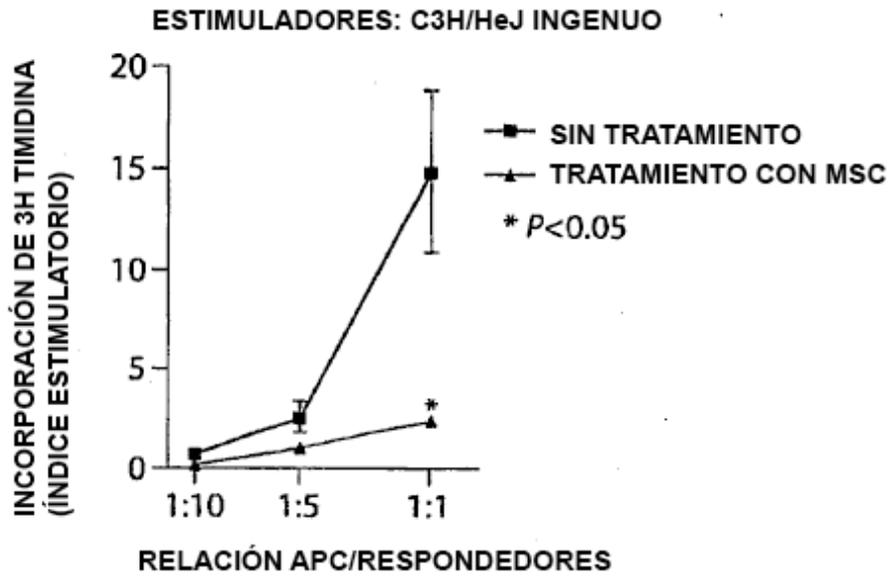


Fig. 6C

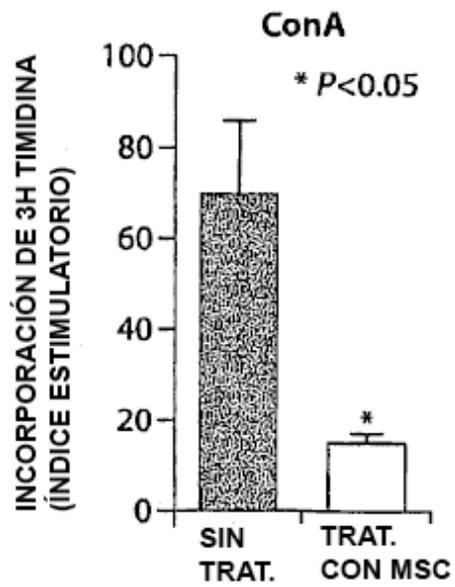


Fig. 6D