

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 755**

51 Int. Cl.:

A01N 63/00 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

A61K 9/14 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2004 E 04780535 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1660633**

54 Título: **Citoblastos atrapados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

04.09.2003 US 655275

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

11.06.2015

73 Titular/es:

**THE ROGOSIN INSTITUTE (100.0%)
505 EAST 70TH STREET
NEW YORK, NY 10021, US**

72 Inventor/es:

**CONN, BRYAN;
SMITH, BARRY;
RUBIN, ALBERT, L. y
STENZEL, KURT**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 537 755 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

Citoblastos atrapados y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un método *in vitro* para inhibir la proliferación de al menos una parte de una población de células no atrapadas, en el que dicha población de células no atrapadas no se derivó usando embriones humanos. Las células atrapadas, cuando se cultivan en el material de atrapamiento, producen un producto que, cuando está en contacto con otras células que crecen libremente no atrapadas *in vitro* o *in vivo*, inhibe su proliferación. Además, el atrapamiento de los citoblastos actúa inhibiendo la proliferación de al menos algunos de los citoblastos atrapados, y puede inhibir la diferenciación de al menos una parte de los citoblastos atrapados.

[0002] La invención se refiere además a:

15 el uso de un medio para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos proliferativos de células, un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población no atrapada de embriocitoblastos no humanos, y un método *in vitro* para inhibir la diferenciación de al menos una parte de una población de embriocitoblastos no humanos.

Antecedentes y estado de la técnica

[0003] El atrapamiento de materiales biológicos, tales como células, es una técnica que se ha usado para diversos fines. A modo de ejemplo de la bibliografía de patentes en esta área están las patentes de EE.UU. nº 6.303.151 (Asina, et al.); 6.224.912 (Asina, et al.); 5.888.497 (Jain, et al.); 5.643.569 (Jain, et al.) y RE38.027 (Jain, et al.).

[0004] Esta familia de patentes relacionadas muestra que las células cancerosas e islotes pueden quedar atrapados en una matriz biocompatible, tal como agarosa, mezclas de agarosa/colágeno y mezclas de agarosa/gelatina, y entonces recubrirse con agarosa. Las células atrapadas resultantes producen materiales que, entre otros, difunden fuera de las matrices biocompatibles permeables en las que están retenidas, y tienen propiedades biológicas útiles. En el caso de los islotes, se produce insulina. En el caso de células cancerosas, el material difunde de la matriz, y este material tiene un efecto sobre el crecimiento y proliferación de células cancerosas. Como mostrará la revisión de las patentes '912 y '151, citada arriba, este efecto cruza especies, es decir, células cancerosas atrapadas o encapsuladas de una especie dada producen material que inhibe el crecimiento y/o proliferación de células cancerosas de otras especies, además de las especies de las que se originaron las células cancerosas.

[0005] Ejemplos adicionales de técnicas de atrapamiento incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.227.298 (Weber, et al.); 5.053.332 (Cook, et al.); 4.997.443 (Walthall, et al.); 4.971.833 (Larsson, et al.); 4.902.295 (Walthall, et al.); 4.798.786 (Tice, et al.); 4.673.566 (Goosen, et al.); 4.647.536 (Mosbach, et al.); 4.409.331 (Lim); 4.392.909 (Lim); 4.352.883 (Lim); y 4.663.286 (Tsang, et al.).

[0006] El atrapamiento no siempre produce un impacto positivo sobre las células atrapadas. Por ejemplo, véanse Lloyd-George, et al., *Biomat. Art. Cell & Immob. Biotech.*, 21(3):323-333 (1993); Schinstine, et al., *Cell Transplant*, 41(1):93-102 (1995); Chi-cheportiche, et al., *Diabetologica*, 31:54-57 (1988); Jaeger, et al., *Progress In Braid Research*, 82:41-46 (1990); Zekorn, et al., *Diabetologica*, 29:99-106 (1992); Zhou, et al., *Am. J Physiol.*, 274:C13561362 (1998); Darquy, et al., *Diabetologica*, 28:776-780 (1985); Tse, et al., *Biotech. & Bioeng.*, 51:271-280 (1996); Jaeger, et al., *J Neurol.*, 21-469-480 (1992); Hortelano, et al., *Blood*, 87(12):5095-5103 (1996); Gardinar, et al., *Transp. Proc.*, 29:2019-2020 (1997).

[0007] Ninguna de las referencias tratadas arriba trata la clase de células conocidas como citoblastos, que incluye embriocitoblastos. El documento US 2003/0119107 enseña la encapsulación de embriocitoblastos para formar esferoides. Weber M et al., *Biomateriales*, vol. 23, p 2003-2013, 2002, describen la encapsulación de células de una línea de citoblastos mesenquimatosos de ratón en alginato purificado. 1 ml de alginato al 0,5 por ciento es suficiente para una producción de aproximadamente 15.000 perlas que contiene cada una aproximadamente 50 células. Además, Citrone P et al., *Human Gene Therapy*, vol. 13, p 1157 - 1166, 2002, desvelan el uso de microcápsulas que contienen células de una línea de células de mioblasto de ratón genéticamente modificada para secretar interleucina 2 ligada a una región de un anticuerpo humanizado con afinidad por un antígeno de la superficie tumoral. Las células encapsuladas se usan para la inhibición de la progresión tumoral.

[0008] Una definición de citoblastos, avanzada por Reya, et al., *Nature*, 414:105-111 (2001), se refiere a citoblastos como células que tienen la capacidad de perpetuarse mediante auto-renovación y de generar células maduras de tejidos particulares mediante diferenciación. Pueden obtenerse diferentes tipos de citoblastos, que incluyen neurales, hematolinfoides, mieloides, y otros tipos de citoblastos de diversos órganos. Todos estos tienen la posibilidad de desarrollarse en órganos o tejidos específicos. Determinados citoblastos, tales como los

embriocitoblastos, son pluripotentes, porque su ruta de diferenciación no se ha determinado en absoluto, y pueden desarrollarse en diversos órganos y tejidos.

5 [0009] Las discusiones de los diversos usos terapéuticos a los que los citoblastos pueden exponerse son muy conocidas, y no necesitan tratarse en este documento. Merece la pena mencionar, ya que pesa sobre la invención descrita en el presente documento, que los citoblastos son muy poco comunes, su purificación y separación de otros tipos de células es laboriosa y difícil, y los citoblastos se diferenciarán en célula madura a menos que se traten de alguna forma para prevenir esto.

10 [0010] Ahora se ha encontrado que los procedimientos de atrapamiento, en línea con los desvelados por Jain et al. y Iwata et al., Journ. Biomedical Material y Res., 26:967 (1992), afectan a los citoblastos de una forma muy deseable. Para la elaboración, los citoblastos atrapados producen materiales que inhiben la proliferación de diversos tipos de células, que incluyen citoblastos y células cancerosas. El efecto de este material cruza líneas de especies. Además, se ha encontrado que los citoblastos, cuando se atrapan como se describe en el presente documento, retienen sus capacidades de diferenciación, que incluyen su pluripotencialidad, durante un periodo de tiempo indefinido.

[0011] Estas características, además de otras, se observarán en la divulgación que sigue ahora.

20 **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

[0012] Según la presente invención, se proporciona:

25 Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de al menos una parte de una población de células no atrapadas según la reivindicación 1,

[0013] Una composición de materia de la reivindicación 1 para su uso en un método según la reivindicación 8,

30 [0014] Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población de células no atrapadas según la reivindicación 15,

[0015] Uso de un medio para el fabricante de un medicamento para tratar trastornos proliferativos de células según la reivindicación 20,

35 [0016] Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población no atrapada de embriocitoblastos no humanos según la reivindicación 22,

[0017] Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de embriocitoblastos no humanos no atrapados según la reivindicación 25, y

40 [0018] Un método *in vitro* para inhibir la diferenciación de al menos una parte de una población de embriocitoblastos no humanos según la reivindicación 28.

45 **Ejemplo 1**

[0019] Se obtuvieron dos líneas de embriocitoblastos (ES) murinos diferentes (es decir, ES-D3 y SCCPSA1, que están ambas públicamente disponibles) de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC").

50 [0020] Ambas líneas se cultivaron bajo condiciones de cultivo estándar, que incluyeron crecimiento como una monocapa, encima de células alimentadoras de fibroblastos embrionarios "STO". Éstas también se obtuvieron de la ATCC. Los citoblastos se cultivaron en medio DMEM que se había complementado con 100 % de suero bovino fetal limitado para ES, factor inhibidor de la leucemia (LIF) y p-mercaptoetanol (conjuntamente, "medio A"). Las células, que se criopreservaron cuando se recibieron, se descongelaron y se establecieron como cultivos después de al menos 3 pases antes de cultivarse como se ha descrito, arriba.

55 [0021] Después de tres días, las células ES fueron confluentes al 70-80 %, y se tripsinaron y a continuación se atraparon en perlas de agarosa, se recubrieron con agarosa, según las patentes de EE.UU. nº 6.303.151; 6.224.912; y 5.888.497, todas las cuales se incorporan por referencia. En resumen, sin embargo, se usó agarosa Sigma XII, a una concentración inicial de aproximadamente el 1,0 %. Se añadió una alícuota de 100 µl de esta disolución de agarosa a 34 µl de suspensión de células. Las perlas resultantes contuvieron $2,0 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^4$ embriocitoblastos murinos. A las perlas se les dio una segunda cubierta de agarosa, a una concentración de aproximadamente el 5,0 %. Las perlas se cultivaron en medio como se ha descrito arriba, excepto que no estuvieron presentes LIF o células alimentadoras STO viables ("medio B").

65 [0022] Se evaluó la viabilidad de las células en las perlas con el tiempo mediante examen histoquímico y microscópico estándar, además de ensayos de MTT estándar, usando células extraídas de perlas o mantenidas en

las perlas, en diversos momentos en el tiempo.

[0023] Se observó que los citoblastos atrapados aumentan su actividad metabólica cuando se recubren primero. Esto va seguido de una disminución en la actividad, ya que las células mueren mediante apoptosis, alcanzando su punto más bajo de la actividad metabólica aproximadamente en el día 21. Después de este punto bajo, sin embargo, las células supervivientes proliferan lentamente, y se observó que la actividad metabólica total aumentaba gradualmente hasta el día 35 después del atrapamiento y más allá. Esto iguala a las observaciones sobre células cancerosas atrapadas.

[0024] Morfológicamente, hubo una diferencia significativa entre las colonias formadas dentro de la capa interna de agarosa de la perla por las células cancerosas y aquellas formadas por los citoblastos. Aunque ambos tipos de colonias son de forma ovoide, aquellas formadas por las células cancerosas se caracterizan por una zona externa de células viables (generalmente dos a tres células de espesor) con una zona central de residuo celular eosinófilo. Las colonias formadas por los citoblastos, por otra parte, están completamente ocupadas por células viables y no hay zona central de residuo celular.

Ejemplo 2

[0025] En estos experimentos se probó el efecto inhibitorio de los citoblastos sobre la proliferación de otros citoblastos.

[0026] Se probaron citoblastos que contenían perlas de agarosa/agarosa de diez semanas de edad (células SCC-PSA1) para viabilidad usando el ensayo MTT, tratado arriba, y se cultivaron en el medio B tratado en el Ejemplo 1, durante 6 días. Después de 6 días, el medio se había acondicionado por los citoblastos atrapados. Por tanto, se llama el medio acondicionado por citoblastos (SCM).

[0027] Después de estos 6 días, el SCM se transfirió a placas de 6 pocillos que contenían células SCC-PSA1 frescas. Estas placas contuvieron cada una 9×10^5 células alimentadoras STO, que se cubrieron con $1,5 \times 10^4$ células SCC-PSA1. Las células STO se habían tratado con mitomicina C para prevenir la proliferación. Hubo tres controles, es decir, pocillos que contuvieron medio B (un medio sin acondicionar) y tres pocillos que contuvieron el SCM.

[0028] Después de 3 días, el contenido de todos los pocillos se tripsinó, y se contaron células totales, usando métodos convencionales. El recuento en bruto se ajustó para representar las 9×10^5 células alimentadoras. Siguen los resultados:

Artículo de prueba	Células total promedio/pocillo	Desviación estándar	Células después de restar STO	Inhibición en porcentaje (de células SCC)
Medio de control	$1,43 \times 10^6$	$\pm 9,9 \times 10^4$	$5,27 \times 10^5$	
SCM (con SCC)	$1,19 \times 10^6$	$\pm 3,6 \times 10^4$	$2,90 \times 10^5$	44,9%

[0029] Se llevó a cabo un experimento similar, con los siguientes resultados:

Artículo de prueba	Células total promedio/pocillo	Desviación estándar	Células después de restar STO	Inhibición en porcentaje (de células SCC)
Medio de control	$3,09 \times 10^6$	$\pm 1,7 \times 10^5$	$1,41 \times 10^6$	
SCM (con SCC)	$2,36 \times 10^6$	$\pm 9,5 \times 10^4$	$6,88 \times 10^5$	51,4%

[0030] Además, el efecto no fue específico de la línea celular, como se demuestra por los siguientes resultados, en los que se añadieron células ES-D3 al medio:

Artículo de prueba	Células total promedio/pocillo	Desviación estándar	Células después de restar STO	Inhibición en porcentaje (de células ES-D3)
Medio de control	$1,27 \times 10^6$	$\pm 1,1 \times 10^5$	$3,67 \times 10^5$	
SCM (con SCC)	$1,14 \times 10^6$	$\pm 7,6 \times 10^4$	$2,37 \times 10^5$	35,5%

Ejemplo 3

[0031] El Ejemplo 2 mostró que el efecto inhibitorio de la proliferación de los citoblastos no era específico de la línea celular. En los experimentos descritos en el presente documento, los citoblastos atrapados se probaron para su capacidad para inhibir la proliferación de células cancerosas.

[0032] En estos experimentos se usaron células tumorales RENCA. Se sembraron un total de 15.000 células tumorales por pocillo. Se usó SCM (acondicionado tanto con SCC-PSA1 como ES-D3), como se describe arriba, como medio de control (medio B), también como se ha descrito.

[0033] Con respecto al SCM, el acondicionamiento tuvo lugar durante 5 días. El ensayo se realizó durante un

periodo de 32 semanas. La inhibición de las células RENCA se determinó fijando las células con 100 % de metanol, seguido de tinción con rojo neutro, lisis con SDS y barrido con un espectrofotómetro para medir la cantidad de rojo neutro en el lisado celular, que es proporcional al número de células por pocillo.

- 5 [0034] Los resultados se resumen en las dos siguientes tablas, que representan el trabajo con ES-D3 y citoblastos SCC-PSA1, respectivamente. Los resultados para las semanas 1-3 se correlacionan con los resultados tratados en el Ejemplo 1, es decir, muerte de los citoblastos atrapados, alcanzando un punto bajo en el día 21, seguido de regeneración.

Semana	1	3	12	16	20	24	28	32
% de inhibición de células RENCA por SCM (con ES-D3)	-2,1%	-8,8%	39,0%	24,4%	25,0%	20,9%	34,9%	31,5%

10

Semana	1	3	9	12	16	20	24	28	32
% de inhibición de células RENCA por SCM (con SCC-PSA1)	-10,0%	8,9%	21,0%	40,4%	32,8%	22,5%	36,6%	38,0%	35,1%

Ejemplo 4

- 15 [0035] En los experimentos precedentes se probó la capacidad de citoblastos atrapados para inhibir la proliferación de citoblastos y células cancerosas, y se demostró. Estos siguientes experimentos se diseñaron para determinar si células cancerosas atrapadas podrían inhibir la proliferación de citoblastos.

- 20 [0036] Se sembraron citoblastos y se cultivaron de la misma forma que se describió, arriba. Perlas que contienen células RENCA, preparadas como se ha descrito en las patentes de EE.UU. nº 6.303.151; 6.224.912; y 5.888.497, se cultivaron en medio B para acondicionarlo, durante 5 días. A continuación este medio acondicionado con RENCA (RCM) se añadió a citoblastos sembrados, y los citoblastos se contaron después de 3 días. Los resultados, que siguen, presentan datos para células ES-D3 primero, y luego células SCC-PSA1:

Artículo de prueba	Células total promedio/pocillo	Desviación estándar	Células después de restar STO	Inhibición en porcentaje (de ES-D3)
Medio de control	$1,69 \times 10^6$	$\pm 1,15 \times 10^4$	$7,93 \times 10^5$	
RCM	$1,42 \times 10^6$	$\pm 8,74 \times 10^4$	$5,23 \times 10^5$	34,0%
Artículo de prueba	Células total promedio/pocillo	Desviación estándar	Células después de restar STO	Inhibición en porcentaje (de SCC-PSA1)
Medio de control	$1,25 \times 10^6$	$\pm 8,08 \times 10^4$	$3,47 \times 10^5$	
RCM	$1,05 \times 10^6$	$\pm 4,04 \times 10^4$	$1,47 \times 10^5$	57,7%

- 25 [0037] Estos resultados indican que las células cancerosas atrapadas inhibieron la proliferación de citoblastos.

Ejemplo 5

- 30 [0038] Una cuestión con la investigación con citoblastos es el hecho de que, por su naturaleza, los citoblastos se diferencian. Como es difícil proteger citoblastos y mantenerlos de la diferenciación en primer lugar, se desearía tener una metodología disponible por la que los citoblastos pudieran mantenerse en su estado indiferenciado, durante un periodo tan largo como fuera posible.

- 35 [0039] Para este fin, se atraparon citoblastos como se ha descrito en el Ejemplo 1, arriba. Las estructuras resultantes se almacenaron en el medio B descrito arriba, y se probaron durante un periodo superior a dos años.

- 40 [0040] Durante este periodo de dos años, los citoblastos se liberaron de las estructuras de atrapamiento y se cultivaron bajo condiciones estándar (incluyendo co-cultivos de STO y aditivo de medio de LIP). En todos los casos, las células liberadas establecieron una monocapa de citoblastos tradicional que proliferaron de un modo no diferenciado, pero mantuvieron la capacidad de diferenciarse espontáneamente. Esto demuestra que el atrapamiento de citoblastos puede mantener sus fenotipos no diferenciados durante más de dos años en ausencia de los inhibidores de diferenciación tradicionalmente requeridos (por ejemplo, STO y LIF).

- 45 [0041] A pesar de este hecho, si las células no reciben los materiales requeridos después de un corto periodo de tiempo, no empiezan la diferenciación.

- [0042] Los anteriores ejemplos describen la invención, que incluye, entre otras, las composiciones de materia que pueden usarse para producir material que suprime la proliferación de células, tales como, pero que no se limitan a, células cancerosas y citoblastos, con la condición de que los citoblastos sean embriocitoblastos no humanos. Estas

composiciones comprenden citoblastos, tales como embriocitoblastos no humanos, atrapados en un material selectivamente permeable para formar una estructura que limita la proliferación de las células atrapadas. Como resultado de ser limitadas, las células producen inesperadamente altas cantidades de material que suprimen la proliferación de otras células. Las células limitadas producen más material que las células no limitadas comparables.

5 **[0043]** El material usado para preparar las estructuras de la invención puede incluir cualquier materia biocompatible que limite el crecimiento de citoblastos, induciéndolos así para producir mayores cantidades de material supresor del crecimiento de la proliferación celular. La estructura tiene un tamaño de poro adecuado de forma que el material anterior pueda difundir al entorno externo, y de forma que pueda prevenir que productos o células del sistema inmunitario del huésped entren en la estructura y causen el rechazo de las células o de otro modo alteren su capacidad para sobrevivir y continuar produciendo el material deseado. Los materiales usados para formar la estructura también podrán mantener células viables (de proliferación limitada, pero sobreviviendo) tanto in vitro como in vivo, preferentemente durante periodos de hasta varios años, proporcionando la entrada de nutrientes apropiados y la eliminación de productos de desecho celular, y un entorno intraestructural fisicoquímico compatible. 10 Las estructuras resultantes proporcionan un entorno adecuado para el estudio prolongado de citoblastos y sus diversos factores de diferenciación, transcripción y nucleares. Los resultados de los mismos pueden usarse para dirigir la diferenciación deseada de otros citoblastos. Los materiales usados para preparar la estructura son preferentemente bien tolerados cuando se implantan in vivo, lo más preferentemente durante la duración completa de la implantación en el huésped. 20

[0044] Una lista no limitante de materiales y combinaciones de materiales que podría utilizarse incluye alginato-poli-(L-lisina); alginato-poli-(L-lisina)-alginato; alginato-poli-(L-lisina)-polietilenimina; quitosano-alginato; polihidroxiletil-metacrilato-metacrilato de metilo; carbonilmelilcelulosa; K-carragenina; quitosano; agarosa-poliétersulfona-bromuro de hexadimetrina (polibreno); etil-celulosa, geles de sílice; y combinaciones de los mismos. 25

[0045] Las estructuras que comprenden las composiciones de materia pueden tomar muchas formas, tales como una perla, una esfera, un cilindro, una cápsula, una hoja o cualquier otra forma que sea adecuada para implantación en un sujeto, y/o cultivo en un medio in vitro. El tamaño de la estructura puede variar, dependiendo de su uso eventual, como será evidente para el experto. 30

[0046] Las estructuras de la invención son selectivamente permeables, de forma que los nutrientes puedan entrar en la estructura, y de manera que el material inhibidor de la proliferación, además de los residuos celulares, puedan abandonar la estructura. Para uso *in vivo*, se prefiere que las estructuras prevengan la entrada de productos o células del sistema inmunitario de un huésped que produciría el rechazo de las células, o de otro modo alteren la capacidad de las células para producir el material supresor de la proliferación. 35

[0047] "Atrapado", como se usa en el presente documento, significa que las células están contenidas dentro de una estructura que previene su escape al entorno que rodea la estructura, sea aquel un entorno *in vitro* o *in vivo*. A pesar de la incapacidad para escapar de la misma, las células están dentro de una estructura que tanto permite la entrada de moléculas tales como agua, nutrientes, etc., como permite el paso de la estructura de materiales de residuo y productos moleculares producidos por las células. La estructura en la que las células están contenidas soporta así la viabilidad/supervivencia continuada de las células durante largos periodos de tiempo. Puede, por tanto, dependiendo de la naturaleza de la estructura/material, producir células contenidas dentro de ella para alterar su comportamiento, que incluye, pero no se limita a, comportamiento tal como proliferación, estado de diferenciación y/o expresión fenotípica. Inhibiendo la diferenciación, uno de hecho tiene un dispositivo de almacenamiento útil para mantener citoblastos como citoblastos. A modo de ejemplo, pero no exclusivo, medios de atrapamiento de las células incluyen encapsularlas, recubrirlas, encerrarlas, o rodearlas de otro modo por todos los lados con algún material permeable. Mediante el atrapamiento, se inhibe la proliferación de los citoblastos atrapados. Además, hay situaciones en las que al menos una parte de la población que está atrapada tampoco experimenta ninguna diferenciación. 40 45 50

[0048] Otro aspecto de la invención incluye composiciones que son útiles en suprimir la proliferación celular. Las composiciones se preparan cultivando células limitadas como se ha descrito arriba en un medio de cultivo apropiado, seguido de recuperación del medio acondicionado resultante. Entonces pueden formarse concentrados a partir del medio acondicionado. 55

[0049] La invención no se limita a ningún tipo particular de especies de citoblastos, con la condición de que se excluyan embriocitoblastos humanos; puede usarse cualquier tipo de citoblasto, excepto embriocitoblastos humanos, según la invención. Tipos a modo de ejemplo de células que pueden usarse son citoblastos murinos, además de citoblastos de otras especies, especialmente especies de mamífero. Los embriocitoblastos no humanos se prefieren especialmente, pero también pueden usarse citoblastos obtenidos de diversos órganos y/o sistemas de órganos. 60

[0050] Como será evidente de la presente divulgación, otro aspecto de la invención es métodos terapéuticos para tratar individuos que padecen trastornos de la proliferación celular tales como enfermedad renal poliquística, reacción hipertrófica de tejidos (incluyendo formación de cicatrices), enfermedad autoinmunitaria, trastornos linfoproliferativos, policitemia verdadera, además de neoplasia tanto de células benignas como malignas. Cuando se 65

5 usa en un contexto terapéutico, como se elaborará según abajo, el tipo de célula limitado en la estructura no necesita ser el mismo tipo de célula que está causando el trastorno que padece el individuo, aunque pueda ser. Un método tal implica insertar al menos una de las estructuras de la invención en el sujeto, en una cantidad suficiente para producir la supresión de proliferación celular en el sujeto. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, aunque es aplicable a otros animales, tales como animales domésticos, animales de granja, o cualquier tipo de animal.

10 **[0051]** La composición de la presente invención puede usarse como terapia primaria en el tratamiento de diversos trastornos proliferativos de células, y como tratamiento complementario en combinación con otras terapias. Por ejemplo, en trastornos neoplásicos, tales como cancer, los pacientes pueden tratarse con composiciones y métodos descritos en el presente documento, conjuntamente con radioterapia, quimioterapia o tratamiento con otros materiales biológicamente activos tales como citocinas, moléculas antisentido, hormonas esteroideas, terapia génica y similares. Adicionalmente, las composiciones y métodos de la invención pueden usarse conjuntamente con procedimientos quirúrgicos para tratar trastornos tales como cáncer, por ejemplo, implantando las estructuras después de la resección de un tumor para prevenir el recrecimiento y metástasis. Los cánceres que están presentes en un estado inoperable pueden convertirse en operables mediante tratamiento con las composiciones antiproliferativas de la invención. La proliferación en exceso de células que no se necesitan o no son deseables para la apropiada función del sistema de órganos, pero no son neoplásicas, tales como aquellas de policitemia verdadera o enfermedad renal poliquística, también puede tratarse por este medio. Los trastornos hiperproliferativos, tales como policitemia verdadera y enfermedad renal poliquística, implican células que presentan proliferación en exceso, pero generan células de otro modo normales (es decir, no neoplásicas o transformadas). Tales trastornos, que producen numerosas células que no se necesitan o no son deseables para la apropiada función del órgano, también pueden tratarse por estos medios. Adicionalmente, también pueden tratarse de esta forma afecciones que se caracterizan por células normales hiperproliferativas, tales como cicatrices hipertróficas. En condiciones tales como esta, las células normales, es decir, los fibroblastos han proliferado más allá de lo que es necesario para la curación, pero a diferencia de las neoplasias, no se caracterizan por proliferación no regulada en curso adicional. Otras afecciones caracterizadas por este fenómeno son muy conocidas para el experto, y no necesitan exponerse en este documento.

30 **[0052]** Las composiciones de la invención también pueden usarse profilácticamente en individuos en riesgo de desarrollar trastornos de proliferación celular, sujetos que muestran la presencia de factores de riesgo individuales, una historia familiar del trastorno generalmente, historia familiar de un tipo específico (por ejemplo, cáncer de mama) y exposición a materiales ocupacionales u otros problemáticos. Para la profilaxis contra el cáncer se administra, por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de las estructuras de la invención al individuo tras la identificación de uno o más factores de riesgo.

35 **[0053]** Como se indica por los ejemplos, arriba, el efecto antiproliferativo no está limitado por el tipo de célula usada, ni por la especie de la que se originó el citoblasto. Por tanto, pueden administrarse estructuras que contengan citoblastos de un primer tipo a un sujeto de una especie diferente. Por ejemplo, los citoblastos murinos pueden limitarse en la estructura de la invención, y entonces administrarse a un ser humano. Por supuesto, las estructuras pueden contener citoblastos de la misma especie que está tratándose. Todavía además, el citoblasto puede tomarse del individuo que va a tratarse, atraparse y limitarse, y luego administrarse al mismo individuo.

40 **[0054]** Los procesos para preparar las estructuras de la invención también son una parte de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de al menos una parte de una población de células no atrapadas, que comprende cultivar dicha población de células en presencia de una composición de materia que comprende una muestra de embriocitoblastos no humanos atrapados en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que el atrapamiento de dicha muestra de embriocitoblastos no humanos inhibe la proliferación de al menos una parte de los embriocitoblastos no humanos atrapados, en el que dicha población de células no atrapadas no se derivó usando embriones humanos.
- 10 **2.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha población de células es una población de citoblastos con la condición de que no sea una población de embriocitoblastos humanos.
- 15 **3.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha población de células es de una especie diferente de la especie de origen de las células atrapadas en dicha composición de materia, o en el que dicha población de células es de la misma especie que la especie de origen de las células atrapadas en dicha composición de materia.
- 4.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha población de células es una población de células cancerosas.
- 20 **5.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha población de células es una población de células de mamífero.
- 6.** El método *in vitro* de la reivindicación 1, en el que dicha población de células es una población de células hiperproliferativas.
- 25 **7.** El método *in vitro* de la reivindicación 5, en el que dicha población de células de mamífero es una población de células humanas, o una población de células murinas.
- 30 **8.** Una composición de materia que comprende una muestra de embriocitoblastos no humanos atrapados en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en la que el atrapamiento de dicha muestra de embriocitoblastos no humanos inhibe la proliferación de al menos una parte de los embriocitoblastos no humanos atrapados, para su uso en un método de tratamiento de trastornos proliferativos de células.
- 35 **9.** El uso de la reivindicación 8, en el que dicha población de células es una población de citoblastos, o en el que dicha población de células comprende células neoplásicas, o en el que dicha población de células es una población de células hiperproliferativas.
- 10.** El uso de la reivindicación 8, en el que las células atrapadas en dicha composición de materia son de una especie diferente de dicho sujeto.
- 40 **11.** El uso de la reivindicación 8, en el que las células atrapadas en dicha composición de materia son de la misma especie que dicho sujeto.
- 12.** El uso de la reivindicación 11, en el que dichas células son autólogas para dicho sujeto.
- 45 **13.** El uso de la reivindicación 8, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 14.** El uso de la reivindicación 11, en el que dicho sujeto es un ser humano.
- 50 **15.** Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población de células no atrapadas, que comprende cultivar una composición de materia que comprende una muestra de embriocitoblastos no humanos atrapados en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que el atrapamiento de dicha muestra de embriocitoblastos no humanos inhibe la proliferación de al menos una parte de los embriocitoblastos no humanos atrapados, en un medio durante un tiempo suficiente para permitir la difusión de un material inhibidor de la proliferación celular en dicho medio, y poner en contacto dicho medio con dicha población de células no atrapadas durante un tiempo suficiente para inhibir la proliferación de dicha población de células no atrapadas, en el que dicha población de células no atrapadas no se derivó usando embriones humanos.
- 55 **16.** El método *in vitro* de la reivindicación 15, en el que dicha población de células no atrapadas es una población de citoblastos con la condición de que no sea una población de embriocitoblastos humanos.
- 17.** El método *in vitro* de la reivindicación 15, en el que dicha población de células no atrapadas y las células atrapadas en dicha composición de materia son de especies diferentes.
- 65 **18.** El método *in vitro* de la reivindicación 15, en el que dicha población de células no atrapadas y las células atrapadas en dicha composición de materia son de la misma especie.

19. El método *in vitro* de la reivindicación 16, en el que dicha población de citoblastos es una población de células de mamífero, preferentemente una población de células humanas, o una población de células murinas.
- 5 20. Uso de un medio para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos proliferativos de células en el que el medio es obtenible cultivando la composición de materia que comprende una muestra de embriocitoblastos no humanos atrapados en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que el atrapamiento de dicha muestra de embriocitoblastos no humanos inhibe la proliferación de al menos una parte de los embriocitoblastos no humanos atrapados en un medio durante un tiempo suficiente para permitir la difusión de un material inhibidor de la proliferación celular en dicho medio.
- 10 21. Uso de la reivindicación 20, en el que dicha población de células es una población de citoblastos, o en el que dicha población de células comprende células neoplásicas.
- 15 22. Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de una población no atrapada de embriocitoblastos no humanos que comprende cultivar dichos citoblastos en presencia de una composición de materia que comprende una muestra de células cancerosas atrapadas en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que dicha muestra de células cancerosas produce material que inhibe la proliferación de dichos citoblastos.
- 20 23. El método de la reivindicación 22, en el que dichos citoblastos son citoblastos de mamífero, preferentemente citoblastos murinos.
- 25 24. El método de la reivindicación 22, en el que dichos citoblastos y células cancerosas se originan a partir de la misma especie, o en el que dichos citoblastos y células cancerosas se originan a partir de especies diferentes.
- 30 25. Un método *in vitro* para inhibir la proliferación de embriocitoblastos no humanos no atrapados, que comprende cultivar una composición de materia que comprende una muestra de células cancerosas atrapadas en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que dicha muestra de células cancerosas produce material que inhibe la proliferación de citoblastos y que difunde en un medio de cultivo, y poner en contacto dicho medio de cultivo con dichos citoblastos.
- 35 26. El método *in vitro* de la reivindicación 25, en el que dichos citoblastos son citoblastos de mamífero, preferentemente citoblastos murinos.
- 40 27. El método *in vitro* de la reivindicación 25, en el que dichos citoblastos y células cancerosas se originan a partir de la misma especie, o en el que dichos citoblastos y células cancerosas se originan de diferente especie.
28. Un método *in vitro* para inhibir la diferenciación de al menos una parte de una población de embriocitoblastos no humanos, que comprende atrapar dichos embriocitoblastos no humanos en una estructura biocompatible, selectivamente permeable, en el que tal atrapamiento hace que al menos una parte de dichos embriocitoblastos permanezca en un estado no diferenciado.