

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 795**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)  
**A61P 5/48** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2015.01)  
**A61K 35/39** (2015.01)  
**C12N 5/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2009 E 09827049 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2350266**

54 Título: **Método para tratar o prevenir una disfunción pancreática**

30 Prioridad:

**20.11.2008 US 199796 P**

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

**12.11.2015**

73 Titular/es:

**MESOBLAST, INC. (100.0%)**  
**275 Madison Avenue 4th Floor**  
**New York NY 10016, US**

72 Inventor/es:

**ITESCU, SILVIU y**  
**KRISHNAN, RAVI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 550 795 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

Método para tratar o prevenir una disfunción pancreática

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a células STRO-1<sup>+</sup> para su utilización en un método destinado a mejorar la función pancreática en un individuo que lo necesita. El método puede utilizarse para tratar y/o prevenir y/o retardar la aparición o la evolución de un trastorno procedente de o relacionado con la disfunción pancreática, p. ej., procedente de la función endocrina o exocrina anormal del páncreas.

### Antecedentes de la invención

10 El páncreas es un órgano glandular multifuncional en el sistema digestivo y endocrino de los vertebrados. Es tanto una glándula endocrina (que produce varias hormonas incluidas insulina, glucagón y somatostatina) como una glándula exocrina (que segrega jugo pancreático que contiene enzimas digestivas que pasan al intestino delgado). Las enzimas en el jugo pancreático ayudan en la degradación ulterior de los hidratos de carbono, proteínas y grasas en el quimo.

15 La parte del páncreas con función endocrina está formada por numerosos grupos de células denominadas islotes de Langerhans. Hay cuatro tipos de células principales dentro de los islotes clasificadas por su secreción: las células  $\alpha$  segregan glucagón, las células  $\beta$  segregan insulina, las células  $\delta$  segregan somatostatina y las células PP segregan polipéptido pancreático. Los islotes son una colección compacta de células endocrinas dispuestas en grupos y cordones y además contienen una red de capilares. Los capilares de los islotes están alineados por capas de células endocrinas en contacto directo con vasos, y la mayoría de las células endocrinas están en contacto directo con  
20 vasos sanguíneos, ya sea mediante procesos citoplásmicos o mediante yuxtaposición directa.

A diferencia del páncreas endocrino, que segrega hormonas en la sangre, el páncreas exocrino produce enzimas digestivas (p. ej., tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa pancreática y amilasa) y un fluido alcalino, y segrega éstas en el intestino delgado a través de un sistema de conductos exocrinos en respuesta a las hormonas secretina y colecistoquinina del intestino delgado. Las enzimas digestivas son producidas y  
25 segregadas por células acinares del páncreas exocrino. Las células específicas que recubren los conductos pancreáticos, denominadas células centroacinares, segregan un bicarbonato- y solución rica en sal en el intestino delgado.

La disfunción pancreática puede conducir a la sobreproducción o infraproducción de hormonas y/o enzimas producidas por el páncreas. Las afecciones asociadas a o causadas por la disfunción pancreática incluyen la  
30 diabetes mellitus, pancreatitis aguda o crónica, insuficiencia de enzima pancreática o tumor pancreático.

La diabetes mellitus (DM) es uno de los trastornos endocrinos crónicos más frecuentes en todos los grupos de edad y poblaciones, y es producida por la disfunción pancreática. La DM aqueja a más de 100 millones de personas en todo el mundo. En los Estados Unidos solo, hay más de 12 millones de individuos diagnosticados con DM, con 600.000 nuevos casos diagnosticados cada año.

35 DM es un término de diagnóstico para un grupo de trastornos caracterizado por homeostasis o metabolismo anormal de carbohidratos (p. ej., glucosa) que da lugar a elevado azúcar en sangre. Estos trastornos comprenden varios componentes metabólicos, vasculares y neuropáticos interrelacionados. Las funciones endocrinas y/o exocrinas del páncreas producen varios componentes de DM. Por ejemplo, el componente metabólico, generalmente caracterizado por hiperglucemia, comprende alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas  
40 producidas por la ausencia o notable reducción de secreción de hormonas, particularmente insulina (es decir, función endocrina) y/o acción ineficaz de la insulina. A un nivel exocrino, el páncreas produce varias enzimas que están implicadas en la digestión de los alimentos. Por ejemplo, el páncreas produce amilasa y en DM puede segregar cantidades insuficientes de esta enzima para digerir los carbohidratos lo que conduce a insuficiencia pancreática exocrina, malnutrición y pérdida de peso. Por consiguiente, tanto las funciones endocrina como exocrina  
45 del páncreas contribuyen a los componentes metabólicos de DM. El componente vascular de DM comprende anomalías en los vasos sanguíneos lo que conduce a complicaciones cardiovasculares, retinianas y renales. Las anomalías en los sistemas nerviosos periférico y autónomo son además componentes de DM.

La DM está generalmente originada por una reducción en la cantidad de insulina circulante y/o una reducción en la sensibilidad de las células a la insulina en un individuo. La insulina es esencial en el metabolismo de los hidratos de  
50 carbonos, grasas y proteínas. La insulina reduce las concentraciones de glucosa en la sangre al permitir que la glucosa entre en las células musculares y adipocitos y al estimular la conversión de glucosa en glucógeno (glucogenia) como un depósito de hidratos de carbono. La insulina también inhibe la liberación de glucosa almacenada procedente del glucógeno hepático (glucogenólisis) y ralentiza la degradación de la grasa a triglicéridos, ácidos grasos libres y cetonas. Además, la insulina ralentiza la degradación de las proteínas para la producción de  
55 glucosa (gluconeogenia). La insulina es producida y segregada por las células  $\beta$  dentro de los islotes de Langerhans del páncreas.

Hay varios tipos de diabetes, incluida la tipo I (también denominada diabetes mellitus dependiente de insulina o IDDM) y la tipo II (también denominada diabetes mellitus no dependiente de insulina o NIDDM), diabetes gravídica y prediabetes (o metabolismo alterado de la glucosa). De éstos, las dos formas más frecuentes de diabetes son diabetes tipo I y tipo II. La diabetes tipo I (o diabetes mellitus dependiente de insulina; IDDM) es producida por la ausencia, destrucción o pérdida de células  $\beta$  pancreáticas lo que da lugar a una insuficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo II (diabetes no dependiente de insulina; NIDDM) es un trastorno heterogéneo que se caracteriza por la resistencia a la insulina.

#### Diabetes tipo I

La frecuencia general de la diabetes tipo I es aproximadamente 15 casos por cada 100.000 individuos en los EE.UU. solo. Aproximadamente, del 5 al 15 por ciento de todos los casos de diabetes son casos de diabetes tipo I en los EE.U., con médicos que diagnostican aproximadamente 10.000 casos nuevos cada año. Internacionalmente, la frecuencia de la diabetes tipo I varía desde aproximadamente 0,61 casos por cada 100.000 individuos en China hasta aproximadamente 34,5 casos por cada 100.000 en Cerdeña, y más de 40 casos por cada 100.000 en Finlandia. Muchos países también señalan que la tasa de frecuencia de la diabetes tipo I se ha duplicado durante los últimos 20 años.

La aparición clínica aguda de la diabetes tipo I se caracteriza por síntomas, tales como hiperglucemia, poliuria, polidipsia, pérdida de peso, o visión borrosa, sola o en combinación, seguido de días o semanas después por cetoacidosis. Generalmente, la aparición aguda de la enfermedad se considera que está precedido por un largo, periodo asintomático preclínico, durante el cual las células  $\beta$  secretoras de insulina son destruidas progresivamente por el sistema inmunitario del individuo.

En los individuos sanos, el páncreas contiene normalmente 1 a 1,5 millones de islotes; y aproximadamente el 80 por ciento de las células de los islotes son células  $\beta$  productoras de insulina. Los síntomas de diabetes clínica aparecen cuando permanecen menos del 10 por ciento de esas células  $\beta$ .

La incompatibilidad entre suministro y demanda de insulina producida por la pérdida de células  $\beta$  pancreáticas conduce al metabolismo anormal de glucosa, lípidos y proteínas. La insuficiencia de insulina puede conducir a hiperglucemia y deshidratación hiperglucémica, concentraciones elevadas de ácidos grasos libres, concentraciones elevadas de cetona sérica, aumento de las concentraciones de triglicéridos, aumento de las concentraciones de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), aumento de las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada, una disminución en la síntesis de proteínas y cetoacidosis. Un individuo con diabetes tipo I es probable que padezca de una cualquiera o más de una variedad de complicaciones vasculares y neurológicas. Por ejemplo, los pacientes de diabetes tipo I es dos veces más probable que los no diabéticos que tengan un ataque cardíaco; es cinco veces más probable que padezcan de gangrena; diecisiete veces más probable que tengan insuficiencia renal completa y veinticinco veces más probable que pierdan la vista.

#### Tratamiento profiláctico de la diabetes tipo 1

Actualmente, la diabetes tipo I se trata por administración de insulina exógena, ejercicio y control alimentario. Estas formas de tratamiento no corrigen el daño al páncreas (es decir, reemplazan las células  $\beta$  destruidas de los islotes), sino que más bien reemplazan los factores de crecimiento producidos por las células  $\beta$  de los islotes o intentan evitar el requisito para estos factores.

La mayoría de los individuos que padecen diabetes tipo I requieren alguna forma de tratamiento con insulina. En este momento, dicho tratamiento requiere generalmente el seguimiento en el individuo de las concentraciones de glucosa y/o insulina en sangre y la inyección de insulina recombinante o purificada cuando se requiera. Además se están desarrollando nuevas formas de insulina para permitir la administración nasal u oral. Sin embargo, esta forma de tratamiento requiere el seguimiento continuo por el individuo y la administración de insulina al menos una vez al día durante la vida del individuo. Si el individuo se descuida de administrarse insulina o de administrarse demasiada insulina existe riesgo del desarrollo de, por ejemplo, hiperglucemia, hipoglucemia o cetoacidosis.

Otros compuestos actualmente utilizados para el tratamiento de la diabetes tipo I incluir por ejemplo, sulfonilurea, biguanida,  $\alpha$ -inhibidor de glucosidasa o tiazolidindiona. Sin embargo, cada uno de esos compuestos adolece además de inconvenientes significativos. Por ejemplo, la sulfonilurea produce hipoglucemia e hiperinsulinemia; biguanida produce acidosis láctica; el inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa produce efectos secundarios gastrointestinales; y tiazolidindiona tiene un largo comienzo de acción, está asociada a la ganancia de peso y requiere frecuentes ensayos de función hepática.

El péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) se ha identificado también como un posible agente terapéutico para la diabetes. Este péptido provoca la expresión del factor-1 de homeosecuencia pancreático y duodenal (PDX-1), un factor de transcripción que desempeña una función significativa en el desarrollo del páncreas, la diferenciación de las células beta y el mantenimiento de la función de las células beta (Babu *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 20:3133-3145, 2006). PDX-1 está implicado en la inducción de la expresión de la detección y metabolismo de la glucosa, tales como GLUT2, glucocinasa e insulina. Se ha sugerido a GLP-1 como un potencial agente terapéutico porque puede inducir la expansión de las células beta pancreáticas en un individuo, además de estimular la expresión de insulina

(Buteau, *Diabetes and Metabolism*, 34: S73-S77, 2008). Sin embargo, la utilización de agentes clínicamente disponibles que aumentan la disponibilidad intracelular de GLP-1, tales como los inhibidores de dipeptidilpeptidasa-4 (DPPIV) activos por vía oral o análogos inyectables de GLP-1, se ha limitado al tratamiento de formas leves de diabetes tipo II. La vida media relativamente corta de estos agentes, su necesidad de frecuente administración, y su relativa falta de potencia en casos de pérdida grave de células beta han impedido su utilización como agentes de reserva de insulina para la diabetes tipo 1 u otros pacientes dependientes de insulina. Incluso los análogos de GLP-1 disponibles por vía oral tienen corta vida media y requieren administración diaria a alta dosis.

Otras opciones terapéuticas incluyen trasplante de islotes pancreáticos de Langerhans, que se ha demostrado que reducen la dependencia de insulina (Shapiro *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 343: 230-238, 2000). Sin embargo, la aplicación de este tratamiento está restringida por la muy limitada disponibilidad de islotes primarios humanos procedentes de donantes, que deben tener un corazón que late para asegurar la supervivencia celular durante el trasplante (Burns *et al.*, *J. Endocrinology*, 103: 437-443, 2004).

También se han propuesto células madre, p. ej., células madre embrionarias (ME) como una fuente adecuada para la producción de cantidades terapéuticamente aplicables de células productoras de insulina. Sin embargo, las células  $\beta$  secretoras de insulina no han sido producidas a partir de células madre, dejadas solas en la cantidad requerida, estimada en  $2-4 \times 10^9$  células  $\beta$  por trasplante. Dichos tratamientos celulares deben superar además dificultades tales como la capacidad proliferante de las células de sustitución, deben estar estrechamente controlados para asegurar que no se expanden hasta un punto en que produzcan hiperinsulinemia o hipoglucemia, y las células trasplantadas deben evitar la destrucción por el sistema inmunitario del receptor. Además, en el caso de tratamientos con células ME, algunas células ME que quedan deben eliminarse para evitar el riesgo de formación de teratoma.

#### Diabetes tipo II

La diabetes tipo II es responsable de aproximadamente 90-95% de los casos de diabetes y mata aproximadamente a 193.000 personas al año en EE.UU. solo. La diabetes tipo II es la séptima causa principal de todas las muertes. En las sociedades occidentales, la diabetes tipo II actualmente afecta al 6% de la población adulta con una frecuencia mundial que se espera que crezca el 6% al año. A pesar de que existen determinados rasgos hereditarios que pueden predisponer a determinados individuos a desarrollar la diabetes tipo II, la causa principal del aumento actual en la frecuencia de la enfermedad es el aumento del estilo de vida sedentaria, la dieta y la obesidad actualmente frecuente en los países desarrollados. La diabetes tipo II está internacionalmente reconocida actualmente como una de las principales amenazas para la salud humana.

La diabetes tipo II, se desarrolla cuando las células musculares, adipocitos y hepáticas no pueden responder normalmente a la insulina. Esta ineficacia para responder (denominada resistencia a la insulina) puede ser debida a cantidades reducidas de receptores de insulina en estas células, o a una disfunción de las rutas de señalización dentro de las células, o a ambas. Las células  $\beta$  inicialmente compensan esta resistencia a la insulina aumentando su producción de insulina. A lo largo del tiempo, estas células se vuelven incapaces para producir suficiente insulina para mantener concentraciones normales de glucosa, indicando la evolución a diabetes (Kahn *et al.*, *Am. J. Med.* 108: 2S-8S). , 2000)

#### Tratamiento de la diabetes tipo II

Los tratamientos convencionales para la diabetes tipo II están muy limitados, y se centran en intentar controlar las concentraciones de glucosa en sangre para minimizar o retardar complicaciones. Los tratamientos actuales se dirigen ya sea a la resistencia a la insulina (metformina, tiazolidindionas ("TZD")), o a la liberación de insulina de las células  $\beta$  (sulfonilureas, exanatida). Las sulfonilureas y otros compuestos que actúan despolarizando las células beta, tienen el efecto secundario de la hipoglucemia ya que producen secreción de insulina independiente de las concentraciones de glucosa circulante. Otros efectos secundarios de los tratamientos actuales incluyen aumento de peso, adelgazamiento en sensibilidad al tratamiento a lo largo del tiempo, problemas gastrointestinales y edema.

Un fármaco actualmente aprobado, Januvia (sitagliptina) aumenta las concentraciones en sangre de las hormonas incretinas, que pueden aumentar la secreción de insulina, reducir la secreción de glucagón y tener otros efectos peor caracterizados. Sin embargo, Januvia y otros inhibidores de dipeptidilpeptidasa IV pueden influir además en las concentraciones en los tejidos de otras hormonas y péptidos, y las consecuencias a largo plazo de este efecto más amplio no han sido completamente investigadas. Además, este compuesto no aborda los problemas relacionados con la resistencia a la insulina.

Como con la diabetes, GLP-1 se ha sugerido como un posible agente terapéutico para la diabetes tipo II como resultado de su capacidad para estimular la secreción de insulina, estimular la expansión de las células beta y restablecer la tolerancia a la glucosa en las células beta resistentes a la glucosa. Sin embargo, como se expuso anteriormente, GLP-1 y sus análogos están muy limitados en su potencial terapéutico como resultado de su vida media muy corta.

Es evidente a partir de lo anterior que hay necesidad en la técnica de tratar, prevenir o retardar la aparición o la evolución de los trastornos relacionados con la función pancreática y/o para mejorar la función pancreática.

### Compendio de la invención

En el trabajo que conduce hasta la presente invención los inventores buscan determinar el efecto de un subconjunto específico de células madre mesenquimáticas (CPM) sobre el desarrollo y/o evolución de la disfunción pancreática. Los inventores hacen uso de un modelo reconocido en el que la disfunción pancreática se provoca al administrar

- 5 estreptozotocina (STZ) a un ratón. Este compuesto provoca inflamación e infiltración en inmunocitos de los islotes pancreáticos dando lugar por último a la muerte celular y a la disfunción pancreática. STZ produce disfunción tanto en las funciones endocrinas del páncreas (p. ej., reduciendo la producción de insulina) como en las funciones exocrinas del páncreas (p. ej., reduciendo la producción de amilasa). Este modelo es además un modelo aceptado de un trastorno del metabolismo de la glucosa, p. ej., diabetes tipo I o diabetes tipo II.
- 10 Como se ejemplifica en la presente memoria, los inventores han demostrado que la administración células de STRO-1<sup>+</sup> a ratones tratados con STZ aumenta las concentraciones de insulina en el suero y reduce las concentraciones de glucosa en la sangre en comparación con los ratones tratados con STZ que no han recibido células STRO-1<sup>+</sup>. Los inventores demostraron además que las células STRO-1<sup>+</sup> inducían o aumentaban el número de células que expresan a PDX-1 en el páncreas y/o aumentaban el número de células beta pancreáticas y/o de islotes en un
- 15 individuo (p. ej., estimulan la regeneración de células beta pancreáticas). Los inventores descubrieron además que las células STRO-1<sup>+</sup> restablecen la relación de células beta pancreáticas a células alfa pancreáticas al aumentar el número de células beta y/o reducir el número de células alfa. Los inventores descubrieron además que el tratamiento con células STRO-1<sup>+</sup> provoca la formación de vasos sanguíneos en el páncreas de un individuo. Todos estos datos indican que las células STRO-1<sup>+</sup> y/o sus células madre y/o los factores segregados de éstas inducen o
- 20 estimulan la regeneración pancreática y/o mejoran la función pancreática. Por consiguiente, las células STRO-1<sup>+</sup>, sus células madre o un factor procedentes de las mismas son capaces de tratar y/o evitar y/o reducir los efectos tóxicos de STZ del páncreas. Se deduce que estos datos indican que las células STRO-1<sup>+</sup>, sus células madre o uno o más factores procedentes de las mismas son capaces de tratar, evitar o retardar la aparición o reducir la gravedad de la disfunción pancreática y/o mejorar la función pancreática y/o inducir la regeneración del páncreas o de sus
- 25 células y/o mejorar el metabolismo de la glucosa (p. ej., al aumentar las concentraciones de insulina en circulación).

Los descubrimientos de los inventores proporcionan las bases para el tratamiento y/o la prevención y/o el retardo de la aparición de la evolución de la disfunción pancreática, tal como la diabetes.

Por consiguiente, la presente invención proporciona células STRO-1<sup>+</sup> para su utilización en un procedimiento destinado a mejorar la función pancreática en un individuo que lo necesita. La presente invención proporciona

- 30 además la utilización de células STRO-1<sup>+</sup> para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar la función pancreática en un individuo que lo necesita.

para las células puede (i) inducir o estimular la regeneración de las células beta pancreáticas y/o los islotes pancreáticos, y/o (ii) reducir las concentraciones de glucosa en la sangre y/o aumentar las concentraciones de insulina en sangre/suero, y/o (iii) aumentar el número de células beta pancreáticas y/o aumentar el número de

- 35 células beta pancreáticas con relación a las células alfa pancreáticas y/o reducir el número de células alfa pancreáticas y/o aumentar el número de islotes pancreáticos, y/o (iv) aumentar la expresión del factor-1 de homeosecuencia pancreático y duodenal (PDX-1) y/o aumentar el número de células que expresan al PDX-1 en un páncreas (v) inducir o estimular arteriogenia o angiogenia en el páncreas.

Las células STRO-1<sup>+</sup> puede estimular o inducir regeneración pancreática en las células STRO-1<sup>+</sup> de un individuo (p. ej., en un individuo que padece disfunción pancreática). Por ejemplo, la producción de nuevas células y/o

- 40 microvasos en un páncreas puede inducirse o estimularse. Las células STRO-1<sup>+</sup> pueden aumentar el número de precursores de células beta pancreáticas o inducir o estimular la proliferación de precursores de células beta pancreáticas en un individuo.

El individuo puede padecer disfunción pancreática.

- 45 La disfunción pancreática puede estar relacionada con la disfunción de la función endocrina del páncreas y/o de la función exocrina del páncreas. Preferiblemente, la disfunción pancreática produce o está relacionada con la función pancreática reducida, p. ej., la función endocrina pancreática reducida o la función exocrina pancreática reducida.

En un ejemplo de la presente invención, la disfunción pancreática está relacionada con un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono o da lugar al mismo. Dicho trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono puede

- 50 ser producido por disfunción pancreática endocrina y/o exocrina. En un ejemplo, el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono es ocasionado por la reducción de la producción de insulina por el páncreas. En otro ejemplo, el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono es ocasionado por el aumento de las concentraciones de glucagón (p. ej., aumento de las cantidades de células alfa y/o aumento de la expresión y/o producción y/o secreción de glucagón). En otro ejemplo, el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono es ocasionado por la
- 55 reducción de la producción de amilasa por el páncreas. El experto en la técnica estará al corriente basándose en la descripción en la presente memoria de que un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono (o disfunción pancreática) necesita estar no solamente caracterizado por la función pancreática. Por ejemplo, un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono puede estar caracterizado además por la resistencia a la insulina y/o por un

componente vascular y/o por un componente neuropático. En un ejemplo de la presente invención, la disfunción pancreática es la diabetes mellitus, p. ej., la diabetes mellitus tipo I o la diabetes mellitus tipo II.

Preferiblemente, se administra una cantidad eficaz o una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de células STRO-1<sup>+</sup>. En un ejemplo, se administra una cantidad de células STRO-1<sup>+</sup> suficientes para inducir la producción de insulina en un individuo, preferiblemente para inducir la producción de insulina durante al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> son para administración directa en el torrente sanguíneo de un individuo, sin embargo no están excluidos otros puntos de administración. Preferiblemente, las células STRO-1<sup>+</sup> son para administración generalizada. Por ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> son para administración por vía intravenosa, intrarterial, dentro de la aorta, dentro de una aurícula o un ventrículo del corazón o dentro de un vaso sanguíneo conectado al páncreas, p. ej., la aorta abdominal, la arteria mesentérica superior, la arteria pancreaticoduodenal o la arteria esplénica. En un ejemplo preferido, las células STRO-1<sup>+</sup> son para administración intrarterial, p. ej., en una arteria femoral o en una arteria celíaca, p. ej., empleando un catéter.

Alternativamente, o además, las células STRO-1<sup>+</sup> son para administración al páncreas o a una parte del mismo de un individuo.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> para administración al individuo son STRO-1<sup>bn</sup>, y/o expresan a la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP). En la presente memoria se describen otras poblaciones de células STRO-1<sup>+</sup> caracterizadas por marcadores de superficie de células específicas o una de sus combinaciones. Las células madre y/o los factores solubles pueden proceder de células que expresan STRO-1 o que son STRO-1<sup>bn</sup> y/o que expresan a TNAP. Dichas células madre pueden expresar también STRO-1 o ser STRO-1<sup>bn</sup> y/o expresar TNAP.

Según los ejemplos de la invención dirigidos a tratar o retardar la evolución de la disfunción pancreática, es preferible que las células STRO-1<sup>+</sup> se administren después del diagnóstico del trastorno, p. ej., empleando procedimientos normalizados conocidos en la técnica. Para aquellos ejemplos dirigidos a evitar o retardar la aparición de la disfunción pancreática, es preferible que las células STRO-1<sup>+</sup> se administren antes del diagnóstico clínico del trastorno, p. ej., cuando el individuo padece intolerancia a la glucosa y/o glucemia en ayunas y/o en el caso de la diabetes tipo I antes de o coincidente con la respuesta autoinmunitaria tal como se indica por la expansión de una población de linfocitos T y/o linfocitos B y/o por la producción de autoanticuerpos (p. ej., expansión de linfocitos T citotóxicos frente a células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y/o autoanticuerpos frente a uno o más marcadores de células  $\beta$  de los islotes pancreáticos al comienzo o evolución de la diabetes tipo 1).

Preferiblemente, la invención comprende además el control o la detección de la aparición y/o la evolución de la disfunción pancreática y/o de las concentraciones de glucosa en la sangre y/o de las concentraciones de insulina en sangre/suero y/o del número de linfocitos beta y/o del número de células alfa y/o del número de islotes pancreáticos y/o del número de células que expresan a PDX-1 y/o la cantidad de expresión de PDX-1 y/o del número de vasos sanguíneos. Por ejemplo, la invención puede comprender además ensayos de tolerancia a la glucosa y/o ensayos de glucemia en ayunas y/o medición de las concentraciones de una hormona o enzima producida por el páncreas y/o obtención de una muestra de un páncreas para determinar el número de células beta y/o el número de células alfa y/o el número de islotes pancreáticos y/o el número de células que expresan a PDX-1 y/o la cantidad de expresión de PDX-1 y/o el número de vasos sanguíneos. Dicho control puede indicar que se requiere o es deseable una administración posterior de células STRO-1<sup>+</sup>.

Como es evidente para el experto en la técnica a partir del párrafo anterior, la invención no debe considerarse que se limita a una sola administración de células STRO-1<sup>+</sup>. La presente invención explícitamente comprende múltiples administraciones ya sea en el mismo o diferentes puntos o a través de la misma o diferentes vías. La presente invención contempla además una sola administración de células STRO-1<sup>+</sup>.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran en forma de una composición, p. ej., una composición que comprende dichas células STRO-1<sup>+</sup> y un portador y/o excipiente. Los portadores y/o excipientes adecuados serán evidentes para el experto en la técnica y/o se describen en la presente memoria.

Dicha composición puede comprender factores adicionales útiles para tratar o evitar un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono, p. ej., insulina o amilasa y/o un péptido o polipéptido relacionado con la función pancreática normal p. ej., octapéptido de colicistoquinina, somatostatina, glucagón, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa o lipasa pancreática. Alternativamente, o además, una célula STRO-1<sup>+</sup> puede estar genéticamente modificada para expresar y, preferiblemente segregar, dicho factor adicional, p. ej., insulina o amilasa y/o un péptido o polipéptido relacionado con la función pancreática normal p. ej., octapéptido de colicistoquinina, somatostatina, glucagón, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa o lipasa pancreática.

La presente invención es aplicable a una amplia diversidad de animales. Por ejemplo, el individuo es un mamífero tal como un ser humano, perro, gato, caballo, vaca u oveja, preferiblemente, el individuo es un ser humano. En un ejemplo el individuo es un ser humano. En otro ejemplo, el individuo es un mamífero no humano.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una representación gráfica que representa los efectos de las células STRO-1<sup>+</sup> sobre las concentraciones de glucosa en la sangre (CGS) en ratones NOD/scid diabéticos inducidos por STZ. Se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre en ratones diabéticos que se inyectaron el día 10 después del tratamiento con STZ (flechas) con células STRO-1<sup>+</sup> en el ventrículo izquierdo (CM) o con vehículo (CV). Los valores de glucosa en la sangre son la glucosa media (mM)  $\pm$ SE. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 2 es una representación gráfica que muestra los efectos de las células STRO-1<sup>+</sup> sobre las concentraciones de glucosa en la sangre (CGS) en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ los días 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> y 21<sup>o</sup> después del tratamiento comparadas con el valor de referencia el 10<sup>o</sup> día después del tratamiento con STZ. Se determinaron las concentraciones de glucosa en la sangre en ratones diabéticos inyectados en el ventrículo izquierdo con vehículo (CV) o con células STRO-1<sup>+</sup> (CM). Los resultados se expresan en % de cambio en CGS con relación al inicio del tratamiento celular el 10<sup>o</sup> día. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 3 es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> sobre las concentraciones de insulina en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ 21 días después de la dosis del tratamiento celular. Se determinaron las concentraciones de insulina en el suero en ratones diabéticos inyectados en el ventrículo izquierdo con vehículo (CV) o con células STRO-1<sup>+</sup> (CM). Los valores de insulina en ratón están en  $\mu\text{g/l} \pm \text{SE}$ . La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 4A es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre la densidad de microvasos pancreáticos en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ 21 días después de la dosis del tratamiento celular. Se determinaron las cantidades totales de microvasos teñidos por anti-actina del músculo liso (AML) basándose en la distribución por tamaño por área de la sección transversal de la sección pancreática. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con vehículo grupo N=8, y tratamiento con STRO-1 N=6 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 4B es una copia de una microfotografía (200x) que muestra microvasos de distintos diámetros teñidos con anti-actina del músculo liso IgG2a-FITC de ratón en tejido pancreático de ratones tratados con células STRO-1.
- La figura 5A es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre el perfil del ARNm pancreático en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ 21 días después de la dosis del tratamiento celular. El ARN se extrajo del tejido pancreático de los grupos de tratamiento con vehículo (CV) y STRO-1 (CM), transcritos a la inversa y ampliados por PCR para los factores de transcripción aplicables para la regeneración de células beta: Mafa, Ngn3, Pdx-1. El contenido de ARN completo se normalizó con respecto a la beta-actina del gen constitutivo. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con el grupo del vehículo N= 8, y tratamiento con STRO-1 N= 6 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 5B es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre células positivas a PDX-1 en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ 21 días después de la dosis del tratamiento celular. Se analizaron tejidos pancreáticos teñidos con anti-PDX-1 para células positivas a PDX-1 per  $\text{mm}^2$  de área de los islotes. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con el grupo del vehículo N= 8, tratamiento con STRO-1 N= 6 y referencias sin tratar (sin STZ) N=3 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 5C es una copia de una serie de microfotografías (400x) que muestra secciones insertadas en parafina fijadas con formalina en antígeno recuperado que se tiñeron con anti-PDX-1 (IgG2b) de ratón y se detectaron con conjugado anti-IgG2b-Alexa 555 de ratón en cabra.
- La figura 6A es una representación gráfica que muestra el efecto de células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre las características de los islotes pancreáticos en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ después de 21 días de tratamiento celular. Se analizó la densidad de los islotes en tejidos pancreáticos teñidos con H&E, que se normalizó con respecto al área de la sección examinada. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con el grupo del vehículo N=8, y tratamiento con STRO-1 N=6 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a  $p < 0,05$ .
- La figura 6B es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre los islotes pancreáticos característicos en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ después de 21 días de tratamiento celular. Se analizaron tejidos pancreáticos teñidos con H&E para el diámetro medio de los islotes, que se normalizó con respecto al área de la sección examinada. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con el grupo del vehículo N=8, y tratamiento con STRO-1 N=6 animales.
- La figura 6C es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre las características de los islotes pancreáticos en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ Después de 21 días de tratamiento celular. Se analizaron tejidos pancreáticos teñidos con H&E para el área media de los islotes, que se normalizó con respecto al área de la sección examinada. Los datos representan la media  $\pm$  sem; con el grupo del

vehículo N= 8, y tratamiento con STRO-1 N= 6 animales.

La figura 7A es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre las características de los islotes en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ después de 21 días de tratamiento celular. Se analizaron tejidos pancreáticos teñidos con anti-insulina para las células positivas a insulina por mm<sup>2</sup> de área de los islotes. Los datos representan la media ± sem; con el grupo del vehículo N= 8, tratamiento con STRO-1N= 6 y referencias sin tratar (sin STZ) N=3 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a p<0,05.

La figura 7B es una copia de una serie de microfotografías (200x) que muestra secciones insertadas en parafina fijadas con formalina en antígeno recuperado que se tiñeron con anti-insulina de cobaya y se detectaron con conjugado anti-IgG-rodamina de cobaya. Los grupos de tratamiento están indicados en la base de cada microfotografía.

La figura 7C es una representación gráfica que muestra el efecto de las células STRO-1<sup>+</sup> intrarteriales sobre las características de los islotes en ratones NOD/scid diabéticos inducidos con STZ después de 21 días de tratamiento celular. Se analizaron células positivas a glucagón por mm<sup>2</sup> de área de islote en tejidos pancreáticos teñidos con anti-glucagón. Los datos representan la media ± sem; con grupo con vehículo N= 8, tratamiento con STRO-1N= 6 y referencias sin tratar (sin STZ) N=3 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a p<0,05.

La figura 7D es una copia de una serie de microfotografías (200x) que muestra secciones insertadas en parafina fijadas con formalina en antígeno recuperado que se tiñeron con anti-glucagón de ratón y se detectaron con conjugado anti-IgG-FITC de ratón en cabra. Los grupos de tratamiento están indicados en la base de cada microfotografía.

La figura 7E es una representación gráfica que muestra el número de células beta dentro del islote como una proporción de células alfa + beta totales. Los datos presentados se calcularon a partir de la cantidad de células positivas a insulina/mm<sup>2</sup> de área de los islotes y de la cantidad de células positivas a glucagón/mm<sup>2</sup> de área de los islotes. Los datos representan la media ± sem; con el grupo del vehículo N= 8, tratamiento con STRO-1 N=6 y referencias sin tratar (sin STZ) N=3 animales. La prueba de la t de Student se llevó a cabo con significación a p<0,05.

### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

En toda esta memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario o que el contexto requiera lo contrario, la referencia a una sola etapa, composición de la materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se considerará que abarcan una sola y una pluralidad (es decir, una o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

Cada realización o ejemplo descrito en la presente memoria se va a aplicar, haciendo los ajustes necesarios, a todas y cada una de las realizaciones, salvo que se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, cada realización o ejemplo descrito en la presente memoria dirigida a tratar y/o evitar y/o retrasar la aparición y/o retrasar la evolución de la disfunción pancreática en un individuo se va a aplicar, haciendo los ajustes necesarios, a procedimientos para mejorar la función pancreática y/o para inducir o estimular la regeneración pancreática como si esas realizaciones se mencionasen explícitamente en la presente memoria.

Cada realización o ejemplo descrito en la presente memoria en relación con el tratamiento de la disfunción pancreática se considerará para aplicar, haciendo los ajustes necesarios, al tratamiento de un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono como si esas realizaciones se mencionasen explícitamente en la presente memoria.

Cada realización descrita en la presente memoria en relación con el tratamiento de la disfunción pancreática se considerará para aplicar, haciendo los ajustes necesarios, al tratamiento de la diabetes mellitus, p. ej., la diabetes mellitus tipo I o la diabetes mellitus tipo II, como si esas realizaciones se mencionasen explícitamente en la presente memoria.

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la invención incluye dichas variaciones y modificaciones. La invención incluye además todas las etapas, componentes, composiciones y compuestos referidos a esta memoria o indicados en la misma, individualmente o en conjunto, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de dichas etapas o componentes.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que están destinadas solamente a ilustración. Productos y composiciones funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención, tal como se describe en la presente memoria.

La presente invención se lleva a cabo sin experimentación indebida usando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en solución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Tales procedimientos se describen por ejemplo en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, segunda edición (1989), conjunto de vols. I, Ily DI; *Clonación de DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, conjunto del texto; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed., 1984) IRL Press, Oxford, conjunto del texto, y especialmente los artículos en la presente memoria de Gait, págs. 1-22; Atkinson *et al.*, págs. 35-81; Sproat *et al.*, págs. 83-115; y Wu *et al.*, págs. 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, conjunto del texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, conjunto del texto; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), conjunto de la serie; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" en: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York. 12. Wünsch, E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Müler, E., ed.), vol. 15, 4ª edn., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, tercera edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, conjunto del texto.

En toda esta memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de una etapa, elemento, número entero, grupo de etapas, elementos o números enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otra etapa, elemento, número entero, grupo de elementos o números enteros.

Como se emplea en esta memoria la expresión "producido a partir de" se adoptará para referirse a un número entero especificado puede obtenerse a partir de una determinada fuente aunque no necesariamente directamente de esa fuente. En el contexto de los factores solubles producidos a partir de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células madre de las mismas, esta expresión se adoptará para referirse a uno o más factores, p. ej., proteínas, péptidos, carbohidratos, etc., producidos durante el cultivo *in vitro* de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células madre de las mismas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "mejorar la función pancreática" se adoptará para referirse a una o más funciones de un páncreas en un individuo se mejora en comparación con la misma función en un individuo que no ha sido tratado según la presente invención (preferiblemente, en el individuo antes del tratamiento). Dicha expresión comprende, p. ej., aumentar la cantidad de secreción de insulina o mejorar la regulación de secreción de insulina en un individuo que puede o no estar padeciendo un trastorno del metabolismo de la glucosa. La expresión comprende además reducir la secreción de, p. ej., glucagón en un individuo que tiene un aumento de concentraciones de esta hormona (p. ej., como resultado de un tumor que segrega glucagón) y/o en un individuo que padece hipoglucemia.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "disfunción pancreática" se adoptará para referirse a cualquier afección en la que una o más de las funciones de un páncreas en un individuo es/son diferente(s) de la misma función en un individuo normal y/o sano. Por ejemplo, la expresión "disfunción pancreática" comprende afecciones en las que una función y/o una función exocrina de un páncreas en un individuo ha(n) aumentado o se ha(n) reducido en comparación con un individuo normal y/o sano. Por ejemplo, la "disfunción pancreática" puede estar caracterizada por, relacionada con o producida por concentraciones atípicas (es decir, aumentadas o reducidas) de insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa o amilasa pancreáticas. Será evidente para el experto en la materia a partir de lo anterior que la expresión "tratamiento de la disfunción pancreática" comprende la normalización de una función del páncreas (p. ej., tratamiento de a un individuo de tal manera que una o más funciones del páncreas que son anormales se reducen o aumentan, de tal manera que son más similares a la misma función en un individuo normal y/o sano). Por ejemplo, dicho tratamiento puede dar lugar a un aumento de las concentraciones de insulina y/o a un aumento del número de células beta pancreáticas y/o de islotes pancreáticos en un individuo con concentraciones anormalmente reducidas de insulina y/o de células beta y/o de islotes. Dicho tratamiento puede reducir igualmente de manera anormal el aumento de las concentraciones de glucagón, p. ej., en el caso de un tumor pancreático secretor de glucagón, p. ej., por reducción del número de células alfa secretoras de glucagón y/o por reducción de la expresión, producción y/o secreción de glucagón. El significado de la expresión "prevenir o retrasar la disfunción pancreática" será evidente para el experto en la técnica sobre la base de lo anterior.

La disfunción pancreática puede estar relacionada con o producir una afección que da lugar a absorción insuficiente de nutrientes, p. ej., hidratos de carbono, lípidos o proteínas, p. ej., como resultado de una concentración reducida de una enzima digestiva producida por el páncreas, p. ej., lipasa o amilasa y o por la reducción de la producción de jugo pancreático. Dichas afecciones incluyen pancreatitis, insuficiencia pancreática, síndrome de autoinmunodeficiencia adquirida, cáncer, fibrosis quística o síndrome de Zollinger Ellison. En un ejemplo preferido, la

afección es producida por o está relacionada con una reducción de la amilasa o lipasa producida por el páncreas.

La disfunción pancreática también puede estar relacionada con o ser causada por una afección relacionada con el uso atípico o el metabolismo de los nutrientes por un individuo, p. ej., dando como resultado. Dichas afecciones incluyen trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono, p. ej., diabetes mellitus. Otras afecciones incluyen, por ejemplo, tumores (p. ej., tumores secretores de glucagón, que pueden dar lugar a hiperglucemia). A modo de ejemplo los tumores comprenden glucagonomas.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono" se adoptará para referirse a cualquier trastorno en el que un individuo es incapaz o tiene una capacidad reducida para descomponer, metabolizar, absorber o utilizar una o más formas de hidratos de carbono, que por lo general conduce a mayores concentraciones de este o estos carbohidrato(s) en el torrente sanguíneo del individuo. Preferiblemente, el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono está relacionado con o es producido por la producción reducida por el páncreas de una hormona involucrada en la descomposición de un hidrato de carbono, p. ej., en la producción de amilasa. Más preferiblemente, el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono está relacionado con u ocasionado por la reducción de la producción de una hormona implicada en la absorción de un hidrato de carbono, p. ej., en la producción de insulina. Trastornos del metabolismo de hidratos de carbono típicos incluyen la diabetes mellitus tipo I, la diabetes mellitus tipo II, la diabetes tipo I idiopática (tipo Ib), la diabetes tipo II prematura (EOD), la diabetes juvenil atípica (YOAD), la diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (MODY), la diabetes relacionada con la malnutrición, la diabetes gravídica, las condiciones de intolerancia a la glucosa (IGT), las condiciones de alteración de la glucosa en el plasma en ayunas, la acidosis metabólica, la cetosis, el síndrome X, la hiperglucemia, la hipoinsulinemia, la resistencia a la insulina, la mannosidosis alfa, la mannosidosis beta, la intolerancia a la fructosa, la fucosidosis, la galactosemia, la enfermedad de Leigh, la mucopolisacáridosis, mucopolisacáridosis o una complicación de una cualquiera o más de las anteriores. Preferiblemente, el trastorno del metabolismo de hidratos de carbono es la diabetes, por ejemplo, diabetes tipo I o diabetes tipo II.

Preferiblemente, un individuo que padece diabetes tiene un marcador de diabetes clínicamente aceptado, tal como:

- Glucosa en el plasma en ayunas mayor o igual a 7 nmol/l o 126 mg/dl;
- Glucosa plasmática ocasional (tomada en cualquier momento del día) mayor o igual a 11,1 nmol/l o 200 mg/dl con los síntomas de la diabetes.
- Valor de la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) mayor o igual a 11,1 nmol/l o 200 mg/dl medido en un intervalo de dos horas. La POTG se da en un lapso de tiempo de dos a tres horas.

Tal como se emplea en la presente memoria, que la expresión "cantidad eficaz" se adoptará para referirse a una cantidad suficiente de células STRO-1<sup>+</sup> para mejorar la función pancreática en un individuo al que se administran células STRO-1<sup>+</sup> y/o en comparación con su función pancreática antes de la administración y/o en comparación con un individuo al que no se administran células STRO-1<sup>+</sup>. Por ejemplo, una cantidad eficaz de células STRO-1<sup>+</sup> puede reducir concentraciones de glucosa (glucemia) basales o en reposo y/o mejorar la tolerancia a la glucosa y/o aumentar las concentraciones de insulina en sangre y/o las concentraciones de glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa o amilasa pancreática en suero, en el páncreas o en el sistema digestivo. Una cantidad eficaz de células STRO-1<sup>+</sup> puede aumentar además el suministro de sangre al páncreas o a una región del mismo, p. ej., al aumentar los vasos sanguíneos alrededor, en el páncreas o en una de sus regiones. El experto en la técnica será consciente de que dicha cantidad variará dependiendo de, por ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> y/o del individuo concreto y/o del tipo o la gravedad de la disfunción pancreática. Por consiguiente, esta expresión no debe considerarse que limita la invención a una cantidad específica, p. ej., el peso, el número de células o los factores solubles, más bien la presente invención comprende cualquier cantidad de células STRO-1<sup>+</sup> suficiente para mejorar la función pancreática en un individuo. Los métodos para detectar la función pancreática y/o para determinar la cantidad de células STRO-1<sup>+</sup> suficiente para mejorar la función pancreática serán evidentes para el experto en la técnica y/o están descritos en la presente memoria. Una cantidad eficaz no necesita necesariamente tratar o evitar la disfunción pancreática.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se adoptará para referirse a una cantidad suficiente de células STRO-1<sup>+</sup> y/o para reducir o inhibir uno o más síntomas de un cuadro clínico relacionada con o ocasionada por una disfunción pancreática a un nivel que está por debajo del observado y aceptado como clínicamente diagnóstico de esa afección. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de células STRO-1<sup>+</sup> puede reducir la tolerancia a la glucosa en un individuo a partir de un nivel observado en un individuo diabético a un nivel observado en un individuo presintomático (p. ej., que padece intolerancia a la glucosa o con problemas de glucemia en reposo) o en un individuo normal o saludable.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se adoptará para referirse a una cantidad suficiente de células STRO-1<sup>+</sup> para evitar o inhibir la aparición de uno o más síntomas detectables de un cuadro clínico relacionado con u ocasionado por la disfunción pancreática. Por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de células STRO-1<sup>+</sup> puede impedir la tolerancia a la glucosa en un individuo que se vuelve intolerante hasta tal punto que al individuo se le diagnostica clínicamente con diabetes.

Como se emplea en la presente memoria, el término "tratar" o "tratamiento" se entiende que significa la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de factores solubles y/o células y la reducción o la inhibición de al menos un síntoma de un cuadro clínico relacionado con o causado por la disfunción pancreática.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "prevenir" o "prevención" se adoptará para referirse a la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de células y detener o impedir el desarrollo de al menos un síntoma de un cuadro clínico relacionado con o causado por la disfunción pancreática.

10 Por "retrasar la evolución de la disfunción pancreática" se entiende que un tratamiento reduce la gravedad de la disfunción pancreática en un individuo. Dicha reducción en la gravedad puede ser, por ejemplo, la prevención de una o más complicaciones de la disfunción pancreática, tales como, por ejemplo, absorción insuficiente de nutrientes, hipoglucemia, hiperglucemia, cetoacidosis, retinopatía, cataratas, hipertensión, insuficiencia renal, enfermedad de la arteria coronaria, vasculopatía periférica, neuropatía (p. ej., neuropatía periférica o neuropatía autónoma) o aumento del riesgo de infección. Alternativamente, o además, una reducción en la gravedad de la disfunción pancreática se caracteriza por una reducción en requisitos para el tratamiento terapéutico (p. ej., la administración de insulina) o la regularidad del tratamiento terapéutico de un individuo en comparación con un individuo que no ha recibido tratamiento utilizando el procedimiento de la invención. Alternativamente, o además, "reducir la evolución de la disfunción pancreática" es un retraso en la aparición de uno o más síntomas detectables de la disfunción pancreática en comparación con un individuo diabético que no ha recibido tratamiento con un compuesto que reduce la evolución de la disfunción pancreática.

20 Como se emplea en la presente memoria, la expresión "factores solubles" se adoptará para referirse a cualquier molécula, p. ej., proteínas, péptidos, glucoproteínas, lipoproteínas, lipopéptidos, hidratos de carbono, etc. producida por células STRO-1<sup>+</sup> y/o de su descendencia que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser intracelulares y/o segregados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (p. ej., sobrenadante) y/o una fracción del mismo y/o pueden ser un factor purificado. Los factores solubles pueden estar contenidos dentro del sobrenadante. Por consiguiente, se adoptará cualquier ejemplo en la presente memoria dirigido a la administración de uno o más factores solubles para aplicar, haciendo los ajustes necesarios, a la administración de sobrenadante.

30 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "sobrenadante" se refiere al material no celular producido tras el cultivo *in vitro* de células madre mesenquimatosas, y/o células madre de las mismas, en un medio adecuado, preferiblemente medio líquido. Normalmente, el sobrenadante se produce cultivando las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, seguido de la eliminación del material celular por un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede o no haber sido sometido a más etapas de purificación antes de la administración. En el ejemplo preferido, el sobrenadante comprende menos de 10<sup>5</sup>, más preferiblemente menos de 10<sup>4</sup>, más preferiblemente menos de 10<sup>3</sup> e incluso más preferiblemente sin células vivas.

35 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "individuo normal o sano" se adoptará para referirse a un individuo que no padece disfunción pancreática según se evalúa por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en la presente memoria.

Células STRO-1<sup>+</sup> o células madre, y sobrenadante o uno o más factores solubles obtenidos a partir de las mismas

40 Las células STRO-1<sup>+</sup> son células que se encuentran en la médula ósea, la sangre, las células de la pulpa dental, el tejido adiposo, la piel, el bazo, el páncreas, el cerebro, los riñones, el hígado, el corazón, la retina, el cerebro, los folículos pilosos, los intestinos, los pulmones, los ganglios linfáticos, el timo, los huesos, los ligamentos, los tendones, los músculos estriados, la dermis y el periostio; y son capaces de diferenciarse en estirpes germinales, tales como el mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo.

45 En una realización, las células STRO-1<sup>+</sup> son células multipotenciales que son capaces de diferenciarse en un gran número tipos de células incluídas, pero no limitadas a, las de los tejidos adiposo, ósea, cartilaginoso, elástico, muscular y conectivo fibroso. El compromiso de linaje específico y la vía de diferenciación que estas células introducen depende de diversas influencias desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas, y/o condiciones microambientales locales creadas por los tejidos del hospedador. Las células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales son, pues, las células madre hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son ya sea células madre o son células madre que con el tiempo se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.

55 En un ejemplo preferido, las células STRO-1<sup>+</sup> se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un individuo, p. ej., un individuo que va a ser tratado, un individuo relacionado o un individuo no relacionado (ya sea de la misma o diferente especie). Los términos "enriquecido", "enriquecimiento" o variaciones de los mismos se emplean en la presente memoria para describir una población de células en las que se aumenta la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de un número tipos de células específicas en comparación con la población no tratada.

En un ejemplo preferido, las células utilizadas en la presente invención expresan uno o más marcadores individual o colectivamente seleccionados del grupo que consiste en TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, Thy-1<sup>+</sup>, STRO-2<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD146<sup>+</sup>, 3G5<sup>+</sup> o cualquier combinación de los mismos.

Por "individualmente" se entiende que la invención comprende los marcadores o grupos de marcadores citados por separado, y que, pese a que cada uno de los marcadores o grupos de marcadores no se pueden enumerar por separado en la presente memoria las reivindicaciones adjuntas pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y divisiblemente entre sí.

- 5 Por "colectivamente" se entiende que la invención abarca cualquier número o combinación de los marcadores o grupos de péptidos citados, y que, a pesar de que dichos números, combinaciones de marcadores o grupos de marcadores no aparezcan específicamente en la presente memoria las reivindicaciones adjuntas pueden definir dichas combinaciones o combinaciones por separado y divisiblemente a partir de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.
- 10 Preferiblemente, las células STRO-1<sup>+</sup> son STRO-1<sup>brillante</sup> (sin. STRO-1<sup>bri</sup>). Preferiblemente, las células STRO-1<sup>brillante</sup> son, además, una o más de TNAP<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, THY-1<sup>+</sup>, STRO-2<sup>+</sup> y/o CD146<sup>+</sup>.

En un ejemplo, las células madre mesenquimatosas son células madre mesenquimatosas perivasculares tal como se definen en el documento WO 2004/85630.

- 15 Una célula a la que se hace referencia como "positiva" para un marcador dado puede expresar ya sea un bajo (lo o dim) o un alto (brillante, bri) nivel de ese marcador en función del grado en el que el marcador está presente en la superficie de la célula, donde los términos se refieren a la intensidad de la fluorescencia u otro marcador usado en el proceso de clasificación de las células. La distinción de lo (o tenue o mate) y bri se entenderá en el contexto del marcador utilizado en una determinada población celular particular que se está clasificando. Una célula a la que se hace referencia como "negativa" para un marcador dado no está necesariamente completamente ausente de esa
- 20 célula. Este término significa que el marcador es expresado a un nivel relativamente muy baja por esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo.

- El término "brillante", cuando se emplea en la presente memoria, se refiere a un marcador en una superficie celular que genera una señal de relativamente alta cuando se marca de forma detectable. Aunque no se desea estar
- 25 limitado por la teoría, se propone que las células "brillante" expresan más de la proteína marcadora objetivo (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1<sup>bri</sup> producen una señal fluorescente mayor, cuando están marcadas con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC como se determina por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que las células no brillantes (STRO-1<sup>opaco/mate</sup>). Preferiblemente, las células "brillante" constituyen al menos aproximadamente 0,1% de las células mononucleares de médula ósea más brillantemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células "brillante" constituyen al menos aproximadamente 0,1%, al menos aproximadamente 0,5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1,5%, o al menos aproximadamente 2%, de las células mononucleares de médula ósea más brillantemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo preferido, las células STRO-1<sup>brillante</sup> tienen una expresión mayor de la magnitud 2 log de la expresión de la
- 30 superficie de STRO-1 con relación al "fondo", es decir, células que son STRO-1-. En comparación, las células STRO-1<sup>oscuro</sup> y/o STRO-1<sup>intermedio</sup> tienen menos que la mayor expresión de magnitud 2 log de la expresión de superficie de STRO-1, por lo general de aproximadamente 1 log o menos que el "fondo".

- Tal como se emplea en la presente memoria, el término "TNAP" se pretende que abarque todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma del hígado (LAP), la isoforma
- 40 ósea (BAP) y la isoforma de riñón (KAP). En un ejemplo preferido, la TNAP es BAP. En un ejemplo especialmente preferido, TNAP tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la estirpe celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest bajo el número de ingreso de depósito PTA-7282.

Además, en un ejemplo preferido, las células STRO-1<sup>+</sup> son capaces de dar lugar a CFU-F clonógena.

- 45 Es preferible que una proporción significativa de células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales sean capaces de diferenciación en al menos dos estirpes germinales diferentes. Ejemplos no restringidos de los linajes a los que las células multipotenciales pueden estar comprometidas incluyen células madre óseas; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para las células epiteliales del conducto biliar y hepatocitos; las células neurales restringidas, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores
- 50 neuronales que evolucionan a neuronas; precursores para el músculo cardíaco y cardiomiocitos, estirpes de células beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero no se limitan a, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos y células madre de lo siguiente: células epiteliales pigmentarias de la retina, fibroblastos, células de la piel tales como queratinocitos, dendrocitos, células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células del músculo liso y estriado, células madre testiculares,
- 55 células endoteliales vasculares, de los tendones, de los ligamentos, de los cartílagos, adipocitos, fibroblastos, del estroma medular, de músculo cardíaco, de músculo liso, de músculo estriado, pericitos, vasculares, epiteliales, gliales, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

En otro ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> no son capaces de dar lugar, en cultivo, a células hematopoyéticas.

En un ejemplo, las células se extraen del individuo que se va a tratar, se cultivan *in vitro* utilizando técnicas normalizadas y se utilizan para obtener sobrenadante, factores solubles o células expandidas para la administración al individuo como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan células de una o más de las estirpes celulares humanas creadas. En otro ejemplo útil de la invención, se utilizan células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie).

En la presente memoria se describe el uso de factores de sobrenadante o solubles obtenidos o provenientes de células STRO-1<sup>+</sup> y/o células madre de las mismos (denominándose también estas últimas células expandidas) que se produce a partir de cultivo *in vitro*. Las células expandidas de la invención pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluidas el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pasos y similares. En ciertos ejemplos, las células madre se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9 o aproximadamente 10 pasos a partir de la población parental. Sin embargo, las células madre pueden obtenerse después de cualquier número de pasos a partir de la población parental.

Las células madre se pueden obtener por cultivo en cualquier medio adecuado. El término "medio", tal como se emplea haciendo referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. El medio pueden ser sólido, líquido, gaseoso o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de cultivo líquidos, así como medios líquidos que no mantienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como matrices de agar, agarosa, gelatina y colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también se refiere al material que está destinado para su uso en un cultivo celular, incluso si no se ha puesto todavía en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido se vuelve adecuada para el cultivo celular puede denominarse un "medio en polvo".

En un ejemplo, las células madre útiles para la invención se obtienen aislando células TNAP<sup>+</sup> STRO-1<sup>+</sup> de la médula ósea utilizando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3 y, a continuación, el cultivo que expande las células aisladas (véase Gronthos *et al. Blood* 85: 929-940, 1995, para un ejemplo de condiciones de cultivo adecuadas).

En un ejemplo, dichas células expandidas (descendencia) (preferiblemente, al menos después de 5 pasos) pueden ser TNAP<sup>-</sup>, CC9<sup>+</sup>, HLA de clase I<sup>+</sup>, HLA de clase II<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD11a-c<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD86<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup> y/o CD80<sup>-</sup>. Sin embargo, es posible que, en diferentes condiciones de cultivo a las descritos en la presente memoria, la expresión de diferentes marcadores puede variar. Además, mientras que las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de células expandidas no significa que haya una menor proporción de células no tienen este o estos fenotipo(s) (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9<sup>+</sup>). En un ejemplo preferido, las células expandidas todavía tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

En un ejemplo, una población de células expandidas utilizada para obtener factores de sobrenadante o solubles, o células propiamente dichas, comprende células en las que al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, de las células son CC9<sup>+</sup>.

En otro ejemplo, una población de células expandidas utiliza para obtener factores de sobrenadante o solubles, o células propiamente dichas, comprende células en las que al menos 40%, más preferiblemente al menos 45%, de las células son STRO-1<sup>+</sup>.

En un ejemplo más, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores colectiva o individualmente seleccionados del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1<sup>brillante</sup> y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En un ejemplo, las células madre son células madre multipotenciales STRO-1<sup>+</sup> expandidas (MEMP) tal como se definen y/o se describen en el documento WO 2006/032092. Los procedimientos para preparar poblaciones enriquecidas de células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales de las que puede obtenerse descendencia se describen en los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto *in vitro* células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales rara vez estarán presentes en forma de un preparado absolutamente puro y generalmente estarán presentes con otras células que son células comprometidas específica de tejido (TSCC). El documento WO 01/04268 se refiere a la recolección de dichas células de médula ósea a niveles de pureza de aproximadamente 0,1% a 90%. La población que comprende CMP de las que se obtiene la descendencia puede recogerse directamente de una fuente de tejido, o, alternativamente, pueden ser una población que ya se ha expandido *ex vivo*.

Por ejemplo, la descendencia puede obtenerse a partir de una población recolectada, no expandida, de células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales sustancialmente purificadas, que comprende al menos aproximadamente 0,1, 1, 5, 10, 20,

30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 95% de las células totales de la población en la que están presentes. Este nivel puede conseguirse, por ejemplo, seleccionando las células que son positivas para al menos un marcador individual o colectivamente seleccionado del grupo que consiste en TNAP, STRO-1<sup>brillante</sup>, 3G5<sup>+</sup>, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

- 5 Las MEMP pueden distinguirse de las células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales recién recolectadas en que son positivas para el marcador STRO-1<sup>brn</sup> y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). Por el contrario, las células STRO-1<sup>+</sup> multipotenciales recién aisladas son positivas tanto para STRO-1<sup>brn</sup> como para ALP. En un ejemplo preferido de la presente invención, al menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1<sup>brn</sup>, ALP<sup>-</sup>. En un ejemplo más preferido las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1. En un ejemplo aún más preferido las MEMP no presentan actividad de TERT y/o son negativas para el marcador CD18.

- 10 La población de partida de células STRO-1<sup>+</sup> puede obtenerse de uno cualquiera o más tipos de tejidos propuestos en los documentos WO 01/04268 o WO 2004/085630, a saber, de la médula ósea, de las células de la pulpa dental, del tejido adiposo y de la piel, o quizás más ampliamente del tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestinos, pulmones, bazo, ganglios linfáticos, timo, páncreas, huesos, ligamentos, médula ósea, tendones y los músculos estriados.

- 15 Debe entenderse que en la realización de la presente invención, la separación de las células que llevan cualquier marcador de superficie celular dado puede efectuarse mediante varios procedimientos diferentes, sin embargo, los procedimientos preferidos se basan en la fijación de un aglutinante (p. ej., un anticuerpo o uno de sus fragmentos de fijación al antígeno) al marcador correspondiente seguido de una separación de los que presentan fijación, ya sea fijación de alto nivel o fijación de bajo nivel o sin fijación. Los aglutinantes más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpos, siendo preferiblemente anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales, debido a la especificidad de estos últimos agentes. Los anticuerpos pueden utilizarse para ambas etapas, sin embargo también pueden utilizarse otros agentes, por lo tanto también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer en células que los llevan o que carecen de ellos.

- 20 Los anticuerpos o ligandos pueden estar unidos a un soporte sólido para permitir una separación burda. Las técnicas de separación preferiblemente maximizan la retención de viabilidad de la fracción que se recoge. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente burdas. La técnica específica empleada dependerá de la eficiencia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y la velocidad de rendimiento, y la necesidad de equipo sofisticado y/o habilidad técnica. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero no se limitan a, separación magnética, utilizando perlas magnéticas revestidas en anticuerpos, cromatografía de afinidad y "panning" con anticuerpos adheridos a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación correcta incluyen, pero no se limitan a FACS. Los métodos para realizar FACS serán evidentes para el experto en la técnica.

- 25 Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos en la presente memoria están disponibles en el mercado (p. ej., anticuerpos monoclonales contra STRO-1 están disponibles en el mercado en R&D Systems, EE.UU.), disponibles en ATCC u otra organización depositaria y/o pueden producirse usando técnicas reconocidas en la tecnología.

- 30 Es preferible que el procedimiento para aislar células STRO-1<sup>+</sup>, por ejemplo, comprenda una primera etapa que es una etapa de clasificación en fase sólida utilizando por ejemplo la clasificación de células activadas por campos magnéticos (MACS) que reconoce la expresión de alto nivel de STRO-1. Una segunda etapa de clasificación puede seguir a continuación, si así se desea, para dar lugar a un nivel más alto de expresión de células madre como se describe en la memoria de patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría implicar la utilización de dos o más marcadores.

- 35 El procedimiento de obtención de células STRO-1<sup>+</sup> también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. De este modo el tejido se extirpa quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido original a continuación, se separarán en una denominada suspensión de células individuales. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y/o enzimáticos.

- 40 Una vez que se ha obtenido una población adecuada de células STRO-1<sup>+</sup>, puede cultivarse o expandirse por cualquier medio adecuado para obtener las MEMP.

- 45 En un ejemplo, se extraen células del individuo que se va a tratar, se cultivan *in vitro* empleando técnicas normalizadas y utilizadas para obtener factores de sobrenadante o solubles o células expandidas para la administración al individuo como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, las células de una o más de las estirpes celulares humanas creadas se utilizan para obtener el factores de sobrenadante o solubles. En otro ejemplo útil, las células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie) se utilizan para obtener factores de sobrenadante o solubles.

La invención puede ponerse en práctica utilizando células de cualquier especie animal no humana, incluidas, pero sin limitarse a células de primates no humanos, células de ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, roedores, aves y

peces. Las células de primates con las que puede realizarse la invención incluyen, pero no se limitan a las células de chimpancés, papiones, macacos cangrejeros, y cualquier otro de los monos del Nuevo o Viejo Mundo. Las células de ungulados con la que puede realizarse la invención incluyen, pero no se limitan a las células de ganado bovino, porcino, ovino, caprino, equino, búfalos y bisontes. Las células de roedores con las que puede realizarse la invención incluyen, pero no se limitan a las células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo. Ejemplos de la especie lagomorfa con la que se puede realizar la invención incluyen conejos domésticos, liebres, liebres, conejos de cola blanca, conejos de las nieves y picas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la que puede realizarse la invención.

Las células útiles para los procedimientos de la invención pueden almacenarse antes de su uso. Los métodos y protocolos para la conservación y almacenamiento de las células eucariotas, y en particular de las células de mamíferos, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pollard, J. W. y Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, segunda edición, Humana Press, Totowa, N. J.; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N. J.). Cualquier procedimiento de mantenimiento de la actividad biológica de las células madre aisladas, tales como las células madre/progenitoras mesenquimatosas, o su descendencia, puede utilizarse en relación con la presente invención. En un ejemplo preferido, las células se mantienen y se almacenan utilizando la criopreservación.

#### Células genéticamente modificadas

En un ejemplo, la células STRO-1<sup>+</sup> se modifican genéticamente, p. ej., para expresar y/o segregar una proteína de interés, p. ej., una proteína que proporciona una cualidad terapéutica y/o profiláctica, p. ej., insulina, glucagón, somatostatina, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa o amilasa pancreática o un polipéptido relacionado con o causante de una mayor angiogenia o un polipéptido relacionado con la diferenciación de una célula en una célula pancreática o una célula vascular.

Los procedimientos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico que se va a expresar en una célula está operativamente unido a un activador para producir la expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico está ligado a un activador operable en una variedad de células de un individuo, tales como, por ejemplo, un activador vírico, p. ej., un activador de CMV (p. ej., un activador de CMV-IE) o un activador de SV-40. Otros activadores adecuados son conocidos en la técnica y se adoptarán para aplicar, haciendo los ajustes necesarios, al presente ejemplo de la invención.

Preferiblemente, el ácido nucleico se proporciona en forma de un montaje de expresión. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "montaje de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene capacidad de conferir expresión en un ácido nucleico (p. ej., un gen indicador y/o un gen indicador contraseleccionable) al que está conectado operativamente, en una célula. En el contexto de la presente invención, debe entenderse que un montaje de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagómido, cósmido, fragmento subgenómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

Los procedimientos para el montaje de un montaje de expresión adecuada para la ejecución de la invención serán evidentes para el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (en: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook *et al.* (en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición, 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes del montaje de expresión se amplía a partir de un ácido nucleico plantilla adecuado utilizando, p. ej., PCR y posteriormente se clona en un montaje de expresión adecuado, tal como p. ej., un plásmido o un fagómido.

Los vectores adecuados para dicho montaje de expresión se conocen en la técnica y/o se describen en la presente memoria. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el procedimiento de la presente invención en una célula de mamífero es, p. ej., un vector de la serie del vector pcDNA suministrado por Invitrogen, un vector de la serie del vector pCI (Promega), un vector de la serie del vector pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector de la serie del vector pcDNA (Invitrogen).

El experto en la técnica será consciente de los vectores y fuentes adicionales de dichos vectores, tales como, p. ej., Invitrogen Corporation, Clontech o Promega.

Los medios para introducir la molécula aislada de ácido nucleico o un montaje génico que comprende el mismo en una célula para la expresión son conocidos por los expertos en la técnica. La técnica utilizada para un organismo dado depende de las técnicas efectivas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, tal como empleando lipofectamina (Gibco, MD, EE.UU.) y/o cellfectin (Gibco, MD, EE.UU.), absorción de ADN en la que actúa como mediador PEG, electroporación y bombardeo con micropartículas tal como utilizando ADN recubierto de tungsteno o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EE.UU.), entre otros.

Alternativamente, un montaje de expresión de la invención es un vector vírico. Vectores víricos adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Sistemas a base de virus convencionales para la

administración de un ácido nucleico y la integración de ese ácido nucleico en un genoma de célula hospedadora incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector vírico adeno-asociado. Alternativamente, un vector adenoviral es útil para la introducción de un ácido nucleico que permanece episómico en una célula hospedadora. Los vectores víricos son un método eficiente y versátil de transferencia génica en células y tejidos diana. Además, se han observado altas eficiencias de transducción en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

Por ejemplo, un vector retroviral comprende generalmente repeticiones terminales largas que actúan en cis (LTR) con capacidad de empaquetamiento para hasta 6 a 10 kb de secuencia extraña. Las LTR mínimas de acción cis son suficientes para la replicación y empaquetamiento de un vector, que a continuación se utiliza para integrar el montaje de expresión en la célula diana para proporcionar expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen aquellos a base de virus de leucemia murina (MuLV), virus de leucemia del gibbon (GaLV), virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y cualquiera de sus combinaciones (véase, p. ej., Buchscher *et al.*, *J. Virol.* 56: 2731-2739 (1992); Johann *et al.*, *J. Virol.* 65: 1635-1640 (1992); Sommerfelt *et al.*, *Virol.* 76: 58-59, (1990); Wilson *et al.*, *J. Virol.* 65: 274-2318 (1989); Miller *et al.*, *J. Virol.* 65: 2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller y Rosman *BioTechniques* 7: 980 a 990, 1989; Miller A. D., *Human Gene Therapy* 7: 5-14, 1990; Scarpa *et al. Virology* 75: 849-852, 1991; Burns *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-8037, 1993).

Varios sistemas de vectores de virus adeno-asociado (AAV) también se han desarrollado para la administración de ácido nucleico. Los vectores AAV pueden construirse fácilmente empleando técnicas conocidas en la tecnología. Véase, p. ej., las Pat. De EE.UU. n° 5.173.414 y n° 5.139.941; las publicaciones internacionales n° WO 92/01070 y n° WO 93/03769.; Lebkowski *et al. Molec. Cell Biol.* 5: 3988-3996, 1988; Vincent *et al.* (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5: 533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling y Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; y Zhou *et al. J. Exp. Med.* 179: 1867-1875, 1994.

Otros vectores víricos útiles para la administración de un montaje de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, los obtenidos de la familia de los virus de la viruela, tales como virus de la vacuna y virus de la viruela aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (p. ej., el descrito en Fisher-Hoch *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 317-321, 1989).

Ensayo terapéutico/profiláctico potencial de células y factores solubles

Los métodos para determinar la capacidad de las células o factores solubles para tratar, impedir o retrasar la aparición o la evolución de la disfunción pancreática serán evidentes para el experto en la técnica.

Por ejemplo, las células o factores solubles (p. ej., una mezcla de factores o un solo factor o una fracción de factores (p. ej., obtenidos por purificación por afinidad o cromatografía)) se administran a un individuo del ensayo, p. ej., un animal de ensayo durante un tiempo y en condiciones suficientes para proporcionar una cualidad terapéutica/profiláctica y las concentraciones de glucosa se evalúan en reposo, basal o en ayunas y/o se lleva a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa. Dichos ensayos se llevan a cabo utilizando kits y/o dispositivos disponibles en el mercado. Las concentraciones basales o en ayunas de glucosa se evalúan después del ayuno, p. ej., durante aproximadamente 8 a aproximadamente 14 horas. Para una prueba de tolerancia a la glucosa, un individuo ayuna durante aproximadamente 8 a aproximadamente 14 horas y luego consume glucosa (p. ej., aproximadamente 1,75 gramos de glucosa por kilogramo de peso corporal) y la concentración de glucosa en sangre se evalúa después de aproximadamente 2 a 3 horas. Según la Organización Mundial de la Salud, la glucemia en el plasma en ayunas debe ser inferior a 6,1 mmol/l (100 mg/dl). Las concentraciones en ayunas entre 6,1 y 7,0 mmol/l (100 y 126 mg/dl) son dudosas ("glucemia en ayunas defectuosa"), y las concentraciones en ayunas repetidamente igual o superior a 7,0 mmol/l (126 mg/dl) son diagnóstico de diabetes. La concentración de glucosa a las 2 horas debe ser inferior a 7,8 mmol/l (140 mg/dl). Las concentraciones entre ésta y 11,1 mmol/l (200 mg/dl) indican intolerancia a la glucosa. Las concentraciones de glucosa por encima de 11,1 mmol/l (200 mg/dl) a las 2 horas confirman un diagnóstico de diabetes.

Preferiblemente, el individuo de la prueba padece disfunción pancreática. Por ejemplo, el individuo de la prueba es un ratón (NOD) diabético no obeso (un modelo de diabetes tipo I) o un ratón o una rata al que se ha administrado estreptozotocina (modelos de diabetes tipo I y/o tipo II; ver Lúkcic *et al.*, *Developmental Immunol.* 6: 119-128, 1998 y Arulmozhi *et al.*, *Indian J. Pharmacol.* 36: 217-221, 2004), Goto Kakizaki (GK) rata (modelo de diabetes tipo II), ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO) (modelo de diabetes tipo II). Otros modelos de diabetes tipo I y/o tipo II se describen, por ejemplo, en Rees y Alcolado, *Diabet. Med.* 22: 359-70, 2005.

Las células y/o factores solubles que reducen las concentraciones basales de glucosa y/o mejoran la tolerancia a la glucosa en dicho modelo de disfunción pancreática en comparación con un animal sin tratar o el animal de ensayo antes del tratamiento se consideran probables para tratar, impedir o retrasar la aparición o la evolución de la disfunción pancreática.

Alternativamente, o además se evalúan las concentraciones de insulina en la circulación de un individuo de la

prueba, p. ej., utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o ligado a fluorescencia. Las células y/o los factores solubles que aumentan las concentraciones de insulina en la circulación de un individuo de ensayo se consideran factibles para tratar, evitar o retrasar la aparición o la evolución de la disfunción pancreática.

5 Los kits y análisis para la determinación de las concentraciones de glucagón o somatostatina en el suero son conocidos en la técnica y/o están disponibles en el mercado, p. ej., en Immuno-Biological Laboratories, Inc. o Millipore Corporation.

10 Alternativamente, o además, se determina una concentración de amilasa en el suero utilizando un análisis colorimétrico, p. ej., como se describe en Caraway, *Am. J. Clin. Pathol.*, 32: 97-99, 1959 o un análisis fluorométrico, p. ej., como se describe en Rinderknecht y Marbach, *Clin. Chem. Acta.*, 29: 107-110, 1972. Los factores o las células que mantienen las concentraciones de amilasa en el suero a concentraciones normales (p. ej., 21-101 U/l) se consideran factibles para tratar, evitar o retrasar la aparición o evolución de la disfunción pancreática.

15 Las concentraciones de amilasa también pueden determinarse en secciones de páncreas o en el jugo pancreático, p. ej., obtenido por intubación oral duodenal. Estas muestras también proporcionan muestras para determinar las concentraciones de tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa pancreática. Por ejemplo, Connon *et al.*, *Digestive Diseases and Sciences*, 23: 472-475, 1978 describe un análisis para la determinación de las concentraciones de lipasa pancreática en el jugo pancreático.

Los ensayos descritos en los párrafos anteriores también son adecuados para el seguimiento continuo de un individuo que recibe un tratamiento como se describe en la presente memoria según cualquiera ejemplo.

20 Será evidente para el experto en la técnica a partir de lo anterior que un método para identificar o aislar una célula o un factor soluble para el tratamiento de la disfunción pancreática, comprende:

- (i) administrar una célula o un factor soluble a un individuo de ensayo que padece disfunción pancreática y evaluar la función pancreática del individuo;
- (ii) comparar la función pancreática del individuo con (i) para la función pancreática de un individuo que padece disfunción pancreática al que no se ha administrado la célula o el factor soluble,

25 en donde la función pancreática mejorada en el individuo de ensayo en comparación con la del individuo de referencia indica que la célula o factor soluble trata la disfunción pancreática.

Un método para identificar o aislar una célula o un factor soluble para la prevención o retraso de la disfunción pancreática, puede comprender:

- 30
- (i) administrar una célula o un factor soluble a un individuo de ensayo y a continuación provocar la disfunción pancreática en el individuo de ensayo;
  - (ii) comparar la función pancreática del individuo con (i) para la función pancreática de un sufriendo individuo de referencia que padece disfunción pancreática al que no se ha administrado la célula o factor soluble,

en donde la función pancreática mejorada en el individuo de ensayo en comparación con el individuo de referencia indica que la célula o el factor soluble evita o retarda la aparición de la disfunción pancreática.

35 La célula puede ser cualquier célula descrita en la presente memoria según cualquiera ejemplo.

#### Composiciones celulares

En un ejemplo de la presente invención se administran células STRO-1<sup>+</sup> en forma de una composición. Preferiblemente, dicha composición comprende un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 Los términos "portador" y "excipiente" se refieren a composiciones de materia que se emplean convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, p. ej., *Pharmaceutical Sciences* de Remington, 16<sup>a</sup> Ed., Mac Publishing Company (1980). Un portador también puede reducir cualquier efecto secundario indeseable del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, p. ej., incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el portador. En un ejemplo, el portador no produce efecto adverso local o general significativo en los receptores a las dosis y concentraciones empleadas para el tratamiento.

50 Los portadores adecuados para esta invención incluyen los empleados convencionalmente, p. ej., agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución tamponada, hialuronano y glicoles se prefieren portadores líquidos particularmente (cuando son isotónicos) para soluciones. Los portadores y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares.

En otro ejemplo, un portador es una composición del medio, p. ej., en el que se cultiva o se pone en suspensión una célula. Preferiblemente, una composición del medio no provoca efectos adversos en un individuo al que se administra.

5 Vehículos y excipientes preferidos no afectan negativamente a la viabilidad de una célula y/o a la capacidad de una célula para reducir, evitar o retardar la disfunción pancreática.

10 En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad de tamponamiento para mantener las células y/o los factores solubles a un pH adecuado para ejercer de esta manera una actividad biológica, p. ej., el portador o excipiente es la solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS representa un vehículo o excipiente atractivo porque interactúa con las células y factores mínimamente y permite la liberación rápida de las células y factores, en tal caso, la composición de la invención puede producirse como un líquido para su aplicación directa al torrente sanguíneo o en un tejido o una región circundante o adyacente a un tejido, p. ej., por inyección.

15 Las células STRO-1<sup>+</sup> pueden incorporarse o incrustarse dentro de los andamiajes que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son perjudiciales para el receptor. Estos andamiajes proporcionan apoyo y protección para las células que van a ser trasplantadas a los individuos receptores. Los andamiajes naturales y/o sintéticos biodegradables son ejemplos de dichos andamiajes.

20 Una variedad de diferentes andamiajes puede utilizarse con éxito en la práctica de la invención. Los andamiajes preferidos incluyen, pero no se limitan a, andamiajes degradables, biológicos. Andamios biodegradables naturales incluyen andamiajes de colágeno, fibronectina y laminina. El material sintético adecuado para un andamio para trasplante de células debe ser capaz de soportar el cultivo celular extensivo y la función celular. Dichos andamiajes también pueden ser reabsorbibles. Los andamiajes adecuados incluyen andamiajes de ácido poliglicólico, p. ej., como los descritos por Vacanti, *et al. J. Ped. Surg.* 23: 3-9 1988; Cima, *et al. Biotechnol. Bioeng.* 38: 145, 1991; Vacanti, *et al. Plast. Reconstr. Surg.* 88: 753-9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

25 En otro ejemplo, las células pueden administrarse en un andamio de gel (tal como de Gelfoam de Upjohn Company).

30 Las composiciones celulares útiles para la presente invención pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con una composición de la invención inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cultivarse juntas durante un período de tiempo antes de la administración.

35 Preferiblemente, la composición comprende una cantidad eficaz o una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de células. Por ejemplo, la composición comprende aproximadamente  $1 \times 10^5$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg o aproximadamente  $1 \times 10^6$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células STRO-1<sup>+</sup>/kg. La cantidad exacta de las células que debe administrarse depende de una variedad de factores, incluidos la edad, el peso y el sexo del paciente, y el alcance y gravedad de la disfunción pancreática.

40 En algunos ejemplos, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan en circulación de un individuo, sin embargo, que permite a los factores segregados por las células entrar en la circulación. De esta manera pueden administrarse factores solubles a un individuo, al permitir a las células segregar los factores en la circulación del individuo. Dicha cámara puede igualmente implantarse en un sitio en un individuo para aumentar las concentraciones locales de los factores solubles, p. ej., implantadas en o cerca de un páncreas.

En algunos ejemplos de la invención, puede no ser necesario o deseable inmunodeprimir a un paciente antes de iniciar el tratamiento con composiciones celulares. Por consiguiente, el trasplante con células STRO-1<sup>+</sup> alogénicas, o incluso xenogénicas, o su descendencia puede tolerarse en algunos casos.

45 Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado para inmunodeprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar el tratamiento celular. Esto puede lograrse mediante el empleo de agentes inmunodepresores generales o locales, o puede lograrse administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden encapsularse en una cápsula que es permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y los factores terapéuticos la célula es todavía impermeable a factores humorales e inmunocitos. Preferiblemente el encapsulante es hipoalergénico, está fácil y establemente situado en un tejido diana, 50 y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmunitaria a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

#### Composiciones de factores solubles

55 El sobrenadante obtenido de las células STRO-1<sup>+</sup> y/o el obtenido de la descendencia de las células o los factores solubles puede administrarse en forma de una composición, p. ej., que comprende un vehículo y/o excipiente adecuado. Preferiblemente, el vehículo o excipiente no afecta negativamente al efecto biológico de los factores

solubles o del sobrenadante.

En un ejemplo, la composición comprende una composición de materia para estabilizar un factor soluble o un componente del sobrenadante, p. ej., un inhibidor de proteasa. Preferiblemente, el inhibidor de proteasa no está incluido en una cantidad suficiente para tener un efecto adverso en un individuo.

- 5 Las composiciones que comprenden sobrenadante obtenido de las células STRO-1<sup>+</sup> y/o el obtenido de la descendencia de las células o los factores solubles pueden prepararse como suspensiones en líquidos apropiados, p. ej., en medio de cultivo, en un soporte estable o una solución tampón, p. ej., solución salina tamponada con fosfato. Los portadores adecuados se han descrito anteriormente en la presente memoria. En otro ejemplo, las suspensiones que comprenden sobrenadante obtenido de las células STRO-1<sup>+</sup> y/o el obtenido de la descendencia
- 10 de las células o factores solubles son suspensiones oleosas para inyectables. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se utilizan para inyectables pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o agentes que
- 15 aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el sobrenadante o factores solubles en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes descritos anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

- 20 Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el factores de sobrenadante o solubles en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril de la misma. Según un aspecto alternativo de la invención, los factores de sobrenadante o solubles pueden formularse con uno o más compuestos
- 25 adicionales que mejoran su solubilidad.

- Otros portadores o excipientes a modo de ejemplo se describen, por ejemplo, en Hardman, *et al.* (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics* de Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, N. Y.; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, N. Y.; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, N. Y.; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y.
- 30

- Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura
- 35 ordenada. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, p. ej., agua, etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y cualquiera de sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante la utilización de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol,
- 40 sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Por otra parte, los factores solubles se pueden administrar en una formulación de liberación controlada, p. ej. en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con
- 45 vehículos que protejan el compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como de vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico, poliglicólico (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica.

- Los factores de sobrenadante o solubles pueden administrarse en combinación con una matriz apropiada, por
- 50 ejemplo, para proporcionar liberación lenta de los factores solubles.

Componentes adicionales de composiciones

- El sobrenadante o factores solubles obtenidos de las células STRO-1<sup>+</sup>, las células STRO-1<sup>+</sup> o su descendencia pueden administrarse con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores
- 55 tróficos). Cuando se administra con otros agentes, pueden administrarse juntos en una sola composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o sucesivamente con los demás agentes (ya sea antes o después de la administración de los demás agentes). Los factores bioactivos que pueden administrarse conjuntamente incluyen agentes antiapoptóticos (p. ej., EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (p. ej., inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta,

estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS, y FAINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; p. ej., TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunodepresores/inmunomoduladores (p. ej., inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina, tacrolimus; inhibidores de mTOR (p. ej., SIROLIMUS, EVEROLIMUS); antiproliferantes (p. ej., azatioprina, micofenolato mofetil); corticosteroides (p. ej., prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos del receptor anti-IL-2Ralfa monoclonal (p. ej., basiliximab, daclizumab), anticuerpos anti-linfocitos T policlonales (p. ej., anti-timocito globulina (ATG); anti-linfocito globulina (ALG); anticuerpo anti-linfocito T monoclonal OKT3)); agentes antitrombógenos (p. ej., heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrofenilalanina prolina arginina clorometilcetona), compuestos de antitrombina, antagonistas de receptores plaquetarios, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos de receptores antiplaquetarios, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (p. ej., probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, la coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína), así como anestésicos locales.

En un ejemplo, una composición como se describe en la presente memoria según cualquier ejemplo comprende un factor adicional para el tratamiento o profilaxis de una disfunción pancreática. Por ejemplo, la composición comprende una biguanida, una tiazolidindiona, una sulfonilurea, un derivado del ácido benzoico, un inhibidor de alfa-glucosidasa, un inhibidor de SGLT2 y el péptido INGAP, un inhibidor de la dipeptidilpeptidasa-IV, sensibilizadores de insulina (p. ej., un agonista de PPAR o una biguanida), insulina, un mimético de insulina, un antagonista del receptor de glucagón, un GLP-1, un mimético de GLP-1, agonistas del receptor GLP-1; GIP, un mimético de GIP, un agonista del receptor GIP, PACAP, miméticos de PACAP a, un agonista de los receptores 3 de PACAP; un agente reductor del colesterol (p. ej., inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un secuestrante, un alcohol nicotínico, un ácido nicotínico), un agonista doble de PPAR $\alpha/\gamma$  o un compuesto contra la obesidad.

En otro ejemplo, una composición como la descrita en la presente memoria según cualquier ejemplo comprende además, un factor que induce o mejora la diferenciación de una célula madre en una célula pancreática. Ejemplos de factores incluyen, Wnt, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos o TGF $\beta$ .

En otro ejemplo, una composición como la descrita en la presente memoria según cualquier ejemplo comprende además, un factor que induce o mejora la diferenciación de una células madre en una célula vascular. Ejemplos de factores que incluyen, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, p. ej., PDGF-BB) y FGF.

En otro ejemplo, una composición como la descrita en la presente memoria según cualquier ejemplo comprende además una célula comprometida específica de tejido (TSCC). En este sentido, la Solicitud de Patente Internacional n° WO 2006/032092 demuestra que la administración de una TSCC y células STRO-1<sup>+</sup> puede conducir a una mayor proliferación de las TSCC. En un ejemplo, la TSCC es una célula pancreática, p. ej., una célula  $\beta$  o una mezcla de células pancreáticas, p. ej., un islote de Langerhans. La administración de una composición de este tipo a un individuo puede dar lugar a aumento de la producción de, por ejemplo, células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. En otro ejemplo, la TSCC es una célula vascular. La administración de una composición de este tipo a un individuo puede dar lugar a aumento de la producción de vasos sanguíneos, p. ej., en el páncreas, p. ej., lo que conduce a un aumento de nutrientes suministrados al páncreas.

#### Dispositivos médicos

En la presente memoria se describen además dispositivos médicos para su empleo o cuando se emplean en un procedimiento como se describe en la presente memoria según cualquiera ejemplo. Por ejemplo, una jeringuilla, catéter u otro dispositivo de administración adecuado puede comprender células STRO-1<sup>+</sup> y/o cualesquiera de sus células madre y/o de sus factores solubles y/o una composición de la invención. Opcionalmente, la jeringuilla o catéter está envasado con instrucciones para uso en un método descrito en la presente memoria según cualquier ejemplo.

Puede proporcionarse un implante que comprende células STRO-1<sup>+</sup> y/o algunas de sus células madre y/o algunos de sus factores solubles y/o una composición de la invención. Opcionalmente, el implante se envasa con instrucciones para su empleo en un procedimiento descrito en la presente memoria según cualquier ejemplo. Pueden formarse implantes adecuados con un andamiaje, p. ej., como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y algunas de sus células STRO-1<sup>+</sup> y/o células madre y/o algunos de sus factores solubles.

#### Modos de administración

Las células STRO-1<sup>+</sup> pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (p. ej., por medio de un catéter o jeringuilla), o si no administrarse directa o indirectamente en la zona necesitada de reparación o aumento, p. ej., en el páncreas o en el sistema sanguíneo de un individuo.

Preferiblemente, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran en el torrente sanguíneo de un individuo. Por ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran por vía parenteral. Ejemplos de vías de administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, las vías intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal. Preferiblemente, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran por vía intrarterial, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo conectado al páncreas, p. ej., una aorta abdominal, una arteria mesentérica superior, una arteria

pancreático-duodenal o una arteria esplénica. En otro ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran a una arteria femoral o a una arteria celíaca.

En el caso de la administración de células a una aurícula o ventrículo del corazón, es preferible que las células se administren a la aurícula o el ventrículo izquierdos para evitar complicaciones que pueden surgir de la administración rápida de las células a los pulmones.

Preferiblemente, las células STRO-1<sup>+</sup> se inyectan en la zona de administración, p. ej., utilizando una jeringuilla, mediante un catéter o una vía central.

La selección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de varios factores, incluidos el ritmo de renovación del suero o tejido del organismo, el nivel de síntomas, y la inmunogenicidad del organismo. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de compuesto terapéutico administrado al paciente coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de formulación suministrada depende en parte de cada organismo y de la gravedad de la afección que se está tratando.

En un ejemplo, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran como una sola dosis por inyección intravenosa rápida. Alternativamente, las células STRO-1<sup>+</sup> se administran por infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, p. ej., un día, una semana, o 1-7 veces a la semana. Un protocolo de dosis preferido es el que implica la dosis o frecuencia de dosis máxima que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y de la actividad del compuesto que se está utilizando. La determinación de la dosis apropiada la realiza un médico, p. ej., utilizando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan el tratamiento o se prevé que afectan al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en pequeños incrementos después hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas importantes para el diagnóstico son las de los síntomas de la diabetes.

De acuerdo con los ejemplos de la invención dirigida a tratar o retardar la evolución de la disfunción pancreática, es preferible que las células STRO-1<sup>+</sup> se administren tras el diagnóstico de la enfermedad, p. ej., utilizando métodos normalizados conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria, p. ej., de tolerancia a la glucosa.

Para los ejemplos dirigidos a prevenir o retrasar la aparición de la disfunción pancreática, es preferible que los células STRO-1<sup>+</sup> se administren antes del diagnóstico clínico de la enfermedad, p. ej., cuando el individuo sufre de intolerancia a la glucosa y/o alteración de la glucemia en ayunas y/o en el caso de la diabetes tipo I antes de o coincidente con una respuesta autoinmunitaria tal como la indicada por expansión de una población de linfocitos T y/o linfocitos B y/o por la producción de autoanticuerpos (p. ej., la expansión de linfocitos T citotóxicos contra las células beta de los islotes pancreáticos y/o autoanticuerpos contra uno o más marcadores de células-β de los islotes pancreáticos en la aparición o evolución de la diabetes tipo I). Los métodos para determinar o predecir la aparición de una respuesta autoinmunitaria serán evidentes para el experto y/o están descritos en la presente memoria. Por ejemplo, la detección de un autoanticuerpo contra un antígeno producido por una célula β pancreática o en su superficie es indicativo de una respuesta inmunitaria contra dicha célula por un individuo. Uno de dichos ensayos detecta anticuerpos de las células de los islotes en el suero de un individuo. Este ensayo comprende poner en contacto una sección de un páncreas que comprende una células de los islotes con suero de un individuo de prueba. La inmunoglobulina en el suero del individuo que es capaz de unirse a una célula β de los islotes pancreáticos se detecta a continuación, utilizando un anticuerpo secundario marcado que se fija a la inmunoglobulina humana. Un método adecuado para la detección de anticuerpos de las células de los islotes utilizando un marcador fluorescente se describe, por ejemplo, en Bottazzo *et al.*, *Lancet* 2: 1279-1283, 1974. Alternativamente, o además, se utiliza un ensayo para detectar un autoanticuerpo que se fija a un antígeno específico en un individuo. A modo de ejemplo, Brooking *et al.* (*Clin. Chim. Acta* 331: 55-59, 2003) describen un ensayo basado en ELISA para la detección de autoanticuerpos contra GAD65. El ensayo descrito utiliza una baja concentración del antígeno GAD en una placa de microvaloración para capturar los autoanticuerpos en una muestra. Se añade GAD biotinilado en la fase fluida y es capturado por el segundo punto de fijación del autoanticuerpo, y es el GAD65 biotinilado el que se detecta al producir una señal detectable no isotópica. Nagata *et al.*, *Ann. New York Acad. Sci.* 1037: 10-15, 2004 describen un análisis ELISPOT útil para detectar la presencia de autoanticuerpos contra la insulina, IA-2 y GAD65.

50 Procedimientos para el control de tratamiento/profilaxis

Los procedimientos para el control de tratamiento/profilaxis serán evidentes para el experto basándose en la descripción en la presente memoria. Por ejemplo, las concentraciones de glucosa en sangre y/o las concentraciones de insulina y/o las concentraciones de amilasa se determinan utilizando procedimientos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente memoria.

55 En otro ejemplo, se obtiene una muestra de páncreas (p. ej., mediante una biopsia) después del tratamiento y el número de células beta (p. ej., células que expresan la insulina) y/o las células alfa (p. ej., células que expresan glucagón) y/o islotes y/o células que expresan PDX-1, p. ej., usando inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o un ensayo de ampliación de ácido nucleico, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dichos ensayos se

describen en la presente memoria.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Tratamiento de ratones diabéticos con células STRO-1<sup>+</sup>

## 5 1.1 Materiales y métodos

Diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones

Ratones NOD/scid macho inmunodeficientes (NOD.CB17-Prkdc<sup>scl<sup>d</sup></sup>/J; Animal Research Center, Perth, Australia) a las 7-8 semanas de edad se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) con 35 mg/kg de la toxina de las células beta, estreptozotocina (STZ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diariamente los días 1-4 después de un ayuno de 4 h en la mañana. Se disolvió STZ en tampón de citrato de sodio, pH 4,5, y se inyectó a los 15 min de la preparación. Los ratones se mantuvieron en condiciones estériles.

Infusión de las células y grupos de tratamiento

Células del estroma STRO-1<sup>+</sup> humanas inmunomagnéticamente seleccionadas procedentes de células de médula ósea de un banco se expandieron en cultivo esencialmente como se describe en Gronthos y Zannettino (*Methods Mol. Biol.* 449: 45-51, 2008) y se obtiene en Angioblast Systems, EE.UU. 4 pasos, se descongelaron células de estroma STRO-1<sup>+</sup> criopreservadas en ProFreeze™-CDM (Lonza, EE.UU.) y 2,5 x 10<sup>6</sup> células se formaron en 200 µl de vehículo por ratón para inyección inmediata. El día 10<sup>o</sup>, después de tratamiento con STZ, se inyectó a los ratones NOD/scid ya sea con una sola dosis de células a través de la pared torácica en el ventrículo izquierdo (vía arterial) de los ratones anestesiados. Los ratones de referencia fueron inyectados con 200 µl de vehículo (ProFreeze™ - CDM que contiene DMSO al 7,5% y alfa-MEM) a través de las vías arterial o venosa.

Análisis de glucosa e insulina en sangre

La glucosa en sangre se analizó en la vena de de la cola con un glucómetro (Optimum Xceed™ Diabetes Monitoring System; Abbott Diagnostics, Victoria, Australia) después de unas 4 h de ayuno por la mañana. La insulina en sangre se analizó en la sangre extraída por punción intracardiaca de ratones anestesiados antes de que fueran sacrificados el día 32 utilizando un kit ELISA específico para ratón (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA Mercodia, Uppsala, Suecia).

Preparación de muestras de tejido

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo el páncreas y se disecó simétricamente, con una mitad fija en formalina neutra al 10% y la otra incrustada en Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) y se congelaron en nieve carbónica y se almacenaron a -70°C. Mientras que el páncreas se utilizó específicamente para la mayoría de los análisis en este estudio, se recolectaron otros tejidos tales como pulmón, hígado, corazón, bazo, estómago, intestino/ciego, vejiga, testículos y cerebro para histopatología.

Tinción histológica e inmunofluorescencia de tejido pancreático

Para la histología de las secciones de páncreas incrustadas en parafina fijadas en formalina (IPFF) se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones de tejido IPFF (5 µm) montadas en portaobjetos de vidrio de microscopio se desparafinaron y sometieron a recuperación de antígenos por calentamiento en tampón citrato en una olla a presión. Después las secciones de recuperación de antígeno se bloquearon con suero de cabra normal al 10% durante 2 horas y se utilizan para la detección por inmunofluorescencia utilizando los siguientes anticuerpos que se han probado previamente y se ha demostrado que detectan moléculas específicas de ratón en tejidos de antígenos recuperados: anti-insulina de cobaya (1:100; Millipore, EE.UU.), anti-glucagón de ratón (10 µg/ml; clon K79bB10; AbCAM), anti-PDX-1 de ratón (10 µg/ml; clon 267712; R&D Systems). Después de la etapa de incubación de anticuerpo primario de 2 h, los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 min con 0,1% de suero normal de cabra/PBS y se incubaron durante otros 90 min a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos de la especie (1:400; anti-ratón en cabra Alexa Fluor 555; Molecular Probe o cabra-anti-cobaya Rodamina; Jackson Laboratories o cabra anti-ratón IgG1-FITC; AbCAM). Omitiendo las referencias incluidas el anticuerpo primario. La tinción de actina de músculo liso (AML) en tejidos pancreáticos se realizó por inmunofluorescencia directa usando un mAAb anti-AML-FITC de ratón (2 mg/ml; clon 1A4; AbCAM).

Evaluación de la inmunotinción

Los portaobjetos se examinaron en un microscopio Zeiss Observer Z1 (Alemania) y las imágenes se fotografiaron utilizando un AxioCam MRm. Las imágenes capturadas de secciones pancreáticas teñidas con H&E o anticuerpos contra insulina, glucagón, PDX-1 y AML y detectadas con sondas fluorescentes se analizaron con el programa informático Axio Vision Rel 4.7. Cada sección H&E de 5 mm de cada animal experimental se utilizó para contar el número total de islotes y se analizó para el tamaño de los islotes (mediciones de área y diámetro) y se normalizó a

cada área de sección total respectiva medida por análisis de imagen. Además, cada sección IPFF de 5  $\mu\text{m}$  recuperada de antígeno teñida con anti-insulina, glucagón o anticuerpo PDX-1 se contaron para el número total de células teñidas positivamente y se normalizó al área de la sección total respectiva medida o área total de los islotes. La distribución de los microvasos pancreáticos de diámetros variables se contó y se midió por análisis de imagen y se normalizó a su área de la sección respectiva examinada. Todas las imágenes se analizaron a ampliaciones de objetivo de 20-40x.

#### Análisis de ARN por RT-PCR semicuantitativo

Se extrajeron muestras de ARN de los páncreas de grupos experimentales en reactivo Trizol de un total de secciones de 100 mm de cada tejido congelado. Los extractos de tejido Trizol se purificaron para ARN utilizando el kit de aislamiento ilustra RNAspin Mini RNA (GE Healthcare, Reino Unido). El ARN completo se cuantificó por espectrofotometría y se transcribió a la inversa 1  $\mu\text{g}$  con oligo-dT (pdT<sub>12-18</sub>) y MMLV transcriptasa inversa. Las muestras de ADNc se ampliaron por PCR usando cebadores para genes murinos para la MafA, Ngn3 y Pdx-1 utilizando Tth Plus ADN polimerasa (Roche Applied Science) en condiciones de ampliación especificadas en la Tabla 1. El gen de beta-actina se utilizó para normalizar la expresión génica objetivo. Los productos de PCR se analizaron cuantitativamente por análisis densitométrico de las bandas examinadas bajo iluminación UV utilizando el programa informático Kodak ID 3.5.

Tabla 1. Condiciones de PCR

gen	pb del producto	Condiciones de ciclación	ciclos
Actina	238	94°C 1 min/55°C 30 s/72°C 30s	28
NGN3	347	94°C 1min/55°C 30s/72°C 30s	45
MafA	393	94°C 1 min/58°C 30 s/72°C 30 s	45
PDX-1	243	94°C 1 min/55°C 30 s/72°C 30s	30

#### Análisis estadístico

La prueba de la t de Student se utilizó para valores de p.

#### 1.2 Resultados

##### *Hiper glucemia provocada por estreptozotocina en ratones NOD/scid*

Se provocó hiper glucemia en ratones NOD/scid mediante cuatro inyecciones intraperitoneales diarias de 35 mg/kg/día de STZ. El 1<sup>er</sup> día del estudio, es decir, antes de la primera inyección de STZ, la concentración media de glucosa en la sangre en ayunas (CGS) para todo el grupo de animales (N=80) fue 7 mM  $\pm$  1,5 desviaciones típicas (SD). Se consideró que los animales desarrollan hiper glucemia si tenían una CGS el 10<sup>o</sup> día del estudio (es decir, 5 días después de la finalización de la tanda de inyecciones de STZ) que fue mayor que 3SD por encima de la concentración de glucosa media en los ratones no tratados. Los ratones que no alcanzaron hiper glucemia según este criterio fueron excluidos posteriormente de todos los análisis. Hubo 29 ratones que cumplían con el criterio anterior para hiper glucemia el 10<sup>o</sup> día. En estos ratones, las CGS medias el 10<sup>o</sup> día fueron 15,2  $\pm$  0,6 mM, un aumento del 217% por encima del valor inicial.

Efecto de la inyección intrarterial de células de estroma STRO-1<sup>+</sup> sobre las concentraciones de glucosa en sangre en ratones NOD/scid diabéticos

Como se muestra en la figura 1, una dosis única de 2,5 x 10<sup>6</sup> células STRO-1<sup>+</sup> inyectadas en ratones hiper glucémicos por vía intrarterial dieron como resultado una reducción de CGS en toda la tanda de inyecciones de 3 semanas después de la terapia celular.

La figura 1 demuestra que una sola inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> produjo reducción inmediata en la CGS en ratones diabéticos en comparación con la inyección intrarterial del vehículo solo. La reducción de la CGS fue evidente ya el 17º día, fue máxima el día 24º (35% de reducción media, CGS media 12,7 mM ± 1,2 frente a 19,6 mM ± 2,1; p = 0,012), y persistió a lo largo de las tres semanas de seguimiento.

5 *Inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> produce reducción inmediata y persistente en las concentraciones de glucosa en la sangre en relación con la valor inicial*

Los ratones tratados con STZ que recibieron una única inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> demostraron una reducción persistente en la CGS media en relación con el nivel el 10º día del valor inicial a lo largo de tres semanas completas de seguimiento. Como se muestra en la figura 2, este grupo de animales tenía una CGS media inferior a las concentraciones antes del tratamiento durante todo el periodo del estudio, mientras que se demostró que el grupo de referencia tratado con el medio aumentaba progresivamente las concentraciones de CGS. El grupo que recibió una inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> el 10º día después del tratamiento con STZ demostró reducciones medias de CGS de -11%, -14% y -4% respecto al valor basal de CGS los días 7º, 14º y 21º, respectivamente. Por el contrario, el grupo de referencia que recibe medio intrarterial solo demostró aumentos de la CGS media de +8%, +20% y +17% respecto al valor inicial de CGS los días 7º, 14º y 21º, respectivamente.

*Inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> humanas en ratones NOD/scid diabéticos produjo un aumento significativo de las concentraciones circulantes de insulina de ratón tres semanas después*

Como se muestra en la figura 3, las concentraciones circulantes de insulina en el suero determinadas al 21º día después del tratamiento por un ELISA específico para insulina de ratón demostraron que los ratones diabéticos inyectados por vía intrarterial tres semanas antes con células STRO-1<sup>+</sup> presentaban concentraciones de insulina endógena circulante significativamente más altas en comparación con los ratones diabéticos tratados con vehículo (0,79 mg/l ± 0,11 frente a 0,57 mg/l ± 0,02; p = 0,009).

*La inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> produce un aumento de la densidad de microvasos pancreáticos en ratones NOD/scid diabéticos*

Se tiñeron tejidos pancreáticos con un anticuerpo monoclonal conjugado directamente (mAb) contra la proteína actina de los músculos lisos para determinar si terapia celular con STRO-1<sup>+</sup> provoca o no arteriogenia en el páncreas dañado. Después de la inmunotinción, se exploró toda la sección y se contó el número total de microvasos y se normalizó al área de la sección total. Se contó el número de vasos y se clasificaron por tamaño en 3 diámetros de vasos distintos de <20µm, 20-100µm y >100µm. La figura 4 demuestra que hubo un aumento del 176% en el número de microvasos positivos a actina del músculo liso con diámetros <20µm en el grupo de terapia con células STRO-1<sup>+</sup> en comparación con el grupo con vehículo (299,8 ± 52 frente a 169,1 ± 18,5; p = 0,01). Por lo tanto, la terapia con células STRO-1<sup>+</sup> provoca una respuesta arteriolar de pequeño calibre dentro del páncreas dañado.

*La inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> produce un aumento de la expresión pancreática del factor de transcripción PDX-1 en ratones NOD/scid diabéticos*

Para evaluar si la terapia con células STRO-1<sup>+</sup> humana podría o no provocar una respuesta regenerativa en células beta endógenas de ratones NOD/scid diabéticos, se examinaron los niveles de expresión de ARNm de los factores de transcripción PDX-1, MAFA y Ngn3 relacionados con el desarrollo de páncreas y la generación de células beta (Zhou et al., *Nature* 455: 627 a 632, 2008). Como se muestra en la figura 5A, hubo un aumento de 2,5 veces (p = 0,01) en las concentraciones medias de ARNm del páncreas para el factor de transcripción PDX-1 en el grupo de la terapia de células STRO-1<sup>+</sup> en comparación con el grupo del vehículo. Los aumentos se observaron también en las concentraciones de ARNm del páncreas para los factores de transcripción MafA y Ngn3, pero éstos no alcanzaron significación.

Para confirmar que el aumento de las concentraciones de proteínas del factor de transcripción PDX se expresaban por los islotes pancreáticos expuestos a terapia con células STRO-1<sup>+</sup>, las secciones de los islotes procedentes de ratones NOD/scid no diabéticos sanos, ratones NOD/scid diabéticos tratados con medio de referencia y ratones NOD/scid diabéticos tratados con células STRO-1<sup>+</sup> por vía intrarterial se examinaron por inmunohistoquímica utilizando mAb anti-PDX-1. Como se muestra en la figura 5B, el tratamiento con estreptozotocina produjo una reducción del 59% en el número medio de células de los islotes que eran positivas a la proteína PDX-1 en comparación con los ratones no diabéticos sanos (37,1 ± 12 de células/islote positivas medias frente a 15,1 ± 4,8 de células/islote positivas medias, p = 0,03). En comparación con los animales tratados con estreptozotocina que recibieron medio de referencia, la inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> aumentó el número de células de los islotes que eran positivas a la proteína PDX-1 en un promedio del 71% (25,7 ± 2,2 de células/islote positivas medias, p = 0,049), lo que produce una reducción media de células positivas a la proteína PDX-1 en comparación con los animales no diabéticos de sólo el 31% (p=NS). La microfotografía fluorescente en la figura 5C demuestra que los islotes pancreáticos de animales NOD/scid representativos que, no eran diabéticos o que eran diabéticos y tratados con células STRO-1<sup>+</sup> demostraron un número similar de células positivas a PDX-1. En cambio, un islote pancreático de un animal NOD/scid representativo que era diabético y recibió medio de referencia demuestra cifras significativamente reducidas de células que son positivas a la proteína PDX-1.

*La inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> produce un mayor número de islotes pancreáticos*

Se evaluó también el efecto del tratamiento con células STRO-1<sup>+</sup> sobre el número total de islotes pancreáticos. Como se muestra en la figura 6A, los animales que recibieron una sola inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> tres semanas antes demostraron en el sacrificio cifras más de 2 veces mayores de islotes pancreáticos en comparación con los grupos de referencia inyectados con medio solo ( $0,78 \pm 0,07$  frente a  $0,38 \pm 0,07$  islotes/mm<sup>2</sup>, p = 0,0012). Aparte de un aumento en el número total de islotes, no se observaron cambios significativos en el diámetro de islote o área de islote medios entre los grupos de tratamiento, figuras 6B y 6C.

*La inyección intrarterial única de células STRO-1<sup>+</sup> produjo un aumento del número de células beta endógenas, reducción de las células alfa y restablecimiento de una relación normal de célula beta/alfa dentro de los islotes en ratones NOD/scid diabéticos*

Se utilizó tinción con mAb anti-insulina de ratón para cuantificar el número de células beta dentro de los islotes en secciones pancreáticas de ratones NOD/scid no diabéticos sanos, ratones NOD/scid diabéticos tratados con medio de referencia y ratones NOD/scid diabéticos tratados por vía intrarterial con células STRO-1<sup>+</sup>. Como se muestra en la figura 7A, el tratamiento con estreptozotocina produjo 21% de reducción en el número de células beta de los islotes en comparación con los ratones no diabéticos sanos ( $6.726 \pm 450$ /mm<sup>2</sup> de área de islote frente a  $5.289 \pm 387$ /mm<sup>2</sup>, p = 0,04). En comparación con los animales tratados con estreptozotocina que recibieron medio de referencia, la inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> aumentó el número de células beta en una media de 8% ( $5.709 \pm 690$ /mm<sup>2</sup>), produciendo una reducción media en las células beta en comparación con los animales no diabéticos de sólo el 15% (p = NS). En la microfotografía fluorescente en la figura B, las células beta en un islote de un animal de referencia no diabético representativo demuestran la localización de las células fluorescentes positivas a insulina por lo general densamente concentradas en la zona central del islote. Sin embargo, en un ratón representativo tratado con STZ las células beta son menos abundantes y presentan un modelo alterado en el islote. Las células beta en un ratón representativo tratado con células STRO-1<sup>+</sup> demuestran un modelo intermedio de fluorescencia, que es más abundante y está menos alterado.

Se utilizó tinción con mAb anti-glucagón para cuantificar el número de células alfa dentro de los islotes en secciones pancreáticas de ratones NOD/scid no diabéticos sanos, ratones NOD/scid diabéticos tratados con medio de referencia, y ratones NOD/scid diabéticos tratados con células STRO-1<sup>+</sup> por vía intrarterial. Como se muestra en la figura 7C, el tratamiento con estreptozotocina produjo 470% de aumento en el número de células alfa dentro de un islote e comparación con los ratones no diabéticos sanos ( $1.046 \pm 46$ /mm<sup>2</sup> de área de islote frente a  $4.954 \pm 632$ /mm<sup>2</sup>, p = 0,003). En comparación con los animales tratados con estreptozotocina que recibieron medio de referencia, la inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> redujo el número de células alfa en un promedio del 44% ( $2.764 \pm 274$ /mm<sup>2</sup>, p = 0,008), produciendo un aumento medio en células alfa en comparación con los animales no diabéticos de solamente 164% (p = 0,002). En la microfotografía fluorescente mostrada en la figura 7D, las células alfa dentro de los islotes normales de un animal de referencia no diabético representativo pueden identificarse como células teñidas con glucagón dispuestas en forma circular ordenada. Sin embargo, en un ratón representativo tratado con STZ las células alfa son más abundantes y presentan un modelo difuso en todo el islote. Las células alfa en el islote de un ratón representativo tratado con células STRO-1<sup>+</sup> demuestran un modelo de fluorescencia más periférico y son menos abundantes en todo el centro del islote.

La figura 7E representa la proporción de las células beta en relación con las células alfa dentro de islotes de secciones pancreáticas de ratones NOD/scid no diabéticos sanos, ratones NOD/scid diabéticos tratados con medio de referencia y ratones NOD/scid diabéticos tratados células STRO-1<sup>+</sup> por vía intrarterial. El tratamiento con estreptozotocina produjo una disminución del 40% en el porcentaje del número de células beta en relación con el total de células alfa y beta dentro de un islote en comparación con los ratones sanos no diabéticos ( $86 \pm 0,9\%$  frente a  $52 \pm 2,6\%$ , p = 0,00002). En comparación con los animales tratados con estreptozotocina que recibieron los medios de referencia, la inyección intrarterial de células STRO-1<sup>+</sup> aumentó la proporción de las células beta en relación con las células alfa en una media del 29% ( $52 \pm 2,6\%$  frente a  $67 \pm 3,9\%$ , p = 0,005). Por lo tanto, el tratamiento con células STRO-1<sup>+</sup> de ratones NOD/scid convertidos en diabéticos por estreptozotocina dado lugar a un restablecimiento de una relación más normal de células beta a células alfa dentro de los islotes pancreáticos.

Exposición

Este estudio proporciona pruebas por primera vez de que una sola dosis de células STRO-1<sup>+</sup> humanas fue eficaz para provocar la regeneración continua de células beta e invertir la hiperglucemia en ratones NOD/scid convertidos en diabéticos con estreptozotocina. El modelo experimental de diabetes provocado por estreptozotocina (STZ) da lugar a un fenotipo diabético similar al observado tras la destrucción génica de PDX-1, con un número reducido de células beta productoras de insulina, aumento de células alfa productoras de glucagón, y reducción en GLUT2 ARNm y expresión de proteínas (Liu *et al.*, *Mol. Ther.* 15: 86-93, 2007; y Wang *et al.*, *Diabetes* 47: 50-6, 1998.). Una sola dosis de células STRO-1<sup>+</sup> produjo la activación continua de PDX-1, aumento del número de células beta endógenas, reducción en las células alfa que expresan glucagón y aumento de la producción de insulina.

La inducción continua en la expresión de PDX-1 y la homeostasis restablecida entre las células beta y alfa pancreáticas en ratones NOD/scid diabéticos tratados con STZ después de una única dosis de células STRO-1<sup>+</sup> son

características enormemente similares a las descritas tras la administración de genoterapia para provocar la sobreexpresión a largo plazo de péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) en el mismo modelo murino (Liu *et al.*, *Mol. Ther.* 15: 86-93, 2007). GLP-1 es un péptido derivado del intestino que emigra al páncreas, activa a PDX-1 y GLUT2, y produce aumento de la secreción de insulina. Su descubrimiento ha llevado al desarrollo de dos nuevas clases de agentes que dan lugar a aumento de la actividad de GLP-1 en las células beta: (a) análogos de GLP-1 que son bien agonistas del receptor de acción prolongada o resistentes a la degradación por el antagonista natural de GLP-1, dipeptidilpeptidasa IV (DPPiV), y (2) antagonistas de DPPiV oralmente activos que dan lugar a un aumento de la actividad endógena de GLP-1.

5 Sin embargo, el uso clínico de estos agentes se ha limitado al tratamiento de formas leves de la diabetes tipo II. Su vida media relativamente corta, necesaria para una administración frecuente, y la relativa falta de potencia en los casos de pérdida severa de células beta han impedido su uso como agentes ahorradores de insulina para diabéticos tipo 1 o de otros pacientes dependientes de insulina. De hecho, los antagonistas de DPPiV son incapaces de revertir la diabetes confirmada en ratones tratados con STZ a pesar de aumentar las concentraciones de GLP-1 endógena (Kim *et al.*, *Diabetes* 50: 1562-1570, 2001), y sólo son capaces de mejorar la hiperglucemia en el contexto de la administración prolongada coincidente con dosis bajas de STZ y la pérdida parcial de células beta (Mu *et al.*, *Diabetes* 55: 1695-1704, 2006). Del mismo modo, los agonistas de GLP-1 solamente son eficaces cuando se administran antes de o simultáneamente con STZ y requieren la administración prolongada (Tourell *et al.*, *Diabetes* 50: 1562-1570, 2001; Li *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278: 471-478, 2003; Gezginci-Oktayoglu y Bolkent, *Biochem. Cell. Biol.* 87: 641-651, 2009). En conjunto, estos datos sugieren que los inhibidores de DPPiV y los análogos de GLP-1 sólo son eficaces para facilitar la regeneración de las células beta cuando todavía existe masa significativa de células beta.

10 En cambio, el presente estudio sugiere que incluso una sola inyección de células STRO-1<sup>+</sup> puede provocar la regeneración continua de las células beta aun cuando existe todavía poca masa de células beta. Esto se prueba por la capacidad de las células para invertir la hiperglucemia confirmada cuando se administra 5 días después de la finalización de una tanda de inyecciones de altas dosis de STZ, un modelo de la pérdida completa de células beta. Resultados similares sólo pueden conseguirse por sobreexpresión prolongada de GLP-1 utilizando genoterapia (Liu *et al.*, *Mol. Ther.* 15: 86-93, 2007). Los efectos a largo plazo y potentes del tratamiento con STRO-1<sup>+</sup> indican que este tipo de terapia celular puede proporcionar el control prolongado de la glucosa y efectos ahorradores de la insulina en diabéticos dependientes de insulina que los inhibidores de DPPiV o análogos de GLP-1 no pueden.

25  
30

**REIVINDICACIONES**

1. Células STRO-1<sup>+</sup> para su utilización en un procedimiento destinado a mejorar la función pancreática en un individuo que lo necesita.
2. Las células para la utilización de la reivindicación 1, en donde la utilización de las células:
- 5 (i) induce o favorece la regeneración de células beta pancreáticas y/o de islotes pancreáticos; y/o
- (ii) reduce las concentraciones de glucosa en la sangre y/o aumenta las concentraciones de insulina en sangre/suero; y/o
- (iii) aumenta el número de células beta pancreáticas y/o aumenta el número de células beta pancreáticas con relación a las células alfa pancreáticas y/o reduce el número de células beta pancreáticas y/o aumenta el número de islotes pancreáticos; y/o
- 10 (iv) aumenta la expresión del factor-1 de homeosecuencia pancreático y duodenal (PDX-1) y/o aumenta el número de células que expresan a PDX-1 en un páncreas; y/o
- (v) induce o estimula arteriogenia o angiogenia en el páncreas.
3. Las células para la utilización de la reivindicación 1 o 2, en donde el individuo padece disfunción pancreática con la función endocrina y/o exocrina del páncreas.
- 15 4. Las células para la utilización de la reivindicación 3, en donde la disfunción pancreática:
  - (a) está relacionada con o produce concentraciones anómalas de insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa o amilasa pancreáticas;
  - (b) está relacionada con o produce absorción insuficiente de nutrientes;
  - 20 (c) está relacionada con la pancreatitis, insuficiencia pancreática, síndrome de autoinmunodeficiencia adquirida, cáncer, fibrosis quística o síndrome de Zollinger Ellison;
  - (d) produce hiperglucemia o hipoglucemia, concentraciones reducidas de aminoácidos en el suero, proteinuria, eritema necrolítico migratorio; o
  - (e) está relacionada con o produce un trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono.
- 25 5. Las células para la utilización de la reivindicación 4, en donde la concentración anómala de glucagón la ocasiona un tumor secretor de glucagón.
6. Las células para la utilización de la reivindicación 4, en donde el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono lo ocasiona la menor producción de insulina del páncreas.
7. Las células para la utilización de la reivindicación 4 o 6, en donde el trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono es la diabetes mellitus.
- 30 8. Las células para la utilización de cualquier reivindicación precedente, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> son para su administración directamente en el torrente sanguíneo de un individuo.
9. Las células para la utilización de la reivindicación 10, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> son para su administración por vía intrarterial.
- 35 10. Las células para la utilización de cualquier reivindicación precedente, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> administradas al individuo son STRO-1<sup>bri</sup> y/o expresan fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).
11. Las células para la utilización de cualquier reivindicación precedente para tratar o retardar la evolución de la disfunción pancreática, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> son para su administración después del diagnóstico del trastorno.
- 40 12. Las células para la utilización de cualquier reivindicación precedente, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> son para su administración en forma de una composición que comprende dichas células STRO-1<sup>+</sup> y un potador y/o excipiente y, opcionalmente, que produce o aumenta diferenciación de células madre en células vasculares o la composición comprende una célula comprometida específica del tejido.
13. Las células para la utilización de cualquier reivindicación precedente, en donde las células STRO-1<sup>+</sup> se cultivaron previamente *in vitro*.
- 45 14. Utilización de células STRO-1<sup>+</sup> en la fabricación de un medicamento para mejorar la función pancreática en un

individuo que lo necesita.

15. La utilización de la reivindicación 14, en donde el medicamento es para:

(i) provocar o favorecer la regeneración de las células beta pancreáticas y/o de los islotes pancreáticos; y/o

5 (ii) reducir las concentraciones de glucosa en la sangre y/o aumentar las concentraciones de insulina en sangre/suero; y/o

(iii) aumentar el número de células beta pancreáticas y/o aumentar el número de células beta pancreáticas con relación a las células alfa pancreáticas y/o reducir el número de células beta pancreáticas y/o aumentar el número de islotes pancreáticos; y/o

10 (iv) aumentar la expresión del factor-1 de homeosecuencia pancreático y duodenal (PDX-1) y/o aumentar el número de células que expresan a PDX-1 en un páncreas; y/o

(v) provocar o estimular arteriogenia o angiogenia en el páncreas.

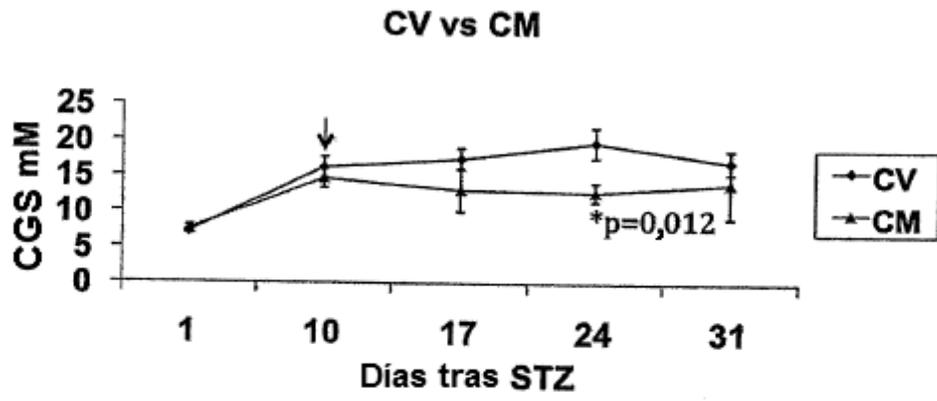


FIGURA 1

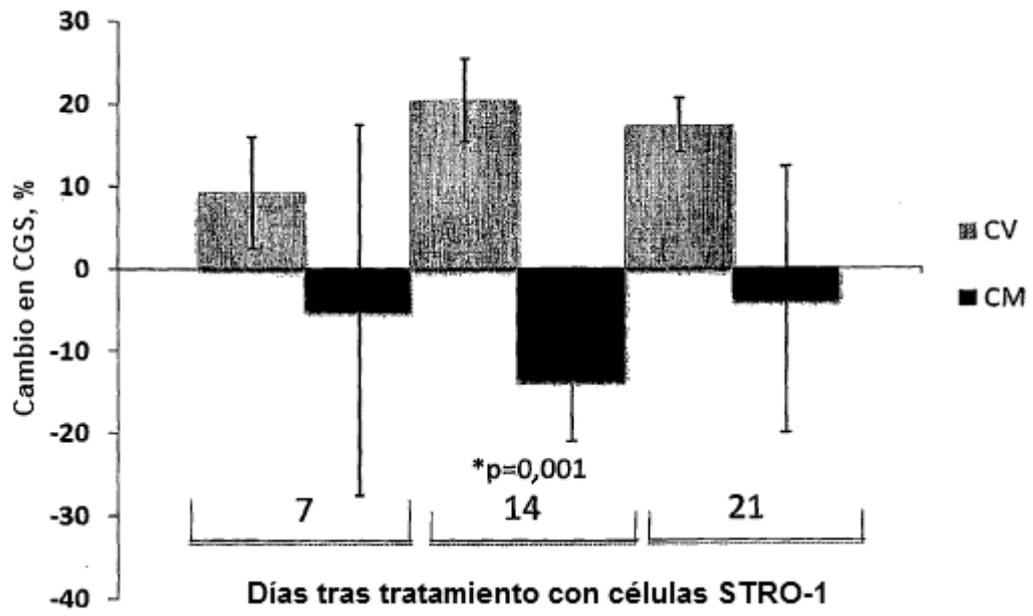


FIGURA 2

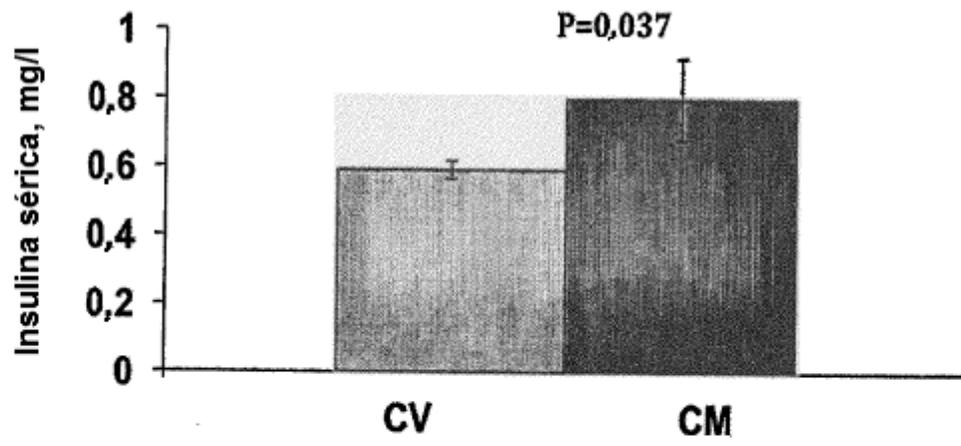


FIGURA 3

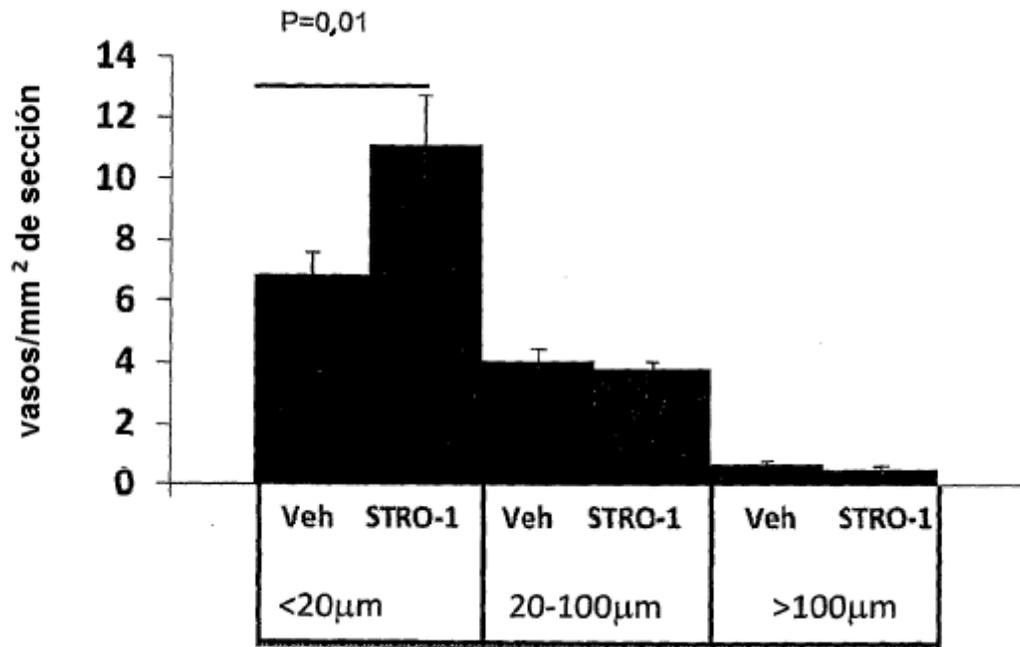


FIGURA 4A

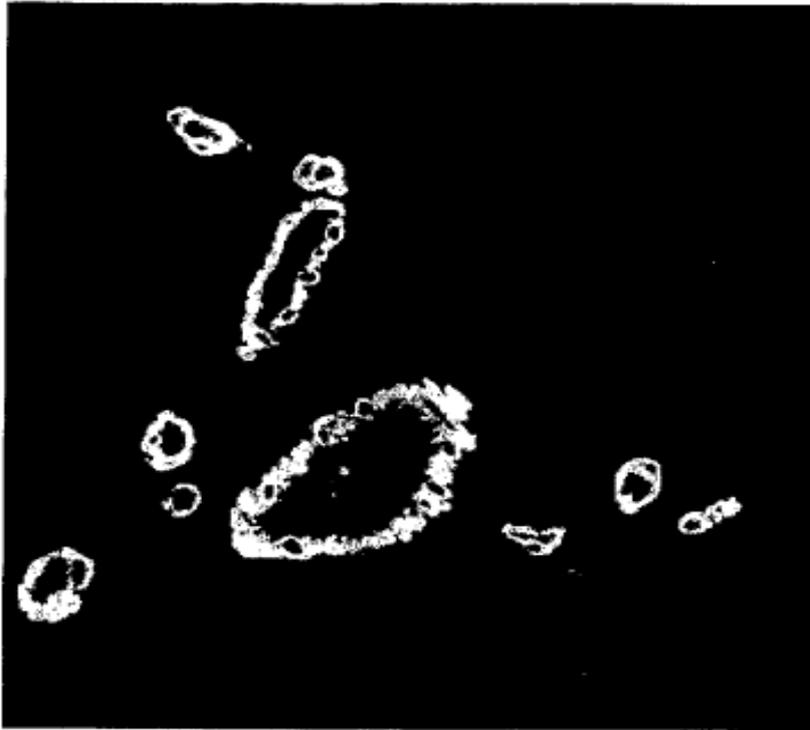


FIGURA 4B

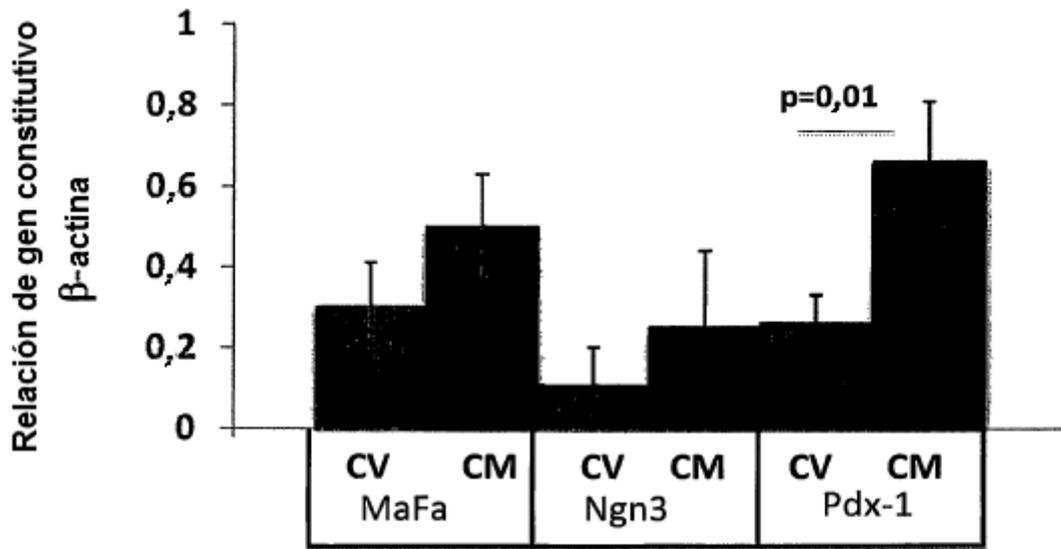


FIGURA 5A

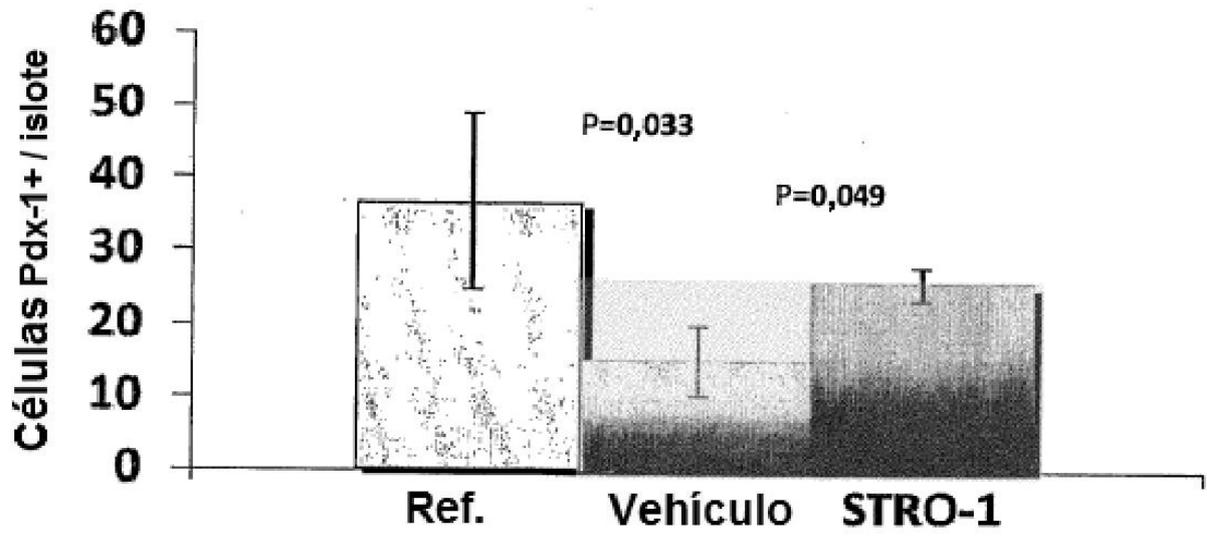


FIGURA 5B

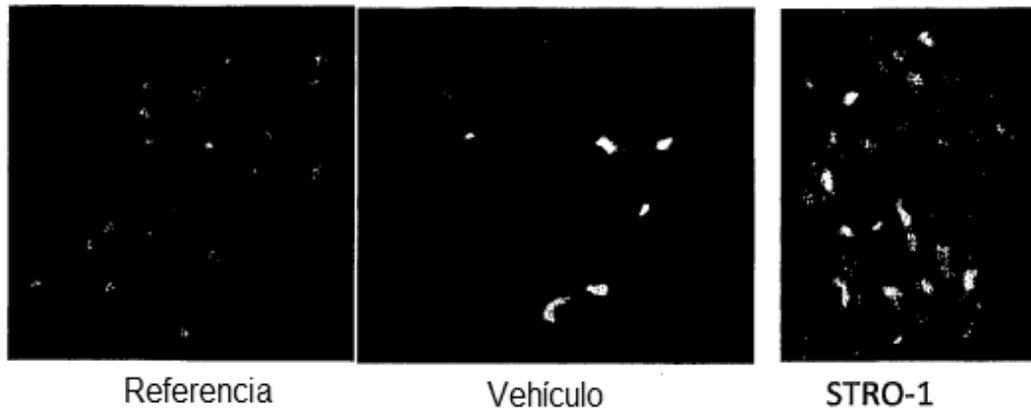


FIGURA 5C

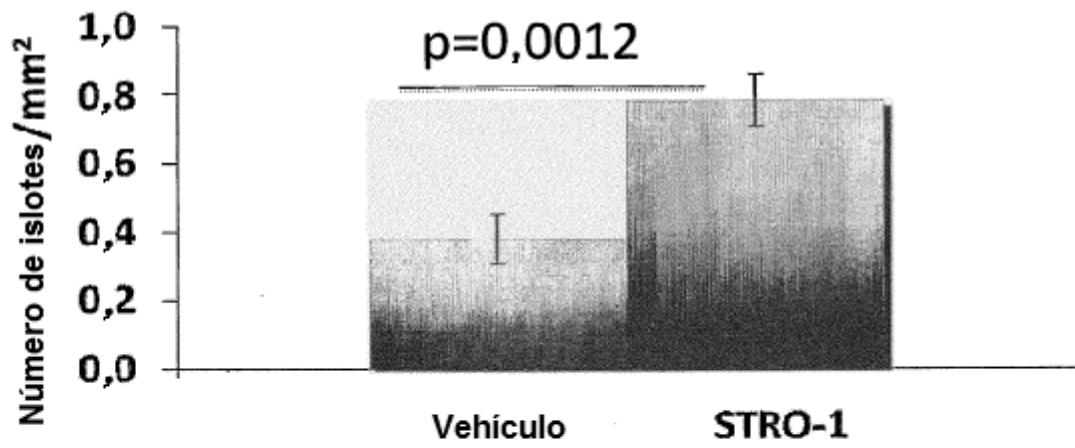


FIGURA 6A

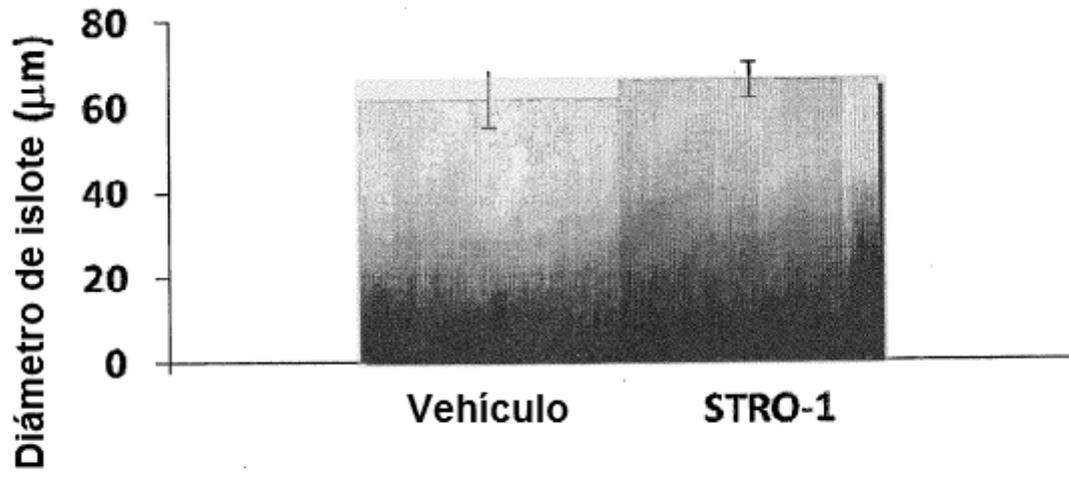


FIGURA 6B

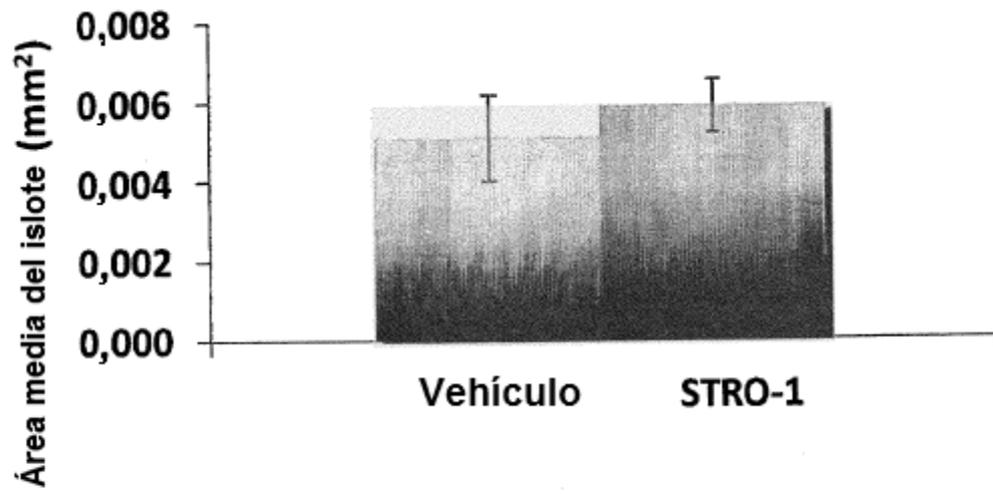


FIGURA 6C

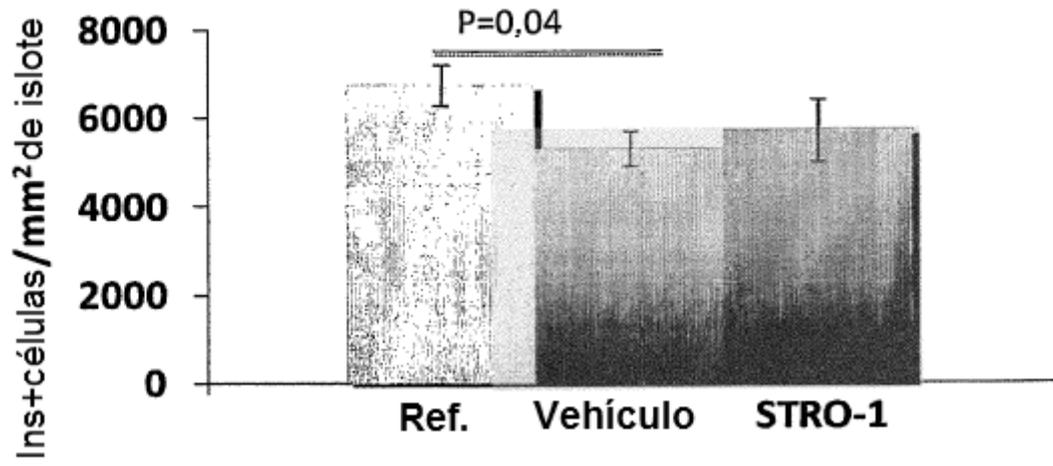
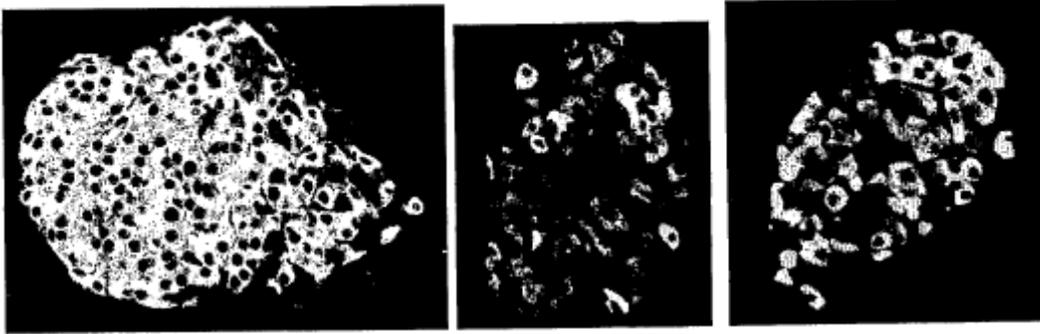


FIGURA 7A



REFERENCIA

VEHÍCULO

STRO-1

FIGURA 7B

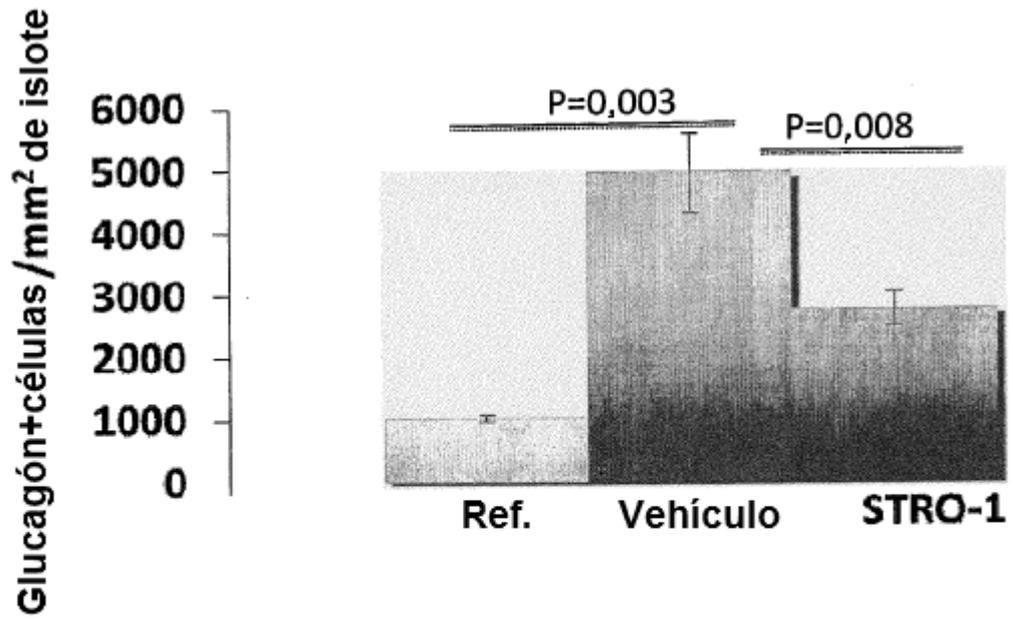


FIGURA 7C

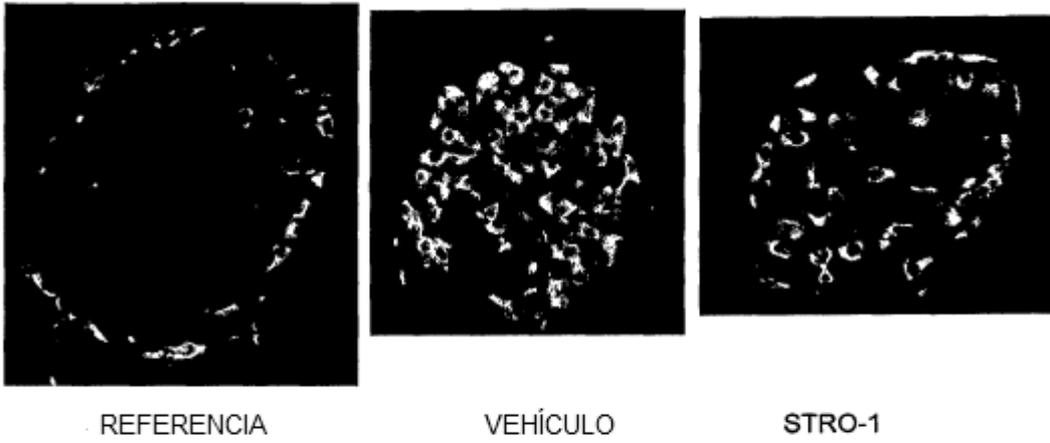


FIGURA 7D

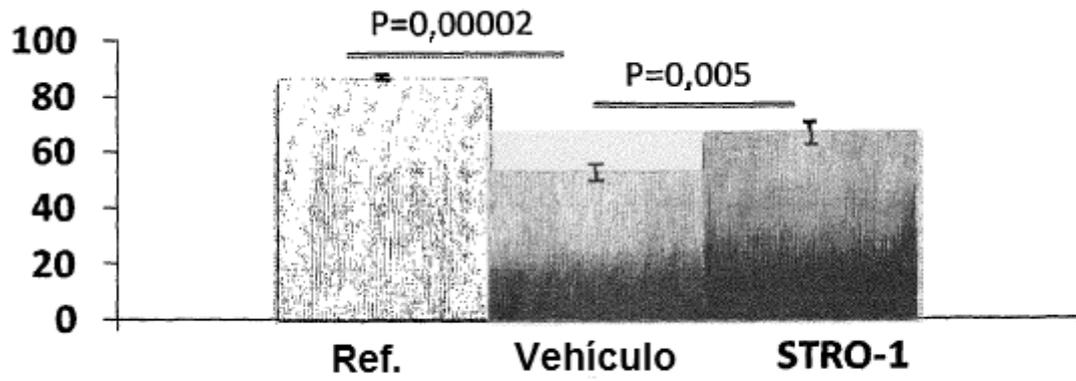


FIGURA 7E