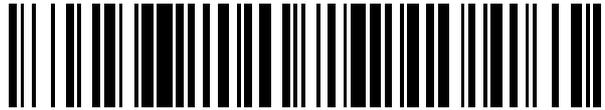


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 053**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2004 E 04726246 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1611233**

54 Título: **Células madre con aumento de sensibilidad a SDF-1 y procedimientos de generación y utilización de las mismas**

30 Prioridad:

08.04.2003 IL 15530203

10.12.2003 IL 15930603

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

10.02.2016

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**KOLLET, ORIT y
LAPIDOT, TSVEE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 559 053 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células madre con aumento de sensibilidad a SDF-1 y procedimientos de generación y utilización de las mismas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos de generación de células madre *in vitro* adecuados para trasplantes.

Antecedentes de la invención

Los tratamientos médicos de los trastornos causados por la función orgánica anormal generalmente emplean agentes farmacéuticos diseñados, ya sea para la compensación de dicha función orgánica anormal o para tratar el tejido orgánico disfuncional. Sin embargo, en algunos casos, el tratamiento farmacéutico no puede ser instaurado ya que la función orgánica a menudo es compleja y/o no completamente entendida.

En tales casos, la única alternativa viable es la sustitución quirúrgica del órgano no funcional, que se utiliza ahora ampliamente para el tratamiento de insuficiencia hepática y renal, tanto aguda como crónica, así como para el cáncer y determinadas anomalías congénitas. Sin embargo, la necesidad de órganos de donantes excede en mucho a la oferta. La escasez de órganos ha dado lugar a nuevas técnicas quirúrgicas, tales como la división de órganos de adultos para trasplante. A pesar de resultados bastante buenos, dichas técnicas adolecen todavía de una falta de tejidos de donantes.

La falta de tejidos de donantes viables ha dado lugar a la aparición de tratamiento reconstitutivo de células madre, que se basa en la plasticidad de las células madre es decir, la capacidad de dar lugar a tipos de células en una nueva ubicación que normalmente no están presentes en el órgano en el que se encuentran las células madre.

Las células madre se clasifican generalmente según su origen, fundamentalmente origen adulto, embrionario o neonatal. Las células madre embrionarias procedentes de la masa celular interna del blastocisto son pluripotenciales, siendo capaces de dar lugar a células que se encuentran en las tres capas germinales. A pesar de la creencia largamente sostenida las células madre adultas no son linaje tan restringido como se pensaba anteriormente. En particular, las células madre hematopoyéticas y neurales parecen ser las más versátiles en el corte a través de límites de linaje. Por ejemplo, informes recientes sugieren que las células madre hematopoyéticas (CMH) de origen humano tienen un potencial hepático. Los estudios de trasplante de hígado o de médula ósea de donantes no coincidentes en sexo, identificaron hepatocitos procedentes de médula ósea en receptores [Alison (2000) *Nature* 406:257; Theise (2000) *Hepatology* 32:11-16; Korbling (2002) *N. Engl. J. Med.* 346:738-746]. También encontraron CMH murinas y de rata que migran a hígados adultos irradiados o heridos, y que se diferencian en células hepáticas [Petersen (1999) *Science* 284: 1168-70; Theise (2000) *Hepatology* 31:235-240; Lagasse (2000) *Nat. Med.* 6:1229-1234]. Además, un solo trasplante de células madre hematopoyéticas murinas ha dado lugar a la detección de células derivadas de CMH en el hígado de receptores irradiados con un bajo porcentaje de células trasplantadas que presentan propiedades inmunohistoquímicas y morfológicas de las células epiteliales hepáticas [Krause (2001) *Cell* 105:369-377].

Los mecanismos que guían las células madre hematopoyéticas circulantes son clínicamente significativos porque el éxito del trasplante de las células madre depende de la orientación eficiente (denominada también *homing* (búsqueda de dianas)) de células injertadas al tejido diana del receptor [Mazo y von Adrian (1999) *Journal of Leukocyte Biology* 66, 25-32]. A esta búsqueda de dianas de células trasplantadas se debe que los trasplantes de médula ósea no requieran cirugía invasiva, como en el caso del trasplante de cualquier otro órgano, sino que más bien puede efectuarse mediante una sencilla infusión intravenosa.

La búsqueda de dianas de CMH puede definirse como el conjunto de interacciones moleculares que permite la circulación de las CMH para reconocer, adherirse a, y migrar a través de las células endoteliales de la médula ósea dando lugar a la acumulación de las CMH en el único microambiente que estimula la hematopoyesis de la médula ósea. La búsqueda de dianas de células progenitoras puede concebirse como un fenómeno en varios pasos [Voermans (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:725-738, Lapidot (2002) *Leukemia* 16:1992-2003]. Las CMH que llegan a la médula ósea deben interactuar en primer lugar con la superficie luminal del endotelio de la médula ósea. Esta interacción debe ocurrir en segundos una vez que las CMH han entrado en los capilares de la médula ósea y proporciona una resistencia mecánica suficiente para permitir que las células adherentes resistan la fuerza de cizalladura ejercida por la sangre circulante. Las CMH adherentes deben atravesar la capa endotelial para entrar en el compartimiento hematopoyético. Después de la extravasación, las CMH encuentran células de estroma especializadas cuya yuxtaposición ayuda al mantenimiento del grupo inmadura por el proceso de autorrenovación, además de la diferenciación, proliferación y maduración de las CMH específicas del linaje, un proceso que involucra a citocinas derivadas de estroma y otras señales de crecimiento.

Hasta la fecha sólo se conoce un número limitado de factores que intervienen en la búsqueda de dianas de las células madre; éstos comprenden, el ligando para c-kit, el factor de células madre, que se ha demostrado que desempeñan una función principal en la adherencia de las CMH al estroma; y las interacciones con integrina (p. ej., β 1-integrinas), que se demostró que son cruciales para la migración de las CMH al hígado fetal [Zanjani (1999) *Blood* 94:2515-2522]. Una interacción molecular importante que se considera fundamental para la búsqueda de dianas de CMH es el factor procedente de las quimiocinas del estroma (SDF-1) y su receptor afín, CXCR4.

SDF-1 es el único factor quimiotáctico potente conocido hasta la fecha de las células madre hematopoyéticas tanto de origen humano [Aiuti (1997) *J. Exp. Med.* 185:111-120] como murino [Wright (2002) *J. Exp. Med.* 195:1145-1154]. SDF-1 se expresa ampliamente en muchos tejidos durante el desarrollo [McGrath (1999) *Dev. Biol.* 213:442-456] y la edad adulta [Nagasawa (1994) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 91:2305-2309; Imai (1999) *Br. J. Haematol.* 106:905-911; Pablos (1999) *Am. J. Pathol.* 155:1577-1586], tal como por ejemplo el hígado [Shirozu (1.995) *Genomics* 28:495-500; Nagasawa (1996) *Nature* 382:635-638; Goddard (2001) *Transplantation* 72:1957-67]. Anteriormente, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la búsqueda de dianas en la médula ósea y la repoblación por células madre CD34⁺/CD38^{low} humanas clasificadas trasplantadas en la vena de la cola de ratones NOD/SCID inmunodeficientes irradiados y NOD/SCID/B2m null, dependen de las interacciones SDF-1/CXCR4 [Peled (1999) *Science* 283:845-848; Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291].

Más recientemente, los presentes inventores establecieron también una función para estas interacciones en la movilización inducida por G-CSF de células madre murinas y humanas [Petit (2002) *Nat. Immunol.* 3:687-694].

En vista de que el empleo cada vez mayor del tratamiento con células madre, es muy deseable aclarar aún más el mecanismo subyacente a la búsqueda de dianas de células madre y la repoblación objetivo a fin de mejorar la eficiencia y la tasa de éxito del tratamiento reconstitutivo celular.

Aunque al idear la presente invención, los presentes inventores han supuesto que las condiciones de estrés pueden favorecer la búsqueda de dianas de las células madre a un tejido diana. Esta hipótesis está muy apoyada por los estudios de la técnica anterior que ilustraban lo que sigue a continuación:

(i) Se descubrió que las células madre repueblan un hígado murino dañado mientras que dicho descubrimiento no se observó en ratones parabióticos [Wagers (2002) *Science* 297:2256-2259], lo que sugiere que la repoblación no se produce en condiciones homeostáticas del estado estacionario en hígados intactos no irradiados y no dañados.

(ii) Aunque las cantidades de células madre hematopoyéticas que injertan el hígado irradiado y se desarrollan en células semejantes a hepatocitos productoras de albúmina son muy bajas, este proceso puede ampliarse por lesión del hígado o inflamación vírica. Por lo tanto, en las condiciones potentes de selección que existen en ratones null con fumarilacetato hidrolasa (FAH), que tienen daños graves de los hepatocitos en continuo debido a la insuficiencia de esta enzima, hay una enorme amplificación de células madre hematopoyéticas murinas, purificadas y trasplantadas que demuestran morfología y función hepáticas, junto con la mejora del trastorno metabólico [Lagasse (2000) *Nat. Med.* 6:1229-1234].

(iii) La repoblación del hígado por las células de la médula ósea (MO) procedentes de ratones transgénicos Bcl.2 trasplantados en receptores naturales, seguida de rondas repetidas de lesión del hígado y captación provocada por apoptosis mediada por Fas, representa otro ejemplo de amplificación selectiva de células de MO trasplantadas después de la diferenciación en los hepatocitos [Mallet (2002) *Hepatology* 35:799-804].

(iv) Se describieron grandes cantidades de hepatocitos procedentes de la médula ósea en un receptor de trasplante de hígado en el que el hígado trasplantado llegó a infectarse con virus de hepatitis C [Theise (2000) *Hepatology* 32:11-16].

En conjunto estas observaciones demuestran que el potencial de las células madre hematopoyéticas para obtener el fenotipo hepático puede ampliarse significativamente en condiciones de estrés. Sin embargo, se conocen actualmente los mecanismos y factores, que regulan la captación de células madre para el tejido dañado y producen su fenotipo deseable.

40 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a lo que sigue a continuación:

1. Un procedimiento *in vitro* para generar células madre adecuadas para trasplantes, que comprende:

(a) exponer las células madre recogidas a una metaloproteasa de la matriz o a su porción activa, en donde dichas células madre recogidas son células madre embrionarias no humanas y además en donde dicha metaloproteasa de la matriz se selecciona del grupo consistente en MMP-2 y MMP-9; y

(b) aislar las células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de un umbral predeterminado, para generar de este modo células madre adecuadas para trasplantes.

2. El procedimiento del apartado 1, en donde las células madre de (a) se han recogido previamente mediante:

(i) un procedimiento de movilización de células madre; y/o

(ii) un procedimiento quirúrgico.

3. El procedimiento del apartado 1, en donde dichas células madre son células madre hematopoyéticas.

4. El procedimiento del apartado 3, en donde dichas células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas CD34⁺.

5. El procedimiento del apartado 4, en donde dichas células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas CD34⁺/CD38^{low/baja}.

6. El procedimiento del apartado 1, en donde dichas células madre son células madre mesenquimáticas.

7. El procedimiento del apartado 1, en donde dicha exposición de dichas células madre a dicha metaloproteasa de la matriz o a dicha parte activa de la misma, se efectúa:

- 5 (i) expresando un polinucleótido que codifica dicha metaloproteasa de la matriz o dicha porción activa de la misma en dichas células madre; y/o
- (ii) poniendo en contacto dichas células madre con dicha metaloproteasa de la matriz o dicha porción activa de la misma.

8. El procedimiento del apartado 1, en donde dicho aislamiento de células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de dicho umbral predeterminado se efectúa por FACS.

- 10 9. El procedimiento del apartado 1, que comprende además la determinación de las capacidades de búsqueda de dianas de dichas células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de dicho umbral predeterminado después de la etapa (b).

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en este documento tienen el mismo significado que el entendido normalmente por cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o ensayos de la presente invención pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de discrepancia, controlará la descripción detallada de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser restrictivos.

20 Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en la presente memoria, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y a título de exposición ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan para proporcionar lo que se cree es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, tomada la descripción con los dibujos que son evidentes para los expertos en la técnica de cómo las diversas formas de la invención pueden realizarse en la práctica.

En los dibujos:

- 30 Las FIG. 1a-c muestran gráficos que representan la búsqueda de dianas dependiente de SDF-1/CXCR4 de células CD34⁺ humanas para diferentes tejidos diana de ratones NOD/SCID. La figura 1a es un histograma que presenta la inhibición de la búsqueda de dianas de células CD34⁺ enriquecidas con CB o MPB humanas para la médula ósea, bazo e hígado murinos mediante neutralización de anticuerpos CXCR4. Los datos presentan la inhibición en porcentaje de la referencia. $P \leq 0,008$, que compara las muestras tratadas con anti CXCR4 con contrapartidas de referencia. La figura 1b muestra un experimento de búsqueda de dianas representativo que presenta células de búsqueda de dianas CD34⁺/CD38^{-baja} humanas (cerradas) en el hígado de ratones trasplantados con células sin tratar (recuadro superior), células neutralizadas con CXCR4 (recuadro medio) y ratones no inyectados que sirvieron como referencia negativa (recuadro inferior). La figura 1c muestra un experimento de búsqueda de dianas de cuatro horas de células CD34⁺ neutralizadas con CXCR4 o sin tratar para el hígado de ratones no irradiados. Se inyectó SDF-1 humano al parénquima del hígado como se indica. Se recogieron células del lóbulo inyectado para determinar la búsqueda de dianas de células CD34⁺ humanas.

La FIG. 2a muestra un gráfico que representa un ensayo de búsqueda de dianas de cuatro horas de células CD34⁺ humanas enriquecidas para el hígado de ratones NOD/SCID no irradiados inyectados con 15 μ l de CCl₄ 24 horas antes del ensayo.

- 45 La FIG. 2b muestra un histograma que representa las cantidades de células madre humanas en ratones seis semanas después del trasplante según se determina utilizando células mononucleares (CMN) de la sangre periférica de ratones híbridos en cultivos semisólidos un día después de una sola inyección de 10 μ l de CCl₄. Los datos resumen tres experimentos independientes.

La FIG. 2c muestra un histograma que representa la tinción de CXCR4 de CMN de la sangre periférica de ratones híbridos no tratados o inyectados con CCl₄ de la figura 2b.

- La FIG. 2d muestra una fotomicrografía que representa un ensayo de zimografía que presenta el aumento de actividad por MMP-2/9 en el hígado de ratones inyectados con CCl₄. Muestras de sangre de referencia (vías 1 y 2); muestras de sangre extraídas un día después de la inyección de 15 μ l de CCl₄ (vía 3); muestras de sangre extraídas dos días después de la inyección de 30 μ l de CCl₄ (vía 4); muestras de sangre extraídas dos días después de la inyección de 15 μ l de CCl₄ (vía 5); medio acondicionado enriquecido con MMP2/9 de la estirpe celular humana HT1080 (vía 6).

La FIG. 2e muestra un gráfico que representa el aumento de expresión de CXCR4 después del tratamiento con MMP2/9 según se determina por análisis FACS. Se incubaron células CB CD34⁺ durante 5 horas con medio de

cultivo RPMI y medio acondicionado HT1080. Se tiñeron las células con isotipo de anticuerpo de referencia como referencia negativa (Isot) o con anticuerpo CXCR4. Se muestran datos representativos de 3 experimentos.

La FIG. 2f muestra un histograma que representa la migración de células CD34⁺ de CB y MPB hacia SDF-1 determinada utilizando un sistema Transwell. Medio RPMI (Ref.) o acondicionado de la estirpe celular HT1080, enriquecido con MMP-2/9 segregado (Ginestra 1997. *J. Bio. Chem.* 272:17216-17222) se añadieron a los Transwells superiores junto con células CD34⁺. Las células se incubaron con un inhibidor III de MMP-2/9 específico (100 µM, CalBiochem, 30 min.) antes de la migración. Al añadirlos conjuntamente, el medio acondicionado HT1080 y el inhibidor de MMP-2/9 se preincubaron juntos (30 min.), antes de la adición de las células en el Transwell superior. Los datos representan el aumento de la migración en comparación con las células de referencia.

La FIG. 3 demuestra que MMP-9/2 intervienen en la búsqueda de dianas de las células CD34⁺ de MPB para el bazo. Se pretrataron células CD34⁺ de MPB durante 2 horas con un inhibidor de MMP-9/2 y se inyectaron en ratones NOD/SCID irradiados por debajo de la dosis letal (0,5x10⁵ células/ratón). Se sacrificaron los ratones 16 horas después y se analizó la presencia de células humanas/1,5 x10⁶ células obtenidas.

La FIG. 4 demuestra que MMP-9/2 intervienen en la migración *in vitro* en la que actúa como mediador SDF-1 de las células G2. Se preincubaron 1x10⁵ células G2 con inhibidor de MMP-9/2 y/o la estirpe celular HT1080 y se ensayaron en un ensayo de migración Transwell a 10 ng/ml de SDF-1.

La FIG. 5 demuestra que purificadas intervienen en la migración *in vitro* de células CD34⁺. 1x10⁵ CB CD34+ sin tratar se ensayaron en un Transwell con MMP-2 o MMP-9 biotecnológicas purificadas en presencia o ausencia de inhibidor de MMP-2/MMP-9. El aumento al doble en la migración compara la migración mediada por SDF-1 (10 ng/ml) de células sin tratar en presencia de MMP-9 o MMP.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a células madre que presentan una mayor sensibilidad a un factor quimiotáctico y a procedimientos de generación y utilización de las mismas. Específicamente, la presente invención permite tratar trastornos que requieren la sustitución de células o tejidos tales como, por ejemplo, tratar daños hepáticos crónicos o agudos.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden comprenderse mejor haciendo referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, debe entenderse que la descripción no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos.

Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria es para la descripción y no deben considerarse restrictivas.

El empleo del tratamiento celular está creciendo rápidamente, y se está convirtiendo gradualmente en una modalidad terapéutica importante en el tratamiento de diversos trastornos. El trasplante de células madre hematopoyéticas (CMH) (p. ej., de la médula ósea, de sangre del cordón umbilical o sangre periférica movilizada) es un ejemplo de un tratamiento celular practicado habitualmente, reembolsado por el seguro. Sin embargo, se están desarrollando también muchos otros tratamientos celulares, como la inmunoterapia para el cáncer y las enfermedades infecciosas, el tratamiento con condrocitos para los defectos de cartílagos, el tratamiento de células neuronales para las enfermedades neurodegenerativas y tratamientos con células madre para numerosas aplicaciones [Forbes (2002) *Clinical Science* 103: 355 -369].

Uno de los problemas asociados con el tratamiento con células madre es la dificultad de lograr el injerto con éxito a largo plazo de las células en el tejido diana. Actualmente, los individuos que fueron trasplantados con éxito presentan contenidos muy bajos de células madre y células madre inmaduras que generan células con el fenotipo deseado.

Por lo tanto, el éxito de trasplante de células madre depende de la capacidad de las células madre infundidas por vía intravenosa para alojarse en el tejido diana (p. ej., la médula ósea), proceso denominado *homing* (búsqueda de dianas). Se supone que la búsqueda de dianas es un proceso de varias etapas, que consiste en la adhesión de las células madre a las células endoteliales de los sinusoides medulares, seguido de la migración transendotelial dirigida por factores quimiotácticos, y, por último el anclaje dentro de los espacios extravasculares de la médula ósea donde tendrá lugar la proliferación y la diferenciación.

Los estudios han demostrado que numerosos factores intervienen en el proceso de búsqueda de dianas como por ejemplo, moléculas de adhesión, citocinas y factores de crecimiento. En 1997 estudios descubrieron que la migración de células CD34⁺ estaba controlada por el factor quimiotáctico, SDF-1. Los estudios posteriores han demostrado que SDF-1 activa las integrinas en las CMH e induce la migración transendotelial de las CMH *in vitro*. El receptor de SDF-1 es un receptor acoplado a la proteína G, denominado CXCR-4. En los precursores hematopoyéticos SDF-1 o CXCR-4 de ratones genéticamente modificados no se desplazan a la médula ósea durante el desarrollo fetal lo que sugiere que las interacciones SDF-1/CXCR4 desempeñan una función importante en la migración de células madre [para reseña véase Voermans (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:725-738, Lapidot (2002) *Leukemia* 16: 1992-2003].

A pesar de la comprensión preliminar del proceso de búsqueda de dianas, la información sobre regulación de la migración de las células madre es todavía incompleta y dispersa. Se aprecia mucho que la mejora de la eficacia del trasplante de células madre puede conseguirse modulando la capacidad de las células madre para albergarse en el tejido diana.

- 5 Mientras reducían la presente invención a la práctica los presentes inventores han descubierto que la actividad de la metaloproteasa de la matriz aumenta la expresión de CXCR4 en células madre hematopoyéticas, favoreciendo con ello la búsqueda de dianas de células madre mediada por SDF-1/CXCR4 en el tejido objetivo dañado.

Los inventores descubrieron que MMP-2/9 interviene también en la búsqueda de dianas de células madre en el bazo y la médula ósea y en la repoblación de dichos órganos también en ausencia de inflamación.

- 10 Además los inventores demostraron que la acción de MMP-2/9 interviene también en la migración de las células leucémicas tales como la célula G2 pre BLL.

- Como se ilustra a continuación y en el apartado Ejemplos que sigue, los presentes inventores ilustran que la lesión hepática aumenta la actividad de la metaloproteasa de la matriz (MMP) en el hígado, lo que conduce al aumento de la expresión de CXCR4 y la búsqueda de dianas mediada por SDF-1 de células madre hematopoyéticas para el hígado dañado. Además el tratamiento de las células madre CD34⁺ con las MMP segregadas aumenta la expresión de CXCR4 y la migración de las células madre *in vitro*, mientras que la adición de un inhibidor de MMP bloquea completamente la migración, corroborando la función de MMP en la búsqueda de dianas de las células madre.

- Aunque la actividad de la metaloproteasa de la matriz (es decir, MMP-2, 3, 9, 10, 13 y 14) se ha demostrado previamente que aumenta después de una lesión hepática [Knittel (2000) *Histochem. Cell Biol.* 113:443-453], los presentes inventores son los primeros en demostrar que este aumento en la actividad de MMP conduce al aumento en la expresión de CXCR4 y a una búsqueda de dianas acelerada de células que expresan la misma, tales como las CMH, al contrario que la función propuesta por Knittel en la remodelación de ECM y la motilidad de los hepatocitos estrellados denominados CMH.

- Además, aunque las enzimas proteolíticas tales como la elastasa, catepsina-G, MMP-2 y MMP-9 se descubrió que inactivan a SDF-1 escindiendo unos pocos aminoácidos en la parte del N terminal de esta quimiocina, para crear de este modo una quimiocina que está desprovista de quimiotaxia [Delgado (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:699; McQuibban (2001) *J. Biol. Chem.* 276:43503], estos episodios intervienen en la movilización de las células madre más que la búsqueda de dianas, dos procesos de imagen el espejo que utilizan mecanismos similares.

- Los presentes resultados permiten la generación de células madre, lo que puede conseguirse de manera eficiente para un tejido diana y, como tal, se pueden utilizar en numerosas aplicaciones clínicas, como en la reparación de lesiones en el hígado y el trasplante de médula ósea o del hígado.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, en la presente memoria se describe un procedimiento para aumentar la sensibilidad de las células madre a un factor quimiotáctico.

- Además, según otro aspecto, se describe un procedimiento para inhibir la migración de células leucémicas tales como las células preBLL, utilizando un inhibidor de MMP-9/2.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células madre" se refiere a células, que son capaces de diferenciarse en otros tipos de células que tienen una función específica, especializada (es decir, células "completamente diferenciadas").

- El procedimiento según este aspecto comprende la exposición de las células madre a una metaloproteasa de la matriz o una porción activa de la misma que es capaz de aumentar el nivel de al menos un receptor del factor quimiotáctico de las células madre para aumentar de este modo la sensibilidad de las células madre al factor quimiotáctico.

Alternativamente, el aumento de la sensibilidad de las células madre a un factor quimiotáctico también puede efectuarse aumentando la expresión o actividad de al menos una MMP endógena de las células madre.

- 45 Como se describe además en la presente memoria a continuación, la exposición de las células madre a una metaloproteasa de la matriz o a una porción activa de la misma puede efectuarse ya sea poniendo en contacto las células con la proteína o una porción activa de la misma, o expresando la proteína o una porción activa de la misma en estas células o en células no germinales cultivadas con éstas (p. ej., los fibroblastos utilizados como una capa de alimentación).

- 50 Como se demuestra claramente en la sección Ejemplos siguiente, la exposición de células madre a MMP aumentó sustancialmente su capacidad para buscar dianas en un tejido lesionado.

- Ejemplos no limitativos de células madre, que pueden utilizarse según este aspecto de la presente descripción, son las células madre hematopoyéticas (CMH) y las células madre mesenquimáticas (CMM) extraídas de tejido de la médula ósea de un individuo en cualquier edad o de la sangre del cordón umbilical de un recién nacido, las células madre embrionarias (ES) no humanas de un tejido embrionario formado después de la gestación (p. ej. blastocisto), o las células germinales embrionarias (EG) extraídas del tejido genital de un feto en cualquier momento durante la gestación, preferiblemente antes de las 10 semanas de gestación. Más descripción de las células madre, que puede utilizarse según este aspecto se resume en la presente memoria a continuación.

CMH - Las células madre hematopoyéticas (CMH) son los blastocitos pluripotenciales en formación encontrados entre otros en el hígado fetal, la sangre del cordón umbilical, la médula ósea y la sangre periférica que son capaces de diferenciarse en cualquiera de los tipos específicos de células hematopoyéticas o sanguíneas, tales como eritrocitos, linfocitos, macrófagos y megacariocitos. Normalmente, en la médula ósea, las CMH residen en nichos

5 que soportan todos los factores requisito y propiedades adhesivas para mantener su capacidad y producir una producción equilibrada apropiada de descendencia madura a lo largo de la vida del organismo [Whetton (1999) *Trends Cell Biol.* 9:233-238; Weissman (2000) *Cell* 100:157-168; Jankowska-Wieczorek (2001) *Stem Cells* 19:99-107; Chan (2001) *Br. J. Haematol.* 112:541-557].

Las CMH según este aspecto son preferiblemente células CD34⁺ y más preferiblemente las células CD34⁺/CD38^{-/baja}

10 , que son una población de células madre más primitivas y están por lo tanto menos restringidas por el linaje y demostraron ser las principales células repobladoras de la médula ósea a largo plazo.

CMM – Las células madre mesenquimáticas son los blastocitos pluripotenciales en formación que se encuentran entre otros en la médula ósea, la sangre, la dermis y el periostio que son capaces de diferenciarse en más de un tipo específico de tejido mesenquimático o conjuntivo (es decir, los tejidos del cuerpo que soportan los elementos

15 especializados; p. ej., los tejidos adiposo, óseo, estroma, cartilaginoso, elástico y conectivo fibroso) dependiendo de diversas influencias de factores bioactivos, tales como las citocinas.

Aproximadamente, el 30% de las células aspiradas de la médula humana que se adhieren al plástico se consideran CMM. Estas células se pueden expandir *in vitro* y luego inducirse para diferenciarse. El hecho de que las CMM adultas se pueden expandir *in vitro* y estimularse para formar células de hueso, cartílago, tendón, músculo o de

20 grasa les hace atractivas para estrategias de ingeniería de tejidos y terapia génica. Se han desarrollado ensayos *in vivo* para ensayar la función de CMM. Las CMM inyectadas en la circulación pueden integrarse en un número de tejidos descritos anteriormente. Específicamente, el músculo esquelético y cardíaco puede ser inducido por la exposición a 5-azacitidina y la diferenciación neuronal de las CMM de rata y humanas en cultivo pueden inducirse mediante exposición a β-mercaptoetanol, DMSO o hidroxianisol butilado [Tomita (1999) 100:11247-11256;

25 Woodbury (2000) *J. Neurosci. Res.* 61:364-370]. Además, se considera que las células derivadas de CMM se integran profundamente en el cerebro después de la inyección periférica, así como después de la inyección directa de CMM humanas en cerebro de rata; migran a lo largo de las vías utilizadas durante la migración de las células madre neuronales en desarrollo, llegan a distribuirse ampliamente y empiezan a perder marcadores de especialización de CMH [Azizi (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3908-3913]. Los procedimientos para favorecer

30 la proliferación de células madre mesenquimáticas y específicas de linaje se describen en la Pat. de EE.UU. nº 6.248.587.

Los epítomos en la superficie de las células madre mesenquimáticas humanas (hCMM), tales como SH2, SH3 y SH4 descritas en la Pat. de EE.UU. nº 5.486.359 pueden utilizarse como reactivos para detectar y capturar una población de células madre mesenquimáticas de una población de células heterogéneas, tal como existe, por ejemplo, en la

35 médula ósea. Las células madre mesenquimáticas precursoras que son positivas para CD45 se utilizan preferiblemente según este aspecto de la presente invención, ya que estas células madre mesenquimáticas precursoras pueden diferenciarse en los diversos linajes mesenquimáticos.

Las células madre preferidas según este aspecto de la presente invención son células madre humanas con exclusión de las células madre embrionarias humanas.

Tabla 1, a continuación proporciona ejemplos de células madre adultas, que pueden utilizarse para obtener el fenotipo indicado en un tejido diana de interés, según este aspecto de la presente descripción.

Célula madre	Fenotipo diferenciado	Tejido diana	Referencia
Médula ósea	Células ovaladas, Hepatocitos	Hígado	Petersen (1999) <i>Science</i> 284:1168-1170
Células KTLS	Hepatocitos	Hígado	Lagasse (2000) <i>Nat. Med.</i> 6:1229-1234
Médula ósea	Hepatocitos	Hígado	Alisan (2000) <i>Nature</i> 406:257; Thiese (2000) <i>Hepatología</i> 32:11-16
Células exocrinas pancreáticas	Hepatocitos	Hígado	Shen (2000) <i>Nat. Cell Biol.</i> 2:879-887
Pacreas	Hepatocitos	Hígado	Wang (2001) <i>Am. J. Pathol.</i> 158:571-579
Médula ósea	Endotelio	Hígado	Gao (2001) <i>Lancet</i> 357:932-933
Médula ósea	Epitelio tubular, glomérulos	Riñón	Poulsom (2001) <i>J. Pathol.</i> 195:229-235
Médula ósea	Endotelio	Riñón	Lagaaij (2001) <i>Lancet</i> 357:33-37
Extrarrenal	Endotelio	Riñón	Williams (1969) <i>Surg. Forum</i> 20:293-294
Médula ósea	Miocardio	Corazón	Orlic (2001) <i>Nature</i> 410:701-704
Médula ósea	Cardiomiocitos y endotelio	Corazón	Jackson (2001) <i>J. Clin. Invest.</i> 107:1395-1402
Médula ósea	Neumocitos tipo 1	Pulmón	Krause (2001) <i>Cell</i> 105:369-377
Neuronal	Múltiples linajes hematopoyéticos	Médula	Bjornson (1999) <i>Science</i> 283:534-537
Médula ósea	Neuronas	SNC	Mezey (2000) <i>Science</i> 290:1779-1782
Médula ósea	Microglía y astrocitos	SNC	Eglitis (1997) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 94:4080-4085

Abreviaturas: SP - Células de población secundarias; SNC - Sistema nervioso central;

Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria las células madre según este aspecto se exponen a una metaloproteasa de la matriz(MMP) o a una porción activa de la misma. Una metaloproteasa de la matriz (MMP) se refiere a una enzima de la familia MMP, que se conocen normalmente por degradar los tejidos conectivos y los componentes del tejido conectivo. Las MMP están caracterizadas por un dominio catalítico de aproximadamente 170 aminoácidos incluido un motivo de unión de cinc HEXXHXXGXXH y una metionina conservada, que forma una estructura única "espira de Met". El dominio catalítico comprende una lámina β con cinco cadenas, tres hélices α y bucles en puente. MMP-2 y MMP-9 tienen tres repeticiones del dominio de fibronectina tipo II insertadas en el dominio catalítico. Estas repeticiones interactúan con colágenos y gelatinas. El dominio similar a hemopexina en el C terminal incluidos aproximadamente 210 aminoácidos tiene forma de disco elipsoidal con una estructura de hélice β de cuatro paletas; cada paleta consta de cuatro cadenas β antiparalelas y una hélice α . El dominio de hemopexina es un requisito absoluto para las colagenasas para escindir los colágenos los colágenos intersticiales de triple hélice, aunque los dominios catalíticos solos conservan actividad proteolítica hacia otras sustancias. No se conoce la función del péptido enlazador rico en prolina que conecta los dominios catalítico y de hemopexina, aunque su interacción con el colágeno de triple hélice se supone basada en el modelado molecular. MMP-23 tiene regiones ricas en cisteína, ricas en prolina y similares al receptor de IL-1 en lugar del dominio de hemopexina. En las MT-MMP se encuentra un dominio transmembranal, que ancla estas enzimas a la superficie celular. La porción activa de la MMP según este aspecto preferiblemente se refiere a la secuencia mínima de MMP, que es suficiente para aumentar la sensibilidad de las células madre al factor quimiotáctico. Tal como se emplea en la presente memoria una porción activa de MMP, se refiere a una muteína, a una proteína de fusión, derivado funcional, fragmento, MMP permutada circularmente y/o una de sus sales. Para determinar la porción activa de MMP, las células madre pueden poner en contacto con un segmento de MMP y la respuesta de las células a la misma pueden seguirse molecular, bioquímica o funcionalmente (p. ej., mediante ensayos de motilidad, búsqueda de dianas, migración) usando

procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen además a continuación. La Tabla 2 a continuación, da una lista de numerosas MMP de vertebrados, que pueden utilizarse para aumentar la expresión del receptor del factor quimiotáctico según este aspecto de la presente descripción.

Tabla 2

Proteína	MMP
Colagenasa 1	MMP-1
Gelatinasa A	MMP-2
Estromelisinina 1	MMP-3
Matrilisina	MMP-7
Colagenasa 2	MMP-8
Gelatinasa B	MMP-9
Estromelisinina 2	MMP-10
Estromelisinina 3	MMP-11
Elastasa de macrófagos	MMP-12
Colagenasa 3	MMP-13
MT1-MMP	MMP-14
MT2-MMP	MMP-15
MT3-MMP	MMP-16
MT4-MMP	MMP-17
(sin nombre vulgar)	MMP-19
Enamelisina	MMP-20
XMMP	MMP-21
CMMP	MMP-22
(sin nombre vulgar)	MMP-23

La selección de MMP utilizada según este aspecto depende del receptor activado. Numerosos receptores de células quimiotácticas son conocidos por participar en la migración transendotelial de células madre. Muchos de estos receptores pertenecen a la familia de receptores de transmembrana siete acoplados a la proteína G (7-TMR). La señalización a través de proteínas G, en particular proteínas Gi, da lugar a una respuesta quimiotáctica de las células hacia un gradiente del ligando correspondiente [Voermans (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:725-738]. Estudios recientes han proporcionado pruebas para la expresión de varios 7-TMR en células progenitoras hematopoyéticas inmaduras, que potencialmente median efectos quimiotácticos: receptores de quimiocinas (p. ej., CXCR4, receptor para el factor 1 derivado de células de estroma), receptores de mediadores lipídicos (p. ej., el receptor cysLT1 de cisteinil leucotrieno y el receptor cb2 de cannabinoides periféricos) y los receptores para las hormonas neuroendocrinas (p. ej., el receptor sst2 de somatostatina). De estos estudios se puede concluir que la migración de células progenitoras hematopoyéticas y células madre está controlada por una variedad de factores quimiotácticos en lugar de por una sola quimiocina (p. ej., SDF-1).

Dado que se han caracterizado numerosos receptores de factor quimiotáctico expresados por células madre, puede medirse y evaluarse el efecto de varios tipos de MMP sobre la expresión de estos receptores en células madre. Por lo tanto, el efecto de cualquier MMP o de una porción activa de la misma sobre la expresión del receptor quimiotáctico puede determinarse utilizando ensayos bioquímicos o preferiblemente funcionales, que son muy conocidos en la técnica, varios de los cuales se describen con detalle a continuación en la presente memoria.

La MMP utilizada por el procedimiento de la presente invención es MMP2 y/o MMP9. Tal como se muestra en el apartado Ejemplos que sigue, la exposición de las células madre a una de las dos de estas MMP da lugar a aumento de CXCR4, el receptor de SDF-1 acoplado a la proteína G.

Como se ha mencionado anteriormente, la exposición de las células madre a una MMP o a una porción activa de la misma puede efectuarse poniendo en contacto las células madre con la proteína o expresando la proteína en las células madre.

La puesta en contacto células madre con una MMP o una porción activa de la misma se efectúa *ex vivo* usando células recolectadas, aunque la presente invención también contempla la movilización de células madre de tejido en circulación y la exposición de células madre circulantes a la MMP.

La descripción se refiere a MMP y a sus sales, derivados funcionales, precursores y fracciones activas así como sus mutantes activos, es decir, otras proteínas o polipéptidos en donde uno o más aminoácidos de la estructura son eliminados o sustituidos por otros aminoácidos o uno o más aminoácidos se añaden a esta secuencia con el fin de obtener polipéptidos o proteínas que tienen la misma actividad de la MMP y comprende también las correspondientes "proteínas de fusión", es decir polipéptidos que comprenden la MMP o una mutación de la misma fusionada con otra proteína. Por consiguiente, la MMP puede fusionarse con otra proteína tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina.

El término "sales" en la presente memoria se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la proteína MMP descrita en la presente memoria o una de sus muteínas. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica y comprenden sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido comprenden, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Desde luego, cualquiera de dichas sales deben tener una actividad sustancialmente similar a la proteína MMP de la invención o sus muteínas.

La definición "derivados funcionales" tal como se emplea en la presente memoria se refiere a derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos de aminoácidos o en los grupos terminales N o C según métodos conocidos y están comprendidos en la descripción cuando son farmacéuticamente aceptable es decir, cuando no destruyen la actividad de la proteína o no imparten toxicidad a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Dichos derivados comprenden por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados de N-acilo de grupos amino libres o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanilo o aroilo.

"Fragmento" de la proteína descrita en la presente memoria se refiere a cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica del propio compuesto, solo o en combinación con moléculas relacionadas o restos unidos a él, por ejemplo restos de azúcares o fosfatos, o agregados de la molécula de polipéptido cuando dichos fragmentos o precursores muestran la misma actividad de la MMP como medicamento.

La expresión "circularmente permutada" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula lineal en la que los extremos han sido unidos entre sí, ya sea directamente o mediante un enlazador, para producir una molécula circular, y después la molécula circular se abre en otro lugar para producir una nueva molécula lineal con extremos diferentes de los extremos terminales en la molécula original. Las permutaciones circulares comprenden aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha hecho circular y luego se ha abierto. Por lo tanto, una molécula circularmente permutada puede sintetizarse por primera vez como una molécula lineal y nunca van a través de una etapa de formación del círculo y apertura. La permutación circular particular de una molécula se diseña mediante bridas que contienen los restos de aminoácidos entre las que se elimina el enlace peptídico. Moléculas circularmente permutadas, que pueden incluir ADN, ARN y proteínas, son moléculas de cadena sencilla que tienen fusionados sus terminales normales, a menudo con un enlazador, y contienen nuevos terminales en otra posición. Ver Goldenberg, *et al. J. Mol. Biol.*, 165:407-413 (1983) y Pan *et al. Gen* 125:111-114 (1993). La permutación circular es funcionalmente equivalente a tomar una molécula de cadena lineal, fusionar los extremos para formar una molécula circular, y después cortar la molécula circular en un lugar diferente para formar una nueva molécula de cadena lineal con diferentes terminales. Por lo tanto la permutación circular tiene el efecto de conservar esencialmente la secuencia y la identidad de los aminoácidos de una proteína a la vez que genera de nuevos terminales en diferentes lugares.

Los términos "polipéptido y proteína" en la presente memoria son intercambiables.

La presente descripción también se refiere a muteínas de la proteína MMP anterior de la invención, muteínas que conservan esencialmente la misma actividad biológica de la proteína MMP que tiene esencialmente sólo las secuencias de origen natural de la MMP. Dichas "muteínas" pueden ser aquellas en los que hasta aproximadamente 20 y 10 restos de aminoácidos se pueden eliminar, añadir o sustituir por otras en la proteína MMP, respectivamente, de tal manera que las modificaciones de este tipo no cambian sustancialmente la actividad biológica de la proteína muteína con respecto a la propia proteína.

Estas muteínas se preparan mediante técnicas de síntesis conocidas y/o mutagenia dirigida al sitio, o cualquier otra de las técnicas conocidas adecuadas.

Cualquiera de dichas muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de la MMP básica, de modo que tiene sustancialmente similar actividad que la misma. Por lo tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que la proteína básica descrita en la presente memoria por medio de experimentación rutinaria que comprende someter dicha muteína a las pruebas de actividad biológica indicadas en los Ejemplos a continuación.

Las muteínas de la proteína MMP que pueden utilizarse según la presente descripción, o uno de sus ácidos nucleicos codificadores, comprenden un conjunto finito sustancialmente de las correspondientes secuencias de MMP como péptidos de sustitución o polinucleótidos que pueden obtenerse rutinariamente por cualquier experto en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en las enseñanzas y orientaciones presentadas en la presente

memoria. Para una descripción detallada de la química y estructura de las proteínas, véase Schulz, G.E. *et al.*, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nueva York., 1978; y Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. Para una presentación de sustituciones en la secuencia de nucleótidos, tales como las preferencias de codones, véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications y Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995.; . Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Los cambios preferidos para las muteínas según la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de aquellos que en la proteína tienen esencialmente las secuencias de MMP de origen natural, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo, que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre los miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula, ver Grantham, *Science*, vol. 185, págs. 862-864 (1974). Es evidente que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos también pueden hacerse en la secuencia definida anteriormente sin alterar su función, particularmente si en las inserciones o eliminaciones solamente intervienen unos pocos aminoácidos, p. ej., menos de 50, y preferiblemente menos de 20 MMP y no eliminan ni desplazan aminoácidos que son críticos para una configuración funcional, p. ej., restos de cisteína, Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", *Science*, vol. 181, págs. 223-230 (1973). Las muteínas producidas por dichas eliminaciones y/o inserciones entran dentro del ámbito de la presente descripción.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla A. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla B; y aún más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla C.

TABLA A Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
25 Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
30 Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
35 Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
40 Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA B Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
5 Arg	His, Lys, Arg
Leu	Ile, Phe, Met, Leu
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
10 Val	Met, Ile, Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
15 Cys	Ser, Cys
Su	Arg, Gln, His
Gln	Glu, His, Gln
Asn	Asp, Asn
Lys	Arg, Lys
20 Asp	Asn, Asp
Glu	Gln, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

25 TABLA C Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácidos	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
30 Leu	Ile, Met, Leu
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
35 Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Ser, Cys
40 His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
45 Glu	Glu
Met	Ile, Leu, Met
Trp	Trp

50 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para la obtención de muteínas de la proteína para su utilización en la presente descripción comprenden cualquiera de las etapas de los métodos conocidos, tales como las presentadas en las patentes de EE.UU. RE n° 33653, n° 4.959.314, n° 4.588.585 y n° 4.737.462, de Mark *et al.*; n° 5.116.943 de Koths *et al.*, n° 4.965.195 de Namen *et al.*; n° 4.879.111 de Chong *et*

al.; y n° 5,017,691 de Lee *et al.*; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Straw *et al.*).

En otra realización preferida de la presente invención, cualquier muteína de la proteína MMP para su utilización en la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde esencialmente a la de la proteína MMP
5 indicada anteriormente descrita en la presente memoria. La expresión "esencialmente correspondiente a" está destinada a comprender muteínas con cambios menores a la secuencia de la proteína básica que no afectan a las características básicas de las mismas, especialmente en cuanto a su capacidad para la MMP se refiere. El tipo de cambios que se consideran generalmente que caen dentro del lenguaje "esencialmente correspondiente a" son las que podrían resultar de las técnicas convencionales de mutagenia del ADN que codifica la proteína MMP, dando
10 lugar a algunas modificaciones de menor importancia, y detectando la actividad deseada, por ejemplo aumentando la sensibilidad de las células madre para un factor quimiotáctico.

La presente descripción también abarca variantes de MMP. Una variante de MMP preferida es la que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 80%, una variante más preferida de MMP es la que tiene al menos 90% de identidad y la variante más preferida es la que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos de
15 MMP.

La expresión "identidad de secuencia" tal como se emplea en la presente memoria significa que las secuencias de aminoácidos se comparan por alineación según Hanks y Quinn (1991) con un perfeccionamiento de las regiones de baja homología utilizando el programa Clustal-X, que es la interfaz de Windows para el programa de alineación de secuencias múltiple ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). El programa Clustal-X está disponible en Internet en ftp://ftp-
20 igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx/. Por supuesto, debe entenderse que si este enlace se vuelve inactivo, cualquier experto en la técnica podría encontrar versiones de este programa en otros enlaces utilizando técnicas de búsqueda habituales en Internet sin excesiva experimentación. A menos que se especifique de otro modo, la versión más reciente de cualquier programa que mencionado en la presente memoria, como la fecha de presentación efectiva de la presente solicitud, es la que se utiliza con el fin de poner en práctica la realización descrita.

Otro método para determinar la "identidad de secuencia" es el siguiente. Las secuencias se alinean utilizando la versión 9 del Grupo de Computación Genética GDAP (programa de alineamiento global), utilizando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores de -4 a +11) con una penalización de hueco abierto de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización por extensión del hueco de -4 (para cada nulo consecutivo adicional en el hueco). Después de la alineación, la identidad porcentual se calcula expresando el número de coincidencias como
25 porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

Las muteínas según la presente invención incluyen las codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida con ADN o ARN en condiciones severas y que codifica una proteína MMP descrita en la presente memoria, que comprende esencialmente la totalidad de las secuencias de origen natural que codifican la MMP y las secuencias que pueden diferir en su secuencia nucleotídica de la secuencia nucleotídica natural en virtud de la
30 degeneración del código genético, es decir, una secuencia de ácido nucleico algo diferente puede codificar todavía la misma secuencia de aminoácidos, debido a esta degeneración.

El término "hibridación" como se emplea en la presente memoria deberá incluir cualquier proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a la cadena complementaria mediante un emparejamiento de bases (Coombs J., 1994, *Dictionary of Biotechnology*, Stokton Press, Nueva York NY). "Amplificación" se define como la producción
40 de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y generalmente se lleva a cabo utilizando tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa bien conocidas en la técnica (Dieffenbach y Dveksler, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY).

"Severidad" se produce normalmente en un intervalo de aproximadamente $T_f - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la temperatura de fusión de la sonda) de aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de T_f .

La expresión "condiciones severas" se refiere a condiciones de hibridación y de lavado posterior, a las que los expertos en la técnica se refieren convencionalmente como "severas". Véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publications y Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995.; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989.

Tal como se usa en el presente documento, las condiciones de severidad están en función de la temperatura utilizada en el experimento de hibridación, la molaridad de los cationes monovalentes y el porcentaje de formamida en la solución de hibridación. Para determinar el grado de severidad involucrado en cualquier conjunto dado de condiciones, se utiliza en primer lugar la ecuación de Meinkoth *et al.* (1984) para determinar la estabilidad de los híbridos de identidad 100%, expresada como temperatura de fusión T_f del híbrido ADN-ADN:
50 $T_f = 81,5 C + 16,6 (\text{Log } M) 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$

donde M es la molaridad de cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos G y C en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. Por cada 1 C que se reduce la T_f de la calculada para un híbrido de 100% de identidad, la cantidad de emparejamientos incorrectos permitidos se incrementa en aproximadamente un 1%. Por lo tanto, si la T_f utilizada para cualquier experimento de hibridación dada a las concentraciones especificadas de sal y formamida es 10°C inferior a la T_f

calculada para un híbrido 100% según la ecuación de Meinkoth, la hibridación se producirá incluso si hay hasta aproximadamente 10% de desemparejamiento de bases.

Tal como se emplea en la presente memoria, "condiciones muy severas" son aquellas que proporcionan una Tf que no es más de 10°C por debajo de la Tf que existiría para un duplicado perfecto con la secuencia diana, ya sea como se calcula por la fórmula anterior o como se mide en realidad. "Condiciones moderadamente severas" son aquellas, que proporcionan una Tf, que no es más de 20°C inferior a la Tf que existiría para un duplicado perfecto con la secuencia diana, ya sea como se calcula por la fórmula anterior o como se mide en realidad. Sin limitación, ejemplos de condiciones muy severas (5-10°C inferiores a la Tf calculada o medida del híbrido) y moderadamente severas (15-20°C inferiores a la Tf calculada o medida del híbrido) utilizan una solución de lavado de 2 x SSC (citrato de solución salina normal) y 0,5% de SDS (dodecilsulfato de sodio) a la temperatura apropiada inferior a la Tf calculada del híbrido. La severidad final de las condiciones se debe principalmente a las condiciones de lavado, particularmente si las condiciones de hibridación utilizadas son aquellas, que permiten formar híbridos menos estables junto con híbridos estables. Las condiciones de lavado a mayor severidad a continuación eliminan los híbridos menos estables. Una condición de hibridación corriente que puede utilizarse con las condiciones de lavado muy severas a moderadamente severas descritas anteriormente es la hibridación en una solución de 6 x SSC (o 6 x SSPE (solución salina habitual-fosfato-EDTA), 5 x reactivo Denhardt, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado a una temperatura de aproximadamente 20 a 25°C por debajo de la Tf. Si se utilizan sondas mezcladas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC (Ausubel, 1987, 1999).

Pueden obtenerse células madre adultas utilizando un procedimiento quirúrgico tal como la aspiración de médula ósea o pueden recolectarse utilizando sistemas comerciales, tales como los disponibles en Nexell Therapeutics Inc. Irvine, CA, EE.UU.

Las células madre utilizadas por la presente invención se recogen preferiblemente (es decir, se recolectan) utilizando un procedimiento de movilización de células madre, que utiliza quimioterapia o estimulación de citocinas para liberar las CMH en circulación de los individuos. Las células madre se recuperan preferiblemente utilizando este procedimiento ya que la movilización se sabe que produce más CMH y células progenitoras que la cirugía de la médula ósea.

La movilización de células madre puede ser provocada por numerosas moléculas. Los ejemplos comprenden pero no se limitan a las citocinas tales como, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina (IL)-7, IL-3, IL-12, el factor de células madre (SCF) y el ligando flt-3; quimiocinas como IL-8, Mip-1α, Groβ o SDF-1; y los agentes de quimioterapia ciclofosfamida (Cy) y paclitaxel. Se apreciará que estas moléculas difieren en cinética y eficacia, sin embargo, según realizaciones actualmente conocidos G-CSF se utiliza preferentemente solo o en combinación tal como con ciclofosfamida para movilizar las células madre. Normalmente, G-CSF se administra diariamente a una dosis de 5-10 µg/kg durante 5-10 días. Los procedimientos de movilización de células madre se describen en las Pat. De EE.UU. nº 6.447.766 y nº 6.162.427.

Las células madre embrionarias humanas de la descripción pueden aislarse de blastocistos humanos. Los blastocistos humanos se obtienen generalmente de embriones humanos de preimplantación *in vivo* o de embriones fertilizados *in vitro* (FIV). Alternativamente, un embrión humano de una sola célula puede ampliarse a la etapa de blastocisto. Para el aislamiento de células ES humanas se retira la zona pelúcida del blastocisto y la masa celular interna (MCI) se aísla por inmunocirugía, en la que las células de trofoctoderma se lisan y eliminan de la MCI intacta por pipeteo suave. La MCI se siembra en placas a continuación en un matraz de cultivo de tejidos que contiene el medio apropiado que permite su crecimiento. Después de 9 a 15 días, la excrecencia procedente de la MCI se disocia en grupos, ya sea por una disociación mecánica o por una degradación enzimática y las células se vuelven a sembrar en un medio de cultivo de tejido fresco. Las colonias que demuestran la morfología indiferenciada se seleccionan individualmente con micropipeta, se disocian mecánicamente en grupos y se vuelven a sembrar en placas. Las células ES resultantes se dividen luego rutinariamente cada 1-2 semanas. Para más detalles sobre los procedimientos de preparación de células ES humanas véase Thomson *et al.*, [Pat. de EE.UU. nº 5.843.780; *Science* 282: 1145, 1998; *Curr. Top. Dev. Biol.* 38:133, 1998; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844, 1995]; Bongso *et al.*, [*Hum. Reprod.* 4:706, 1989]; Gardner *et al.*, [*Fertil. Steril.* 69:84, 1998].

Se apreciará que las células madre disponibles en el mercado también se puedan utilizar según este aspecto de la presente descripción. Las células ES humanas pueden adquirirse en el registro de células madre embrionarias humanas NIH (<<http://escr.nih.gov>>). Ejemplos no limitativos de estirpes de células madre embrionarias disponibles en el mercado son BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03, TE32.

Se pueden recuperar células EG humanas a partir de las células germinales primordiales obtenidas de fetos humanos de alrededor de 8-11 semanas de gestación utilizando técnicas de laboratorio conocidos por cualquier experto en las técnicas. Las verrugas genitales se disocian y se cortan en trozos pequeños, que se desagregan posteriormente en células por disociación mecánica. Las células EG se cultivan en matraces de cultivo de tejidos con el medio apropiado. Las células se cultivan con la sustitución diaria de medio hasta que se observa una morfología celular consistente con células EG, normalmente después de 7-30 días o 1-4 pasajes. Para más detalles sobre procedimientos de preparación de células EG véase Shambloott *et al.*, [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13726, 1998] y Pat. de EE.UU. nº 6.090.622.

Se apreciará que se pueda efectuar preferiblemente el enriquecimiento de la población de células madre que presenta pluripotencia. Así, por ejemplo, como se indicó anteriormente, se pueden concentra células madre CD34⁺ usando columnas de afinidad o FACS como se describe además en la presente memoria .

5 El cultivo de células madre en condiciones proliferativas puede efectuarse también en los casos en que el número de células madre es demasiado bajo para su uso en el tratamiento. El cultivo de células madre se describe en las Pat. de EE.UU n° 6.511.958, n° 6.436.704, n° 6.280.718, n° 6.258.597, n° 6.184.035, n° 6.132.708 y n° 5.837.5739.

Una vez se obtienen las células madre, se ponen en contacto con una metaloproteasa de la matriz o su porción activa.

10 Las metaloproteasas solubles de la matriz, y, en especial, su porción activa pueden sintetizarse bioquímicamente utilizando, por ejemplo, técnicas en fase sólida estándar. Estos procedimientos comprenden la síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y están descritos además por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984).

15 Los péptidos sintéticos se pueden purificar por cromatografía líquida de alto rendimiento de preparación [Creighton T. (1983) *Proteins, Structures and Molecular Principles*. W.H. Freeman and Co. NY] y cuya composición puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos.

Se apreciará que las metaloproteasas de la matriz puedan adquirirse también en proveedores comerciales tales como, por ejemplo, MegaPharm, Oncogene Research Products, Hod-Hasharon, Israel.

20 En los casos en que se desean grandes cantidades de metaloproteasa de la matriz o de su porción activa, dichos polipéptidos se generan preferiblemente utilizando técnicas biotecnológicas.

Para sintetizar biotecnológicamente dichos polipéptidos, se introduce en las células anfitrionas un montaje de expresión (es decir, un vector de expresión), que comprende un polinucleótido que codifica la metaloproteasa soluble de la matriz o su porción activa colocada bajo el control de la transcripción de un elemento regulador, tal
25 como un activador.

Las células "transformadas" se cultivan en condiciones adecuadas, que permiten la expresión de la proteína codificada por el polinucleótido.

Tras un período de tiempo predeterminado, la proteína expresada se recupera de la célula o cultivo celular y se efectúa la purificación.

30 Como sistemas de expresión del anfitrión puede utilizarse una variedad de células procariotas o eucariotas para expresar la secuencia codificadora del polipéptido modificado. Estos comprenden, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago biotecnológico, un vector de expresión de ADN plásmido o de ADN cósmido que contiene la secuencia de codificación deseada; sistemas de expresión de mamíferos se utilizan preferiblemente para expresar la metaloproteasa de la matriz o su porción activa,
35 ya que las células eucariotas permiten la generación de proteínas modificadas tras la traducción. Sin embargo, los sistemas bacterianos suelen utilizarse para producir proteínas recombinadas ya que permiten un gran volumen de producción a bajo costo. Por lo tanto, el sistema anfitrión se selecciona según la proteína biotecnológica que debe generarse y el uso final de la misma.

40 En sistemas bacterianos, puede seleccionarse ventajosamente numerosos vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido modificado expresado. Por ejemplo, cuando se desean grandes cantidades de conjugados, pueden desearse vectores que dirigen la expresión de grandes cantidades de producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado en el periplasma de la bacteria o el medio de cultivo donde el producto proteico se purifica fácilmente. También pueden ser deseables determinadas proteínas de fusión diseñadas con un punto de escisión específico para ayudar a la
45 recuperación del conjugado. Dichos vectores adaptables a dicha manipulación comprenden, pero no se limitan a, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier *et al.* (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89).

Pueden ser utilizados también otros sistemas de expresión tales como sistemas de células anfitrionas de insectos y mamíferos, que son bien conocidos en la técnica (Pat. de EE.UU. n° 6.541.623).

50 En cualquier caso, las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, lo que permite la expresión de grandes cantidades de polipéptido recombinado. Las condiciones eficaces de cultivo comprenden, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactor, condiciones de temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de proteínas. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinado modificado de la presente invención. Dicho medio incluye normalmente una solución acuosa que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, y sales, minerales y metales apropiados y otros nutrientes, tales como
55 vitaminas. Las células descritas en la presente memoria pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microvaloración, y placas de Petri. El cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula biotecnológica. Dichas condiciones de cultivo están dentro de la competencia de cualquier experto en la técnica.

Las proteínas recombinadas resultantes de la presente invención se segregan preferiblemente en el medio de cultivo (p. ej., fermentación).

Después de un tiempo predeterminado en el cultivo, se efectúa la recuperación de la proteína recombinada. La frase "recuperar la proteína recombinada" se refiere a recolectar todo el medio de crecimiento que contiene la proteína y no necesita involucrar etapas adicionales de separación o purificación. Las proteínas descritas en la presente memoria pueden purificarse empleando una variedad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatografía de enfoque y disolución diferenciada.

- 5
- 10 Las proteínas descritas en la presente memoria se recuperan preferiblemente en forma "sustancialmente pura". Tal como se emplea en la presente memoria, "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las diversas aplicaciones, descritas a continuación.

Se apreciará que la producción biotecnológica de la MMP o su porción activa de la presente invención pueda efectuarse también *in vitro*.

- 15 La MMP o su porción activa pueden ser incluidas en un medio de cultivo utilizado para el cultivo o mantenimiento de las células madre recolectadas. Dicho medio de cultivo incluye normalmente una solución tampón (es decir, un medio de cultivo) adecuada para el cultivo de células madre. El medio de cultivo también puede incluir suero o suero de sustitución, que incluyen factores de crecimiento que ayudan al crecimiento y supervivencia de las células madre. El medio de cultivo también puede incluir un agente tales como SDF-1, IL-6, SCF y similares, que pueden favorecer el crecimiento celular, la diferenciación en la supervivencia y la búsqueda de dianas. Además, el medio de crecimiento de la presente invención también puede incluir agentes inhibidores de diferenciación tal como el factor inhibidor de la leucemia (LIF).
- 20

Las células madre descritas en la presente memoria también pueden ponerse en contacto con las células que expresan y presentan de manera óptima a MMP (es decir, MMP unida a la membrana insoluble). Esto puede efectuarse cultivando conjuntamente las células madre con células que expresan una MMP segregada o unida a la membrana. Por ejemplo, las células alimentadoras de fibroblastos, que a menudo se cultivan con células madre para ayudar a su proliferación en un estado indiferenciado pueden expresar una MMP de interés, realizando de este modo una doble función, es decir, el apoyo al crecimiento y el aumento de la potencial búsqueda de dianas de las células madre.

- 30 Sin embargo, dado que las células madre se usan preferiblemente para aplicaciones clínicas, se toman medidas para aislar las células madre de la segunda población de células que expresan MMP tras la inducción de cantidad suficiente de al menos un receptor del factor quimiotáctico de las células madre. Los procedimientos de clasificación de poblaciones de células se describen además a continuación.

- 35 Alternativamente, las células madre de la presente invención pueden transformarse con un montaje de expresión tal como el descrito anteriormente con el fin de expresar la metaloproteasa de la matriz o su porción activa en las células madre.

En tales casos, el montaje de expresión incluye un elemento activo regulador que actúa en cis en las células de mamífero (ejemplos anteriores), preferiblemente en condiciones inducibles, específicas de crecimiento o específicas para el tejido.

- 40 Ejemplos de activadores específicos de un tipo de célula y/o específicos de un tejido comprenden activadores tales como la albúmina que es específico para el hígado [Pinkert *et al.*, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], activadores específicos linfoides [Calame *et al.*, (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]; en particular activadores de receptores de linfocitos T [Winoto *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33729-740], activadores específicos de neuronas tales como el activador de neurofilamentos [Byrne *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], activadores específicos del páncreas [Edlunch *et al.* (1985) *Science* 230:912-916] o activadores específicos de la glándula mamaria tales como el activador de suero de leche (Pat. de EE.UU. nº 4.873.316 y Publicación de la Solicitud Europea nº 264.166). El montaje de ácido nucleico de la presente invención puede incluir además un potenciador, que puede ser adyacente o distante a la secuencia activadora y puede funcionar regulando por incremento la transcripción del mismo.
- 45

- 50 Preferiblemente, el elemento regulador inducible que actúa en cis es regulable por los cambios en el medio de las células madre durante el proceso de implantación de búsqueda de dianas.

Durante su migración, las células madre se someten a fuerzas de cizallamiento generadas por el movimiento de las células dentro de la sangre circulante; una vez implantadas, las células madre ya no están sometidas a dichas fuerzas de cizallamiento. Dado que la MMP necesita solamente ser activa durante la etapa de búsqueda de dianas (migración), la utilización de un elemento regulador que actúa en cis que es activo solamente en la etapa de la migración es particularmente ventajoso. Uno de dichos elementos reguladores es el elemento sensible a la tensión de cizallamiento descrito por Resnick *et al.*, en *PNAS USA* 90:4591-4595, 1993.

55

La modificación genética de células madre mesenquimáticas se expone en la patente de EE.UU. nº 5.591.625. La modificación genética de las CMH se expone en Zheng 2000 *Nat. Biotechnol.* 18: 176-180 de Lotti y 2.002 *J. Virol.* 76 (8) 3996-4007.

5 Una vez expuestas a la MMP o a su porción activa, las células madre que presentan un aumento de los niveles de expresión del receptor del factor quimiotáctico y, como consecuencia, una mayor sensibilidad al factor quimiotáctico se identifican y aíslan preferentemente. Aunque dicha etapa enriquece a las células muy quimiotácticas, también se prevé el empleo de una población tratada con MMP no enriquecida.

La identificación y aislamiento de dichas células se puede efectuar utilizando una serie de procedimientos citológicos, bioquímicos y moleculares que son bien conocidos en la técnica.

10 Por ejemplo, el análisis de la cantidad de receptor puede efectuarse por citometría de flujo. Este enfoque emplea la instrumentación que explora células aisladas que pasan delante de fuentes de excitación en un medio líquido. La tecnología puede proporcionar un análisis rápido, cuantitativa, multiparamétrico sobre las células aisladas vivas (o muertas) basado en la medición de la emisión de luz visible y fluorescente. Este protocolo básico se centra en: medir la intensidad de fluorescencia producida por anticuerpos y ligandos marcados con fluorescencia que se unen
15 moléculas asociadas a células específicas. Para aislar poblaciones de células utilizando el clasificador de células activadas por fluorescencia, las células madre de la presente invención se ponen en contacto con anti CXCR4 disponible en el mercado en R & D, 614 McKinley Place NE Minneapolis, MN.

Otros procedimientos citológicos o bioquímicos para evaluar cuantitativamente el nivel de la expresión del receptor quimiotáctico comprenden, pero no se limitan al análisis de unión usando una quimiocina marcada (p. ej., marcada
20 con radiactividad), análisis de transferencia Western, biotilación de la superficie celular y tinción de inmunofluorescencia.

Se apreciará que los niveles de expresión del receptor se puedan determinarse también en el ARNm. Por ejemplo, ARNm de CXCR4 puede detectarse en las células mediante hibridación a una sonda específica. Dichas sondas pueden ser ADN clonados o uno de sus fragmentos, ARN, generalmente se hace por transcripción *in vitro*, o sondas
25 de oligonucleótidos, normalmente generadas por síntesis en fase sólida. Los procedimientos para la generación y utilización de sondas adecuadas para la hibridación específica son bien conocidos y utilizados en la técnica. La cuantificación de los contenidos de ARNm también se puede efectuar utilizando una reacción de amplificación [p. ej., PCR, "*PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*", Academic Press, San Diego, CA (1990)], empleando cebadores, que hibridan específicamente al ARNm de un receptor quimiotáctico de interés.

30 Se puede emplear una variedad de controles de manera útil para mejorar la precisión en los ensayos de detección de ARNm. Por ejemplo, pueden hibridarse muestras con una sonda irrelevante y tratarse con RNasa A antes de la hibridación, para evaluar la hibridación falsa.

Pueden también utilizarse ensayos funcionales para determinar la expresión del receptor quimiotáctico. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de quimiotaxia, que emplea un gradiente del agente quimiotáctico (p. ej., SDF-1) y sigue
35 la migración de células madre a través de una membrana hacia el agente quimiotáctico para identificar y aislar las células madre que presentan un aumento de quimiotaxia. Si las células no expresan suficientes contenidos del receptor quimiotáctico (p. ej., CXCR4), entonces la mayoría de las células permanecerá en la membrana. Sin embargo, tras el aumento de expresión del receptor del factor quimiotáctico de la presente invención, las células migrarán a través de la membrana y sedimentarán en el fondo del pocillo de la placa de quimiotaxia (véase el ejemplo 2 del apartado Ejemplos).
40

Se apreciará que un ensayo funcional de búsqueda de dianas también pueda utilizarse. Dicho ensayo se describe en Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291.

Las células madre que presentan una mayor sensibilidad al factor quimiotáctico se pueden utilizar en una amplia gama de aplicaciones clínicas.

45 Por lo tanto, según otro aspecto, en la presente memoria se describe un procedimiento para tratar un trastorno que requiere la sustitución de células o tejido. El procedimiento se efectúa proporcionar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de células madre tratadas previamente con metaloproteasa de la matriz o su porción activa que puede aumentar un nivel de al menos un receptor del factor quimiotáctico de las células madre descritas anteriormente en la presente memoria, para tratar de ese modo el trastorno que requiere la sustitución de
50 células o tejido en el individuo.

Trastornos que requieren la sustitución de células o tejidos comprenden, pero no se limitan a diversas inmunodeficiencias tal como de linfocitos T y/o B, o trastornos inmunitarios, tales como la artritis reumatoide. Dichas inmunodeficiencias pueden ser el resultado de infecciones víricas, HTLV I, HTLV II, HTLV III, exposición intensa a la radiación, terapia del cáncer o el resultado de otro tratamiento médico; las deficiencias hematológicas comprenden,
55 pero no se limitan a, leucemias, tales como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia no linfoblástica aguda (LNLA), la leucemia mielocítica aguda (LMA) o leucemia mielocítica crónica (LMC). Otras de dichas deficiencias hematológicas pueden ser, pero no se limitan a, síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) [tales como, por ejemplo insuficiencia de adenosina desaminasa (ADA) y IDCG ligada al cromosoma X (XIDCG), osteopetrosis, anemia aplásica, enfermedad de Gaucher, talasemia y otras anomalías hematopoyéticas congénitas o

determinadas genéticamente; otros trastornos que requieren sustitución de células o tejidos comprenden los relacionados con la insuficiencia hepática, la insuficiencia pancreática, trastornos neurológicos, los trastornos que requieren aumento de la formación de hueso tales como la osteoartritis, osteoporosis, condiciones traumáticas o patológicas que involucran a cualquiera de los tejidos conectivos, tales como una defectos óseos, defectos del tejido conectivo, defectos del esqueleto o defectos de los cartílagos.

Los individuos preferidos son los mamíferos, tales como los caninos, felinos, ovinos, porcinos, equinos, bovinos y preferiblemente los seres humanos.

Las células madre según este aspecto de la presente invención se obtienen preferiblemente del individuo a tratar. Sin embargo las células madre también pueden obtenerse de un donante singénico, alogénico y menos preferiblemente de un donante xenogénico.

Se apreciará que cuando se utilizan células madre alogénicas o xenogénicas, el individuo receptor y/o las células se traten preferiblemente para evitar los rechazos del injerto contra el anfitrión y del anfitrión contra el injerto. Los protocolos de inmunosupresión son bien conocidos en la técnica y algunos se describen en la Pat. de EE.UU. n° 6.447.765.

Se apreciará que las células madre descritas en la presente memoria se puedan modificar genéticamente para expresar cualquier gen terapéutico tal como un agente antivírico contra la hepatitis descrito además en la patente de EE.UU. n° 5.928.638.

Las células madre se trasplantan en el individuo receptor. Esto se efectúa generalmente utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, y por lo general implica inyectar o introducir las células madre tratadas en el individuo utilizando las herramientas clínicas bien conocidos por los expertos en la técnica (Pat. de EE.UU. n° 6.447.765, n° 6.383.481, n° 6.143.292 y n° 6.326.198).

Por ejemplo, la introducción de las células madre puede efectuarse local o generalmente por administración intravascular, incluidas la administración intravenosa o intrarterial, la administración intraperitoneal y similares. Las células pueden inyectarse en una bolsa de infusión Fenwall mol usando jeringuillas estériles u otros mecanismos estériles de transferencia. Las células a continuación pueden infundirse inmediatamente por administración IV durante un período, tal como 15 minutos, en una línea IV de flujo libre en el paciente. En algunas realizaciones, se pueden añadir también reactivos adicionales tales como tampones o sales. La composición para administración debe formularse, producirse y almacenarse según procedimientos normalizados que cumplen con la esterilidad y estabilidad apropiadas.

Las dosis de células madre se pueden determinar según el uso previsto. En general, en el caso de administración parenteral, es habitual administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del receptor. El número de células utilizadas dependerá del peso y estado del receptor, del número o la frecuencia de las administraciones y de otras variables conocidas por los expertos en la técnica.

Después de administrar las células al individuo, puede evaluarse el efecto del tratamiento, si se desea, como es sabido en la técnica. El tratamiento se puede repetir en la medida que se necesite. La descripción también describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una MMP, o de su porción activa para tratar un trastorno que requiere la sustitución de células o tejido.

Otros objetos, ventajas y características novedosas serán evidentes para cualquier experto en la técnica tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser restrictivos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se ha esbozado anteriormente y como se reivindica en el apartado de reivindicaciones a continuación encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Se hace referencia a continuación a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no restrictivo.

En general, la nomenclatura empleada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción e invención comprenden técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ingeniería genética. Dichas técnicas se explican extensamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" Sambrook *et al.*, (1989); "*Current Protocols in Molecular Biology*" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "*Current Protocols in Molecular Biology*", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "*A Practical Guide to Molecular Cloning*", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "*Recombinant DNA*", *Scientific American Books*, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "*Genome Analysis: A Laboratory Manual Series*", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las Pat. de EE.UU. n° 4.666.828; n° 4.683.202; n° 4.801.531; n° 5.192.659 y n° 5.272.057; "*Cell Biology: A Laboratory Handbook*", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1.994); "*Current Protocols in Immunology*" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1.994); Stites *et al.* (eds), "*Basic and Clinical Immunology*" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, C.T. (1994); Mishell y Shiigi (eds.), "*Selected Methods in Celular Immunology*", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoanálisis disponibles se describen extensamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las Pat. de EE.UU. n° 3.791.932; n° 3.839.153; n° 3.850.752; n° 3.850.578; n° 3.853.987; n° 3.867.517; n° 3.879.262; n° 3.901.654; n° 3.935.074; n° 3.984.533; n° 3.996.345; n° 4.034.074; n° 4.098.876; n° 4.879.219; n° 5,011,771 y n°

5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications", Academic Press, San Diego, California (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization—A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). En este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en la presente memoria son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

10 *Las interacciones SDF-1/CXCR4 intervienen como mediadores en la búsqueda de dianas de células progenitoras CD34⁺ humanas para el hígado en ratones NOD/SCID*

Para examinar la función de SDF-1 en la captación de células madre humanas (CMH) en el hígado, se trasplantaron ratones NOD/SCID irradiados con células enriquecidas con CD34⁺ humanas de la sangre periférica inmovilizada o de sangre del cordón umbilical, con y sin neutralizar los anticuerpos CXCR4 y se ensayó la búsqueda de dianas de los mismos.

Materiales y procedimientos experimentales

Células humanas – Células de la sangre del cordón (CB) y células adultas de la sangre periférica movilizada (MPB) se obtuvieron después de la autorización paterna y de acuerdo con los procedimientos aprobados por el comité de ética humana del Weizmann Institute. El enriquecimiento de las células CD34⁺ se efectuó utilizando la separación con perlas magnéticas como se ha descrito anteriormente [Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291]. La expresión de CXCR4 se determinó por citometría de flujo utilizando anti CXCR4 humano purificado (clon 12G5, R&D, Minneapolis, MN) y fragmento secundario F(ab')₂ de anti-IgG FITC de ratón en cabra (Jackson, West Grove, PA).

Ratones – Se criaron y enjaularon ratones NOD/SCID como se ha descrito anteriormente [Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291]. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité para el cuidado de los animales del Weizmann Institute. Se irradiaron por debajo de la dosis letal los ratones (es decir, 375 cGy) como se indicó, 24 horas antes del trasplante. Se utilizaron ratones no irradiados cuando se efectuó inyección hepática local de SDF-1.

Neutralización de CXCR4 – Se preincubaron células CD34⁺ humanas con mAb neutralizante anti CXCR4 humano (10 µg/0,5x10⁶ células por ratón, 12G5, R&D) y se inyectaron (0,5-0,6x10⁶ células CD34⁺ por ratón) en la vena de la cola sin lavado. Se sacrificaron los ratones después de 4 horas, 16 horas o 5-6 semanas del trasplante celular como se indicó. Las suspensiones de células aisladas se lavaron intensamente con PBS. Se determinó la búsqueda de dianas de células humanas como se ha descrito [Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291], obteniendo 1,5x10⁶ células/muestra.

Resultados

La neutralización de CXCR4 inhibió de manera significativa la búsqueda de dianas de células de CB o MPB enriquecidas con CD34⁺ para la médula ósea, bazo e hígado de receptores NOD/SCID 16 horas después del trasplante (figura 1a). Curiosamente, las células CD34⁺/CD38^{tbaja} primitivas e indiferenciadas, muy enriquecidas con CMH humana [Peled (1999) *Science* 283:845-848] y células con potencial similar a las hepáticas [Danet (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:10441-10445; Wang (2003) *Blood* (publicación electrónica antes de impresión)] también requirió interacciones SDF-1/CXCR4 para su migración al hígado murino (figura 1b).

Además, después de la inyección local de SDF-1 humano en el parénquima hepático de receptores NOD/SCID no irradiados e infusión intravenosa (IV) de células CD34⁺ humanas enriquecidas, era evidente que SDF-1 incrementó la búsqueda de dianas células progenitoras CD34⁺, neutralizando mientras anticuerpos CXCR4 casi completamente anulados de su búsqueda de dianas (figura 1c).

En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión local en el tejido de SDF-1 desempeña una función quimiotáctica en la migración de células madre y progenitoras humanas al hígado murino irradiado.

Ejemplo 2

La captación de células progenitoras hematopoyéticas CXCR4⁺ provoca estrés a un hígado lesionado

Se ha descubierto que la lesión hepática aumenta las cantidades de células progenitoras de médula ósea de roedor trasplantadas presentando un fenotipo hepático en el hígado de rata y murino [Petersen (1999) *Science* 284:1168-1170; Theise (2000) *Hepatology* 31:235-240; Lagasse (2000) *Nat. Med.* 6:1229-1234]. La lesión hepática provocada por tetracloruro de carbono (CCl₄) un mes después del trasplante, en combinación con la estimulación del factor de crecimiento hepático (HGF), aumentó significativamente los niveles de diferenciación pseudohepática y producción de albúmina humana en ratones NOD/SCID inmunodeficientes y ratones NOD/SCID/B2m null injertados con células progenitoras CD34⁺ y CD34⁺/CD38⁺ humanas, poniendo de manifiesto <1% células productoras de albúmina humana en el hígado murino 2 meses después del trasplante [Wang (2003) *Blood* (publicación electrónica antes de impresión)], apoyada en otro informe que utiliza un protocolo diferente [Kakinuma (2003) *Stem Cells* 21:217-227].

Procedimientos experimentales

Lesión hepática - Se inyectó por vía intraperitoneal (IP) a ratones con 10, 15 o 30 µl/ratón y se recogieron muestras de hígado en unas pocas horas o 1-2 días después de la inyección, como se indica. En los ensayos de búsqueda de dianas, se trasplantaron ratones por vía intravenosa (IV) con células CD34⁺ de MPB (0,6x10⁶ células/ratón) 4 horas antes de la extracción del hígado. La búsqueda de dianas se bloqueó por preincubación de las células trasplantadas con 10 µg de anti CXCR4/ratón o mediante inyección IP de 10 µg/ratón de un inhibidor III de MMP2/9 específico (CalBiochem, nº 444251 del catálogo). Se determinaron cuantitativamente las células progenitoras humanas en la circulación sanguínea de ratones injertados trasplantados un mes antes con CMN de CB humana (20x10⁶ células/ratón) sembrando 2x10⁵ células monocleares/ml en el ensayo de unidad formadora de colonias descrito [Kollet (2001) *Blood* 97:3283-3291]. La expresión de CXCR4 se determinó por citometría de flujo.

Resultados

Como se muestra en la figura 2a, una sola inyección de CCl₄ provocó rápidamente búsqueda de dianas de célula CD34⁺ humanas enriquecidas en el hígado de ratones tratados de una manera dependiente de CXCR4. Curiosamente, la lesión del hígado mediada por CCl₄ también provocó la captación de células progenitoras humanas formadoras de colonias desde la médula ósea a la circulación de ratones NOD/SCID injertados (figura 2b). Inesperadamente, se observó un aumento del nivel de expresión de CXCR4 en células CMN humanas en la circulación de los ratones tratados con CCl₄ (figura 2c). Además, el tratamiento con CCl₄ produjo mayor actividad de la enzima proteolítica MMP-2 y aparición de la expresión de MMP-9 en el hígado de ratones NOD/SCID tratados (figura 2d). Estos resultados muestran una función para la metaloproteasas en la búsqueda de dianas de células madre CD34⁺ humanas para el hígado lesionado.

Para sustanciar más la función de MMP-2 y MMP-9 en la captación de células progenitoras hematopoyéticas para el hígado lesionado, se efectuaron ensayos de migración en presencia de MMP-2/9 solubles.

Se descubrió que los sobrenadantes de la estirpe celular humana HT1080 , que segregan MMP-2 y MMP-9, aumentan la expresión de CXCR4 en superficie en células CD34⁺ humanas enriquecidas (figura 2e). Además, los sobrenadantes enriquecidos con MMP aumentaron significativamente la migración mediada por SDF-1 de células progenitoras humanas *in vitro* una migración que además se inhibió en presencia de un inhibidor de MMP-2/9 (figura 2f), demostrando que estas enzimas proteolíticas afectan directamente la movilidad de las células progenitoras CD34⁺ humanas enriquecidas. Similares resultados se observaron utilizando MMP-2 purificada o MMP-9 purificada en lugar de HT1080 sup (figura 5). Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, este inhibidor también redujo la migración de células progenitoras CD34⁺ humanas al hígado lesionado *in vivo* (figura 2a), lo que demuestra una función principal para estas enzimas proteolíticas en la captación mediada por SDF-1 de células progenitoras hematopoyéticas para las zonas de inflamación en el hígado lesionado.

Ejemplo 3

Intervención de MMP-9/2 en la migración y repoblación de células precursoras a la médula ósea y el bazo en ausencia de inflamación.

El presente trabajo se destinó a descubrir si MMP-2/9 interviene también en la búsqueda de dianas de células precursoras para el bazo y la médula ósea y en la repoblación de dichos órganos también en ausencia de inflamación.

Inicialmente, las células CD34⁺ de la sangre del cordón umbilical humano se trataron durante 2 horas con un inhibidor de MMP-9/2 y se inyectaron en ratones NOD/SCID irradiados por debajo de la dosis letal.

Las células CD34⁺ se pretrataron durante 2 horas con un inhibidor de MMP-9/2 y se inyectaron en ratones NOD/SCID irradiados por debajo de la dosis letal (1-2x10⁵ células/ratón). Los ratones se sacrificaron 5 semanas después y se marcó la médula ósea murina con el marcador CD45 panleucocitario humano y se analizaron por FACS. 5 semanas después se sacrificaron los ratones y se midió en número de células humanas se midió en la médula ósea murina. La tabla 1 demuestra que el injerto a la médula ósea parece inhibirse en las células tratadas con inhibidor de MMP-2/9 cuando se compara con células sin tratar de referencia.

Tabla 1 inhibición de MMP-9/2 afecta a la repoblación de CD34+ de la CB en la médula ósea de ratones NOD/SCID.

Experimento	Referencia (% de células inyectadas totales)	Inhibidor (% de células inyectadas totales)
Exp. 1 (2 ratones por grupo)	74,76, 30,2	21, 8
Exp. 2 (2 ratones por grupo)	33, 32	18, 13

Se exploró más si MMP-9/2 están también involucrados en búsqueda de dianas de células CD34⁺ para el bazo y la médula ósea. Por lo tanto, las células CD34⁺ de la sangre periférica movilizadas (MPB) se pretrataron durante 2 horas con inhibidor de MMP-2/9 y se inyectaron en ratones NOD/SCID irradiados por debajo de la dosis letal (0,5x10⁵ células/ratón). Los ratones se sacrificaron 16 semanas después y se analizó la presencia de células humanas/1,5x10⁶ células obtenidas.

Los resultados en la figura 3 demuestran que el inhibidor de MMP-9/2 inhibe significativamente la migración de las células CD34⁺ de la MPB al bazo pero no a la médula ósea. Por consiguiente, este resultado sugiere que MMP-9/2 interviene en la búsqueda de dianas para el bazo.

5 Se demostró previamente que la incubación de sobrenadantes procedentes de la estirpe celular humana HT1080, que segregan MMP-2 y MMP-9, se descubrió que aumentan la expresión de CXCR4 en superficie en células CD34⁺ humanas enriquecidas (ejemplo 2). Por lo tanto, dicho aumento en la expresión de CXCR4 en superficie por MMP-2 y MMP-9 puede considerarse para la inducción observada de la búsqueda de dianas y la repoblación.

10 Aparentemente, los resultados de que se requiere MMP-9/2 para la repoblación de la médula ósea (Tabla 1) pero no para la migración a este mismo órgano (Fig. 3) puede ser debido a la migración de las células trasplantadas a la médula ósea antes de la repoblación indirectamente vía el bazo. En este contexto, puede necesitarse MMP-9/2 para la búsqueda de dianas al bazo en primer lugar y la inhibición de las proteasas dará lugar a la inhibición de la búsqueda de dianas al bazo e indirectamente a la inhibición de la repoblación de la médula ósea.

Ejemplo 4

Intervención de MMP-9/2 en la migración de células PreBLL

15 Como se mencionó anteriormente (ejemplos 2 y 3), la acción de MMP-9/2 está involucrada en el mecanismo que gobierna la migración y repoblación de células precursoras hematopoyéticas normales. Acto seguido, se exploró si dicha acción de las proteasas está involucrada también en la migración de las células leucémicas. Con este objeto, se controló el efecto del inhibidor de MMP-9/2 para la migración *in vitro* de la célula G2 pre BLL, que es un linfoma que surge a partir de los precursores de linfocitos B, hasta SDF-1 (Fig. 4).

20 Para explorar la implicación de MMP-9/2 en la migración de G2, se preincubaron células G2 (1x10⁵ células G2) con el inhibidor de MMP-9/2 o con el sobrenadante de la estirpe celular HT1080, que segregan MMP-2 y MMP-9, y se ensayaron en un ensayo de migración Transwell a SDF-1 (10 ng/ml). Los resultados representados en la figura 4 demuestran que las células G2 producen MMP-9/2 que se necesita para la migración a SDF-1. Los resultados demuestran que la adición de MMP-9/2 ectópica no aumentó más la migración de células G2 a SDF-1. Además la
25 inhibición de la migración por MMP-9/2 no fue bloqueada por la adición ectópica de MMP9/2.

Los resultados obtenidos demuestran que MMP-9/2 está involucrada en la migración mediada por SDF-1, no solamente de las células progenitoras normales, sino además en las células leucémicas que se desarrollan a partir de precursores de linfocitos B.

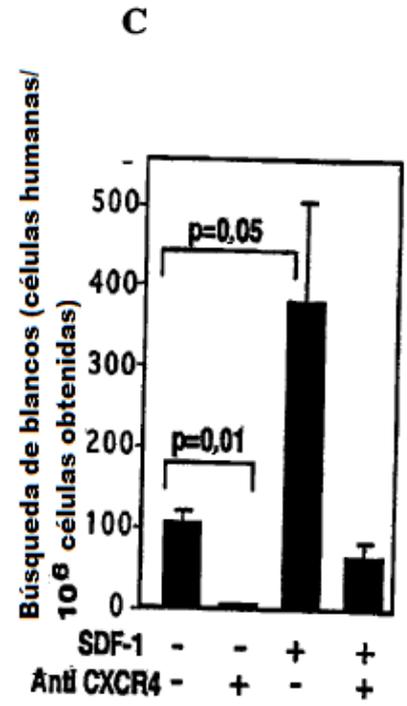
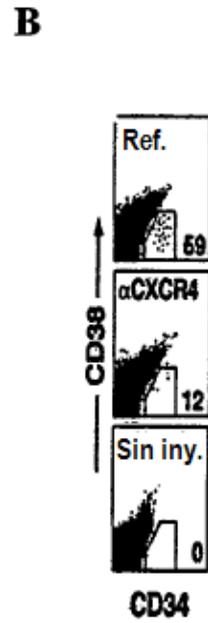
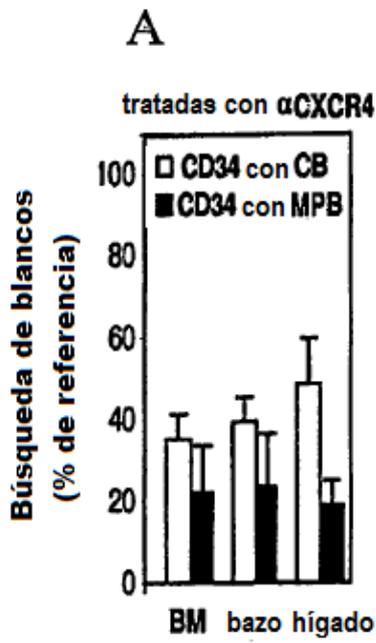
30 Los resultados también demuestran que el inhibidor de MMP9/2 inhibe eficientemente la migración de células G2 leucémicas incluso en presencia de MMP9/2 añadido de modo exógeno.

Aunque la invención se ha descrito juntamente con las realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán obvias para los expertos en la técnica. Además, la mención o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no deberá considerarse como un reconocimiento de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para generar células madre adecuadas para trasplantes, que comprende:
 - (a) exponer las células madre recogidas a una metaloproteasa de la matriz o a su porción activa, en donde dichas células madre recogidas son células madre embrionarias no humanas y además en donde dicha metaloproteasa de la matriz se selecciona del grupo consistente en MMP-2 y MMP-9; y
 - (b) aislar las células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de un umbral predeterminado, para generar de este modo células madre adecuadas para trasplantes.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde las células madre de (a) se han recogido previamente mediante:
 - (i) un procedimiento de movilización de células madre; y/o
 - (ii) un procedimiento quirúrgico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dichas células madre son células madre hematopoyéticas.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en donde dichas células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas CD34⁺.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en donde dichas células madre hematopoyéticas son células madre hematopoyéticas CD34⁺/CD38^{-/baja}.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dichas células madre son células madre mesenquimáticas.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicha exposición de dichas células madre a dicha metaloproteasa de la matriz o a dicha parte activa de la misma, se efectúa:
 - (i) expresando un polinucleótido que codifica dicha metaloproteasa de la matriz o dicha porción activa de la misma en dichas células madre; y/o
 - (ii) poniendo en contacto dichas células madre con dicha metaloproteasa de la matriz o dicha porción activa de la misma.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde dicho aislamiento de las células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de dicho umbral predeterminado se efectúa por FACS.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la determinación de las capacidades de búsqueda de dianas de dichas células madre que tienen contenidos de CXCR4 por encima de dicho umbral predeterminado después de la etapa (b).

Figs. 1A-C



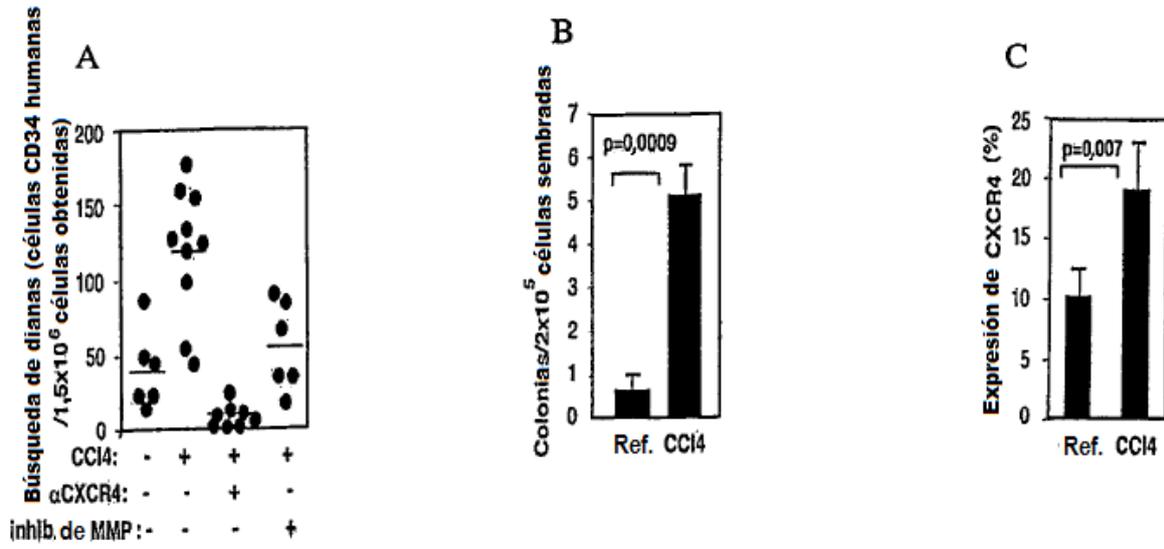


Fig. 2A-D

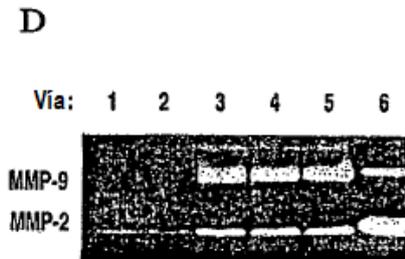
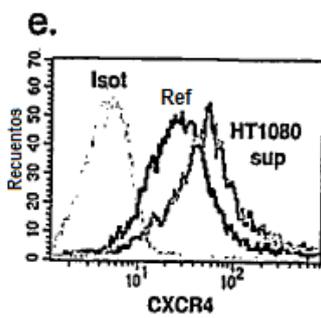
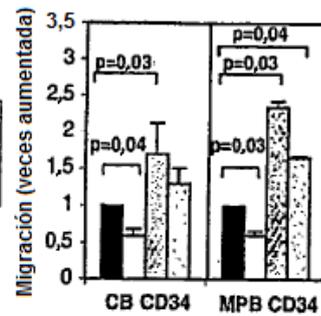


Fig 2E-F



E



F

Figura 3

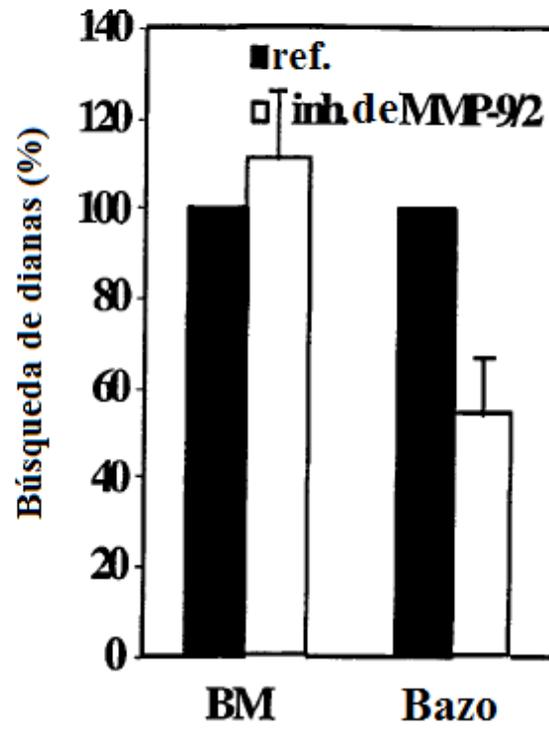


Figura 4

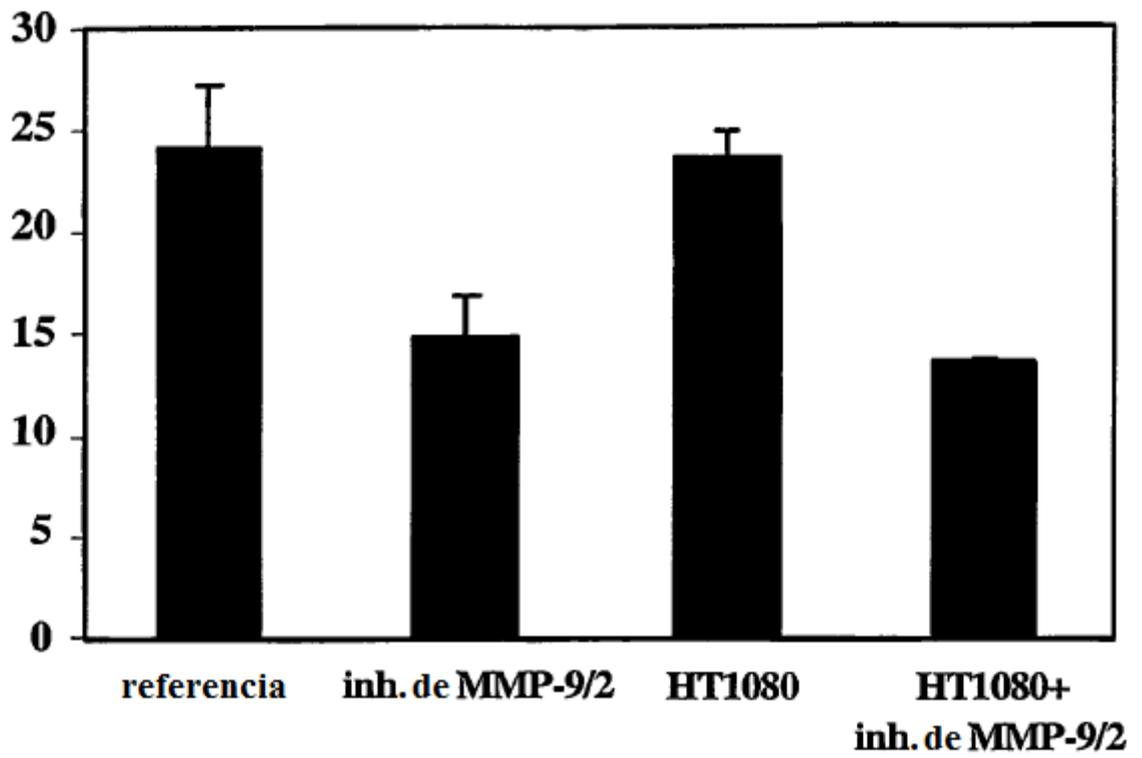


Figura 5

