

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 582**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 35/54 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2010 E 10746666 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2400971**

54 Título: **Células madre de tipo blastómero para uso en el tratamiento de trastorno proliferativo celular e inmunodeficiencia**

30 Prioridad:

24.02.2009 US 391581

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

13.09.2016

73 Titular/es:

**STEMBIOS TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2530 Corporate Place, Suite A112
Monterey Park CA 91754, US**

72 Inventor/es:

**WANG, JAMES;
CHANG, LUFEN y
YEN, YUN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 582 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 de tipo blastómero para uso en el tratamiento de trastorno proliferativo celular e inmunodeficiencia

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de EE.UU. nº 12/391.581, presentada el 24 de febrero de 2009.

5 Antecedentes

El sistema inmune defiende a un organismo frente a infecciones de patógenos, transformaciones celulares y daños físicos o químicos. Cuando el sistema inmune es menos activo de lo normal se produce una inmunodeficiencia o inmunosupresión, que da como resultado infecciones o cáncer que amenazan la vida. La inmunosupresión puede ser el resultado de una enfermedad, o puede ser producida por productos farmacéuticos o una infección. Se ha observado que la inmunosupresión sistémica está asociada a una mielopoiesis anormal secundaria al crecimiento tumoral, la terapia mielosupresora y la administración de factor de crecimiento y posterior expansión/movilización de células inmunosupresoras derivadas de médula ósea. Estas células supresoras de origen mielóide (MDSCs) reducen el número de células T activadas e inhiben la función de células T a través de múltiples mecanismos, conduciendo de este modo a la inmunosupresión y la tolerancia. Por tanto, las MDSCs tienen una función protumoral. Adicionalmente, las MDSCs presentan actividades pleiotrópicas que incluyen la inducción de mutaciones en el microentorno tumoral, la promoción de angiogénesis y metástasis, y el apoyo directo al crecimiento neoplásico y la reacción inflamatoria. De hecho, el número de células aumenta en numerosas afecciones patológicas, que incluyen infecciones, enfermedades inflamatorias, enfermedad de injerto-contrahospedante, estrés traumático y enfermedades neoplásicas (Dolcetti et al., Cancer Lett. 2008, 28 de agosto, 267(2): 216-25; Talmadge, Clin Cancer Res. 2007, 15 de sept.; 13(18 Pt 1): 5243-8).

Sumario

La invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de que una población de células madre preparadas a partir de un animal adulto o joven, células madre de tipo blastómero (BLSCs), pueden reducir significativamente el número de MDSCs en un animal.

25 Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta células madre de tipo blastómero para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo en un sujeto.

Un trastorno proliferativo celular se refiere a un trastorno que se caracteriza por un crecimiento celular autónomo no controlado (que incluye crecimiento maligno y no maligno), y por una inmunosupresión mediada por MDSCs. Los ejemplos de dicho trastorno incluyen cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, melanoma, cáncer de pulmón, glioblastoma, tumor cerebral, malignidades hematopoiéticas, retinoblastoma, carcinoma de célula renal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cervical, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de ovario y carcinoma de células escamosas.

Un sujeto se refiere a un humano o a un animal no humano. Los ejemplos de animal no humano incluyen todos los vertebrados que tienen sistemas inmunes, p.ej., mamíferos, tales como primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (p.ej., ratones o ratas), cobayas, gatos, animales de granja (p.ej., caballos, vacas, ovejas o cerdos), y no mamíferos, tales como pájaros, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un humano. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o un animal adecuado como modelo de enfermedad.

Un sujeto que va a ser tratado de un trastorno proliferativo celular puede ser identificado mediante técnicas de diagnóstico estándares para dicho trastorno. "Tratado" se refiere a la administración de una composición (p.ej., una composición celular) a un sujeto, que padece o que está en riesgo de desarrollar un trastorno celular proliferativo, con el propósito de curar, aliviar, paliar, remediar, retrasar el inicio, prevenir o reducir el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado de enfermedad secundario al trastorno, o la predisposición hacia el daño/trastorno, Una "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de la composición que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede llevarse a cabo solo o en combinación con otros fármacos o terapias.

La descripción también presenta un método para reducir el nivel de MDSCs en un sujeto mediante la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de BLSCs.

50 En otro aspecto de la presente descripción, se presenta un método para superar una inmunosupresión en un sujeto. El método incluye la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de BLSCs. La inmunosupresión puede ser una inmunosupresión mediada por MDSCs. En otro aspecto adicional, la descripción presenta un método para modular la respuesta inmune en un sujeto. El método incluye la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de BLSCs.

En cada uno de los métodos descritos anteriormente, el sujeto puede presentar un trastorno celular proliferativo, una infección o una enfermedad de inmunodeficiencia. En cada uno de los métodos, las BLSCs son administradas a un sujeto en una concentración de 1×10^8 a 1×10^{11} /tiempo, preferiblemente a una concentración de 5×10^8 a 5×10^{10} /tiempo, o más preferiblemente una concentración de 1×10^9 a 1×10^{10} /tiempo. Para minimizar o evitar rechazos de hospedante, las células preferiblemente son autólogas para el sujeto. Las BLSCs pueden administrarse una vez cada dos semanas de 2 a 5 veces, o más preferiblemente, una vez cada dos semanas 3 veces. Opcionalmente, el sujeto puede ser examinado para determinar el nivel de MDSCs antes de la administración de BLSCs. Si el nivel es estadísticamente superior en una muestra del sujeto que en una muestra de un sujeto normal, entonces el sujeto es un candidato para tratamiento con los métodos descritos anteriormente. El sujeto también puede ser examinado para determinar el nivel de MDSCs después de la administración de BLSCs para confirmar el efecto de la administración de BLSCs. Por ejemplo, si el nivel de MDSCs tras la administración es estadísticamente inferior al de antes de la administración, entonces la administración de BLSCs es efectiva.

Los detalles de uno o más aspectos se presentan en la descripción mostrada a continuación. A partir de la descripción y de las reivindicaciones, serán evidentes otras características, objetivos y ventajas.

15 Descripción detallada

La invención se refiere al uso de BLSCs para modular la respuesta inmune y para tratar trastornos relacionados, tales como trastornos celulares proliferativos y otros trastornos de inmunodeficiencia.

Las BLSCs son una población de células madre no embrionarias en animales adultos o jóvenes. Dichas células son totipotentes y presentan una capacidad de diferenciación similar a la de las células madre embrionarias. Véase el documento WO 2007/100845. Al contener un complemento cromosómico normal, las BLSCs no están comprometidas por linaje y pueden formar todas las células somáticas (no reproductoras) del cuerpo. Pueden diferenciarse en varios linajes que incluyen los derivados del ectodermo (p.ej., neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y queratinocitos), el mesodermo (p.ej., músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco, tejidos grasos, cartílago, hueso, dermis, células sanguíneas, tejidos ligamentosos, tendones y células endoteliales) y el endodermo (p.ej., epitelio GI, hepatocitos, células ovals, células biliares, células pancreáticas (tales como las células α , las células β y las células γ). Adicionalmente, pueden diferenciarse en espermatogonia y formar los gametos reproductores esperma y/u óvulo, y células y tejidos de las porciones embrionaria y fetal de la placenta. Las células responden a agentes de inducción de linaje, agentes de proliferación y agentes inhibidores de la diferenciación. Por otro lado, no responden a agentes de progresión. De forma similar a las células madre de tipo epiblasto, las BLSCs no son inhibidas por contacto en la confluencia, sino que más bien forman múltiples capas confluentes de células siempre que se mantengan con un suministro de nutrientes adecuado. Las BLSCs no expresan marcadores de expresión fenotípicos para células progenitoras o diferenciadas, células madre de linaje de capa germinal, o células madre de tipo epiblasto. En su lugar, expresan marcadores de linaje embrionarios generales y específicos, tales como los marcadores de células madre embrionarias CD66e, HCEA, CEA y CEA-CAM-1. Las BLSCs normalmente son quiescentes en tejidos adultos. Sin embargo, cuando los tejidos son lesionados, las BLSCs se activan y se diferencian para reparar los tejidos dañados.

Para preparar BLSCs, se pueden usar los métodos descritos en el Ejemplo 1, presentado a continuación, o en el documento WO 2007/100845. De forma general, se pueden aislar las células a partir de muchos tejidos de animales adultos o jóvenes, incluyendo sangre, médula ósea y músculo esquelético. Para confirmar que las células aisladas son realmente BLSCs, se pueden examinar una serie de características, que incluyen (1) los tamaños de las células en suspensión, que son inferiores a $1 \mu\text{m}$, (2) los marcadores de superficie celular, p.ej., CD66e⁺, y (3) tinción positiva con azul de tripano. Se pueden usar anticuerpos contra marcadores de superficie celular, tales como CD66e, para identificar las BLSCs. Para ese fin, se pueden conjugar anticuerpos adecuados con etiquetas adecuadas, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofococianina (APC) o puntos cuánticos ("quantum dots"). Las BLSCs se pueden enriquecer adicionalmente mediante citometría de flujo usando dichos anticuerpos.

A continuación las células enriquecidas son evaluadas mediante técnicas estándar. Para confirmar el potencial de diferenciación de las células, se puede inducir que formen, por ejemplo, células neurogliales, osteocitos y adipocitos mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden someterse a pasaje y cultivarse hasta confluencia, ser cambiadas a un medio osteogénico o a un medio adipogénico, e incubadas durante un tiempo adecuado (p.ej., 3 semanas). Véase, p.ej., las Patentes de EE.UU. n°: 7470537, 7374937 y 6777231. El potencial de diferenciación para la osteogénesis se determina mediante la mineralización de acumulación de calcio, que puede visualizarse mediante tinción de von Kossa. Para examinar la diferenciación adipogénica, se pueden teñir gotitas de lípidos intracelulares con Oil Red O y observarse en un microscopio. Para la diferenciación neural, las células pueden ser incubadas en un medio neurogénico durante un tiempo adecuado (p.ej., 7 días) y después ser sometidas a agotamiento de suero e incubación de β -mercaptoetanol. Véase, p.ej., la Patente de EE.UU. n° 7470537 y las Solicitudes de EE.UU. 20080274087, 20080213228 y 20080152629. Tras la diferenciación, las células exhiben la morfología de un cuerpo celular refractivo con estructuras de tipo neurita extendidas dispuestas en un entramado. Se puede llevar a cabo adicionalmente una tinción inmunocitoquímica de marcadores específicos de linaje para confirmar la diferenciación neural. Los ejemplos de los marcadores incluyen la clase específica de neurona III β -tubulina (Tuj-1), neurofilamento y GFAP.

Alternativamente, para confirmar la identidad de las células aisladas, se puede aprovechar la falta de inhibición por contacto de las BLSCs. Para este fin, se pueden cultivar las células aisladas hasta confluencia. En dichas condiciones, las BLSCs pueden formar una agregación celular de tipo esfera, múltiples capas confluentes o estructuras de malla-red. Por el contrario, las células CD42⁺ o las plaquetas no pueden formar la estructura mencionada, tal como una agregación celular.

Las BLSCs así confirmadas pueden ser propagadas adicionalmente en un medio de cultivo no diferenciador para más de 10, 20, 50, 100 ó 300 doblamientos de población sin indicios de diferenciación espontánea, senescencia, cambios morfológicos, incremento de tasa de crecimiento, o cambios en la capacidad para diferenciarse en neuronas. Las células se pueden almacenar mediante métodos estándar antes de su uso. Tal como se describe en la presente memoria, las BLSCs pueden usarse para reducir el nivel de MDSCs en un sujeto.

El término "MDSCs" se refiere a una población de células heterogénea, de derivación mieloide, que abarca estadios contiguos de diferenciación mielo-monocítica. Esta heterogeneidad se refleja en un patrón de expresión complejo de los marcadores superficiales. El principal fenotipo de MDSCs de ratón está definido por los siguientes marcadores: CD11b⁺, Gr-1⁺, F4/80^{int}, CD11c^{low}, MHCII^{low}, Ly-6C⁺, ER-MP58⁺, CD31⁺ e IL-4Rα⁺. Las MDSCs humanas tiene un fenotipo inmaduro, que incluye linaje negativo (Lin⁻), CD14⁻, antígeno de leucocito humano DR-negativo (HLA-DR⁻), CD15⁺, CD34⁺, CD11b⁺, CD33⁺ y CD13⁺ (Dolcetti et al., Cancer Lett. 2008, 28 de agosto; 267(2): 216-25; Talmadge, Clin Cancer Res. 2007, 15 de sept.; 13(18 Pt 1): 5243-8).

Los animales portadores de tumores y los pacientes de cáncer exhiben defectos en la mielopoiesis, que dan como resultado la acumulación de MDSCs. Las MDSCs, reclutadas durante el crecimiento neoplásico, están entre los principales subconjuntos inflamatorios que apoyan la progresión tumoral, actuando tanto localmente como a un nivel sistémico. Estas células pueden sostener la progresión tumoral proporcionando un microentorno favorable en el que las células transformadas pueden proliferar, adquirir nuevas mutaciones, expandirse y evadir la inmuno-vigilancia del hospedante; además, las MDSCs pueden participar en la neoangiogénesis.

Por lo tanto, la represión de MDSCs mediada por BLSCs puede usarse para tratar cáncer y otros trastornos celulares proliferativos. En particular, se puede usar para tratar trastornos que se caracterizan por un nivel de MSDC anormalmente elevado. El término "cáncer" se refiere a una clase de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular incontrolado, invasión y a veces metástasis. Las células cancerosas tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal que se caracteriza por un crecimiento celular de rápida proliferación. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico, o del estadio de invasión. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinomas y sarcomas tales como leucemia, sarcoma, osteosarcoma, linfomas, melanoma, glioma, feocromocitoma, hepatoma, cáncer de ovario, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer adrenal cortical, cáncer de pulmón, cáncer de bronquios, cáncer endometrial, cáncer nasofaríngeo, cáncer cervical o de hígado, y cáncer de sitio principal desconocido.

Las MDSCs han sido descritas en patologías diferentes de tumores, que implican reacciones inmunes inflamatorias tales como la estimulación de súper-antígenos, e infecciones tales como tripanosomiasis, salmonelosis y candidiasis. Por ejemplo, se ha observado un mayor número de MDSCs asociadas a enfermedades inflamatorias, infecciosas y de injerto-contra-hospedante, donde reprimen respuestas de células T exuberantes o nuevas (Talmadge, Clin Cancer Res. 2007, 15 de sept.; 13(18 Pt 1): 5243-8). Se ha demostrado que las MDSCs inducen un estado profundo de supresión inmune a través de la reducción del número de células T activadas e inhiben su función a través de múltiples mecanismos, que incluyen el agotamiento de L-arginina por arginasa-1 (ARG1), la producción de óxido nítrico, especies de oxígeno reactivas y especies de óxido de nitrógeno reactivas mediante óxido nítrico sintasa inducible. De este modo, la represión de MDSCs mediada por BLSCs también puede usarse en estrategias de desarrollo que permitan la eliminación de MDSCs no solo para oncología sino también para la enfermedad de injerto-contra-hospedante, la inflamación y enfermedades autoinmunes.

Dentro del alcance de la presente descripción se presenta un método de tratamiento de un trastorno de inmunodeficiencia mediado por MDSCs, para aliviar el síntoma del trastorno, o retrasar la aparición del trastorno en un sujeto. Un ejemplo del trastorno es un trastorno celular proliferativo. Se puede identificar a un sujeto que va a ser tratado mediante técnicas estándar de diagnóstico de afecciones o trastornos de interés. En particular, se puede identificar el sujeto si el nivel de MDSCs del sujeto es significativamente superior al nivel previo de MDSC del mismo sujeto, o si es superior al de un sujeto normal. El método de tratamiento implica la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad efectiva de las BLSCs descritas anteriormente.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona BLSCs en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mezclando una cantidad terapéuticamente efectiva de BLSCs y, opcionalmente otra sustancia activa, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede adoptar diferentes formas, dependiendo de la ruta de administración. Los ejemplos de otras sustancias activas incluyen compuestos que inhiben la actividad de inmunosupresión de las MDSCs, que interfieren con el reclutamiento de MDSCs, o que mejoran las funciones inmunes del cuerpo.

- Las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente pueden prepararse usando excipientes farmacéuticos y métodos de preparación convencionales. Todos los excipientes pueden ser mezclados con agentes desintegrantes, disolventes, agentes de granulación, humectantes y aglomerantes. Tal como se usa en la presente memoria, el término “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad que da como resultado un alivio medible de al menos un síntoma o parámetro de un trastorno específico. Una cantidad terapéuticamente efectiva de las BLSCs puede ser determinada mediante métodos conocidos en la técnica. Una cantidad efectiva para tratar un trastorno puede determinarse fácilmente mediante métodos empíricos conocidos por los especialistas en la técnica. La cantidad exacta que debe administrarse a un paciente variará dependiendo del estado y la gravedad del trastorno y de la condición física del paciente. Un alivio medible de cualquier síntoma o parámetro puede ser determinado por el especialista en la técnica, o puede ser informado por el paciente al médico responsable. Cabe destacar que dentro del alcance de la invención entra cualquier atenuación o alivio clínica o estadísticamente significativo de cualquier síntoma o parámetro de los trastornos descritos anteriormente. Una atenuación o alivio clínicamente significativo significa que es perceptible por parte del paciente y/o el médico responsable.
- La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de dichas composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen normalmente reacciones indeseadas cuando se administran a un humano. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o del gobierno de un estado, o que está incluido en la Farmacopea de los EE.UU. o en otra farmacopea reconocida de forma general para uso en mamíferos, y más particularmente en humanos. Las sales, ésteres, amidas y pro-fármacos farmacéuticamente aceptables se refieren a las sales (p.ej., sales de carboxilato, sales de adición ácida), ésteres, amidas y profármacos que entran dentro del alcance de un juicio médico sensato, adecuados para uso en contacto con los tejidos de pacientes sin generar ninguna toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, indebidas, proporcionados con a una relación beneficio/riesgo razonable, y efectivos para su uso pretendido.
- Un agente portador aplicado a las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente incluye un diluyente, excipiente o vehículo con el cual se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Preferiblemente se emplean como vehículos agua o disoluciones acuosas, disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E. W. Martin, 18ª edición.
- Las BLSCs pueden administrarse a individuos mediante infusión o inyección (por ejemplo, intravenosa, intratecal, intramuscular, intraluminal, intratraqueal, intraperitoneal o subcutánea), oralmente, transdérmicamente, u otros métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo, las células pueden inyectarse directamente en el sitio o al interior de un tejido (p.ej., hígado o páncreas), donde exista un tumor o una inmunosupresión. La administración puede ser una vez cada dos semanas, una vez cada semana, o más a menudo, pero la frecuencia puede reducirse durante una fase de mantenimiento de la enfermedad o trastorno.
- Se pueden usar BLSCs tanto heterólogas como autólogas. En el primer caso, debería llevarse a cabo un análisis de correspondencia HLA para evitar o minimizar reacciones del hospedante. En el segundo caso, BLSCs autólogas son enriquecidas y purificadas a partir de un sujeto y se almacenan para un uso posterior. Las BLSCs de hospedante pueden cultivarse en presencia de células T del hospedante o de injerto *ex vivo* y ser re-introducidas al hospedante. Esto puede tener la ventaja de que el hospedante reconoce las BLSCs como propias y proporciona mejor una reducción de la actividad de células T.
- La dosis y la frecuencia de administración dependerán de los signos clínicos, que confirman el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno, o más preferiblemente más de uno, de los signos clínicos de la fase aguda conocidos por el especialista en la técnica. De forma más general, la dosis y la frecuencia dependerán en parte de la recesión de signos patológicos y de síntomas clínicos y subclínicos de un estado de enfermedad o trastorno contemplado para el tratamiento con la composición descrita anteriormente. Las dosificaciones y el régimen de administración pueden ajustarse dependiendo de la edad, sexo, condición física del administrado, así como del beneficio del conjugado y los efectos secundarios en el paciente o sujeto mamífero que va a ser tratado, y el juicio del médico responsable, tal como pueden apreciar los especialistas en la técnica.
- Se ha publicado que el reclutamiento de MDSCs a un sitio tumoral podría ser activado por una variedad de factores solubles derivados del tumor, que afectan profundamente a la mielopoiesis y la obilización de células mieloides, así como a su activación (Dolcetti et al., *Cancer Lett.*, 28 de agosto de 2008; 267(2): 216-25). Las células madre totipotentes o pluripotentes (tales como las BLSCs) pueden intervenir en la activación o la migración de MDSCs, o promover la diferenciación de MDSCs, superando con ello la inmunosupresión mediada por MDSCs.
- Por consiguiente, también pueden usarse células madre totipotentes o pluripotentes diferentes de las BLSCs para tratar los trastornos de inmunodeficiencia mencionados anteriormente, que se caracterizan por la acumulación de MDSCs. Los ejemplos de dichas células madre totipotentes o pluripotentes incluyen células derivadas de las BLSCs descritas anteriormente, tales como las células SBR y las células SBT que son derivadas por incubación de las BLSCs con ácido retinoide y TFG- β , respectivamente. Los ejemplos de células madre totipotentes o pluripotentes

también pueden incluir células madre embrionarias (células ES), BLSCs adherentes (aBLSCs), BLSCs transicionales (trBLSCs) y células madre de tipo epiblasto (ELSCs), tal como se describe en el documento WO 2007/100845. Por tanto, dentro del alcance de esta descripción se incluyen los métodos de uso de dichas células madre totipotentes o pluripotentes para tratar los trastornos de inmunodeficiencia mencionados anteriormente.

- 5 Las estrategias de tratamiento basadas en células madre procedentes de animales adultos o jóvenes, tal como las BLSCs, disfrutaron de una serie de ventajas sobre las basadas en células ES. En primer lugar, dados los buenos marcadores, las BLSCs son fáciles de obtener a partir de tejidos procedentes de animales adultos o jóvenes. En segundo lugar, se pueden obtener un gran número de BLSCs a partir de sangre (más de 2×10^8 /mL). En tercer lugar, las BLSCs son fáciles de mantener y expandir y de ser inducidas para diferenciar en células específicas de linaje. En cuarto lugar, las BLSCs, una vez introducidas en un sujeto, no se desarrollan en un teratoma y por tanto son más seguras que las células ES. Por último, y no por ello menos importante, la obtención y el uso de BLSCs no implica manipular o matar embriones, ni los problemas éticos asociados.

Ejemplo 1. Aislamiento de BLSCs

- 15 Los métodos para la activación, purificación y expansión de BLSCs han sido descritos en el documento WO/2007/100845. En este ejemplo, las BLSCs fueron purificadas a partir de la sangre de sujetos humanos usando dos métodos, un método de fracción de plasma y un método de hemolisis.

Resumidamente, para el método de la fracción de plasma, se preparó una muestra de sangre entera (1 mL) procedente de un primer sujeto humano usando un método estándar. A continuación la muestra fue almacenada a 4°C durante aproximadamente 7-9 días y las BLSCs fueron enriquecidas desde la muestra del modo descrito en WO/2007/100845.

El método de hemolisis fue usado para obtener una fracción de hemolisis en el modo descrito en WO/2007/100845. Resumidamente, se obtuvo aproximadamente 1 mL de sangre entera procedente de un segundo sujeto humano y se almacenó a aproximadamente 4°C en presencia de EDTA u otros agentes complejantes de Ca^{2+} durante aproximadamente 9 días en un medio de transporte (p.ej., medio Moraga con número de catálogo MBC-HUB-MED-100-A004, Moraga Biotechnology Corporation, Los Angeles, CA). Después de 9 días, los glóbulos rojos de la muestra de sangre entera fueron lisados usando aproximadamente 50 mL de una disolución de hemolisis estéril (p.ej., MBC-ASB-REBG-900A-001). Tras centrifugación (p.ej., a 1800 xg, 10 minutos) para eliminar los residuos y las células lisadas, la partícula de células se re-suspendió en 2 mL de una disolución de reconstitución estéril de Moraga (MBC-ASB-REBG-900A-002).

- 30 Las dos poblaciones celulares descritas anteriormente fueron analizadas mediante citometría de flujo usando anticuerpo anti-CD10 marcado con FITC, anticuerpo anti-CD66e marcado con PE, anticuerpo anti-CD90 marcado con APC. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Marcadores	Porcentaje de Células Aisladas (%)	
	Método de hemolisis	Método de fracción de plasma
CD10 ⁻ CD66e ⁺	5,81	9,14
CD10 ⁺ CD66e ⁺	66,67	2,99
CD10 ⁺ CD66e ⁻	3,11	1,10
CD10 ⁻ CD90 ⁺	0,62	9,80
CD10 ⁺ CD90 ⁺	13,65	2,20
CD10 ⁺ CD90 ⁻	55,13	1,46

- 35 Tal como se muestra en la Tabla 1, cuando se usa el método de hemolisis, aproximadamente el 5,81%, el 66,67% y el 3,11% de las células aisladas fueron BLSCs (CD10⁻CD66e⁺), BLSCs transicionales (trBLSCs, CD10⁺CD66e⁺) y células madre de tipo epiblasto (ELSCs, CD10⁺CD66e⁻), respectivamente. Aproximadamente el 0,62%, el 13,65% y el 55,13% de las células fueron CD10⁻CD90⁺, CD10⁺CD90⁺ (células madre de tipo epiblasto transicionales, trELSCs), y CD10⁺CD90⁻, respectivamente. Las BLSCs fueron enriquecidas adicionalmente en base a sus marcadores (CD10⁻CD66e⁺). Este método dio lugar a aproximadamente 200×10^6 BLSCs/mL de sangre.

Cuando se usan los métodos de fracción de plasma, aproximadamente el 9,14%, el 2,99% y el 1,10% de las células aisladas fueron BLSCs, BLSCs transicionales y ELSCs, respectivamente. Aproximadamente el 9,8%, el 2,2% y el 1,46% de las células fueron CD10⁻CD90⁺, CD10⁺CD90⁺ (trELSCs), CD10⁺CD90⁻, respectivamente. Este método dio lugar a aproximadamente 239 x 10⁶ BLSCs/mL de plasma.

- 5 Las BLSCs dieron positivo en la tinción con azul de tripano y de forma general tenían un tamaño inferior a 1 µm, lo cual difiere de las plaquetas (CD42⁺ y tinción negativa con azul de tripano). Especialmente, al contrario que las plaquetas, que carecen de núcleo, no proliferan ni se diferencian, las BLSCs pudieron proliferar en un medio y mantenerse y expandirse en un estatus no diferenciado del modo descrito en WO/2007/100845. Las BLSCs carecieron de inhibición por contacto y pudieron formar agregaciones celulares de tipo esfera, múltiples capas
 10 confluentes y estructuras de malla-red. La agregación de las células condujo a un cambio en la morfología celular. Por el contrario, las células CD42⁺ o plaquetas no formaron las estructuras mencionadas, tales como una agregación celular.

- A continuación las BLSCs fueron evaluadas para determinar su capacidad de diferenciación del modo descrito en el documento WO/2007/100845 o mediante otros métodos conocidos en la técnica. Se observó que, tras inducción
 15 usando condiciones conocidas en la técnica, las células se diferenciaron en varios linajes que incluyen los derivados de ectodermo, mesodermo, endodermo y espermatogonia. Pudieron ser mantenidas y expandidas en el estatus no diferenciado durante más de 300 pasajes sin perder los potenciales de diferenciación. No formaron teratoma.

Ejemplo 2. Actividad in vivo de BLSCs

- Las BLSCs fueron purificadas a partir de un sujeto humano según los métodos descritos anteriormente, y fueron
 20 administradas autológamente al mismo sujeto en una concentración de 1x10⁹ células. En los días 0, 14 y 28 tras la administración, se extrajeron muestras de sangre obtenidas de la persona. A continuación se llevó a cabo un análisis de citometría para examinar los niveles en sangre de MDSCs y Treg. Se observó que, a los días 0, 14 y 28, los niveles de MDSCs (CD14⁻CD33⁺CD11b⁺Lin⁻) fueron 9,24%, 2,19% y 0,35% del total de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), respectivamente. Estos resultados indican que las BLSCs disminuyen
 25 significativamente el nivel de MDSCs en un sujeto y por tanto pueden usarse para tratar pacientes que tengan un trastorno de inmunodeficiencia relacionado con MDSCs.

REIVINDICACIONES

1. Células madre de tipo blastómero, para uso en el tratamiento de un trastorno celular proliferativo en un sujeto.
2. Células madre de tipo blastómero, para uso en el tratamiento de inmunodeficiencia en un sujeto.
- 5 3. Las células madre de tipo blastómero, para uso según la reivindicación 2, en donde la inmunodeficiencia es una inmunodeficiencia mediada por células supresoras derivadas de la línea mieloide.
4. Células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre de tipo blastómero deben administrarse a una concentración de 1×10^8 a 1×10^{11} /tiempo.
5. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según la reivindicación 4, en donde las células madre de tipo blastómero deben administrarse a una concentración de 5×10^8 a 5×10^{10} /tiempo.
- 10 6. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según la reivindicación 5, en donde las células madre de tipo blastómero deben administrarse a una concentración de 1×10^9 a 1×10^{10} /tiempo.
7. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre de tipo blastómero deben administrarse una vez cada dos semanas de 2 a 5 veces.
- 15 8. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según la reivindicación 7, en donde las células madre de tipo blastómero deben administrarse una vez cada dos semanas 3 veces.
9. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las células madre de tipo blastómero son autólogas para el sujeto.
- 20 10. Las células madre de tipo blastómero, para uso en un sujeto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el nivel de células supresoras derivadas de línea mieloide en el sujeto se determina antes o después de la administración de las células madre de tipo blastómero.