

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 876**

51 Int. Cl.:

A61K 35/42 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

A61K 35/54 (2015.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012 PCT/IB2012/057042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 12813990 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2788009**

54 Título: **Células pulmonares fetales de mamífero y uso terapéutico de las mismas**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568240 P

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

27.10.2016

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;
SHEZEN, ELIAS y
ROSEN, CHAVA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 587 876 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 pulmonares fetales de mamífero y uso terapéutico de las mismas

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a células pulmonares embrionarias de mamífero y proporciona el uso de las mismas para aplicaciones terapéuticas.

10 Las enfermedades respiratorias son una importante causa de mortalidad y morbilidad, están clasificadas por la organización mundial de la salud como la segunda causa en incidencia, prevalencia, morbilidad, mortalidad y coste. La mayoría de las terapias disponibles actualmente solo mejoran ligeramente la calidad de vida de los pacientes con una enfermedad pulmonar y no previenen la pérdida de la superficie de intercambio gaseoso, que es una consecuencia importante de la progresión en una diversidad de patologías pulmonares. Por lo tanto, actualmente, el
15 único tratamiento definitivo para la enfermedad pulmonar en fase terminal es la sustitución del órgano dañado, pero muchos pacientes mueren mientras están en la lista de espera debido a una importante disminución en la disponibilidad de órganos para trasplantes.

20 Algunos estudios previos han definido unas "ventanas óptimas" para el trasplante de precursores embrionarios humanos y porcinos de diferentes órganos. Estas "ventanas óptimas" para el trasplante fueron definidas mediante tres parámetros: ausencia de riesgo de teratoma, propiedades funcionales del tejido en crecimiento, así como una baja inmunogenicidad. Por ejemplo, la implantación en ratones SCID de diferentes tejidos precursores embrionarios porcinos reveló distintas 'ventanas' temporales durante las cuales el tejido muestra unas propiedades adecuadas para su trasplante, mostrando el riñón y el hígado unas propiedades óptimas a los 28 días, mientras que se
25 demostró que la 'ventana' pulmonar se producía mucho después, a los 56 días, de la edad de gestación porcina [Eventov-Friedman S. et al., Proc Nat Acad of Sciences. (2005) 102 (8): 2928]. Algunos estudios que usan tejido precursor pancreático porcino sugirieron su momento óptimo a los 42 días, momento en el cual este tejido muestra una notable capacidad para corregir la hiperglucemia inducida por estreptozocina en ratones inmunosuprimidos y más recientemente, en primates no humanos. Además, unos estudios recientes han demostrado que el trasplante de tejidos embrionarios de bazo porcino, recogidos en unos puntos temporales de gestación específicos, es capaz de
30 corregir la hemofilia en ratones deficientes en el FVIII.

35 Durante la última década se ha investigado ampliamente el potencial papel curativo de las terapias basadas en células madre. Algunos hallazgos recientes sugieren que los progenitores tempranos derivados de tejidos adultos, tales como de médula ósea o de la sangre del cordón umbilical, del líquido amniótico o de la placenta, incluyendo las células madre mesenquimatosas, los progenitores endoteliales o los fibrocitos circulantes y otras diversas poblaciones, podrían injertarse estructuralmente y diferenciarse en forma de células epiteliales de las vías aéreas y alveolares o en forma de células pulmonares endoteliales vasculares o intersticiales, y podrían utilizarse en la reparación y en la regeneración de pulmones dañados o enfermos [Baber SR et al., American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. (2007) 292 (2): H1120; Weiss DJ. Pulm Pharmacol Ther. (2008) 21 (4): 588-94; Weiss DJ et al., Proceedings of the American thoracic society: Am Thoracic Soc; (2008) pág. 637; Sueblinvong V y Weiss DJ. Translational Research. (2010) 156 (3): 188-205]. Sin embargo, la ausencia de una transdiferenciación epitelial significativa, la extremadamente compleja estructura del pulmón, formado por más de 40 tipos de células diferentes y un bajo índice de injerto de las células trasplantadas en el pulmón, en diferentes modelos
45 experimentales, representa un importante desafío.

Algunos antecedentes de la técnica adicionales incluyen:

50 la publicación PCT N° WO 2006/038211 se refiere a métodos para proporcionar la función de un órgano y/o de un tejido pancreático, linfoide/hematopoyético o pulmonar a un sujeto mamífero. El método comprende trasplantar al sujeto un injerto en desarrollo de un órgano/tejido pancreático, linfoide/hematopoyético o pulmonar de mamífero, respectivamente. El injerto pulmonar divulgado en el documento WO 2006/038211 está en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un órgano/tejido pulmonar porcino en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de desde aproximadamente 42 hasta aproximadamente 80 días de gestación.

55 la publicación PCT N° WO 2004/078022 se refiere a métodos para el tratamiento de un trastorno relacionado con una fisiología o una morfología patológica de un órgano o de un tejido. El método se efectúa mediante el trasplante a un sujeto de un injerto de un órgano o de un tejido de mamífero (por ejemplo, un injerto de un órgano o de un tejido renal, pancreático, hepático, cardíaco o linfoide) seleccionado para que no exprese ni presente sustancialmente al menos una molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto.
60

Sumario de la invención

65 Según la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo una población aislada de una suspensión celular procedente de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en la que el

tejido pulmonar fetal está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de entre 20 y 22 semanas de gestación.

5 Consecuentemente, la presente divulgación proporciona un método para la regeneración de un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, regenerando así el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial.

10 Consecuentemente, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o de una afección en los que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, tratando así la enfermedad o la afección en la que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa.

15 Según la presente divulgación se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno o de una lesión pulmonar en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, tratando así el trastorno o la lesión pulmonar.

20 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de una afección en las que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un sujeto que lo necesite.

25 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención para su uso en el tratamiento de un trastorno o de una lesión pulmonar en un sujeto que lo necesite.

30 Según un aspecto de la presente invención se proporciona un banco de células que comprende una pluralidad de poblaciones de células aisladas a partir de tejidos pulmonares fetales de mamífero, en el que los tejidos pulmonares fetales están en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de entre 20 y 22 semanas de gestación y en el que la pluralidad de poblaciones celulares han sido clasificadas según el HLA para formar un banco de células alogénicas, dispuesta individualmente cada una en recipientes individuales.

35 Según algunas realizaciones de la invención, la fase de gestación es de entre 20 y 21 semanas de gestación.

Según algunas realizaciones de la invención, la fase de gestación es de entre 21 y 22 semanas de gestación.

40 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.

Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión de células comprende una población heterogénea de células.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión de células comprende células progenitoras.

Según algunas realizaciones de la invención, las células progenitoras se seleccionan entre el grupo que consiste en células progenitoras epiteliales, células progenitoras mesenquimatosas y células progenitoras endoteliales.

50 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+).

55 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+) y citoqueratina 14+ (CK14+).

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD45- CD34- CD31- CD326- CD271-.

60 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD31+.

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD326+.

65 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador CD34+ CD31+

CD14+ CD45+.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador CD34+ CD31+ CD45- CD105+.
- Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador nestina+ y/o proteína relacionada con el gen de la calcitonina+ (CGRP+).
- 10 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden la expresión del marcador actina alfa del músculo liso+ (alfa-SMA+) y/o Vimentina+.
- Según algunas realizaciones de la invención, las células son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional.
- 15 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende la generación de un pulmón quimérico.
- Según algunas realizaciones de la invención, el pulmón quimérico comprende la formación de estructuras alveolares, bronquiales y/o bronquiolares, y/o de estructuras vasculares.
- 20 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende una capacidad para sintetizar tensioactivo y/o una capacidad para el transporte de iones.
- Según algunas realizaciones de la invención, las células son capaces de regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial.
- 25 Según algunas realizaciones de la invención, las células son células epiteliales que expresan el CFTR.
- Según algunas realizaciones de la invención, el tejido epitelial se selecciona entre el grupo que consiste en un tejido pulmonar, un tejido del tracto gastrointestinal, un tejido de un órgano reproductor, un tejido del tracto urinario, un tejido renal, un tejido cutáneo, un tejido cardíaco, un tejido isquémico y un tejido cerebral.
- 30 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido mesenquimatoso se selecciona entre el grupo que consiste en un tejido linfático, un tejido del sistema circulatorio y un tejido conectivo.
- 35 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido endotelial se selecciona entre el grupo que consiste en un tejido linfático y un tejido del sistema circulatorio.
- Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende adicionalmente el acondicionamiento del sujeto con un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal antes de la administración.
- 40 Según algunas realizaciones de la invención, la administración se efectúa a través de una vía intravenosa.
- Según algunas realizaciones de la invención, la administración se efectúa a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intraalveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intraserosal, intramucosal, transmucosal, transnasal, rectal e intestinal.
- 45 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende adicionalmente el tratamiento del sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, junto con o después del trasplante.
- 50 Según algunas realizaciones de la invención, la composición está formulada para su administración por vía intravenosa.
- Según algunas realizaciones de la invención, la composición está formulada para su administración a través de una vía seleccionada entre el grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intraalveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intraserosal, intramucosal, transmucosal, transnasal, rectal e intestinal.
- 55 Según algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal.
- 60 Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento subletal, letal o supraletal se selecciona entre el grupo que consiste en una irradiación corporal total (TBI), una irradiación corporal parcial, un acondicionamiento mielosupresor, un bloqueo coestimulante, un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.
- 65

Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento comprende el tratamiento con naftaleno.

Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento comprende adicionalmente una irradiación corporal total (TBI).

5 Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento comprende una irradiación corporal total (TBI).

Según algunas realizaciones de la invención, la TBI comprende una dosis de radiación individual o fraccionada en el intervalo de 1-7,5 Gy.

10 Según algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un sujeto humano.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.

15 Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión de células no es singénica con el sujeto.

Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión de células es alogénica con el sujeto.

20 Según algunas realizaciones de la invención, las células alogénicas se seleccionan entre el grupo que consiste en idénticas en el HLA, parcialmente idénticas en el HLA y no idénticas en el HLA con el sujeto.

25 Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión de células es xenogénica con el sujeto.

Según algunas realizaciones de la invención, el trastorno o la lesión pulmonar se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

30 Según algunas realizaciones de la invención, el trastorno o la lesión pulmonar se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

35 Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o la afección en la que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno, una enfermedad o una lesión pulmonar; un trastorno, una enfermedad o una lesión renal; un trastorno, una enfermedad o una lesión hepática; un trastorno, una enfermedad o una lesión cardíaca; un trastorno, una enfermedad o una lesión del tracto gastrointestinal; un trastorno, una enfermedad o una lesión de la piel; y un trastorno, una enfermedad o una lesión del cerebro.

40 Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o la afección en la que la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, curación de defectos de heridas, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar, lesión pulmonar y degeneración de la córnea.

45 Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o la afección en la que la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en una enfermedad o una afección cardíaca, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunes, leucemia, cáncer, anemia drepanocítica, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos.

50 Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o la afección en la que la regeneración del tejido endotelial es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad vascular, isquemia, anemia drepanocítica, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunes,

55 Según algunas realizaciones de la invención, el banco de células comprende adicionalmente un catálogo que comprende información sobre las células clasificadas según el HLA de la pluralidad de poblaciones de células.

60 Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de las realizaciones de la invención, a continuación se describen algunos métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, predominará la memoria descriptiva de la patente,

incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos anexos. Refiriéndonos ahora específicamente a los dibujos con detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con el fin de un análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción, tomada junto con los dibujos, hace evidente a los expertos en la materia cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

Las Figuras 1 A-R representan el crecimiento y el desarrollo de tejidos precursores embrionarios humanos recogidos en diferentes puntos temporales de gestación. Los tejidos embrionarios humanos fueron implantados bajo la cápsula renal de ratones NOD-SCID. Los implantes fueron evaluados macroscópicamente o mediante una tinción inmunohistológica después de 8 semanas. La Figura 1 A es un sumario del tamaño macroscópico de los implantes en diferentes puntos temporales de gestación:

tamaño medio (\pm DT), basado en el eje mayor (L) y menor (W) y en la altura (H) de los implantes, 6-8 semanas después del trasplante (los datos mostrados son la media de seis experimentos independientes); la Figura 1 B es una fotografía que ilustra un aspecto macroscópico típico de los implantes recogidos en la semana 20 de gestación; las Figuras 1 C-F son fotografías del análisis de la tinción microscópica con hematoxilina y eosina (H&E) del implante derivado del tejido de 20 semanas, que muestra el aspecto normal de los conductos alveolares, los alveolos, la tráquea cubierta con epitelio ciliado, la capa muscular y la monocapa muscular de cartilago y alveolar/epitelial; las Figuras 1 G-H son unas fotografías que ilustran la inmunotinción de la proteína tensioactiva C (sp-C) en rojo y la citoqueratina-18 (CK-18) en verde, con pocos (Figura 1 G) y muchos aumentos (Figura 1 H); la Figura 11 es una fotografía que ilustra la inmunotinción del regulador transmembranario de la fibrosis quística CFTR en rojo y de la CK-18 en verde; las Figuras 1 J-R son unas fotografías que ilustran la típica tinción de H&E de implantes derivados de tejidos de 15 semanas (Figuras 1 J-L), de 18 semanas (Figuras 1 P-R) y de 24 semanas (Figuras 1 M-O), respectivamente. Las flechas indican un quiste. En la (Figura 1 M) se ilustra una imagen macroscópica de un quiste.

Las FIG. 2 A-O representan la identificación de los progenitores tempranos y de sus nichos en el pulmón embrionario humano. Las Figuras 2 A-D son unas fotografías que ilustran la tinción de H&E de tejidos pulmonares embrionarios humanos en diferentes puntos temporales de gestación, revelando las estructuras bronquiales y bronquiolares sin ninguna estructura alveolar; las Figuras 2 E-F son unas fotografías que ilustran una tinción inmunohistológica que muestran una elevada expresión de células CK5+ en las vías aéreas mayores y una expresión conjunta de CK5 y CK14 en los bronquios mayores. Las flechas y las cabezas de flecha indican las regiones con una elevada y una baja expresión de CK5, respectivamente. Las células CK5+ en las estructuras alveolares y bronquiales y en desarrollo están asociadas con una rica inervación, ilustrada por el contacto con células nestina+ y CGRP+ (Figura 2 G), así como por la tinción de los neurofilamentos (NF) (Figura 2 H); la Figura 2 I es una fotografía que ilustra las células positivas de actina alfa del músculo liso; la Figura 2 J es una fotografía que ilustra las células mesenquimatosas Vimentina+ residentes en una estrecha proximidad de los progenitores CK5+; las Figuras 2 K-N son fotografías que ilustran la tinción de CK5 (rojo) en diferentes puntos temporales, que incluyen la semana 15 (Figura 2 K), la 17 (Figura 2 L), la 20 (Figura 2 M) y la 22 (Figura 2 N) de gestación humana, mostrando diferencias en el nivel de expresión de la CK5; la Figura 20 es una gráfica que ilustra un análisis morfométrico cuantitativo del área del tejido ocupada por los progenitores CK5+ que muestra unos niveles significativamente mayores (prueba de la t) en las semanas 20-22 un rombo representa un valor de p que no es significativo, dos rombos representan $p < 0,002$).

Las FIG. 2 P-Z representan un análisis mediante FACS de progenitores tempranos no hematopoyéticos de tejido pulmonar embrionario humano recogido en diferentes puntos de gestación. Las Figuras 2 P-Q ilustran un análisis de FACS representativo de células pulmonares de 20 semanas que muestran una doble tinción con anti-CD45 y anti-CD34. Se representan tres subpoblaciones de las células no hematopoyéticas CD45, incluyendo células CD45-CD34^{high}, CD45-CD34^{intermediate} y CD45-CD34^{neg}; las Figuras 2 R-T ilustran una doble tinción con anti-CD117 (c-kit) y anti-CD271 (marcador de diferenciación mesenquimatoso) que revela el nivel de cada subpoblación; las Figuras 2 U-Z ilustran el porcentaje de células individuales positivas CD117+ en la población CD45-CD34^{neg} en diferentes tejidos pulmonares embrionarios humanos.

Las FIG. 3 A-C representan una triple tinción con CK5, lectina ULEX y CD117 antes del trasplante de tejidos pulmonares recogidos a las 21 semanas. Vía central (Figura 3 A) y bronquio principal (Figura 3 B) mostrando una elevada expresión de CK5 en las vías aéreas grandes, rodeados por grandes vasos sanguíneos. Raras células CD117+ residen en los espacios perivascuales. En la región de las vías aéreas menores (Figura 3 C) se observa una menor expresión de CK5, en estrecho contacto con vasos sanguíneos menores, mientras que numerosas células CD117+ residen en el interior de estos vasos sanguíneos (rosa; doble positivo para lectina ULEX y CD117).

Las FIG. 4 A-K representan una triple tinción con E-cadherina, CD34y CD117 antes del trasplante de tejidos

pulmonares recogidos a las 21 semanas. La Figura 4 A ilustra una tinción individual para CD34; la Figura 4 B ilustra una tinción individual para CD117; la Figura 4 C ilustra una fusión con una tinción de E-cadherina. Se representan imágenes panorámicas de dos regiones vecinas, que incluyen grandes bronquios y estructuras alveolares en desarrollo. La mayoría de las células CD34⁺ de la región de las estructuras alveolares en desarrollo expresan conjuntamente el CD117 (Figuras 4 D-G), mientras que en la región de las vías aéreas mayores pueden observarse raras células individuales positivas CD117⁺ en estrecha proximidad de los vasos sanguíneos (Figuras 4 H-K).

Las FIG. 5 A-D son fotografías que representan una vista panorámica de tres campos vecinos en un pulmón humano de 20 semanas que ilustra la presencia de regiones positivas en CK5 (rojo, Figura 5 A) con una intensidad de expresión diferente, que están rodeadas por vasos sanguíneos (azul, Figura 5 B) y células positivas alfa-SMA (verde, Figura 5 C), ambas en los grandes bronquios y en los alveolos en desarrollo (azul, Figura 5 B), lo que sugiere distintos nichos (la superposición de los 3 compartimentos se muestra en la Figura 5 D). Barra = 50 µm.

Las FIG. 6 A-L representan un análisis policromático de FACS de dos muestras diferentes de pulmón humano adulto. El análisis policromático de FACS de los tejidos de pulmón humano adulto se llevó a cabo en paralelo con los tejidos de pulmón humano embrionario. Se tiñó una suspensión de células individuales después de una disociación enzimática con colagenasa y dispasa de los tejidos, y se tiñó con anticuerpos específicos para CD34 (específica para progenitores hematopoyéticos y endoteliales), para CD45 (células hematopoyéticas), para CD31 (marcador de células endoteliales), para CD 117 (c-KIT, para la identificación de progenitores tempranos), CD271 (marcador de células madre mesenquimatosas NGFR) y para CD326 (marcador de diferenciación epitelial EPCAM) o controles de isotipos equivalentes. En ambas muestras se identificaron poblaciones CD34⁺ y CD34⁻ (Figuras 6 A, 6 D, 6 G y 6 J). Se observaron notables diferencias entre los tejidos de pulmón adulto y embrionario. Se identificaron unos niveles mucho menores de células CD34⁺ en los pulmones adultos. Cuando se ensayó la presencia de la población c-kit⁺, se identificaron las poblaciones muy pequeñas de CD34⁺CD117⁺ y CD34⁻CD117⁺ (Figuras 6 B, 6 E, 6 H y 6 K); la mayoría de las células CD34⁺CD117⁺ eran positivas para el marcador CD31 y únicamente un pequeño porcentaje era negativo para el marcador CD31 (Figuras 6 C, 6 F, 6 I y 6 L) y se averiguó que la mayor parte de la población CD34⁻CD117⁺ era negativa para CD31 y CD326 (Figuras 6 F y 6 L).

Las FIG. 7 A-I representan el análisis de FACS de HEL de 20 semanas, que muestra subpoblaciones CD45-CD34⁺ y CD45-CD34⁻ (Figura 7 A). Tinción CD117⁺ en las subpoblaciones de células CD34 positivas (Figura 7 B) y negativas (Figura 7 C). La mayor parte de la subpoblación CD34⁺CD117⁺ es positiva para los marcadores CD31 o CD326 (Figuras 7 D, 7 F-G). La mayor parte de las células CD34⁻CD117⁺ son negativas para los marcadores CD31 y CD326 (Figuras 7 E, 7 H-I). En las Figuras 7 F-I se muestran histogramas representativos en los que la línea roja marca el control de isotipo de los marcadores CD31 y CD326, la línea azul muestra la subpoblación CD34⁺CD31⁺ y la línea verde muestra la subpoblación CD34⁺CD326⁺ (Figuras 7 F-G); en las Figuras 7 H-I, la línea azul marca la subpoblación CD34⁻CD31⁺ y la línea verde marca la subpoblación CD34⁻CD326⁺. Estos hallazgos confirman la existencia de dos poblaciones diferentes CD117⁺, según se ha demostrado mediante una inmunohistoquímica.

Las FIG. 8 A-D representan una tinción inmunohistológica de HEL de 15 semanas (Figuras 8 A-B) y de 17 semanas (Figuras 8 C-D) para el marcador ulix-vascular (azul), CK5 (verde) y CD 117 (rojo), que muestra el doble patrón de expresión de CD117. Se encuentran numerosas células individuales CD117⁺ en estrecha proximidad a las vías aéreas grandes y los vasos sanguíneos, mientras que la mayor parte de las mismas se localizan conjuntamente en el interior de los vasos sanguíneos que rodean las estructuras alveolares en desarrollo.

Las FIG. 9 A-D representan el análisis de un pulmón humano de 20 semanas para evaluar la presencia de progenitores endoteliales tempranos y tardíos (EPC). Esta figura identifica la presencia de dos subpoblaciones menores distintas CD34⁺CD31⁺ (Figura 9 B). La primera es identificada mediante una tinción positiva para CD14 y CD45 (Figura 9 C), mientras que la segunda subpoblación es CD45-CD105⁺ (Figura 9 D).

Las FIG. 10 A-E representan la caracterización de tejidos embrionarios antes y después del implante bajo la cápsula renal de ratones singénicos. Las Figuras 10 A-C son unas fotografías que ilustran una tinción típica de H&E que muestra el bajo crecimiento de tejidos pulmonares E14 (Figura 10 A) y E17 (Figura 10 B) a las 12 semanas después del trasplante bajo la cápsula renal de ratones SCID (n = 7), en comparación con el notable crecimiento y diferenciación conseguidos después de los implantes embrionarios de ratón E16 (n = 5) (Figuras 10 C-E); las Figuras 10 D-E son unas fotografías que ilustran una tinción de H&E que muestra la tinción de las vías aéreas mayores (flechas grandes) y de las estructuras alveolares (flechas pequeñas) y de citoqueratina en implantes de pulmón fetal de ratón E16.

La FIG. 10 F representa una representación esquemática de estadios paralelos en el desarrollo de un pulmón de rata y humano. La "ventana óptima" para el trasplante está en la fase de desarrollo canalicular.

Las FIG. 11 A-Y representan la caracterización de progenitores de pulmón en pulmón embrionario de ratón E16 antes del trasplante. La Figura 11 A es una fotografía que ilustra una tinción de H&E de pulmón embrionario E16 que muestra estructuras inmaduras y la ausencia de estructuras alveolares; la Figura 11 B es una fotografía que ilustra que las células CK-5 positivas (azul) en tejido de ratón E16, similar al tejido embrionario humano, tienen una mayor expresión en las vías aéreas mayores. Se encuentran numerosos cuerpos neuroepiteliales, teñidos positivamente mediante CGRP (rojo) e hidroxilasa de tirosina (TH, verde) por toda la muestra y están localizados en nichos; la Figura 11 C es una fotografía que ilustra que se encuentran células positivas para CCSP en las regiones de las vías aéreas mayores, también ricas en células positivas para nestina y rodeadas por células

positivas para alfa-SMA (Figura 11 D, flechas blancas), lo que sugiere nichos de células madre; las Figuras 11 E-G son unos análisis policromático representativo mediante FACS de células CD45-CD31⁻ CD326⁺ CD24⁺CD49f⁺CD104⁺ en suspensiones de células individuales derivadas de pulmón E13, E14, E15 y E16 después del tratamiento con colagenasa y dispasa (n = 10, 10, 12 y 10 respectivamente, los valores representan la media ± DT de dos experimentos diferentes). Se muestra una abundancia significativamente mayor en esta población de células en el pulmón E15-16 (p < 0,007); la Figura 11 Y es un resumen de los niveles de las células CD45-CD31- CD326+ CD24⁺CD49f⁺CD104⁺ que muestran significación estadística calculada mediante la prueba de la t de Student (un rombo representa p < 0,037, dos rombos representan p < 0,007, las estrategias de clasificación celular se describen en la sección de Ejemplos del presente documento, a continuación).

Las FIG. 12 A-F son fotografías que representan la tinción inmunohistoquímica de pulmón adulto C57B1 que muestran la presencia de nestina y de CGRP (Figuras 12 A-B), de forma similar a su expresión en los nichos de células madre en el pulmón embrionario de ratón (Figura 12 A - menor aumento - barra = 50 µm, Figura 12 B - mayor aumento - barra = 20 µm). La caja de la (Figura 12 A) indica la posición de la ampliación mostrada en la (Figura 12 B); las Figuras 12 C-F son unas fotografías que ilustran una tinción triple de pulmón adulto C57B1 para alfa-SMA (verde, Figura 12 C), CGRP (rojo, Figura 12 D) y E-cadherina (superposición azul con alfa-SMA y CGRP, Figura 12 E), barra = 50 µm; y la Figura 12 F ilustra un área ampliada del cuadrado marcado en la Figura 12 E, barra = 20 µm.

Las FIG. 13 A-D representan una microscopía de fluorescencia de pulmones quiméricos con poca potencia de aumento que muestran diferentes cifras de focos de células GFP⁺ injertadas después de diferentes regímenes de acondicionamiento. Las Figuras 13 A-C son fotografías de imágenes representativas de pulmones quiméricos de animales tratados con 6 Gy de TBI (Figura 13 A), solo con NA (Figura 13 B) y con NA más 6 Gy de TBI (Figura 13 C); la Figura 13 D son análisis morfométricos cuantitativos de parches GFP⁺ de células injertadas por mm³, después de diferentes regímenes de acondicionamiento (n = 10 en cada grupo). Se presentan los resultados de 3 experimentos independientes.

Las FIG. 14 A-L son fotografías que representan una tinción de células CCSP⁺ antes y después de la infusión de las células E16. La Figura 14 A ilustra las luces de las vías aéreas mayores de los ratones de control sin tratar; la Figura 14 B ilustra los pulmones de los animales experimentales 1 día después del acondicionamiento con naftaleno y con 6 Gy de TBI, que muestra el desprendimiento de las células CCSP⁺; la Figura 14 C ilustra los pulmones de animales acondicionados con naftaleno y 6 Gy de TBI 30 días después de la infusión de las células E16, que muestran una notable regeneración de la capa epitelial con células GFP⁺ injertadas (verde) en las luces bronquiales, que están vascularizadas, según se indica mediante una tinción para V-E cadherina; las Figuras 14 D-L ilustran que las células trasplantadas (Figuras 14 D-F) se incorporan en la capa epitelial, regeneran las células CCSP⁺ (rojo), son capaces de producir tensioactivo (Figuras 14 G-I) y muestran un potencial para el transporte de iones, según se indica mediante una tinción para el CFTR (Figuras 14 J-L).

Las FIG. 15 A-C son fotografías que representan la microscopía bifotónica que revela el nivel de quimerismo en los pulmones trasplantados. Imágenes representativas de microscopía bifotónica del pulmón de los ratones trasplantados a las 6 (Figuras 15 A-B) y a las 16 (Figura 15 C) semanas después del trasplante, sin (Figura 15 A) y con una tinción conjunta de los vasos sanguíneos con puntos cuánticos no dirigidos (rojo) (Figura 15 B).

Las FIG. 16 A-L son fotografías que representan la caracterización inmunohistológica de pulmones quiméricos a las 16 semanas después del trasplante. Las Figuras 16 A-D son imágenes representativas de un pulmón quimérico teñido con anticuerpo anti-GFP (verde), con anticuerpo anti-CD31 (rojo) y con anticuerpo anti-pancitoqueratina (azul), que muestra la incorporación de células GFP⁺ en los compartimentos vascular y epitelial de los pulmones trasplantados, sin signos de cicatrización ni de fibrosis; las Figuras 16 E-H son imágenes representativas de pulmones quiméricos teñidos con anti-GFP (verde) y con anticuerpo anti-AQP-5 (rojo), que muestran la incorporación del tejido trasplantado en la superficie de intercambio gaseoso de los alveocitos de tipo I; las Figuras 16 I-L son imágenes de un pulmón quimérico teñido con anticuerpo anti-GFP (verde), anti-CD31 (rojo) y anti-sp-C (azul), que muestran la participación de los alveocitos de tipo II de las células trasplantadas en la síntesis de tensioactivo.

Las FIG. 17 A-E son fotografías que representan el aspecto del pulmón de control no trasplantado C57B1 analizado mediante microscopía bifotónica, barra = 90 µm (pulmón de control, Figura 17 A) o una tinción triple de un pulmón quimérico con anticuerpos anti-GFP (verde), anti-citoqueratina (azul) y anti-CD31, que muestra quimerismo tanto en el compartimento epitelial como en el vascular del pulmón y una total incorporación en las estructuras, sin signos de cicatrización ni de fibrosis, con pocos aumentos, barra = 200 µm (Figuras 17 B-E). En el canal fluorescente verde GFP⁺ los focos quiméricos están indicados por una línea de puntos (Figura 17 B). En los canales rojo y azul y también están indicadas las mismas regiones quiméricas por una línea de puntos, que muestran una transición suave desde el tejido receptor hacia el donante tanto en el compartimento vascular (Figura 17 C) como en el epitelial (Figura 17 D), y la superposición de todas las capas se muestra en la (Figura 17 E).

Las FIG. 18 A-I son fotografías que representan el injerto y la incorporación de células de pulmón de origen humano en el pulmón de ratón en diferentes puntos temporales después del trasplante. Las Figuras 18 A-C ilustran el quimerismo en el pulmón de ratón a las 6 semanas después del trasplante, que muestra la tinción para el MHC de ratón (rojo) y el tejido humano positivo para MNF-116 (verde) con pocos aumentos; las Figuras 18 D-F ilustran el quimerismo en el pulmón de ratón a las 6 semanas después del trasplante, que muestra la tinción para el MHC de ratón (rojo) y el tejido humano positivo para MNF-116 (verde), con muchos aumentos; las Figuras 18 G-I ilustran un campo adicional, teñido como en las (Figuras 18 D-F).

Las FIG. 19 A-F son fotografías que representan el quimerismo típico en el bronquio pulmonar del ratón

trasplantado a las 7 semanas después del trasplante. Las Figuras 19 A y 19 D ilustran células humanas procedentes de células embrionarias humanas que fueron teñidas selectivamente con un cóctel de anticuerpos de ratón anti-humanos que incluyen anti-MNF (marcador epitelial), anti-Vimentina 9 humana (típica de las células estromales) y anti-CD31 humano de ratón (marcador de células endoteliales) marcado con Daylight 488 (verde); las Figuras 19 B y 19 E ilustran células procedentes de ratón en el pulmón del ratón que fueron teñidas con lectina Bandería marcada con Alexa-flúor 546 (rojo). Se sabe que esta última se une a la a-Gal expresada en las células epiteliales y endoteliales de ratón. El panel superior muestra un campo quimérico con pocos aumentos (Figura 19 C), el panel inferior muestra la misma región con un elevado aumento (Figura 19 F).

Las FIG. 20 A-F son fotografías que representan el quimerismo típico en los alveolos pulmonares de un ratón trasplantado a las 7 semanas después del trasplante. Las Figuras 20 A y 20 D ilustran células humanas procedentes de células embrionarias humanas que fueron teñidas selectivamente con un cóctel de anticuerpos de ratón anti-humanos que incluyen anti-MNF (marcador epitelial), anti-Vimentina 9 humana (típica de las células estromales) y anti-CD31 humano de ratón (marcador de células endoteliales) marcado con Day light 488 (verde); las Figuras 20 B y 20 E ilustran células procedentes de ratón en el pulmón del ratón que fueron teñidas con lectina Bandería marcada con Alexa-flúor 546 (rojo). Se sabe que esta última se une a la a-Gal expresada en las células epiteliales y endoteliales de ratón, pero no en sus homólogos humanos. El panel superior muestra un campo quimérico con pocos aumentos (Figura 20 C); el panel inferior muestra la misma región con un elevado aumento (Figura 20 F).

Las FIG. 21 A-C son fotografías que representan la incorporación de células humanas en el parénquima pulmonar. La Figura 21 A ilustra células humanas que se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos anti-humanos que incluyen anti-MNF 117, anti-V9, anti-CD31 como se ha descrito anteriormente y con anticuerpo de conejo anti-citoqueratina (rojo), que tiñe la citoqueratina tanto de ratón como humana (Figura 21 B). La fusión de ambos colores muestra células humanas en el interior del parénquima pulmonar (Figura 21 C).

Las FIG. 22 A-C son fotografías que representan la incorporación de células humanas en la superficie de intercambio gaseoso del pulmón. Las células humanas se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos anti-humanos que incluyen anti-MNF117, anti-V9 y anti-CD31, como se ha descrito anteriormente (Figura 22 A) y con anti-AQP-5 de cabra (rojo), que tiñe la AQP-5 tanto de ratón como humana (Figura 22 B). La fusión de ambos colores muestra células humanas en el interior de la superficie de intercambio gaseoso del pulmón (Figura 22 C).

Las FIG. 23 A-F son fotografías que representan que las células de pulmón humanas injertadas en el interior de los alveolos de un ratón quimérico participan en la producción de tensioactivo. Las células humanas se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos anti-humanos que incluyen anti-MNF117, anti-V9 y anti-CD31 como se ha descrito anteriormente (Figuras 23 A y 23 D) y con anticuerpo anti-SPC de conejo (rojo), que tiñe la proteína C tensioactiva tanto de ratón como humana (Figura 23 B). La fusión de ambos colores muestra la participación del tejido humano trasplantado en la producción de tensioactivo (Figura 23 C). El panel inferior (Figuras 23 D-F) muestra la tinción con un gran aumento del área del cuadrado indicado en la (Figura 23 C).

Las FIG. 24 A-H son fotografías que representan el injerto de una suspensión de células individuales derivadas de pulmón humano de 20 semanas teñidas con CMTMR en el pulmón de un ratón NOD-SCID, barra = 500 μ m (Figura 24 A); los parches de GFP⁺ indican las células del pulmón procedentes de células de pulmón embrionario de ratón trasplantadas en el modelo de trasplante singénico, barra = 1 mm (Figura 24 B); las Figuras 24 C-E ilustran una tinción de control con anticuerpo de ratón anti-citoqueratina MNF 116 humana (verde, Figura 24 C) y anti-MHC de ratón de rata (rojo, Figura 24 D) de tejido pulmonar embrionario humano, que es positivo para el MNF116 y negativo para el MHC de ratón (la superposición de las dos se muestra en la Figura 24 E); las Figuras 24 F-H ilustran una tinción de control de células pulmonares de ratón con anticuerpos anti-MNF116 humana anti-MHC de ratón, mostrando una tinción negativa para el MNF116 y una tinción positiva para el MHC de ratón, barra = 50 μ m.

Las FIG. 25 A-D son fotografías que representan el seguimiento a largo plazo de ratones implantados con tejido pulmonar embrionario de ratón E16 que no muestra signos de teratoma. La Figura 25 A ilustra un aspecto macroscópico de un pulmón trasplantado un año después del trasplante, que muestra unos bordes lisos y una ausencia de tumores; las Figuras 25 B-C ilustran una tinción de H&E que muestra una morfología normal del pulmón trasplantado con pocos (Figura 25 B) y con muchos aumentos (Figura 25 C) un año después del trasplante; la Figura 25 D ilustra vistas en corona de imágenes de CT del pulmón *in vivo* de un animal trasplantado típico, que muestra un aspecto radiológico normal del pulmón experimental.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a células pulmonares embrionarias de mamífero y proporciona el uso de las mismas para aplicaciones terapéuticas.

Los principios y el manejo de la presente invención pueden comprenderse mejor con referencia a los dibujos y las descripciones anexas.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados mediante los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de llevarse a la práctica o llevarse a cabo de diversas formas. También debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos y no deben interpretarse como limitantes.

Algunos estudios previos han definido "ventanas" para el trasplante de tejidos embrionarios humanos y porcinos de diferentes órganos, incluyendo riñón, hígado, páncreas, pulmón y corazón. Por lo tanto, por ejemplo, se demostró que la 'ventana' pulmonar se producía entre los 42 y los 80 días de edad de gestación porcina [Publicación PCT N° WO 2006/038211; Eventov-Fliedman S. et al., Proc Nat Acad of Sciences. (2005) 102 (8): 2928]. Algunos estudios adicionales sugieren que los progenitores tempranos derivados de tejidos adultos, tales como la médula ósea, o a partir de la sangre del cordón umbilical, el líquido amniótico o la placenta, que incluyen células madre mesenquimatosas, progenitoras endoteliales o fibrocitos circulantes y una diversidad de otras poblaciones, podrían injertarse estructuralmente y diferenciarse en forma de vías aéreas y de células epiteliales alveolares o en forma de células pulmonares endoteliales o intersticiales vasculares, y podrían ser utilizadas en la reparación y la regeneración de pulmones lesionados o enfermos.

Al llevar a la práctica la presente invención, los presentes inventores han identificado una población única de células de tejido pulmonar embrionario, obtenido a partir de una 'ventana' de 20-22 semanas de edad de gestación humana, que comprende una multitud de células progenitoras pulmonares que pueden ser usadas para la reparación de pulmones lesionados/enfermos. Sorprendentemente, puede usarse una suspensión de dicha población de células, que no mantiene una estructura tisular, para regenerar tejidos pulmonares epiteliales, mesenquimatosos y endoteliales.

Según se muestra a continuación en el presente documento y en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han ilustrado, por primera vez, que puede usarse una suspensión de una población de células aisladas, a saber, a las 20-22 semanas de gestación humana (véase el Ejemplo 1, en la sección de Ejemplos que sigue) para regenerar el tejido pulmonar y reanudar la funcionalidad pulmonar tras su administración.

Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que una población de células aisladas de 20-22 semanas de gestación humana y una 'ventana' canalicular similar de tejido pulmonar embrionario de ratón, definida a los 15-16 días de gestación (véase el Ejemplo 1, en la sección de Ejemplos que sigue), mostraba los mayores niveles de supuestos precursores pulmonares (incluyendo células progenitoras epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas) en comparación con los tejidos recogidos en unos puntos temporales de gestación más tempranos o más tardíos (véase el Ejemplo 1, en la sección de Ejemplos que sigue). Adicionalmente, la administración (por ejemplo, la administración intravenosa) de suspensiones de células individuales obtenidas a partir de los tejidos en esta ventana de gestación consiguió una notable reparación del pulmón. Específicamente, las células precursoras pulmonares se alojaron, se diferenciaron y se integraron en los pulmones lesionados de los ratones, dando como resultado la formación de una unidad respiratoria completa, incluyendo la formación de nuevas células epiteliales y de una nueva vasculatura (véase el Ejemplo 2, en la sección de Ejemplos que sigue). Adicionalmente, este proceso mejoró notablemente tras un acondicionamiento adicional de los ratones receptores mediante el uso de un tratamiento con naftaleno, con o sin una irradiación corporal total (TBI) sub-letal, dando lugar a un quimerismo sustancial y duradero en diferentes estirpes celulares de los pulmones lesionados (véase el Ejemplo 2, en la sección de Ejemplos que sigue). Tomados en conjunto, estos resultados apoyan el uso de suspensiones de células individuales de tejido precursor pulmonar embrionario humano recogido a las 20-22 semanas de gestación, para el tratamiento de afecciones epiteliales, mesenquimatosas y endoteliales, incluyendo enfermedades y lesiones de los pulmones.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo una población aislada de una suspensión de células procedentes de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en la que el tejido pulmonar fetal está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de desde 20 hasta 22 semanas de gestación.

La expresión "población aislada de una suspensión de células", según se usa en el presente documento, se refiere a células que han sido aisladas a partir de su entorno natural (por ejemplo, el cuerpo humano) se extraen del tejido conservando su viabilidad pero que no mantienen una estructura tisular (es decir, no hay una estructura de tejido vascularizado) y no están unidas a un soporte sólido.

Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse mediante el uso de una población aislada de una suspensión de células que comprende células singénicas o no singénicas (con respecto a un sujeto).

Según se usa en el presente documento, el término células "singénicas" se refiere a células que son esencialmente genéticamente idénticas a las del sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto. Algunos ejemplos de células singénicas incluyen células derivadas del sujeto (también denominadas en la materia como "autólogas"), de un clon del sujeto, o de un gemelo idéntico del sujeto.

Según se usa en el presente documento, el término células "no singénicas" se refiere a células que no son esencialmente genéticamente idénticas a las del sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto, tales como las células alogénicas o las células xenogénicas.

Según se usa en el presente documento, el término "alogénico" se refiere a una célula que deriva de un tejido pulmonar de un donante que es de la misma especie que la del sujeto, que sustancialmente no es clónico con el

sujeto. Normalmente, los mamíferos no consanguíneos gemelos no cigóticos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que una célula alogénica puede ser idéntica en el HLA, parcialmente idéntica en el HLA o no idéntica en el HLA (es decir, que muestra uno o más determinantes del HLA diferentes) con respecto al sujeto.

5 Según se usa en el presente documento, el término "xenogénica" se refiere a una célula que sustancialmente expresa antígenos de una especie diferente con respecto a la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del sujeto. Normalmente, los mamíferos no con sanguíneos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

10 La presente invención contempla que las células xenogénicas deriven de diversas especies, según se describe con mayor detalle a continuación en el presente documento.

15 Las células con los tejidos de origen xenogénico (por ejemplo, de origen porcino) se obtienen preferentemente a partir de una fuente que se sabe que está exenta de zoonosis, tal como de retrovirus endógenos porcinos. De forma análoga, las células o los tejidos de origen humano se obtienen preferentemente a partir de fuentes sustancialmente exentas de patógenos.

Según una realización de la presente invención, el sujeto es un ser humano y la población aislada de células es de origen humano (por ejemplo, de un feto humano).

20 Dependiendo de la aplicación y de las fuentes disponibles, las células de la presente invención pueden ser naturales o estar modificadas genéticamente. Dichas determinaciones están en la capacidad del experto habitual en la materia.

25 Dado que es probable que las células no singénicas induzcan una reacción inmunitaria cuando son administradas a un sujeto, se han desarrollado varias metodologías para reducir la probabilidad de rechazo de las células no singénicas. Estas incluyen bien la supresión del sistema inmunitario del receptor o bien la encapsulación de las células no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes antes del trasplante. Alternativamente, pueden usarse células que no expresan antígenos de superficie xenogénicos, tales como las desarrolladas en animales transgénicos (por ejemplo, cerdos).

30 La expresión "tejido pulmonar", según se usa en el presente documento, se refiere a un tejido o a un órgano pulmonar. El tejido pulmonar de la presente invención puede ser un órgano o un tejido completo o parcial. Por lo tanto, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender el pulmón derecho, el pulmón izquierdo o ambos. El tejido pulmonar de la presente invención puede comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco lóbulos (tanto del pulmón derecho como del izquierdo). Además, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender uno o más segmentos pulmonares o lóbulos pulmonares. Adicionalmente, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender cualquier cantidad de bronquios y bronquiolos (por ejemplo, el árbol bronquial) y cualquier cantidad de alveolos o de sacos alveolares.

40 Según una realización de la presente invención, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de entre 20 y aproximadamente 21 días de gestación, de entre aproximadamente 20,5 y aproximadamente 21,5 días de gestación, de entre aproximadamente 20 y 22 días de gestación, de entre aproximadamente 21 y 22 días de gestación.

45 Según la invención el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de entre 20 y 22 días de gestación.

Según otra realización específica, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de entre aproximadamente 21 y 22 días de gestación.

50 Según otra realización específica, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de entre 20 y aproximadamente 21 días de gestación.

Como se ha mencionado, el tejido pulmonar de la presente invención se obtiene a partir de un organismo mamífero.

55 Por lo tanto, el tejido pulmonar de la presente invención puede proceder de cualquier un mamífero. Algunas especies de origen adecuadas para el tejido pulmonar comprenden la mayor parte de los animales domésticos o de granja y primates, que han sido ampliamente caracterizados con respecto a la correlación entre la fase de diferenciación y la fase de gestación. Dichos animales incluyen porcinos (por ejemplo, cerdo), bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), ovinos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, gerbo, hámster) y primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, mono macaco, títi).

60 Según una realización específica, el tejido pulmonar deriva de un ser humano.

65 Según una realización específica, el tejido pulmonar deriva de un organismo no humano.

5 Pueden emplearse diversos métodos para la obtención de un tejido pulmonar en una fase de desarrollo que se corresponda esencialmente con la de un tejido pulmonar de origen humano, como acabamos de enseñar. La obtención de dicho tejido pulmonar puede efectuarse mediante la recolección del tejido pulmonar a partir de un feto en desarrollo en dicha fase de gestación (es decir, la correspondiente a un ser humano de 20-22 semanas de gestación), por ejemplo, mediante un procedimiento quirúrgico. Los expertos en la materia comprenderán que la fase de gestación de un organismo es el periodo de tiempo transcurrido después de la fertilización del ovocito que genera el organismo.

10 Alternativamente, un tejido pulmonar en una fase de desarrollo deseada puede obtenerse mediante el cultivo *in vitro* de células, órganos/tejidos. Dicha diferenciación de células, tejidos u órganos controlada *in vitro* se realiza de forma rutinaria, por ejemplo, mediante el uso del cultivo de líneas de células madre embrionarias para la generación de cultivos que contienen células/tejidos/órganos de las estirpes deseadas. Por ejemplo, para la generación de estirpes pulmonares, consúltese, por ejemplo, Otto WR., 1997. Int J Exp Pathol. 78: 291-310.

15 La siguiente tabla proporciona un ejemplo de las fases de gestación de tejidos pulmonares humanos y porcinos en las que éstos pueden proporcionar tejidos pulmonares que están esencialmente en las correspondientes etapas de desarrollo:

20 *Tabla 1: correspondientes fases de gestación de cerdos y de seres humanos*

Fase de gestación de tejido pulmonar porcino (días)	Fase de gestación de tejido pulmonar humano (días *)
18	44
20	49
22	54
23	56-57
25	61-62
26	63
28	68-69
31	75
38	92
42	102
46	112
49	119
56	136
62	151
72	175
80	195
88	214
La fase de gestación (en días) de un tejido pulmonar perteneciente a una especie dada que está en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un tejido pulmonar porcino puede calcularse según la siguiente fórmula: [fase de gestación del tejido pulmonar porcino en días] / [periodo de gestación del cerdo en días] x [fase de gestación del tejido pulmonar de una especie dada en días]. De forma análoga, la fase de gestación (en días) de un tejido pulmonar perteneciente a una especie dada que está en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un tejido pulmonar humano puede calcularse según la siguiente fórmula: [fase de gestación de tejido pulmonar humano en días] / [periodo de gestación de los seres humanos en días] x [fase de gestación del tejido pulmonar de una especie dada en días]. La fase de gestación de los cerdos es de aproximadamente 115 días y la de los seres humanos es de aproximadamente 280 días. * para el cálculo de las semanas dividir las cifras entre 7.	

Después de la obtención del tejido pulmonar fetal, la presente invención contempla la adicionalmente la generación de una población aislada de células a partir del mismo.

25 Según se usa en el presente documento, "suspensión de células individuales" se refiere a una suspensión de células individuales pulmonares fetales que comprende células individuales o agregados de células de no más de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 1.500, 2.000 células en un agregado.

30 La suspensión de células individuales de la presente invención puede obtenerse mediante cualquier medio mecánico o químico (por ejemplo, enzimático). Existen diversos métodos para disociar los grupos de células para formar una suspensión de células individuales a partir de tejidos primarios, célula unidas en cultivo y agregados, por ejemplo, fuerzas físicas (una disociación mecánica tal como un raspador de células, trituración a través de una pipeta de diámetro estrecho, una aspiración con una aguja fina, una desagregación vorticial y una filtración forzada a través de una malla fina de nailon o de acero inoxidable), enzimas (una disociación con enzimas tales como tripsina, colagenasa, acutasa y similares) o una combinación de ambos.

- 5 Por lo tanto, por ejemplo, la digestión enzimática de tejido pulmonar fetal en células aisladas puede llevarse a cabo sometiendo el tejido a una enzima tal como una colagenasa de tipo IV (Worthington biochemical corporation Lakewood, NJ, EE.UU.) y/o una dispasa (productos de Invitrogen Corporation, Grand Isly NY, EE.UU.). Por ejemplo, el tejido pulmonar puede ser digerido con una enzima cortando finalmente el tejido con una hoja de afeitar en presencia de, por ejemplo, colagenasa, dispasa y CaCl_2 a 37 °C durante aproximadamente 1 hora. El método puede comprender adicionalmente la eliminación de desechos no específicos de la suspensión de células resultante mediante, por ejemplo, una filtración secuencial a través de filtros (por ejemplo, filtros de 70 y de 40 μm), esencialmente según se describe en "General Materials and Experimental Methods" de la sección de Ejemplos que sigue.
- 10 Adicionalmente, la disociación mecánica del tejido pulmonar fetal en células aisladas puede llevarse a cabo mediante el uso de un dispositivo diseñado para romper el tejido en un tamaño predeterminado. Dicho dispositivo puede obtenerse en CellArtis Goteborg, Suecia. Adicionalmente o como alternativa, la disociación mecánica puede llevarse a cabo manualmente mediante el uso de una aguja tal como una aguja del calibre 27 (BD Microlance, Drogheda, Irlanda) mientras se observa el tejido/células bajo un microscopio invertido.
- 15 Después de la disociación enzimática o mecánica del tejido pulmonar fetal, las células pulmonares fetales disociadas se rompen adicionalmente en pequeños grumos mediante el uso de punta de pipeta Gilson de 200 μl (por ejemplo, pipeteando arriba y abajo las células).
- 20 Según la presente invención, la suspensión de células individuales de células pulmonares fetales humanas comprende células viables. La viabilidad de las células puede controlarse mediante el uso de cualquier método conocido en la materia, como por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de viabilidad celular (por ejemplo, MultiTox Multiplex Assay disponible en Promega), citometría de flujo, Trypan blue, etc.
- 25 Normalmente, la población aislada de células pulmonares fetales se usa inmediatamente para su trasplante. Sin embargo, en situaciones en las que las células van a ser mantenidas en suspensión antes del trasplante, por ejemplo durante 1-12 horas, las células pueden ser cultivadas en un medio de cultivo que sea capaz de favorecer su viabilidad. Dicho medio de cultivo puede ser un medio basado en agua que incluye una combinación de sustancias tales como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas tales como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, todos los cuales son necesarios para el mantenimiento de la población aislada de células pulmonares fetales en un estado viable. Por ejemplo, un medio de cultivo según este aspecto de la presente invención puede ser un medio de cultivo tisular sintético tal como Ko-DMEM (productos de Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE.UU.), DMEM/F12 (Biological Industries, BeitHaemek, Israel), medio MabADCB (HyClone, Utah, EE.UU.) o DMEM/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) complementados con los aditivos necesarios. Preferiblemente, todos los ingredientes incluidos en el medio de cultivo de la presente invención son sustancialmente puros, con calidad de cultivo tisular.
- 30 Las células aisladas a partir del tejido pulmonar fetal pueden comprender una población heterogénea de células.
- 40 Según una realización, la población aislada de la suspensión de células comprende células progenitoras. Las células progenitoras pueden comprender, por ejemplo, células progenitoras epiteliales, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras hematopoyéticas y/o células progenitoras endoteliales.
- 45 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+).
- Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+) y citoqueratina 14+ (CK14+).
- 50 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD45- CD34-.
- Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD45- CD34-CD31- CD326-CD271-.
- 55 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD34+.
- Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD31+.
- Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD326+.
- 60 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador CD34+ CD31+ CD 14+ CD45+.
- Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador CD34+ CD31+ CD45-CD105+.
- 65 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador nestina+.

Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador de la proteína relacionada con el gen de la calcitonina+ (CGRP+).

5 Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador de la actina alfa del músculo liso+ (alfa-SMA+).

Según una realización, las células comprenden la expresión del marcador Vimentina+.

10 Según una realización específica, cada una de las poblaciones de células mencionadas anteriormente en el presente documento puede tener una purificación de aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %.

15 La purificación de tipos específicos de células puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, mediante una purificación por afinidad (por ejemplo, tal como mediante el uso de microesferas MACS, un clasificador celular FACS y/o un marcaje de captura con ELISA) mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen cualquiera de los marcadores celulares descritos anteriormente (por ejemplo, CK5, CK14, c-Kit, CD31, CD34, CD45, CD105, CD271, CD326, etc.).

20 Según una realización de la presente invención, la población aislada de la suspensión de células comprende una mezcla no purificada de la población aislada de células pulmonares fetales.

25 Según otra realización, la población aislada de la suspensión de células comprende una población específica de un tipo de célula de células pulmonares fetales (como se ha indicado con más detalle anteriormente). El aislamiento de dichas células puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, mediante una purificación por afinidad (por ejemplo, tal como mediante el uso de microesferas MACS, un clasificador celular FACS y/o un marcaje de captura con ELISA, como se ha mencionado anteriormente) o mediante una erradicación (por ejemplo, una destrucción) de las células no deseadas con anticuerpos específicos dirigidos a las mismas.

30 Se apreciará que las células de la población aislada de la suspensión de células son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional, incluyendo la generación de un pulmón quimérico. El pulmón quimérico comprende estructuras alveolares, bronquiales y/o bronquiolares, y/o estructuras vasculares. Adicionalmente, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende una capacidad para sintetizar tensioactivo [por ejemplo, proteína secretada de células claras (CCSP), aquaporin-5 (AQP-5) y proteína tensioactiva C (sp-C)], detectables mediante una tinción celular específica, y/o una capacidad para el transporte de iones (por ejemplo, como se indica mediante una tinción para el regulador transmembranario de la fibrosis cística CFTR. Las células de la población aislada de la suspensión de células son además capaces de regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial (por ejemplo, el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial, según se indica por la formación de un tejido pulmonar quimérico completo que comprende todos estos componentes).

40 Por lo tanto, el uso de células aisladas a partir del tejido pulmonar fetal es especialmente beneficioso en las situaciones en las que existe la necesidad de regenerar el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial, incluyendo el tejido pulmonar.

45 Por lo tanto, según otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para la regeneración de un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención.

50 Según otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o de una afección en los que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención.

55 Según otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno o de una lesión pulmonar en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención.

60 Según se usa en el presente documento, el término "tejido epitelial" se refiere a un tejido que reviste cualquiera de las cavidades o de las superficies de las estructuras del cuerpo de un mamífero. Algunos ejemplos de tejidos epiteliales incluyen, pero no se limitan a, tejido pulmonar, tejido del tracto gastrointestinal, tejido de un órgano reproductor, tejido del tracto urinario, tejido renal, tejido cutáneo, tejido isquémico, tejido cardíaco, tejido endotelial, tejido circulatorio y tejido cerebral.

65 Según se usa en el presente documento, el término "tejido mesenquimatoso" se refiere a un tejido conectivo en el cuerpo de un mamífero que deriva fundamentalmente del mesoderma. Algunos ejemplos de tejidos

mesenquimatosos incluyen, pero no se limitan a, los tejidos conectivos del cuerpo, los vasos sanguíneos y linfáticos.

Según se usa en el presente documento, el término "tejido endotelial" se refiere a una fina capa de células que reviste la superficie interior de los vasos sanguíneos y de los vasos linfáticos. Algunos ejemplos de tejidos endoteliales incluyen, pero no se limitan a, tejidos linfáticos y tejidos del sistema circulatorio (por ejemplo, los vasos sanguíneos).

Según se usa en el presente documento, el término "regenerar un tejido" se refiere a la reconstrucción de un tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial de tal forma que se forme un tejido funcional (es decir, un tejido que funciona como un tejido natural en la región especificada). Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la regeneración se refiere a un aumento de al menos aproximadamente el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 % en el tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial.

Puede usarse cualquier método conocido por el experto en la materia para evaluar la regeneración de un tejido epitelial (por ejemplo, un tejido pulmonar), de un tejido mesenquimatoso (por ejemplo, un tejido conectivo) o de un tejido endotelial (por ejemplo, los vasos sanguíneos) como, por ejemplo, mediante el uso de rayos X, ultrasonidos, TC, imágenes por RM, la tinción histológica de una muestra de tejido de un tejido epitelial (por ejemplo, mediante una tinción de la expresión de la proteína secretada de células claras (CCSP), aquaporin-5 y de la proteína tensioactiva C), de un tejido mesenquimatoso (por ejemplo, mediante una tinción de la expresión de Vimentina⁺) o de tejidos endoteliales (por ejemplo, mediante una tinción de la expresión de CD31).

Según se usa en el presente documento, los términos "sujeto" o "sujeto que lo necesite" se refieren a un mamífero, preferentemente a un ser humano, macho o hembra de cualquier edad, que padece o que está predispuesto a padecer un daño o una deficiencia en un tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial como resultado de una enfermedad, un trastorno o una lesión.

Según se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de los síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Según se usa en el presente documento, el término "enfermedad o afección en los que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, afección o a cualquier afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica que implique una pérdida o una deficiencia en el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial. Normalmente, dicha enfermedad o afección incluye un trastorno, una enfermedad o una lesión pulmonar; un trastorno, una enfermedad o una lesión renal; un trastorno, una enfermedad o una lesión hepática; un trastorno, una enfermedad o una lesión del tracto gastrointestinal; un trastorno, una enfermedad o una lesión de la piel; un trastorno, una enfermedad o una lesión vascular; un trastorno, una enfermedad o una lesión cardíaca; o un trastorno, una enfermedad o una lesión del cerebro.

Algunos ejemplos de enfermedades o de afecciones en los la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, quemaduras cutáneas, úlceras cutáneas, heridas cutáneas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, enfisema, asbestosis, fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, insuficiencia pulmonar, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), hernia diafragmática congénita, síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva (por ejemplo, deficiencia homocigótica en la proteína tensioactiva B), proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar, degeneración de la córnea y cáncer.

Algunos ejemplos de enfermedades o de afecciones en los la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o afecciones cardíacas, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunes, leucemia y linfoma, cáncer (por ejemplo, cáncer de mama), anemia drepanocítica, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos.

Algunos ejemplos de enfermedades o de afecciones en los la regeneración del tejido endotelial es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, enfermedades vasculares, isquemia, anemia drepanocítica, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunes [por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE) y síndrome del anticuerpo antifosfolípido (aPS)].

Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Algunos ejemplos particulares de enfermedades cancerosas pero no se limitan a: leucemia mielóide tal como leucemia mielógena crónica. Leucemia mielógena aguda con maduración. Leucemia promielocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda con un aumento en los basófilos, leucemia monocítica aguda. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia; linfoma maligno, tal como de birkitt no hodgkin; leucemia linfocítica, tal como leucemia linfoblástica

aguda. Leucemia linfocítica crónica; enfermedades mieloproliferativas, tales como tumores sólidos, meningioma benigno, tumores mixtos de las glándulas salivales, adenomas de colon; adenocarcinomas, tales como cáncer de pulmón microcítico, de riñón, de útero, de próstata, de vejiga, de ovario, de colon, sarcomas, liposarcoma, mixoide, sarcoma sinovial, rhabdomyosarcoma (alveolar), condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor de ewing; otros incluyen disgerminoma testicular y de ovario, retinoblastoma, tumor de wilms, neuroblastoma, melanoma maligno, mesotelioma, de mama, de piel, de próstata y de ovario.

Algunos ejemplos de trastornos/enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis, trombosis, infarto de miocardio, etc.), enfermedades reumatoides (por ejemplo, artritis reumatoide y espondilitis anquilosante), enfermedades glandulares (por ejemplo, enfermedad pancreática, diabetes de tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, etc.), enfermedades gastrointestinales (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, enfermedad celíaca, colitis, ileítis y enfermedad de Crohn), enfermedades cutáneas (por ejemplo, enfermedades cutáneas vesiculares autoinmunes, tales como, pero no se limitan a, pénfigo vulgar, pénfigoide vesicular y pénfigo foliáceo), enfermedades hepáticas (por ejemplo, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune), enfermedades neurológicas (por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia gravis, neuropatías, neuropatías motoras; síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunes, miastenia de Lambert-Eaton, síndrome miasténico; enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome de la persona rígida; síndrome de la persona rígida no paraneoplásico, atrofias cerebelosas progresivas, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes; neuropatías disímunes; neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita, neuritis, neuritis óptica y enfermedades neurodegenerativas), enfermedades musculares (por ejemplo, miositis, miositis autoinmune, síndrome de Sjogren primario y enfermedad autoinmune del músculo liso), enfermedades nefríticas (por ejemplo, nefritis y nefritis intersticial autoinmune), enfermedades relacionadas con la reproducción (por ejemplo, pérdidas fetales repetidas), enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunes del oído y enfermedades autoinmunes del oído interno) y enfermedades sistémicas (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica). Según se usa en el presente documento, el término "trastorno o lesión pulmonar" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, afección o a cualquier afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica que implique una pérdida o una deficiencia en el tejido pulmonar.

Algunos ejemplos de una enfermedad o una afección asociada con un trastorno o una lesión pulmonar incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, insuficiencia pulmonar, lesión pulmonar aguda (por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria del adulto), hernia diafragmática congénita, síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva (por ejemplo, deficiencia homocigótica de proteína tensioactiva B), proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

La administración de la población aislada de la suspensión de células al sujeto puede efectuarse de varias formas, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo, la fase o la gravedad de la enfermedad que se va a tratar, los parámetros físicos y fisiológicos específicos del sujeto individual y/o el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y del fin, la administración de la población aislada de la suspensión de células puede efectuarse mediante una vía seleccionada entre el grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intraalveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intraserosal, intramucosal, transmucosal, transnasal, rectal e intestinal.

Según una realización, la administración se efectúa mediante una vía intravenosa.

Alternativamente, la administración de la población aislada de la suspensión de células al sujeto puede efectuarse mediante la administración de la misma en diversas ubicaciones anatómicas adecuadas, de forma que tenga un efecto terapéutico. Por lo tanto, dependiendo de la aplicación y del fin, la población aislada de células pulmonares fetales puede ser administrada en una ubicación anatómica homotópica (una ubicación anatómica normal para el tipo de órgano o de tejido de las células), o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el tipo de órgano o de tejido de las células).

Consecuentemente, dependiendo de la aplicación y del fin, la población aislada de células pulmonares fetales puede implantarse ventajosamente (por ejemplo, trasplantarse) bajo la cápsula renal o en el riñón, la grasa testicular, el subcutis, el epiplón, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad cardíaca, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, el páncreas, la piel y/o el espacio intraabdominal.

Por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o de una afección gastrointestinal, la población aislada de la suspensión de células de la presente invención puede ser administrada en el hígado, la vena porta, la cápsula renal, el subcutis, el epiplón, el bazo, el espacio intraabdominal, el páncreas, la grasa testicular y/o un asa intestinal (la subserosa de un asa en U del intestino delgado). Para el tratamiento de una enfermedad o de una afección pulmonar, la población aislada de la suspensión de células de la presente invención puede ser administrada en el

pulmón, bajo la cápsula renal, en el hígado, la vena porta, el subcutis, el epiplón, el bazo, el espacio intraabdominal, el páncreas y/o la grasa testicular.

5 La población aislada de células pulmonares fetales de algunas realizaciones de la invención puede ser administrada a un organismo como tal o en una composición farmacéutica en la que está mezclada con portadores o excipientes adecuados.

10 Según se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

15 En el presente documento, el término "principio activo" se refiere a la población aislada de la suspensión de células procedente del tejido pulmonar fetal de un mamífero responsable del efecto biológico.

20 En lo sucesivo, las expresiones "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse de forma intercambiable, se refieren a un portador o a un diluyente que no provoca una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. En estas expresiones se incluye un adyuvante.

25 En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Algunos ejemplos, sin limitación, de excipientes, incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

30 Algunas técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora al presente documento como referencia.

35 Algunas vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, por ejemplo, en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, inyecciones intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

40 Algunas metodologías convencionales para la administración de fármacos en el sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); una manipulación molecular del agente (por ejemplo, la producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula de la superficie de la célula endotelial junto con un agente que por sí mismo es incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógenas de la barrera hematoencefálica; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad lipídica de un agente (por ejemplo, la conjugación de agentes solubles en agua con portadores lipídicos o con colesterol); y la desestabilización temporal de la integridad de la barrera hematoencefálica mediante una desestabilización hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o del uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene sus limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, la limitación del tamaño impuesta por una limitación inherente en los sistemas de transporte endógenos, los potenciales efectos secundarios biológicos indeseables asociados con la administración sistémica de una molécula quimérica formada por un motivo portador que podría ser activo fuera del SNC y el posible riesgo de daños cerebrales en las regiones del cerebro en las que se desestabiliza la barrera hematoencefálica, lo que lo hace un método de administración subóptimo.

55 Alternativamente se puede administrar la composición farmacéutica de forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente (por ejemplo, en un tejido pulmonar).

60 Las composiciones farmacéuticas de algunas realizaciones de la invención puede ser elaboradas mediante procesos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsionado, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

65 Las composiciones farmacéuticas para su uso según algunas realizaciones de la invención pueden formularse por tanto de una forma convencional mediante el uso de uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares, que facilitan el procesado de los principios activos en preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para su inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o un tampón salino fisiológico. Para su administración transmucosal, en la formulación se usan unos penetrantes apropiados para la barrera que se quiere atravesar. Dichos penetrantes generalmente son conocidos en la materia.

5 Para su administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente mediante la combinación de los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia. Dichos portadores permiten la formulación de la composición farmacéutica en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para su ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral pueden elaborarse mediante el uso de un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de la adición de las adecuadas sustancias auxiliares si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Algunos excipientes adecuados son, en particular, agentes de relleno tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa, carbometil celulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

20 Se proporcionan núcleos de grageas con recubrimientos adecuados. Para este fin pueden usarse soluciones azucaradas concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carboxipol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de lacado y disolventes orgánicos adecuados o mezclas disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o a los recubrimientos de las grageas para la identificación o para la caracterización de las diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

25 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos en una mezcla con un agente de relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en unas dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

35 Para su administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o de tabletas formulados de una forma convencional.

40 Para su administración mediante inhalación nasal, los principios activos para su uso según algunas realizaciones de la invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol desde un recipiente presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para su uso en un dispensador que contiene una mezcla pulverulenta del compuesto y una base pulverulenta adecuada tal como lactosa o almidón.

45 La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para una administración parenteral, por ejemplo, mediante una inyección en bolo o una infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

50 Las composiciones farmacéuticas para su administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en una forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los principios activos en forma de las apropiadas suspensiones para inyección basadas en aceite o en agua. Algunos disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

60 Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de un polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución basada en agua estéril exenta de pirógenos, antes de su uso.

65 La composición farmacéutica de algunas realizaciones de la invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, mediante el uso, por ejemplo, de bases para supositorios

convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de algunas realizaciones de la invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin previsto. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de los principios activos (es decir, una población aislada de una suspensión de células que comprende células pulmonares fetales) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad epitelial, tal como una enfermedad o una afección pulmonar) o para prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

10 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está ampliamente en las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

15 Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y en cultivos celulares. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos.

20 Un ejemplo de un modelo animal que puede usarse para la evaluación de la cantidad terapéuticamente eficaz de una población aislada de células pulmonares fetales comprende el modelo animal murino (por ejemplo, ratones), en los que se induce una lesión pulmonar, por ejemplo, mediante la inyección intraperitoneal de naftaleno (por ejemplo, con una pureza mayor del 99 %) con o sin una irradiación adicional (por ejemplo, 40-48 horas después de la administración del naftaleno), según se describe con detalle en la sección de Ejemplos que sigue.

25 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos rutinarios *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares, y de los estudios animales, pueden usarse en la formulación de un abanico de dosis para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, la vía de administración y las dosis exactas pueden ser elegidas por el médico dependiendo del estado del paciente (véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1).

30 La cantidad y el intervalo de las dosis pueden ser ajustados individualmente para proporcionar unos amplios niveles del principio activo que sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima eficaz, CME). La CME variará para cada preparación, pero puede ser estimada a partir de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la CME dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Pueden usarse ensayos de detección para la determinación de las concentraciones plasmáticas.

35 Dependiendo de la gravedad y de la sensibilidad de la afección que se va a tratar, la dosis puede ser una administración individual o una pluralidad de administraciones, durando el tratamiento desde varios días hasta varias semanas o hasta que se consiga la curación o la disminución del estado patológico.

La cantidad que se va a administrar de una composición dependerá, por supuesto, del sujeto que se va a tratar, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del juicio del médico prescriptor, etc.

45 Según una realización, la población aislada de la suspensión de células comprende al menos aproximadamente $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 , $0,5 \times 10^6$, 1×10^6 , $1,5 \times 10^6$, 2×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 3×10^6 , $3,5 \times 10^6$, 4×10^6 , $4,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $5,5 \times 10^6$, 6×10^6 , $6,5 \times 10^6$, 7×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 8×10^6 , $8,5 \times 10^6$, 9×10^6 , $9,5 \times 10^6$, 10×10^6 células por kilogramo de peso corporal del sujeto.

50 Según una realización específica, la población aislada de la suspensión de células comprende al menos aproximadamente 1×10^6 células por kilogramo de peso corporal del sujeto.

55 Si se desea, las composiciones de algunas realizaciones de la invención pueden presentarse en un paquete o en un dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica de plástico, tal como un envase alveolado. El paquete o el dispositivo dispensador pueden estar acompañados por las instrucciones de administración. El paquete o el dispositivo dispensador también pueden estar acomodados por un aviso asociado al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso puede ser, por ejemplo, una etiqueta aprobada por la Food and Drug Administration de Estados Unidos para los fármacos de prescripción, o un prospecto de un producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible también pueden ser preparadas, colocadas en un recipiente apropiado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado adicionalmente anteriormente.

65

Las técnicas de encapsulación se clasifican generalmente como microencapsulación, que implica pequeños vehículos esféricos, y macroencapsulación, que implica unas membranas de láminas planas y fibras huecas mayores (Uludag, H. et al. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev 42, 29-64).

5 Los métodos para la preparación de microcápsulas son conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, los divulgados en: Lu, M. Z. et al. (2000). Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine). Biotechnol Bioeng 70, 479-483; Chang, T. M. y Prakash, S. (2001) Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. Mol Biotechnol 17, 249-260; y Lu, M. Z., et al. (2000). A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). J Microencapsul 17, 245-521.

15 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan mediante el uso de colágeno modificado en un complejo con una cubierta de un terpolímero de metilacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), dando como resultado un espesor de la cápsula de 2-5 µm. Dichas microcápsulas pueden ser encapsuladas adicionalmente con unas cubiertas adicionales de terpolímero de 2-5 µm con objeto de impartir una superficie lisa cargada negativamente y minimizar la absorción de proteínas (Chia, S. M. et al. (2002). Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. Biomaterials 23, 849-856).

20 Otras microcápsulas se basan en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. (2003), Encapsulated islets in diabetes treatment. Diabetes Technol Ther 5, 665-668), o en sus derivados. Por ejemplo, pueden prepararse microcápsulas mediante una complejación de polielectrolitos entre los polianiones alginato de sodio y sulfato de sodio de celulosa y el policationo clorhidrato de poli(metilen-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

25 Se apreciará que la encapsulación de la célula mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por lo tanto, por ejemplo, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se redujo desde 1 mm hasta 400 µm (Canaple, L. et al. (2002). Improving cell encapsulation through size control. J Biomater Sci Polym Ed 13, 783-96). Además, se averiguó que las biocápsulas manoporosas con un tamaño de poro bien controlado tan pequeñas como de 7 nm, unas químicas de superficie adaptadas y unas microarquitecturas precisas inmunoaislaban con éxito microentornos para las células (véase Williams, D. (1999). Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. Med Device Technol 10, 6-9; y Desai, T. A. (2002). Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation. Expert Opin Biol Ther 2, 633-646).

35 Como se ha mencionado, con objeto de facilitar la el injerto de las células no singénicas, la presente invención contempla adicionalmente el tratamiento del sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, junto con o después de la administración de la población aislada de la suspensión de células.

40 En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia orientación para la selección y la administración de regímenes inmunosupresores adecuados para trasplantes (por ejemplo, consúltese: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. et al., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. et al., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. et al., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. et al., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. et al., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. et al. 1998. Lancet 351, 623).

45 Según una realización, el régimen inmunosupresor consiste en la administración de al menos un agente inmunosupresor al sujeto.

50 Algunos ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, tacrolimus, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclooroquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanorcept, copaxona, prednisona, metilprednisolona, azatiopreno, ciclofosfamida y fludarabina, CTLA4-Ig, anticuerpos anti CD40, anticuerpos anti ligando CD40, anticuerpos anti B7, anticuerpos anti CD3 (por ejemplo, anticuerpo anti CD3 humano OKT3), micofenolato de mofetilo, daclizumab [un anticuerpo humanizado (IgG1 Fc) anti-cadena alfa IL2R (CD25) y anticuerpos anti linfocitos T conjugados con toxinas (por ejemplo, cadena A del cólera, o la toxina de *Pseudomonas*), bloqueantes del TNF alfa, un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria, y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), incluyendo ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio y colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de la Cox-2, tramadol, rapamicina (sirolimus) y análogos de rapamicina (tales como CCI-779, RAD001, AP23573). Estos agentes pueden ser administrados individualmente o en combinación.

60 Dependiendo del tipo de célula y de la enfermedad o de la afección que se va a tratar, y con objeto de facilitar el injerto de las células pulmonares fetales, el método puede comprender adicionalmente ventajosamente el acondicionamiento del sujeto en unas condiciones subletales, letales o supraletales antes de la administración de la población aislada de la suspensión de células.

5 Según se usa en el presente documento, los términos "subletal", "letal" y "supraletal", cuando se refieren al acondicionamiento de los sujetos de la presente invención, se refieren a tratamientos mielotóxicos y/o linfocitotóxicos que, cuando son aplicados a una población representativa de sujetos, respectivamente, son normalmente: no letales para esencialmente todos los miembros de la población; letales para algunos pero no para todos los miembros de la población; o letales para esencialmente todos los miembros de la población en unas condiciones de esterilidad normales.

10 Según una realización, el acondicionamiento comprende una irradiación corporal total (TBI), una irradiación linfoide total (TLI, es decir, la exposición de todos los nódulos linfáticos, el timo y el bazo), una irradiación corporal parcial (por ejemplo, la exposición específica de los pulmones, los riñones, el cerebro, etc.), un acondicionamiento mielosupresor, un bloqueo coestimulante, un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.

15 Según se ilustra en la sección de Ejemplos que sigue, el acondicionamiento de un sujeto mediante el uso de naftaleno induce una ablación específica del sitio de las células claras en los bronquiolos respiratorios y en las uniones broncoalveolares, y facilita por tanto el injerto de la población aislada de células pulmonares fetales. Para eliminar adicionalmente eficazmente las células madre pulmonares residentes (que pueden proliferar rápidamente después del tratamiento con naftaleno), el sujeto fue sometido adicionalmente a una TBI subletal (por ejemplo, de 6 Gy) antes de la administración de la población aislada de células pulmonares fetales (véase el Ejemplo 2 de la sección de Ejemplos que sigue).

20 Por lo tanto, según una realización de la presente invención, el protocolo de acondicionamiento comprende el tratamiento con naftaleno.

25 Según una realización, el tratamiento con naftaleno es administrado al sujeto 1-10 días (por ejemplo, 3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión de células.

Según una realización, el acondicionamiento comprende el tratamiento con naftaleno y un tratamiento de TBI.

30 Según una realización, la TBI comprende una dosis de irradiación individual o fraccionada en el intervalo de 0,5-1 Gy, de 0, de 5-1,5 Gy, de 0, de 5-2,5 Gy, de 0, de 5-5 Gy, de 0, de 5-7,5 Gy, de 0, de 5-10 Gy, de 0, de 5-15 Gy, de 1-1,5 Gy, de 1-2 Gy, de 1-2,5 Gy, de 1-3 Gy, de 1-3,5 Gy, de 1-4 Gy, de 1-4,5 Gy, de 1-1,5 Gy, de 1-7,5 Gy, de 1-10 Gy, de 2-3 Gy, de 2-4 Gy, de 2-5 Gy, de 2-6 Gy, de 2-7 Gy, de 2-8 Gy, de 2-9 Gy, de 2-10 Gy, de 3-4 Gy, de 3-5 Gy, de 3-6 Gy, de 3-7 Gy, de 3-8 Gy, de 3-9 Gy, de 3-10 Gy, de 4-5 Gy, de 4-6 Gy, de 4-7 Gy, de 4-8 Gy, de 4-9 Gy, de 4-10 Gy, de 5-6 Gy, de 5-7 Gy, de 5-8 Gy, de 5-9 Gy, de 5-10 Gy, de 6-7 Gy, de 6-8 Gy, de 6-9 Gy, de 6-10 Gy, de 7-8 Gy, de 7-9 Gy, de 7-10 Gy, de 8-9 Gy, de 8-10 Gy, de 10-12 Gy o de 10-15 Gy.

35 Según una realización específica, la TBI comprende una dosis de irradiación individual o fraccionada en el intervalo de 1-7,5 Gy.

40 Según una realización, el tratamiento de TBI es administrado al sujeto 1-10 días (por ejemplo, 1-3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión de células.

45 Según una realización, el tratamiento con naftaleno es administrado al sujeto 2-10 días (por ejemplo, 3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión de células, y el tratamiento de TBI es administrado al sujeto 40-48 horas después (por ejemplo, 1 día) antes de la administración de la población aislada de la suspensión de células.

50 Según una realización, cuando se usa una irradiación corporal parcial, la exposición es específica para un órgano o un tejido que se va a tratar (por ejemplo, pulmones, riñón, hígado, páncreas, cerebro etc.). En dichos casos es recomendable proteger los órganos corporales no irradiados con objeto de evitar daños en órganos/tejidos no deseados.

55 Según una realización, el acondicionamiento comprende un agente quimioterapéutico (por ejemplo, agentes mielosupresores). Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, busulfano, mileran, busulfex, fludarabina, melfalano, dimetil mileran y tiotepa y ciclofosfamida. El (los) agente(s) quimioterapéutico(s) puede(n) ser administrado(s) al sujeto en una dosis individual o en varias dosis, por ejemplo, en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante.

60 Según una realización, el acondicionamiento comprende una inmunoterapia con anticuerpos. Algunos ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab, vendido con los nombres comerciales de, por ejemplo, Campath, MabCampath, Campath-1H y Lemtrada) y un agente anti-globulina de timocito (ATG) [por ejemplo, timoglobulina (ATG de conejo, rATG, disponible en Genzyme) y Atgam (ATG equina, eATG, disponible en Pfizer)]. Según una realización, el anticuerpo es administrado al sujeto en una dosis individual o en varias dosis, por ejemplo, en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (por ejemplo, dosis diarias) antes del trasplante.

65

Según una realización, el acondicionamiento comprende un bloqueo coestimulante. Por lo tanto, por ejemplo, el acondicionamiento puede comprender la administración temporal al sujeto de al menos un inhibidor de la coestimulación de los linfocitos T y al menos un inhibidor del ligando CD40, y más preferentemente puede comprender adicionalmente la administración al sujeto de un inhibidor de la proliferación de los linfocitos T.

Según una realización, el inhibidor de la coestimulación de los linfocitos T es CTLA4-Ig, el inhibidor del ligando CD40 es un anticuerpo anti-ligando CD40 y el inhibidor de la proliferación de los linfocitos T es rapamicina. Alternativamente, el inhibidor de la coestimulación de los linfocitos T puede ser un anticuerpo anti-CD40. Alternativamente, el inhibidor de la coestimulación de los linfocitos T puede ser un anticuerpo específico para B7-1, B7-2, CD28, anti-LFA-1 y/o anti-LFA3.

Después del trasplante de la población aislada de la suspensión de células en el sujeto según la presente invención, es recomendable, según la práctica médica habitual, controlar la funcionalidad de crecimiento y la inmunocompatibilidad de las células trasplantadas según cualquiera de las diversas técnicas habituales de la materia. Por ejemplo, la funcionalidad de los tejidos pulmonares regenerados puede controlarse después del trasplante mediante unas pruebas rutinarias de función pulmonar (por ejemplo, un análisis de las propiedades funcionales de los implantes en desarrollo, indicadas por la capacidad para sintetizar tensioactivo, detectable mediante una tinción de la proteína tensioactiva C (sp-C) y por la capacidad para el transporte de iones, indicada por una tinción para el regulador transmembranario de la fibrosis quística CFTR).

La población aislada de células pulmonares fetales descrita en el presente documento puede ser almacenada individualmente o puede estar comprendida en un banco, clasificándose cada población según un parámetro en particular (por ejemplo, el tipo de HLA).

Por lo tanto, según otro aspecto más de la presente invención se proporciona un banco de células que comprende una pluralidad de poblaciones de células aisladas a partir de tejidos pulmonares fetales de mamífero, en el que los tejidos pulmonares fetales están en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de 20-22 semanas de gestación y en el que la pluralidad de poblaciones de células han sido clasificadas según el HLA para formar un banco de células alogénicas, dispuesta cada una individualmente en un recipiente individual.

Según una realización, el órgano/tejido pulmonar humano está en una fase de gestación como se ha descrito con detalle anteriormente en el presente documento.

Según una realización, el banco no comprende células de unas fases de gestación distintas a las mencionadas anteriormente.

Según una realización, el banco no comprende células de unas fases de gestación distintas a las anteriores 20-22 semanas de gestación.

Según una realización, el banco no comprende células de tejidos distintos al pulmón.

Según una realización, el banco no comprende células de tejidos postnatales o adultos.

El banco de células pulmonares fetales de mamífero de este aspecto de la presente invención es un conjunto físico de una o más poblaciones de células pulmonares fetales de mamífero derivadas de fetos en una edad de gestación que se corresponde con 20-22 semanas de la gestación humana. Dichos bancos contienen preferentemente más de una muestra (es decir, alícuota) de cada población de células pulmonares fetales. La recolección de las poblaciones de células pulmonares fetales se ha descrito anteriormente en el presente documento. Las poblaciones de células pulmonares fetales pueden derivar de diversos organismos mamíferos, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Las poblaciones de células pulmonares fetales son almacenadas en unas condiciones apropiadas (normalmente congeladas) para mantener las células (por ejemplo, las células progenitoras) vivas y viables. Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales son almacenadas en forma de poblaciones criopreservadas. Otros métodos de conservación se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.656.498, 5.004.681, 5.192.553, 5.955.257 y 6.461.645. Algunos métodos para la producción de bancos de células madre se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2003/0215942.

Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales almacenadas en el banco están caracterizadas según unas características predeterminadas que incluyen, pero no se limitan a, características morfológicas, perfil de diferenciación, tipo sanguíneo, complejo mayor de histocompatibilidad [antígeno leucocitario humano (HLA)], estado patológico del donante o información genotípica asociada o no asociada con una enfermedad o una afección.

Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales almacenadas en el banco están caracterizadas por una clasificación según el HLA.

5 Según una realización, el banco de células comprende adicionalmente un catálogo que comprende información sobre las características predeterminadas (por ejemplo, las células clasificadas según el HLA) de las poblaciones de células pulmonares fetales.

10 La catalogación puede constituir la creación de un registro centralizado de las características obtenidas para cada población de células, tales como, pero no se limitan a, un registro completo por escrito o una base de datos informatizada con la información introducida en los mismos. El banco de células pulmonares fetales facilita la selección a partir de una pluralidad de muestras de una muestra de células pulmonares fetales específica adecuada para las necesidades de un investigador o de un profesional clínico.

15 Según otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para el aislamiento de células progenitoras pulmonares fetales de mamífero, método que comprende: (a) la obtención de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en el que el tejido pulmonar fetal está en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de aproximadamente 20 y aproximadamente 22 semanas de gestación; (b) la detección de la expresión de un marcador en las células del tejido pulmonar fetal de un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en CK5, CK14, CD271, CD34, c-Kit, CD326, CD31, y CD45 y una combinación de los mismos; y (c) el aislamiento de las células que muestran la expresión del marcador, aislando así las células progenitoras pulmonares fetales de mamífero.

20 Según una realización, la población aislada de células comprende al menos dos veces más células CK5+ en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 15 o 17 semanas de gestación.

25 Según una realización, la población aislada de células da como resultado células epiteliales recién formadas en los bronquiolos menores del pulmón del sujeto.

30 Según una realización, la población aislada de células da como resultado la expresión de las células neumocitos de tipo 1 y/o de las células neumocitos de tipo 2 en un alveolo del pulmón del sujeto.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado una expresión de células CD31⁺ en un vaso sanguíneo de un pulmón del sujeto.

35 Según una realización, la población aislada de células da como resultado en unos conductos alveolares más amplios en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 18 semanas de gestación.

40 Según una realización, la población aislada de células da como resultado unas paredes alveolares más finas en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 18 semanas de gestación.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado más estructuras bronquiales y bronquiolares en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 18 semanas de gestación.

45 Según una realización, la población aislada de células no da como resultado la formación de quistes en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 15 o 24 semanas de gestación.

50 Según una realización, la población aislada de células da como resultado la expresión positiva de la proteína tensioactiva C (sp-C) y/o del CFTR en comparación con un tejido o un órgano pulmonar obtenido con aproximadamente 15 o 24 semanas de gestación.

Según se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

55 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".

El término "que consiste en" significa "incluyendo y limitado a".

60 El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero únicamente si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y nuevas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

65 Según se usa en el presente documento, la forma singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" pueden incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, varias de las realizaciones de esta invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debería entenderse que la descripción en un formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad, y no debería interpretarse como una limitación inflexible del ámbito de la invención. Consecuentemente, debería considerarse que la descripción de un intervalo divulga específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de este intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 divulga específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como las cifras individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independiente de la anchura del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se entiende que incluye cualquier número mencionado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado, y "que varía/varía entre" un primer número indicado "y" un segundo número indicado se usan en el presente documento de forma intercambiable y se entiende que incluyen el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

Según se usa en el presente documento el término "método" se refiere a las formas, los medios, las técnicas y los procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, que incluyen, pero no se limitan a, aquellas formas, medios, técnicas y procedimientos ya conocidos o fácilmente desarrollados a partir de nuevas formas, medios, técnicas y procedimientos por los profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que por claridad se describen en el contexto de realizaciones individuales, también pueden proporcionarse combinadas en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización de la invención descrita. Algunas de las características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben ser consideradas como características esenciales de esas realizaciones, salvo que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Varia realizaciones y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones que siguen hallan apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican ampliamente 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, Mariland (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); en las metodologías según se establece en las patentes de EE.UU. n° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 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, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos de las mismas son bien conocidos en la materia y se proporcionan por conveniencia del lector.

MATERIALES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Xenoinjertos de pulmón fetal

Animales

Los Animales se mantuvieron en las condiciones aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee del Weizmann Institute. Las razas de ratón usadas incluirán: NOD-SCID, RAG-/-, Balb-Nude, C57BL/6J (CD45.2) y C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J. Todos los ratones tenían 6-10 semanas de edad. Se mantuvieron en pequeñas jaulas (hasta cinco animales en cada jaula) y se alimentaron con comida estéril y agua ácida.

5 Procedimientos con animales

Procedimiento de trasplante

10 Los trasplantes de los tejidos precursores embrionarios se llevaron a cabo bajo anestesia general (2,5 % de 2,2,2-tribromoetanol, al 97 % en PBS, 10 ml/kg administrados por vía intraperitoneal) como se ha descrito previamente [Katchman H. et al., Stem Cells. (2008) 26 (5): 1347-55],

15 *Implante bajo la cápsula renal*

Se expuso el riñón del hospedador a través de una incisión lateral izquierda. Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal y se injertaron los tejidos precursores del donante bajo la cápsula renal en fragmentos de 1-2 mm de diámetro.

20 Se obtuvieron tejidos pulmonares fetales humanos, que variaban desde 15 hasta 24 semanas de gestación, a partir de abortos legales en los que se obtuvo un consentimiento por escrito para el uso del tejido pulmonar según un protocolo aprobado por el Helsinki Ethics Committee. La edad fetal se determinó basándose en la información clínica y se confirmó mediante mediciones de la longitud del pie fetal. Para asegurar que el tejido del injerto derivaba de pulmón fetal, únicamente se usaron lóbulos pulmonares completos para la preparación del tejido del xenoinjerto. Las

25 vías respiratorias inferiores recientes se cortaron en condiciones estériles en trozos de 1-3 mm³. Se llevó a cabo una cirugía con ratones inmunodeficientes anestesiados y el tejido pulmonar fetal humano se puso por debajo de la cápsula renal de cada ratón (un trozo). Los xenoinjertos se recogieron en diferentes puntos temporales después del injerto.

30 Para el trasplante singénico de pulmón embrionario de ratón bajo la cápsula renal de ratones C57BL, se recogieron los pulmones de embriones en diferentes edades de gestación (14-17 días de gestación) y se injertaron bajo la cápsula renal en fragmentos de 1-2 mm de diámetro. Para asegurar que el tejido injertado derivaba de pulmón fetal únicamente se usaron lóbulos pulmonares completos para la preparación del tejido del injerto.

35 Los animales que recibieron los implantes fueron sacrificados a las 2-20 semanas después del trasplante. Los riñones portadores de los injertos trasplantados se extrajeron y se fijaron en paraformaldehído al 4 % o se criopreservaron.

40 Se tiñeron rutinariamente secciones tisulares con hematoxilina y eosina (H&E). La evaluación de la diferenciación y la función del injerto se llevaron a cabo mediante un marcaje histoquímico e inmunohistoquímico.

Análisis morfométrico

45 Los pulmones embrionarios humanos de diferentes edades de gestación se congelaron en compuesto para la temperatura óptima de corte (OCT) y se cortaron en criocorte. Se tiñeron secciones consecutivas de 12 μ m con anticuerpo primario de conejo anti-CK5 humana (Abeam) y con anticuerpo secundario de burro anti-Day Light 594 de conejo. Las áreas de interés fueron cuantificadas mediante el uso del programa Image Pro (Media Cybernetics, Crofton, MD). Se analizaron al menos 3-4 muestras diferentes de pulmones con la misma edad de gestación.

Lesión pulmonar con naftaleno

50 Para los estudios de la lesión pulmonar, a los ratones se les administró una inyección intraperitoneal de naftaleno (con una pureza mayor del 99 %; Sigma-Aldrich), disuelto aceite de maíz, 200 mg por kg de peso corporal, 40-48 horas antes del trasplante].

55 Para la lesión de "pulmón doble" los animales tratados con naftaleno fueron adicionalmente irradiados (40-48 horas después la administración del naftaleno): los ratones C57BL se irradiaron con 6 Gy de TBI; los ratones NOD-SCID se irradiaron con 3-4 Gy de TBI.

60 Suspensión de células individuales de pulmón y trasplante

Preparación de las células e inyección

65 Las suspensiones de células se obtuvieron a partir de pulmones de 15-24 semanas digeridos con enzimas. En resumen, la digestión del pulmón se llevó a cabo cortando finamente el tejido con una hoja de afeitar en presencia de un 0,1 % de colagenasa, 2,4 U/ml de dispasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y CaCl₂ 2,5 mM a 37 °C

durante 1 h. La eliminación de los desechos no específicos se consiguió mediante una filtración secuencial a través de filtros de 70 y de 40 µm.

5 Después del acondicionamiento con naftaleno (NA), TBI, o ambos, a cada animal se le trasplantaron 1×10^6 células embrionarias de pulmón positivas para la GFP, inyectadas en la vena de la cola 4-8 horas después de la irradiación.

Citometría de flujo

10 Las suspensiones de células individuales derivadas de pulmón embrionario humano (15-24 semanas) y de ratón (14-17 semanas) y las suspensiones de células individuales humanas adultas y de ratón adultas fueron analizadas mediante una citometría de flujo policromática. Todas las muestras se tiñeron con anticuerpos conjugados o con controles de isotipo concordante según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos procedían de Bioscience, BD y de Biolegend. La lista completa de los anticuerpos usados en el estudio se resume en la Tabla 2, a continuación en el presente documento. Los datos se adquirieron con un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) y se analizaron mediante el uso del programa informático Flow Jo (versión 7.6.5).

Inmunohistoquímica

20 Los animales fueron sacrificados en diferentes puntos temporales después del trasplante; los pulmones se inflaron con una solución de PFA al 4 % y se conservaron durante 24 horas, después se criopreservaron en sacarosa al 30 % y se ultracongelaron en isopentano enfriado previamente con aire líquido, o se procesaron para una inclusión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 4 µm y se tiñeron después de una desparafinización con xileno y se rehidrataron como se ha descrito previamente [Hecht G et al., Proc Nat Acad of Sci. (2009) 106 (21): 8659]. El resumen de los anticuerpos usados en el estudio se representa en la Tabla 2, a continuación en el presente documento. Todos los anticuerpos secundarios procedían de Jackson Immunoresearch Laboratories.

30 Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Olympus (DP70) y en ocasiones se procesaron con Adobe photoshop 7.0. En todas las tinciones inmunohistoquímicas se analizó un control negativo mediante el uso de la misma técnica, pero omitiendo el anticuerpo primario y añadiendo el anticuerpo secundario marcado.

Tabla 2: lista de los anticuerpos usados en el estudio

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Anticuerpo anti CK de conejo (Abeam)	Anti-Daylight 488 de ratón
Anticuerpo anti CK18 humana de ratón (Daco)	Anti-Daylight 594 de ratón
Anticuerpo anti CK14 humana de ratón (Daco)	Anti-Daylight 488 de rata
Anti MNF humano de ratón (Santa Cruz)	Anti-Daylight 594 de rata
Anticuerpo anti Ki-67 humano de ratón (Daco)	Anti-AMCA de rata
Anticuerpo anti nestina humana de ratón (MBL)	Anti-Alexa Fluor 488 de conejo
Anticuerpo anti nestina de ratón de cabra (Santa Cruz)	Anti-Cy5 de conejo
Anticuerpo anti CCSP de ratón de conejo (Abeam)	Anti-AMCA de conejo
Anti GFP de conejo (Abeam)	Anti-Alexa Fluor 488 de cabra
Anti GFP de pollo (Abeam)	Anti-rojo de rodamina de cabra
Anti CGRP humana de cabra (Santa Cruz)	Anti-AMCA de cabra
Anticuerpo anti hidroxilasa de tirosina de pollo (Abeam)	Anti-Alexa Fluor 488 de pollo
Anticuerpo anti proteína tensioactiva C de conejo (Santa Cruz)	
Anti CFTR de conejo (Abeam)	
Anticuerpo anti CD31 humano de rata (Daco)	
Anticuerpo anti CD31 de ratón de conejo (Daco)	
Anticuerpo anti CD11c humano de ratón (Daco)	
Anticuerpo anti CD20 de conejo (Daco)	
Anticuerpo anti CD3 de ratón (Daco)	
Anticuerpo anti Sca-PE de ratón; Anti Sca-FITC de ratón (Biolegend)	
Anticuerpo anti CD45-APC de ratón (Biolegend)	
Anticuerpo anti CD31-APC de ratón; anti CD31-PE-Cy7 de ratón (Biolegend)	
Anti CD326-Percp-Cy5.5 de ratón (Biolegend)	
Anti CD49f-FITC de ratón (Biolegend)	
Anti CD24-PE-Cy7 de ratón (Biolegend)	
Anti CD104-Pacific blue de ratón (Biolegend)	
Anti CD90-Pacific blue de ratón (Biolegend)	
Anti CD73-PE de ratón (Biolegend)	
Anti CD45-APC-Cy77 humano (Biolegend)	
Anti CD326-APC humano (Biolegend)	

Anticuerpos primarios	Anticuerpos secundarios
Anti CD117-PE humano (Biolegend)	
Anti CD271-FITC humano (Biolegend)	
Anti CD31-Pacific blue humano (Biolegend)	
Anti CD34-Percp humano (Biolegend)	
Anti CD14-PE humano (Mylteni)	
Anti CD105-Pacific blue humano (Mylteni)	
Anti CD2-FITC humano (BD)	
Anti CD20-PE humano (BD)	
(Nota, todos los anticuerpos secundarios se adquirieron en Jackson ImmunoResearch o en Abeam)	

Microscopía bifotónica

5 Antes de obtener las imágenes, los ratones fueron sacrificados o se les inyectaron por vía I.V. 655 nanopartículas de un trazador sanguíneo de puntos cuánticos para el marcaje vascular (Invitrogen - Molecular Probes) y después se sacrificaron. Los pulmones se extirparon y se colocaron en una cámara de imagen cubierta por vidrio.

10 Se usó un microscopio Ultima™ Multiphoton (Prairie Technologies Middleton, WI) que incorpora un láser de zafiro pulsado Mai Tai™ Ti (Newport Corp., CA). El láser se ajustó a 850 nm para excitar simultáneamente la EGFP y el trazador sanguíneo. Se usó un objetivo de inmersión en agua 20X (NA 0,95) o 40X (NA 0,8) o un objetivo al aire 10X (NA 0,3) de Olympus.

15 Para crear una típica pila en Z, se escanearon secciones del pulmón que contienen las células GFP a una profundidad de aproximadamente 30-150 μm con etapas en Z de 3 μm . Los datos fueron analizados mediante el uso del programa informático Volocity® (Perkin-Elmer, Coventry, Reino Unido).

Imágenes mediante micro-TC

20 Las imágenes mediante micro-TC se obtuvieron bajo anestesia general (2,5 % de 2,2,2-tribromoetanol, al 97 % en PBS, 10 ml/kg administrados por vía intraperitoneal).

25 Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* de micro-TC con un escáner TomoScape® 30S Duo (CT Imaging, Alemania) equipado con sistemas detectores de doble fuente. El voltaje operativo de ambos tubos era de 40 kV. El tiempo de integración del primer y el segundo protocolo era de 90 ms (rotación de 360) y de 5 min (rotación de 3600) y se obtuvieron imágenes axiales a una resolución isotrópica de 80 μm . El procesado de los datos de la TC fue analizado mediante el uso del programa informático ImageJ.

Análisis estadístico

30 Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de la *t* de Student. Los datos se expresaron como la media \pm DT o la media \pm EEM, como se indica, y se consideraron estadísticamente significativos para unos valores de $p < 0,05$.

Ejemplo 1

35 '*Ventana*' óptima para la recogida de tejido precursor pulmonar embrionario humano

Potencial de crecimiento de los tejidos pulmonares embrionarios humanos recogidos en diferentes puntos temporales de gestación

40 Para evaluar la incidencia de la fase embrionaria sobre el potencial crecimiento y diferenciación, en primer lugar se trasplantaron tejidos progenitores embrionarios pulmonares procedentes de fetos humanos de 15 y 24 semanas bajo la cápsula renal de ratones NOD-SCID. Globalmente, tras un análisis 8 semanas después del trasplante, más del 98 % de los injertos de tejido donante de todas las edades sobrevivió, y todos los injertos recuperados mostraron un aumento de tamaño, sin ningún signo de neoplasia en ninguno de los injertos recuperados. No obstante, los resultados eran bastante distintos cuando se intentó un trasplante similar mediante el uso de pulmones en una estación más temprana o más tardía como tejidos donantes.

50 Como puede observarse en la Figura 1 A, el tejido recogido a las 20-22 semanas, ($n = 25$, 1-3 mm de tamaño) mostraba un aumento en el crecimiento 8 semanas después del trasplante (alcanzando un tamaño de 300,7 \pm 15,2 mm), en comparación con el tejido recogido a las 15-19 o a las 23-24 semanas de gestación (61,6 \pm 3,5 mm y 10,6 \pm 2,0 mm, respectivamente).

55 Para obtener una evaluación cuantitativa de los diferentes atributos estructurales del implante pulmonar en crecimiento, mostrados macroscópicamente en las Figuras 1 B, se empleó un análisis morfométrico.

Como se muestra en las Figuras 1 C-F, todos los elementos del árbol respiratorio, con un aspecto similar al tejido pulmonar humano adulto, fueron detectados en los elementos en crecimiento procedentes de tejido de 20-22 semanas. Por lo tanto, todos los implantes en crecimiento mostraron la formación de conductos alveolares con alveolos (Figuras 1 C-F), la tráquea recubierta con epitelio ciliar (Figura 1 E), las capas musculares y el cartílago (Figura 1 E) y las monocapas epiteliales alveolares (Figura 1 F). Asimismo, los parámetros que definen las propiedades funcionales de los implantes en desarrollo, indicadas por la capacidad para sintetizar tensioactivo, detectable mediante una tinción de la proteína tensioactiva C (sp-C) (Figuras 1 G-H) y la capacidad para el transporte de iones, indicada por la tinción del regulador transmembranario de la fibrosis quística CFTR (Figura 11), estaban claramente expresados. Normalmente, estos marcadores funcionales aparecen relativamente tarde durante el proceso de maduración, coincidiendo con los elementos más diferenciados que expresan la citoqueratina 18 (CK 18) y no son expresados en tejido de 20 semanas antes del trasplante (datos no mostrados).

Sorprendentemente, y en contraste con los resultados anteriores, los implantes procedentes del tejido recogido a las 15 semanas (Figura 1 J-L) o a las 24 semanas (Figura 1 M-O) desarrolló quistes y era negativo para la tinción de sp-C y de CFTR (datos no mostrados), mientras que los implantes procedentes de tejido de 18 semanas, aunque mostraban todos los patrones de diferenciación y maduración, incluyendo la tinción de sp-C y de CFTR (datos no mostrados), todavía eran defectuosos porque los conductos alveolares formados eran más estrechos y las paredes alveolares más gruesas (Figura 1 P-R). Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que la 'ventana' óptima para la recogida del tejido pulmonar embrionario humano para el trasplante de entre 20-22 semanas de gestación.

Identificación de las células madre progenitoras y sus nichos en tejido pulmonar embrionario humano en diferentes puntos temporales de gestación

Después de la identificación de la 'ventana' óptima del tejido pulmonar embrionario humano para el trasplante, se evaluó la presencia de posibles células madre en este tejido 'ventana' en comparación con los tejidos recogidos en unos puntos temporales de gestación más tempranos o más tardíos.

Como se muestra en las Figuras 2 A-D, la tinción de H&E reveló que se encuentran más estructuras bronquiales y bronquiolares en los tejidos recogidos a las 20-22 semanas en comparación con los tejidos recogidos en unos puntos temporales más tempranos. Para definir las diferencias potenciales en los niveles de progenitores en estos tejidos, se analizó la presencia de una supuesta subpoblación progenitora de células pulmonares epiteliales basales, que previamente se ha demostrado que expresan las citoqueratinas 5 (CK5) y 14 (CK14). Estos marcadores distintivos están regulados por disminución tras la diferenciación, en paralelo con la expresión del fenotipo más maduro positivo para CK8/CK18.

Como puede observarse en la Figura 2 E, se encontró una notable frecuencia de células positivas para CK5 en las vías respiratorias mayores junto con la expresión de la CK14 (Figura 2 F), mientras que se encontró una abundancia un poco menor en los alveolos en desarrollo. Adicionalmente, esta tinción inmunohistológica reveló que las células CK5+ estaban rodeadas por células nestina⁺ (Figura 2 G) y algunas de ellas mostraban las propiedades de los cuerpos neuroepiteliales marcadas por la proteína relacionada con un gen de la calcitonina (CGRP). Como puede observarse en la Figura 2 H, esta innervación fue adicionalmente revelada por la tinción de los neurofilamentos (NF), lo que sugiere una arquitectura de nichos de células madre similar a las definidas previamente para las células madre hematopoyéticas de la médula ósea y de las vías respiratorias del ratón adulto. Adicionalmente, en línea con un informe muy reciente relativo al nicho de BM, el nicho de epiteliales CK5⁺ también contenía células positivas para la actina alfa del músculo liso (Figura 2 I y Figuras 5 A-D) y células mesenquimatosas Vimentina⁺ (Figura 2 J).

De forma importante, el análisis morfométrico mostró una abundancia relativa de progenitores CK5⁺ en el tejido 'ventana' de 20-22 semanas de gestación, lo que sugiere que es probable que la ventana óptima esté asociada con un mayor número de estos progenitores. Por lo tanto, en el tejido recogido a las 20-22 semanas de gestación, se encontró que el área de CK5+ representaba un promedio del 14,1 % ± 5,6 del tejido pulmonar total, en comparación con el 5,26 % ± 1,06 (P = 0,0006) o el 6,05 % ± 0,18 (P = 0,002), en tejidos de 15 semanas y de 17 semanas, respectivamente (Figuras 2 K-O).

Tomada en conjunto, esta "ventana de oportunidad" para la recolección de pulmón embrionario como fuente para el trasplante puede ser explicada en parte por la frecuencia de células progenitoras epiteliales positivas para CK5 y sus respectivos nichos. Para investigar adicionalmente otros posibles progenitores en diferentes tejidos embrionarios se usó un análisis mediante FACS para determinar la presencia de diversos fenotipos recientemente atribuidos a las células madre pulmonares humanas pluripotenciales. En particular, se centró la atención en dos fenotipos. El primero, una subpoblación rara, que se tiñó positiva para la c-kit (CD 117) y negativa para muchos marcadores de diferenciación, incluyendo el CD34, fue descrita recientemente por Kajstura et al. fundamentalmente en el tejido pulmonar adulto, pero también en tejido embrionario, los autores sugirieron que estas células representan una célula madre pulmonar multipotente, con capacidad de autorrenovación [Kajstura J. et al., N Engl J Med. (2011) 364 (19): 1795-806; Anversa P. et al., Nat Med. (2011) 17 (9): 1038-9] y con potencial de regeneración para todas las estirpes pulmonares. Sin embargo, Suzuki et al. mantienen que en el pulmón embrionario, las células C-Kit⁺ también expresan el CD34 y son probablemente progenitores endoteliales [Moodley Y. et al., N Engl J Med. (2011) 365 (5): 464-6; Suzuki T. et al., American Journal of Respiratory y Critical Care Medicine (2010) 181 (1 Meeting Abstracts):

A4898], por lo tanto, también se evaluó la presencia de las células C-Kit⁺CD34⁺ (Figuras 2 P-Z).

En este punto, las suspensiones de células individuales obtenidas a partir de tejidos pulmonares embrionarios humanos tratados enzimáticamente, recogidas a las 16, 18 y 20 semanas de gestación, fueron analizadas para evaluar la expresión de varios marcadores de diferenciación, incluyendo el CD34 (específico para los progenitores hematopoyéticos y endoteliales), el CD45 (células hematopoyéticas), el CD31 (marcador de células endoteliales), el CD117 (c-KIT, para la identificación de progenitores tempranos), el CD271 (NGFR, marcador de células madre mesenquimatosas) y el CD326 (EPCAM, marcador de diferenciación epitelial).

De forma impresionante, se encontró que la población no hematopoyética negativa para CD45 comprendía tres poblaciones progenitoras distintas C-Kit⁺, incluyendo células CD34^{high}, CD34^{intermediate} y CD34^{negative} (Figuras 2 P-T). Aunque esta última población es compatible con las células madre pulmonares adultas pluripotenciales tempranas, las otras células CD34⁺ podrían estar más fuertemente diferenciadas hacia una estirpe endotelial que también expresa unos elevados niveles de CD31 (Figuras 5 A-I).

De forma interesante, la subpoblación C-Kit⁺ CD34^{neg} era claramente más abundante en los tejidos recogidos a las 20 semanas (aproximadamente hasta un 2 - 3 % de la población CD34^{neg}) en comparación con unas edades de gestación más tempranas (menos del 0,15 %) o con el tejido pulmonar adulto usado como control (menos del 0,45 %, Figuras 6 A-L). Estas células únicas C-Kit⁺CD45-CD34-CD271-, que también eran negativas para CD31 y CD326 (Figuras 7 A-I), en línea con Kajstura et al., también podrían ser identificadas mediante una inmunohistología. Por lo tanto, como se muestra en las Figuras 3 A-C, estos posibles progenitores estaban presentes a unos bajos niveles en estrecha proximidad de las vías aéreas mayores, principalmente en los espacios perivasculares.

De forma importante, cuando los tejidos pulmonares se analizaron mediante una tinción inmunohistológica para CD117 y CD34, se encontraron varias subpoblaciones celulares distintas similares a las encontradas mediante el análisis de FACS. El análisis de un pulmón humano de 20 semanas se muestra en las Figuras 4 A-K; una gran mayoría de las células CD117⁺ expresaban conjuntamente el CD34 y residían en los vasos sanguíneos (Figuras 4 A-C) rodeando a los alveolos en desarrollo (Figuras 4 D-G), mientras que la subpoblación menor de células individuales positivas CD117⁺ se encontró en estrecha proximidad de los grandes vasos sanguíneos y las vías aéreas mayores (Figura 4 H-K). Se encontró un patrón similar en la distribución de las células CD117⁺ en tejidos pulmonares con una edad de gestación más temprana (Figuras 8 A-D), aunque el porcentaje total, revelado mediante FACS, era significativamente mayor en el tejido de 20 semanas (Figuras 2 A-Z). Adicionalmente, como se muestra en las Figuras 9 A-D, los tejidos embrionarios de 20 semanas también muestran células progenitoras endoteliales tempranas y tardías (EPC) que pueden tener un papel único en la reparación microvascular del pulmón. Por lo tanto, también se encontró que este tejido mostraba la presencia de dos subpoblaciones CD34+CD31+ distintas. La primera identificada mediante una tinción positiva para CD14 y CD45, mientras que la segunda subpoblación es CD45 CD105+, en línea con los estudios previos que sugieren la presencia de estos dos tipos principales de EPC en la sangre periférica humana [Yoder MC et al., Blood. (2007) 109 (5): 1801-9]. El último, denominado 'EPC tempranos', está caracterizado por un crecimiento temprano *in vitro*, positividad para CD34/CD31/CD14, una capacidad de formar tubos en un ensayo de formación de tubos de Matrigel y unos elevados niveles de secreción de citocinas. El otro tipo de EPC, denominado 'EPC de crecimiento tardío', 'células endoteliales de excrecencia (OEC)' o 'células endoteliales formadoras de colonias (ECFC)' se caracteriza por una positividad para CD31 y CD105, una ausencia de CD45 y de CD14 y la capacidad única de formar espontáneamente vasos sanguíneos humanos cuando son implantadas en un gel en ratones inmunodeficientes, integrándose con los vasos murinos de la circulación sistémica.

Ejemplo 2

Estudio preliminar de eficacia en modelos de ratón para el potencial regenerativo de la 'ventana' del trasplante de pulmón embrionario

'Ventana' óptima para la recogida de tejido precursor pulmonar embrionario de ratón para trasplante

Con objeto de evaluar el potencial curativo del tejido derivado de pulmón embrionario en modelos de ratón apropiados, se definió inicialmente la "ventana" óptima para la recogida del pulmón embrionario de ratón para trasplante, al igual que para su homólogo humano. Por lo tanto, el tejido embrionario pulmonar de ratón se recogió en los diferentes puntos temporales de gestación (E14-E17), se implantó bajo la cápsula renal de ratones singénicos y 8 semanas después del trasplante, los implantes fueron evaluados para analizar la presencia de parénquima pulmonar, de estructuras bronquiales y alveolares, así como la presencia no deseada de fibrosis y quistes.

Como puede observarse en las Figuras 10 A-E, doce semanas después del trasplante renal subcapsular, el tejido pulmonar E14 y E17 dio como resultado la formación de tejido quístico y fibrótico (Figuras 10 A-B), mientras que el pulmón embrionario de ratón E15-E16 mostró un potencial notable para diferenciarse adicionalmente y alcanzar la fase alveolar (Figura 10 C-E). Por lo tanto, de forma similar al tejido pulmonar humano, la fase canalicular de desarrollo del pulmón ofrece la ventana óptima para la recolección del tejido para trasplante (Figura 10 F). También, de forma similar al tejido 'ventana' humano, el tejido pulmonar E16 no mostró alveolos (Figura 11 A); las células

positivas para CK-5 eran abundantes en las vías respiratorias mayores, y se encontraron numerosos cuerpos neuroepiteliales en la totalidad de la muestra, que se tiñeron positivamente para la CGRP y estaban localizados en nichos (Figura 11 B) de forma similar a la médula ósea y el pulmón de ratón adulto (Figuras 12 A-F). Asimismo, se encontraron células positivas para CCSP en la región de las vías respiratorias mayores, que eran ricas en células positivas para nestina (Figura 11 C), lo que sugiere nichos de células madre, y estaban rodeadas por células positivas para alfa-SMA (Figura 11 D).

Además, de forma similar a sus homólogos humanos, el tejido E15-E16 estaba enriquecido en supuestos progenitores en comparación con los tejidos de una gestación más temprana o más tardía, como se muestra mediante un análisis de FACS de las células $CD45^+CD31^+EpCAM^+CD24^+CD49TOD104^+$, recientemente establecidas como supuestos progenitores pulmonares en el pulmón de ratón adulto [McQualter JL et al., Proceedings of the National Academy of Sciences. (2010) 107 (4): 1414]. Por lo tanto, como puede observarse en las Figuras 3 E-Y, que representan un análisis representativo mediante FACS de suspensiones de células individuales E13, E14, E15 y E16, se encontraron unos niveles notablemente mayores de células $CD45^+CD31^-EpCAM^+CD24^+CD49^+CD104^+$ en el tejido pulmonar E15 y E16 ($0,062\% \pm 0,007$ y $0,073\% \pm 0,005$, respectivamente) en comparación con el nivel en el tejido E13 y el E14 ($0,002 \pm 0,00057\%$ y $0,012 \pm 0,0057\%$, respectivamente).

Trasplante de células pulmonares embrionarias de ratón E16 para el tratamiento de una lesión pulmonar

Considerando que los tejidos E15-16 muestran un potencial de crecimiento y de diferenciación notables tras el trasplante, este tejido 'ventana' fue evaluado adicionalmente en un modelo de ratón de lesión pulmonar.

Con este fin, estas células fueron evaluadas inicialmente en un modelo basado en la inducción de una lesión con naftaleno, como se ha descrito previamente [Stripp B et al, American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. (1995) 269 (6): 791]. Este modelo de lesión pulmonar simula las enfermedades pulmonares causadas por una lesión epitelial leve, detectables mediante cambios en la expresión de las células claras pulmonares.

La particular ubicación anatómica de las células claras en los bronquiolos respiratorios y en las uniones broncoalveolares permitió localizar de forma precisa el sitio de la lesión después de la exposición al naftaleno y comprobar la capacidad de una suspensión de células individuales de células embrionarias "ventana" para colonizar y restaurar la capa epitelial lesionada en receptores singénicos.

Dos días después de la administración del naftaleno, se infundieron ratones C57BL con 1×10^6 células pulmonares E16, derivadas de ratones gestantes positivos para GFP. Posteriormente, los pulmones de los animales tratados fueron evaluados histológicamente en diferentes puntos temporales para evaluar la presencia de células positivas para GFP. Estos experimentos iniciales (no mostrados) revelaron que la ablación de las células claras por parte del naftaleno era temporal y podía no permitir un injerto y desarrollo significativo de las células claras derivadas del donante. Por lo tanto, los presentes inventores formularon la hipótesis de que podría requerirse un régimen de acondicionamiento más agresivo, que elimine más eficazmente la proliferación de células madre residentes, para la evaluación de la capacidad de regeneración de las células del donante, como se ha averiguado habitualmente en los estudios que miden la inducción de quimerismo después del trasplante de médula ósea.

Para evaluar esta hipótesis, 40 horas después de la lesión por naftaleno, los animales se trataron adicionalmente con una TBI subletal (6 Gy) de forma que se eliminaran las células madre pulmonares residentes, que potencialmente son inducidas a proliferar por un tratamiento previo con naftaleno.

Después de 1 día, los ratones recibieron células pulmonares E16 y se realizó un seguimiento del injerto y el desarrollo de las células derivadas del donante en sus pulmones mediante una tinción inmunohistológica acoplada a un análisis morfométrico, así como mediante una microscopía bifotónica.

Como se muestra en las Figuras 13 A-C, los 'parches' positivos para GFP, que indican el injerto de las células derivadas del donante en los pulmones del receptor, habían aumentado notablemente 30 días después del trasplante, en los ratones acondicionados tanto con naftaleno como con 6 Gy de TBI (Figura 13 C) en comparación con solo con TBI (Figura 13 A) o solo con naftaleno (Figura 13 B). Este notable impacto del acondicionamiento sobre el nivel de quimerismo pulmonar se demuestra cuantitativamente en la Figura 13 D, que representa el análisis morfométrico de los parches de GFP encontrados en tres experimentos independientes que comprenden un total de nueve ratones en cada grupo. Por lo tanto, mientras que se encontraron 55 focos/mm^3 de focos derivados del donante en los ratones acondicionados con naftaleno y 6 Gy de TBI, únicamente se encontraron $10-12 \text{ focos/mm}^3$ y $2-3 \text{ focos/mm}^3$ en los ratones acondicionados solo con naftaleno o con TBI, respectivamente.

El análisis inmunohistológico de los ratones que muestran pulmones quiméricos reveló adicionalmente el nivel de integración en los pulmones receptores. Como se muestra en la Figura 14 A, las luces de las vías respiratorias mayores de los ratones de control sin tratar mostraban claramente la presencia de células claras $CCSP^+$ y estas células experimentaron una ablación y un desprendimiento inmediatamente después del acondicionamiento (Figura 14 B). Sin embargo, los ratones trasplantados después del acondicionamiento de elección mostraron, el día 30

después del trasplante, la formación de una nueva capa epitelial y se encontraron células GFP⁺ injertadas en las luces bronquiales. Estas células GFP⁺ derivadas del donante se incorporaron en las vías respiratorias bronquiales y alveolares del hospedador y estaban vascularizadas, según se muestra mediante una tinción de V-cadherina (Figura 14 C); también expresaban CCSP (Figuras 14 D-F) y eran positivas para la expresión de Sp-c (Figuras 14 G-I) y de CFTR (Figuras 14 J-L), lo que sugiere su capacidad para la producción de tensioactivo y su implicación en el transporte de iones. Como se esperaba, estos marcadores funcionales específicos eran mostrados de forma diferencial por las células GFP⁺ injertadas según su ubicación. Por lo tanto, en las vías respiratorias mayores, las células eran positivas para CCSP y en los alveolos, las células injertadas eran positivas para sp-C, pero se encontró que todas las células expresaban el CFTR, lo que tiene una significación particular para la potencial corrección de la fibrosis quística (FQ).

De forma interesante, cuando se ensayaron en unos puntos temporales posteriores después del trasplante, los focos iniciales estaban claramente creciendo en tamaño y ocupando por tanto una mayor proporción de los pulmones injertados. Esto fue adicionalmente demostrado mediante una microscopía bifotónica, que permite la visión directa de los pulmones inmediatamente después del sacrificio, con o sin una tinción conjunta intravital de los vasos sanguíneos con puntos cuánticos rojos para el marcaje vascular fluorescente (datos no mostrados). Como puede observarse en las Figuras 15 A-C, aunque se encontró un injerto moderado en el pulmón por parte de las células de tipo donante a las 6 semanas después del trasplante, con una integración predominante de las células GFP⁺ trasplantadas en las estructuras broncoalveolares y vasculares (Figuras 15 A-B), se encontró una progresión adicional de las células de tipo donante ocupando prácticamente un tercio del tejido pulmonar a los 4 meses después del trasplante (Figura 15 C).

Adicionalmente, la evaluación inmunohistológica de estos pulmones quiméricos a las 16 semanas después del trasplante revela la total integración de las células derivadas del donante en la superficie de intercambio gaseoso de la interfase de los vasos sanguíneos y en las estructuras epiteliales alveolares (Figuras 16 A-L). Por lo tanto, se encontraron células GFP⁺ mediante una tinción triple con CD31 y anticuerpos anti-pancitoqueratina que estaban incorporadas en los compartimentos vascular y epitelial de los pulmones trasplantados, sin indicios de cicatrización ni de fibrosis (Figuras 16 A-D y Figuras 17 A-E). Asimismo, la tinción AQP (Figuras 16 E-H) y SP-C (Figuras 16 I-L) reveló la incorporación de las células derivadas del donante en la superficie de intercambio gaseoso de los alveocitos de tipo I y de tipo II, respectivamente.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que las células pulmonares embrionarias recogidas a partir de un tejido 'ventana' podrían ofrecer una nueva fuente de células para la reparación del tejido pulmonar. Adicionalmente, se anticipa que la terapia con dichas células podría ser más eficaz si se combina con un acondicionamiento subletal, aunque esto podría ser menos crítico en las situaciones clínicas en las que los progenitores pulmonares del hospedador han sido notablemente eliminados por la lesión en curso.

Trasplante de una suspensión de células individuales derivadas de pulmón embrionario humano de 20-22 semanas en ratones NOD-SCID, después de la inducción de una lesión pulmonar con naftaleno y TBI

Para investigar la capacidad de las células pulmonares embrionarias humanas 'ventana' de integrarse en los pulmones lesionados, se estableció un modelo de lesión pulmonar en ratones SCID inmunodeficientes. Teniendo en cuenta que los ratones NOD-SCID son más sensibles a la TBI, se usaron 3,0 Gy de TBI en lugar de los 6,0 Gy de TBI usados en los estudios con tejido donante de ratón, descritos anteriormente. Adicionalmente, para sustituir el marcaje genético de GFP, se usó una inmunohistología con anticuerpos específicos de ratón y humanos para distinguir entre las células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas del hospedador y del donante.

Por lo tanto, mientras que la infusión de 1×10^6 células recogidas después de la digestión enzimática de células pulmonares embrionarias humanas de 20 semanas en ratones NOD-SCID, acondicionados únicamente con NA, no dio como resultado ningún nivel de injerto apreciable (datos no mostrados), se consiguió un quimerismo notable después de la infusión del mismo número de células en ratones NOD-SCID acondicionados con naftaleno y un posterior tratamiento con 3,0 Gy de TBI (Figuras 18 A-I y 19 A-F).

En un experimento inicial a corto plazo se tiñó una suspensión de células individuales embrionarias humanas (de 20 semanas) derivadas de pulmón con el colorante fluorescente de seguimiento 5-(y-6)((4Clorometil)Benzoil)Amino)Tetrametilrodamina (CMTMR) y las células fueron infundidas en ratones NOD-SCID acondicionados. Cuando se analizaron 2 semanas después, las células humanas injertadas podían ser visualizadas en parches definidos en el pulmón de los ratones receptores (Figura 24 A), de forma similar a los parches de GFP⁺ encontrados en el modelo de trasplante singénico (Figura 24 B). Como la tinción con CMTMR es temporal, se llevó a cabo un segundo conjunto de experimentos para distinguir las células humanas y las de ratón en puntos temporales posteriores después del trasplante, mediante una tinción inmunohistológica mediante el uso de un anticuerpo anti-MHC de ratón que no presenta reactividad cruzada con el tejido humano de control (Figuras 24 C-E) y del anticuerpo anti citoqueratina MNF 116 humana (que tiñe las células epiteliales humanas), que no presenta reactividad cruzada con el tejido de ratón de control, según se verificó mediante una tinción doble en las Figuras 24 F-H.

De forma importante, a las 6 semanas después del trasplante, la tinción doble con estos anticuerpos reveló claramente un nivel significativo de quimerismo. Como puede observarse en las Figuras 18 A-C, que muestran con bajos aumentos los bronquios de ratón, la tinción doble con los marcadores de ratón y humanos muestra claramente la incorporación de las células humanas en la estructura pulmonar, y esto puede apreciarse adicionalmente con un aumento mayor de dos campos diferentes (Figuras 18 D-F y 18 G-I, respectivamente).

En un tercer conjunto de experimentos, las células pulmonares embrionarias humanas recogidas a las 20 semanas fueron trasplantadas en NOD-SCID tratados con NA y una TBI ligeramente mayor (4 Gy).

Los pulmones de ratón se tiñeron 7 semanas después del trasplante con marcadores adicionales que distinguen anti-ratón y antihumano. Por lo tanto, se mezclaron conjuntamente el anticuerpo anti-citoqueratina MNF 116 humana de ratón (que tiñe las células epiteliales humanas), anti V9 humana de ratón (que tiñe la vimentina 9, típica de las células estromales) y anti-CD31 humano de ratón (que tiñe las células endoteliales) y se colocaron en la sección de tejido; después las secciones se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Daylight 488 (verde). Las Figuras 19 A y 19 D muestran la tinción selectiva por parte de este cóctel de anticuerpos de los tejidos humanos en la estructura bronquial del pulmón de ratón. Las células de ratón en el pulmón de ratón se tiñeron con lectina Bandería. Se sabe que esta última se une a la fracción de α -Gal expresada en las células epiteliales y endoteliales de ratón, y como puede observarse, no presenta reactividad cruzada con el tejido humano cuando se controla individualmente (Figuras 19 B y 19 E) o junto con la tinción MNF Figuras 19 C y 19 F). Adicionalmente, mediante el uso de unos marcadores similares, también pudo detectarse un notable quimerismo en los alveolos de los ratones trasplantados (Figuras 20 A-F). De forma importante, también se encontró que las células pulmonares humanas derivadas del trasplante de las células embrionarias humanas mostraban varios marcadores funcionales importantes.

Como puede observarse en las Figuras 21 A-C, la tinción doble de las células humanas marcadas en verde por el cóctel descrito anteriormente (Figura 21 A) junto con un marcador general de citoqueratina, dio como resultado la tinción de todas las células epiteliales tanto de origen humano como de ratón (Figura 21 B), lo que ilustra unas células epiteliales específicas entre la población de células humanas en el pulmón injertado (Figura 21 C). Asimismo, se distinguían claramente células humanas positivas para aquaporin-5 (AQP-5), típicas de los alveocitos de tipo I (Figuras 22 A-C) y células humanas positivas para la proteína tensoactiva C (SP-C) características de los alveocitos de tipo II (Figuras 23 A-F) en el interior de los pulmones quiméricos de los animales trasplantados a las 7 semanas después del trasplante.

Por lo tanto, las células pulmonares humanas no solo son incorporadas en el pulmón lesionado de ratón, sino que también expresan la AQP-5, necesaria para la realización del intercambio gaseoso, o la SP-C, que indica la producción de tensoactivo por parte de los alveolos.

El tratamiento con células madre derivadas de pulmón embrionario no está asociado con el desarrollo de teratoma

Uno de los aspectos más controvertidos del trasplante de células madre embrionarias, que limita su aplicación clínica, es la potencial tumorigenicidad de los tejidos trasplantados. En estudios previos en los que los presentes inventores intentaron definir la 'ventana' óptima para diferentes tejidos precursores embrionarios porcinos, los resultados demostraron que más allá de E28, ninguno de los tejidos ensayados mostraba ningún riesgo de formación de teratomas [Eventov-Friedman S et al., Proceedings of the National Academy of Sciences. (2005) 102 (8): 2928]. Por lo tanto, la consideración de que los pulmones embrionarios se desarrollan tardíamente en la embriogénesis, y que consecuentemente, la 'ventana' de elección del tejido pulmonar embrionario de ratón, de cerdo o humano representa una fase de gestación relativamente tardía, el riesgo de inducción de teratomas asociado con dichos tejidos precursores es probablemente muy bajo. Sin embargo, para verificar adicionalmente esta importante cuestión, se llevó a cabo un análisis histológico detallado de los ratones trasplantados (n = 30) hasta 12 meses después del trasplante; no se encontró ningún signo de tumores en el tejido pulmonar trasplantado. Adicionalmente, el seguimiento a largo plazo de los ratones trasplantados mediante una micro-TC del pulmón (resolución de 80 μ m) no reveló ninguna lesión ocupante sospechosa en estos ratones. En las Figuras 25 A-D se muestra un sumario de estos resultados con imágenes representativas.

Análisis

Los presentes resultados ilustran que el tejido embrionario pulmonar de ratón o humano, obtenido en la etapa canalicular, puede ofrecer una fuente óptima de tejido para el trasplante. Adicionalmente, se propuso que el pulmón embrionario humano, rico en progenitores tempranos, se parece en sus atributos a los tejidos de la médula ósea y del cordón umbilical, cuyo uso para el trasplante en enfermedades hematopoyéticas ha aumentado drásticamente en la última década. Los tejidos embrionarios 'ventana', que muestran un crecimiento y una diferenciación óptimos tras su implantación en ratones SCID singénicos, están significativamente enriquecidos en diversos progenitores epiteliales, mesenquimatosos y endoteliales, en comparación con el tejido procedente de unos puntos temporales de gestación más tempranos o más tardíos. Además, un análisis detallado de estos progenitores tempranos en sus respectivos tejidos embrionarios reveló que los progenitores epiteliales residen en nichos específicos, similares a los descritos ampliamente para los nichos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Por lo tanto, los

presentes resultados han documentado, en las cercanías de posibles células progenitoras pulmonares, la semejanza de las células endoteliales, las células positivas para nestina y las células y mesenquimatosas, que también están normalmente innervadas, como se ha averiguado mediante una tinción positiva para CGRP y neurofilamentos. Estos resultados son coherentes con los estudios que indican la potencial existencia de nichos de células madre en el pulmón de ratón adulto [Engelhardt JF. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. (2001) 24 (6): 649-52],

Además de definir la ventana óptima para el uso del tejido fetal en trasplantes, que se correlaciona con la aparición de nichos de progenitores pulmonares embrionarios humanos, el presente estudio también arroja luz sobre un debate actual relativo al fenotipo de los progenitores pulmonares humanos. Por lo tanto, mientras que Kajstura et al. [Kajstura et al. 2011, *supra*] han descrito una pequeña población de células c-kit⁺ que son negativas para todos los demás marcadores que residen en áreas perivasculares individuales cercanas a las grandes estructuras de las vías respiratorias, los presentes inventores encontraron en los alveolos en desarrollo otra población de células c-kit⁺, que reside en los vasos sanguíneos, en estrecha proximidad de los progenitores CK5⁺, que expresan ambos antígenos CD34 y CD31, como sugirieron Suzuki et al. (Suzuki et al 2010, *supra*). Por lo tanto, el tejido embrionario pulmonar 'ventana', aquí caracterizado, contiene ambas supuestas poblaciones progenitoras positivas para c-kit. La estrecha proximidad y la potencial interacción de las células positivas para c-kit con los progenitores epiteliales CK5⁺ es coherente con la reciente sugerencia de que la activación c-kit es crucial para un normal desarrollo y mantenimiento de las estructuras alveolares [Lindsey JY et al., *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. (2011) 183 (1 Meeting Abstracts): A2445],

De forma importante, los tejidos de la "ventana canalicular óptima" muestran el mayor nivel de todos los tipos de progenitores relacionados con los tejidos pulmonares de unas etapas de desarrollo más tempranas; por lo tanto, los presentes inventores formularon la hipótesis de que el trasplante intravenoso de una mezcla de células no fraccionada, de forma similar a la metodología usada en el trasplante de médula ósea, podría ser la metodología preferida. De hecho, el trasplante de una suspensión de células individuales E15-E16 de pulmón de ratón o de tejido pulmonar humano de 20-22 semanas demostró la notable capacidad de regeneración de estas células tras una lesión pulmonar inducida por la combinación de naftaleno y 6,0 Gy de una TBI subletal. De forma crítica, este nivel de acondicionamiento antes del trasplante era necesario para establecer un quimerismo cuando había presentes progenitores pulmonares del hospedador a unos niveles significativos, como se ha averiguado después de la inducción de una lesión con naftaleno. Recientemente se realizó una observación similar por parte de Duchesneau et al. [Duchesneau P et al., *Molecular Therapy*. (2010) 18 (10): 1830-6] quien demostró que el injerto de células derivadas de médula ósea en estructuras pulmonares puede mejorarse notablemente mediante la intensificación del acondicionamiento mediante el uso del agente mielosupresor busulfano además de naftaleno. Claramente, la intensidad de este requisito para el acondicionamiento podría variar en diferentes situaciones clínicas, dependiendo del nivel entre la lesión pulmonar y los progenitores del hospedador afectados por el proceso patológico.

Tomados en conjunto, los presente resultados revelaron un robusto injerto en diferentes compartimentos del pulmón del hospedador y la formación de la totalidad de la unidad respiratoria, incluyendo los siguientes elementos: a) células epiteliales recién formadas en pequeños bronquiolos, manifestadas en forma de células GFP⁺CCSP⁺, b) células de neumocitos de tipo 1 (GFP⁺AQP-5⁺), importantes para superficie de intercambio gaseoso del interior de los alveolos, c) células de neumocitos de tipo 2 (GFP⁺ Sp-C⁺), importantes para la producción de tensioactivo en los alveolos, d) una fuerte presencia de células GFP⁺ CD31⁺ en la vasculatura. Además, el tejido injertado muestra, junto con los elementos respiratorios, la expresión del CFTR necesario para el transporte de iones, especialmente crítico para los pacientes de FQ.

Este injerto más bien drástico después de una "doble lesión", por oposición al acondicionamiento con cada agente individualmente, podría ser explicado por la competición entre los progenitores del hospedador y del donante por sus respectivos nichos. Reynolds et al. [Reynolds SD et al., *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. (2004) 287 (6): L1256-65] demostraron que la eliminación de la población de células que expresan el CCSP por parte del naftaleno da como resultado una inflamación alveolar secundaria, un edema y un agotamiento de la población de células alveolares de tipo II. Por lo tanto, una lesión selectiva en las vías aéreas puede servir como una lesión desencadenante en las enfermedades caracterizadas por una función alveolar gravemente comprometida. Adicionalmente, Volscaert et al. [Volckaert T et al., *J Clin Invest*. (2011) 121 (11): 4409] demostraron que la cascada de señalización embrionaria Wnt/Fgf10 es reactivada en las células del músculo liso parabronquial maduras (PSMC) tras una lesión inducida por naftaleno, de una forma que activa la señalización Notch y la posterior transición de epitelial a mesenquimatoso; este hallazgo indica que la activación de esta ruta embrionaria podría servir probablemente como desencadenante para una incorporación eficaz del tejido derivado de pulmón embrionario en los diferentes compartimentos pulmonares. Asimismo, se demostró que la lesión pulmonar inducida por radiación induce la ruptura de la barrera hematoalveolar y una disfunción en la microcirculación, y podría permitir por tanto la dominancia de las células endoteliales derivadas del donante (45-47).

Independientemente del mecanismo implicado, el notable injerto en el modelo de ratón de las células derivadas del donante conseguido en ambas estructuras bronquiolares y alveolares es sorprendente. Este quimerismo, que aumenta con el tiempo, puede ser atribuido probablemente a los múltiples progenitores donantes del tejido pulmonar embrionario implantado, que permiten que la progenie de las células madre tempranas pluripotenciales con

autorrenovación sustituyan gradualmente a las células del hospedador o del donante derivadas de precursores tardíos.

5 También se observó una interacción y un desarrollo pulmonar similar cuando se ensayaron progenitores pulmonares humanos en ratones NOD-SCID, aunque en este sistema la potencial pérdida de intercomunicación con las citoquinas de ratón podría reducir el injerto. Por lo tanto, en tres conjuntos de experimentos, los presentes resultados ilustraron que las células humanas derivadas del donante se incorporan tanto en las estructuras bronquiolares como en las alveolares, mostrando unas características similares a las descritas anteriormente para las células pulmonares embrionarias de ratón singénicas.

10 Se requieren estudios adicionales para definir los protocolos óptimos de supresión inmunitaria que permitirán un trasplante con éxito en receptores alogénicos. En general, la fase embrionaria temprana podría hacer que el tejido donante implantado fuera menos inmunógeno; sin embargo, los trasplantes de tejido embrionario no pueden evadir la ruta indirecta de rechazo. No obstante, este reto puede ser abordado mediante protocolos que incluyan agentes que inducen un bloqueo coestimulante. Alternativamente, el notable nivel de progenitores hematopoyéticos (resultados no publicados) en el tejido pulmonar embrionario podría dar como resultado un quimerismo hematopoyético que podría inducir una tolerancia central hacia las células pulmonares derivadas del donante después del trasplante. Además, la posibilidad de criopreservar las suspensiones de células individuales de tejido pulmonar de 20-22 semanas, que podría mejorar notablemente la disponibilidad del trasplante, también podrían permitir el establecimiento de bancos de donantes clasificados según el HLA al igual que para la sangre de cordón umbilical, y por lo tanto podrían reducir potencialmente los requisitos de supresión inmunitaria.

20 Finalmente, el presente tejido embrionario de ratón 'ventana' no mostró ningún riesgo de teratoma cuando se realizó un seguimiento durante periodos prolongados de tiempo después del trasplante, mediante una micro-TC de alta resolución (80 μm) así como mediante un análisis patológico al final del periodo de seguimiento.

25 En resumen, los presentes resultados demuestran por primera vez que la fase de gestación canalicular ofrece una 'ventana' óptima para la recolección de tejido precursor pulmonar embrionario de ratón y humano para un trasplante regenerativo. Este tejido, que está exento de riesgo de teratoma, es muy rico en diversos tipos progenitores que fueron identificados mediante una inmunohistología en sus respectivos nichos, de forma similar a las HSC de la médula ósea. Puede proporcionarse un notable injerto, diferenciación y robusta incorporación de estos progenitores en los pulmones lesionados mediante la infusión de una suspensión de células individuales preparada mediante la digestión enzimática de tejido pulmonar embrionario. Al igual que en el trasplante de médula ósea, la inducción de un quimerismo en el pulmón depende de alguna forma del acondicionamiento, de forma que se reduzca la competencia con los precursores endógenos del tipo del hospedador. A pesar de que se han propuesto varios intentos de aislamiento de células madre pluripotenciales a partir de pulmones adultos y de expansión de estas células en un cultivo con el fin de un trasplante regenerativo, los presentes resultados demuestran que el tejido pulmonar embrionario recogido en las semanas 20-22 de gestación podría ofrecer potencialmente una modalidad alternativa más simple para la reparación del pulmón.

40 Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que para los expertos en la materia serán evidentes muchas alternativas, modificaciones y variaciones. Además, la mención o la identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debería ser interpretada como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior de la presente invención. En la medida en que se usan encabezamientos de sección, éstos no deberían interpretarse como necesariamente limitantes.

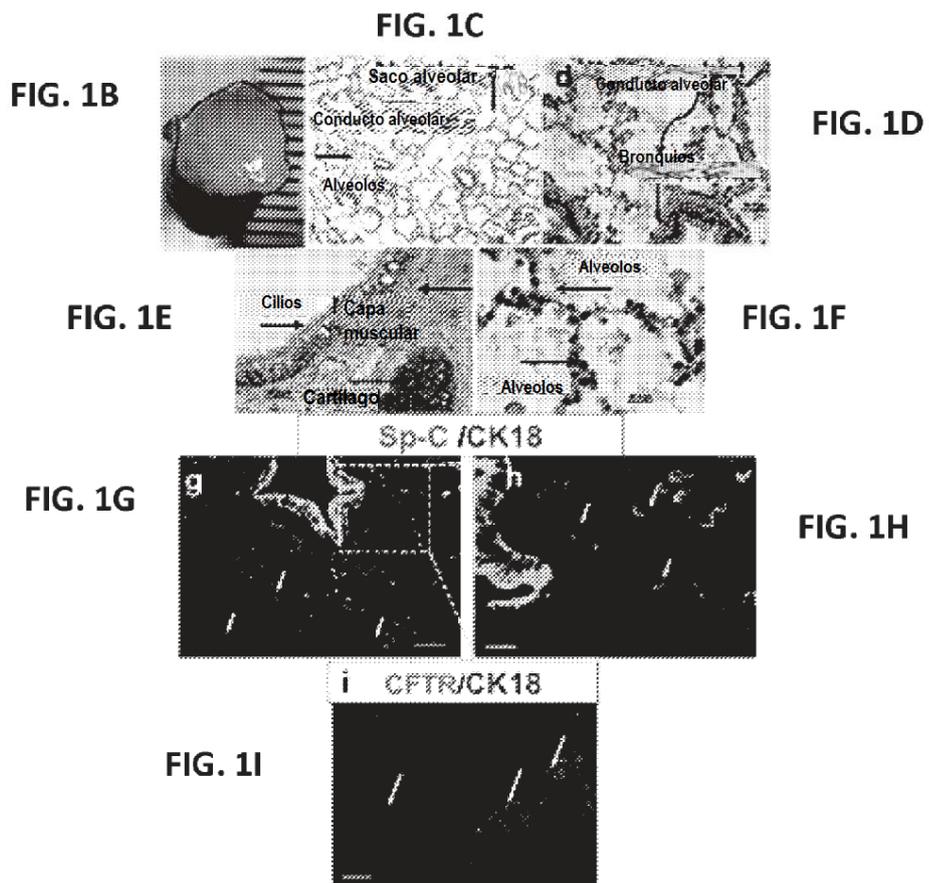
REIVINDICACIONES

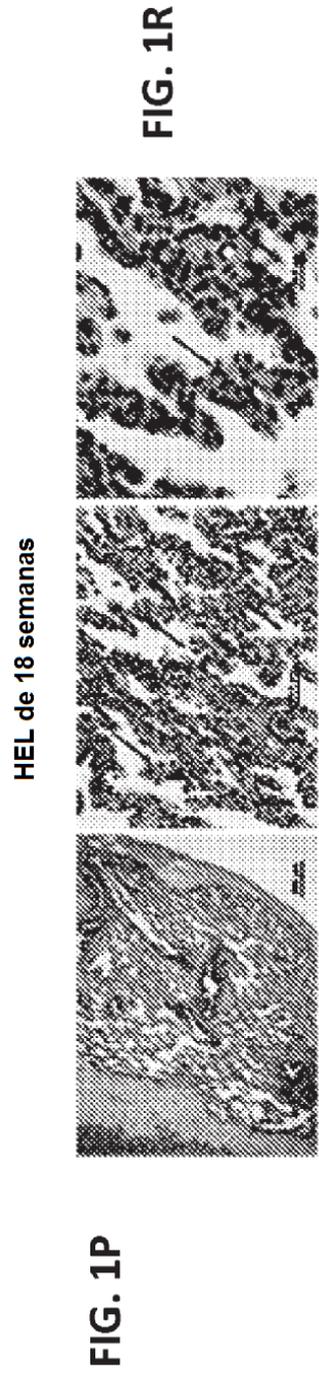
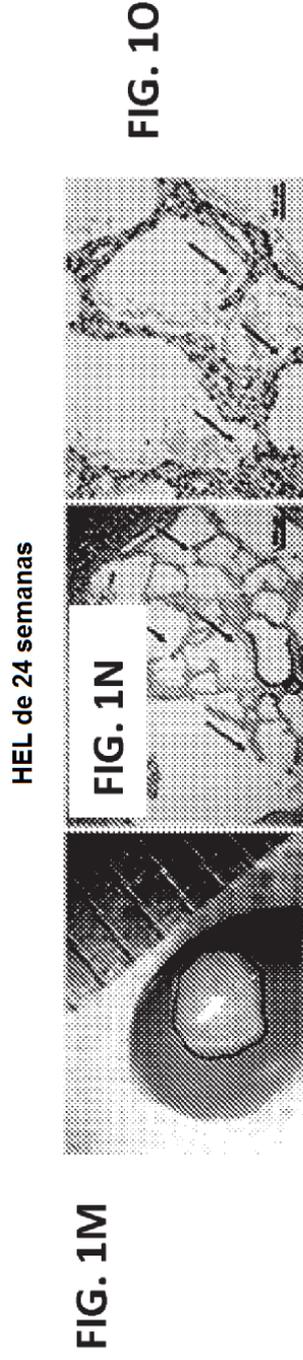
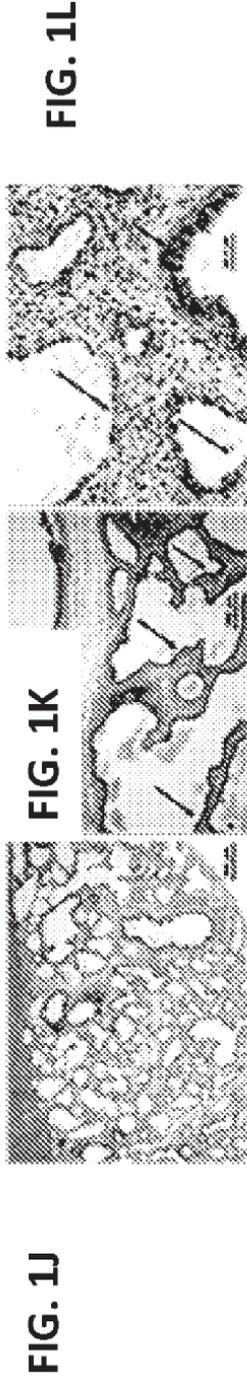
- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo una población aislada de una suspensión de células procedentes de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en la que dicho tejido pulmonar fetal está en una fase de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de 20 y 22 semanas de gestación.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicha fase de gestación es de entre 20 y 21 semanas de gestación.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicha fase de gestación es de entre 21 y 22 semanas de gestación.
- 15 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.
- 20 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dichas células comprenden la expresión de un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 20 la expresión de un marcador de citoqueratina 5+ (CK5+); o
- la expresión de un marcador de citoqueratina 5+ (CK5+) y de citoqueratina 14+ (CK14+); o
- la expresión de un marcador de c-Kit+ CD45- CD34- CD31- CD326- CD271-; o
- la expresión de un marcador de c-Kit+ CD34+ CD31+; o
- 25 la expresión de un marcador de c-Kit+ CD34+ CD326+; o
- la expresión de un marcador de CD34+ CD31+ CD14+ CD45+; o
- la expresión de un marcador de CD34+ CD31+ CD45- CD105+; o
- la expresión de un marcador de nestina+ y/o de una proteína relacionada con el gen de la calcitonina+ (CGRP+);
- y
- 30 la expresión de un marcador de la actina alfa del músculo liso+ (alfa-SMA+) y/o de Vimentina+.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dichas células son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional o de regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial.
- 35 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que dicho tejido pulmonar estructural/funcional comprende la generación de un pulmón quimérico y/o una capacidad para realizar el intercambio gaseoso y/o una capacidad para sintetizar tensioactivo y/o una capacidad para el transporte de iones.
- 40 8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de una afección en la que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un sujeto que lo necesite,
- dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en un trastorno, una enfermedad o una lesión pulmonar; un trastorno, una enfermedad o una lesión renal; un trastorno, una enfermedad o una lesión hepática; un trastorno, una enfermedad o una lesión cardíaca; un trastorno, una enfermedad o una lesión del tracto gastrointestinal; un
- 45 trastorno, una enfermedad o una lesión de la piel; y un trastorno, una enfermedad o una lesión del cerebro;
- dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa se selecciona entre el grupo que consiste en úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, defectos en la curación de heridas, cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis,
- 50 lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar, lesión pulmonar y degeneración de la córnea;
- dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa se selecciona
- 55 entre el grupo que consiste en una enfermedad o una afección cardíaca, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunes, leucemia, cáncer, anemia drepanocítica, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos; y
- dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido endotelial es beneficiosa se selecciona entre el
- 60 grupo que consiste en enfermedad vascular, isquemia, anemia drepanocítica, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunes.
9. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un trastorno o de una lesión pulmonar en un sujeto que la necesite.
- 65 10. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicha composición está formulada para su administración por vía intravenosa.

11. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que comprende adicionalmente un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal.
- 5 12. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que dicho acondicionamiento subletal, letal o supraletal se selecciona entre el grupo que consiste en una irradiación corporal total (TBI), una irradiación corporal parcial, un acondicionamiento mielosupresor, un bloqueo coestimulante, un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia con anticuerpos.
- 10 13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que dicho acondicionamiento comprende un tratamiento con naftaleno y/o una irradiación corporal total (TBI) y/o una irradiación corporal parcial.
14. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicho sujeto es un sujeto humano.
- 15 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicho tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.
- 20 16. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en la que dicha población aislada de la suspensión de células no es singénica con el sujeto.
- 25 17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en la que dicho trastorno o lesión pulmonar se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, enfermedad pulmonar crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia en la proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.
- 30 18. Un banco de células que comprende una pluralidad de poblaciones de células aisladas a partir de tejidos pulmonares fetales de mamífero, en el que dichos tejidos pulmonares fetales están en una fase de desarrollo que se corresponde esencialmente con la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada entre un intervalo de entre 20 y 22 semanas de gestación y en el que dicha pluralidad de poblaciones de células ha sido clasificada según el tipo de HLA para formar un banco de células alogénicas, dispuesta individualmente cada una en recipientes individuales y, opcionalmente, en el que dicho banco de células comprende adicionalmente un catálogo que comprende información sobre dichas células clasificadas según el HLA de dicha pluralidad de poblaciones de células.
- 35 19. El banco de células de la reivindicación 18, en el que dicho tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.
- 40 20. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8-17 o el banco de células de la reivindicación 18, en los que dicho tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido fetal no humano.

FIG. 1A

Edad de gestación	15-19 semanas (n=30)	20-22 semanas (n=25)	23-24 semanas (n=10)
Tamaño del injerto ϕ (mm ³) promedio ± DT	61 ± 3	300 ± 15	10 ± 2





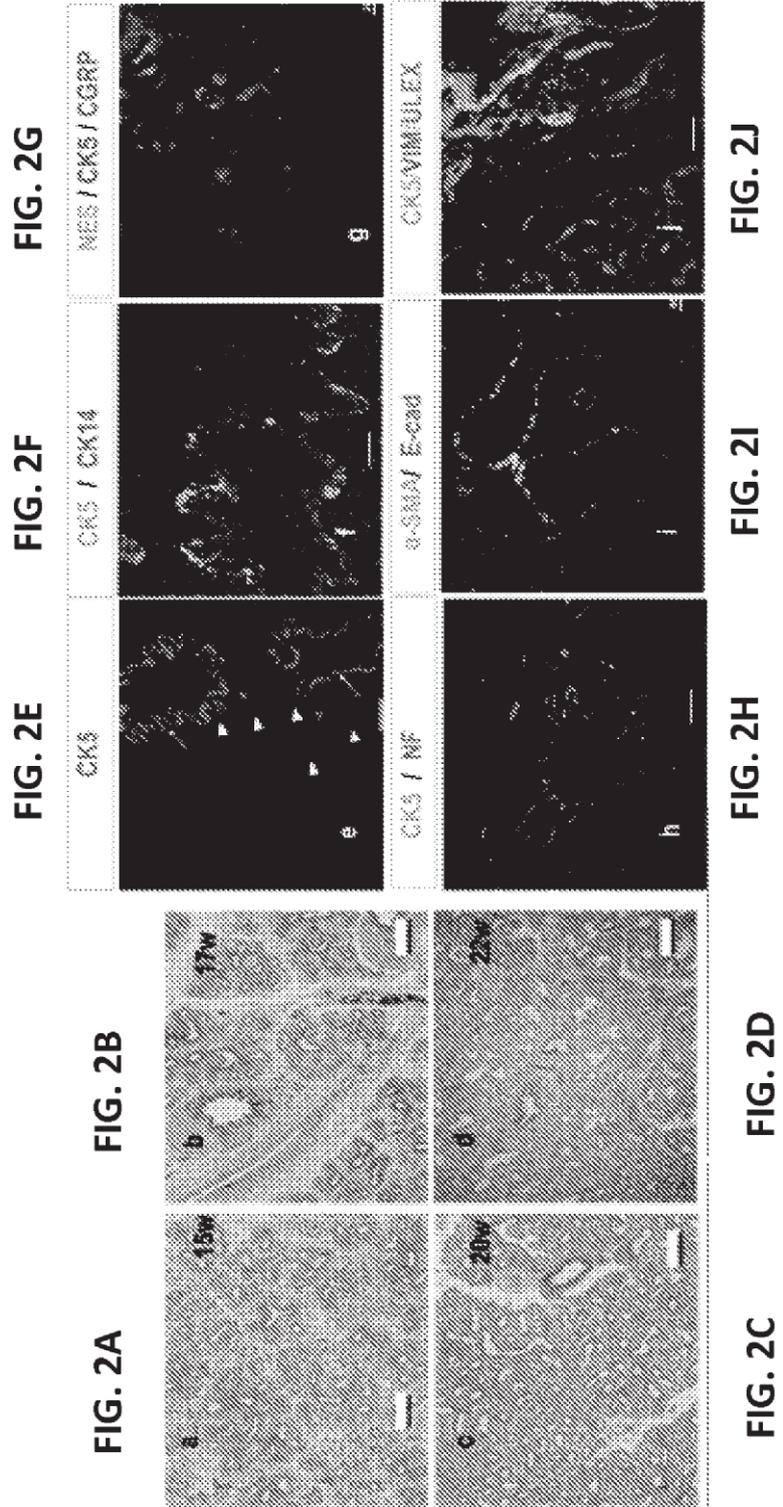


FIG. 2K



FIG. 2L

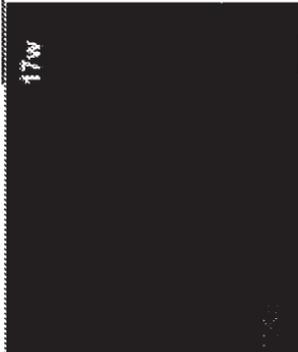


FIG. 2O

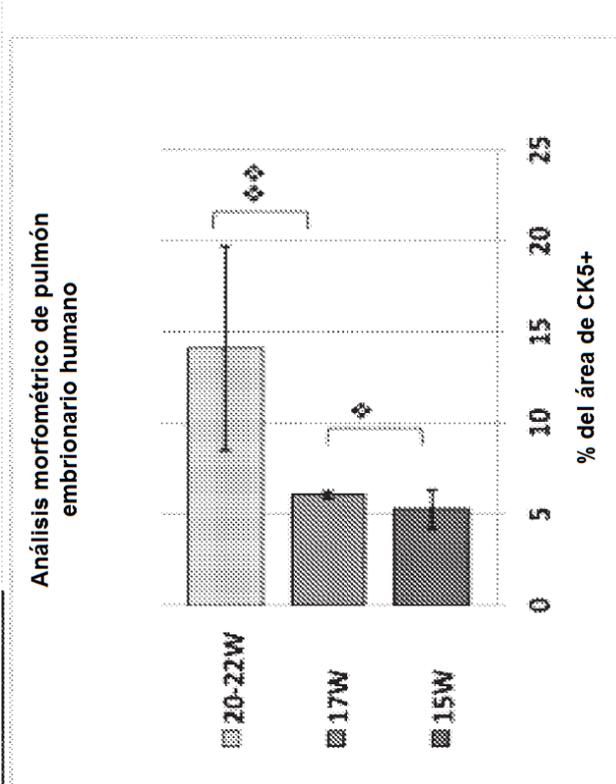


FIG. 2M

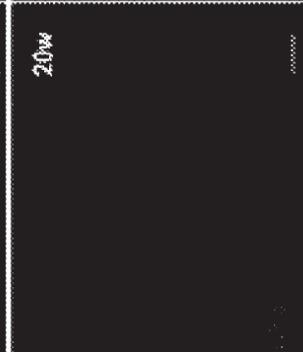
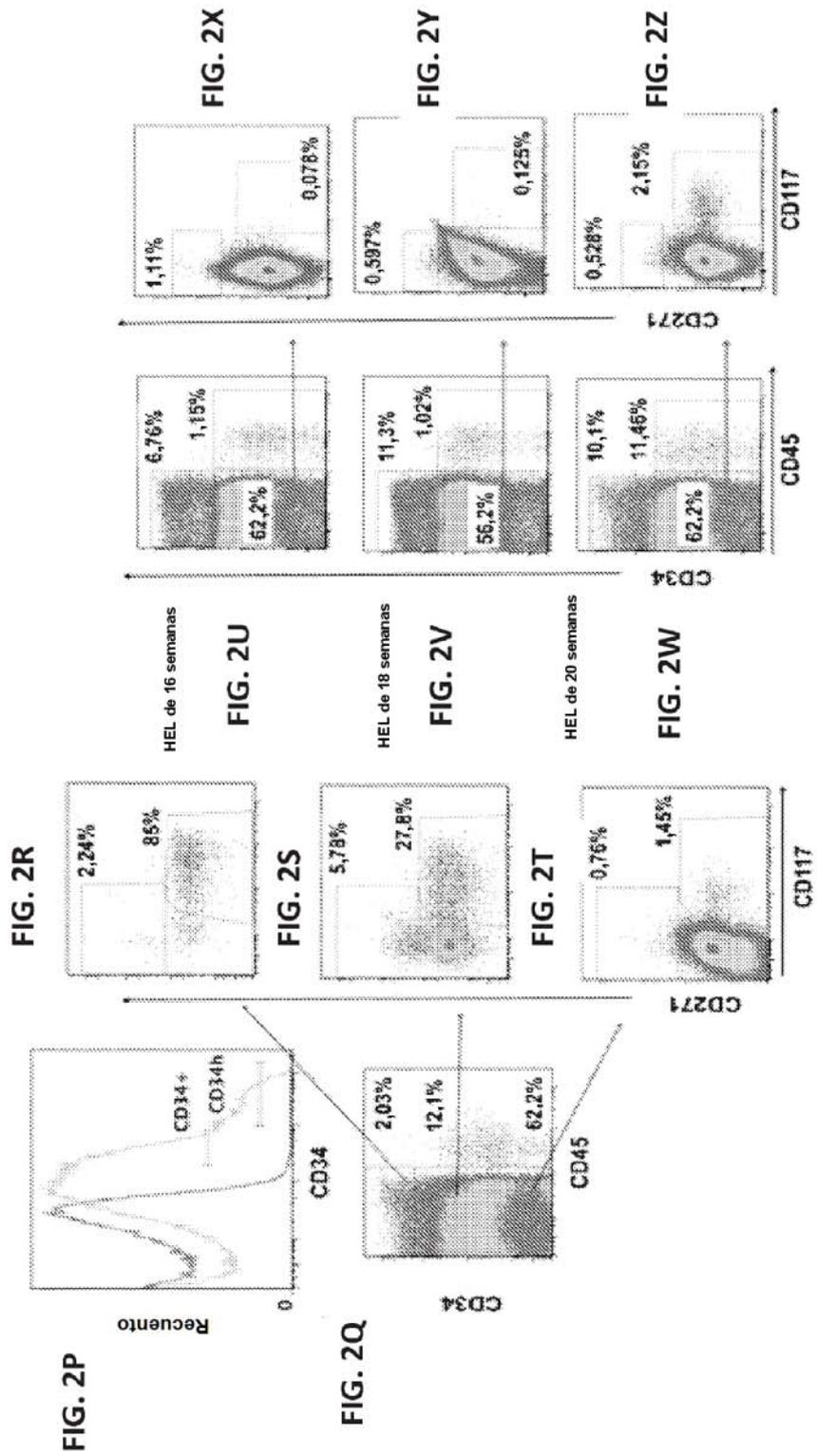


FIG. 2N





CD117/CK5/ULEXColocalización del vaso sanguíneo y de CD117

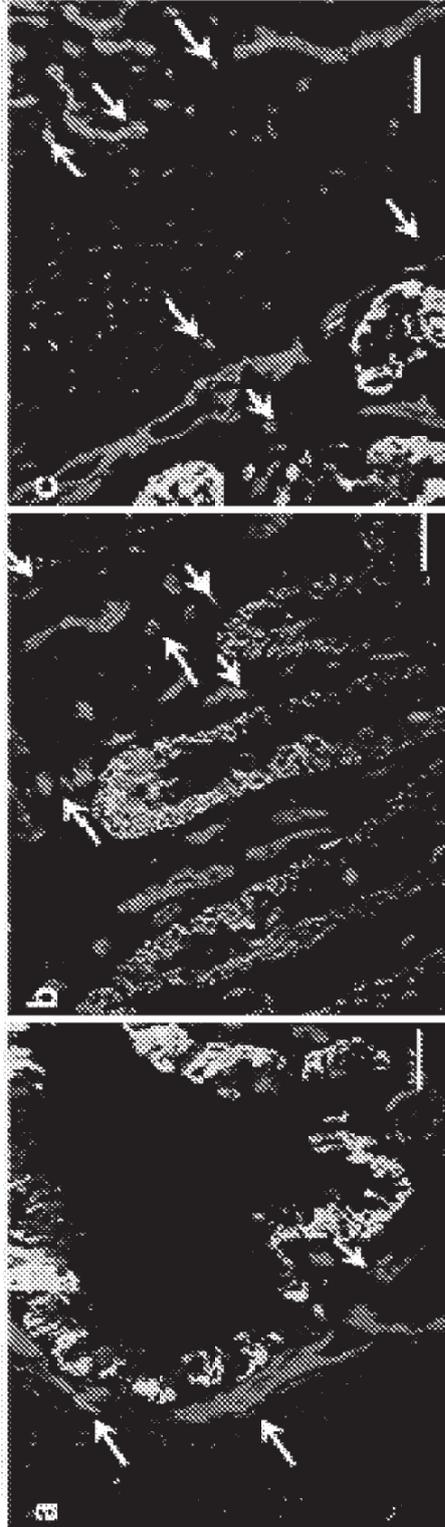
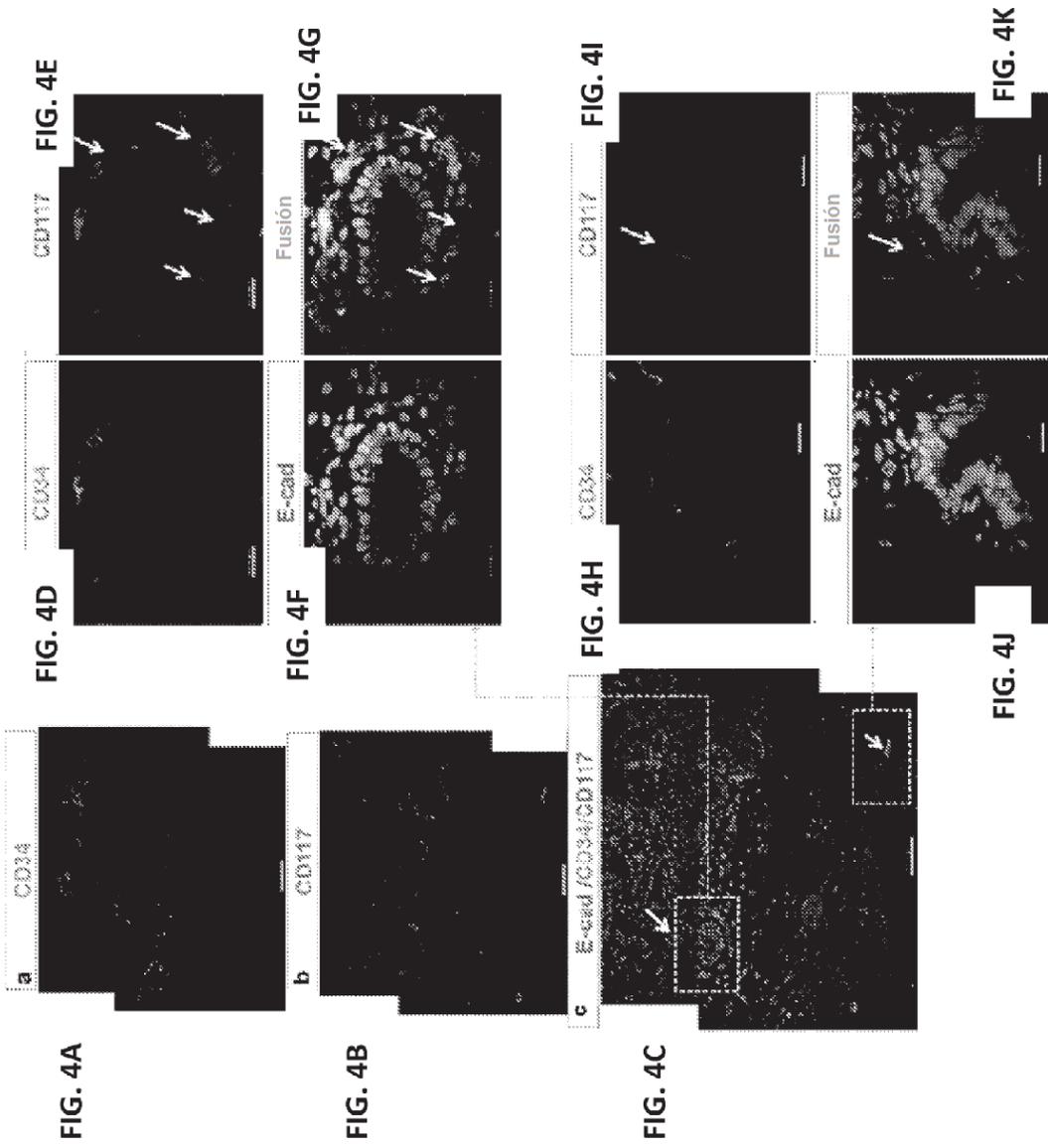
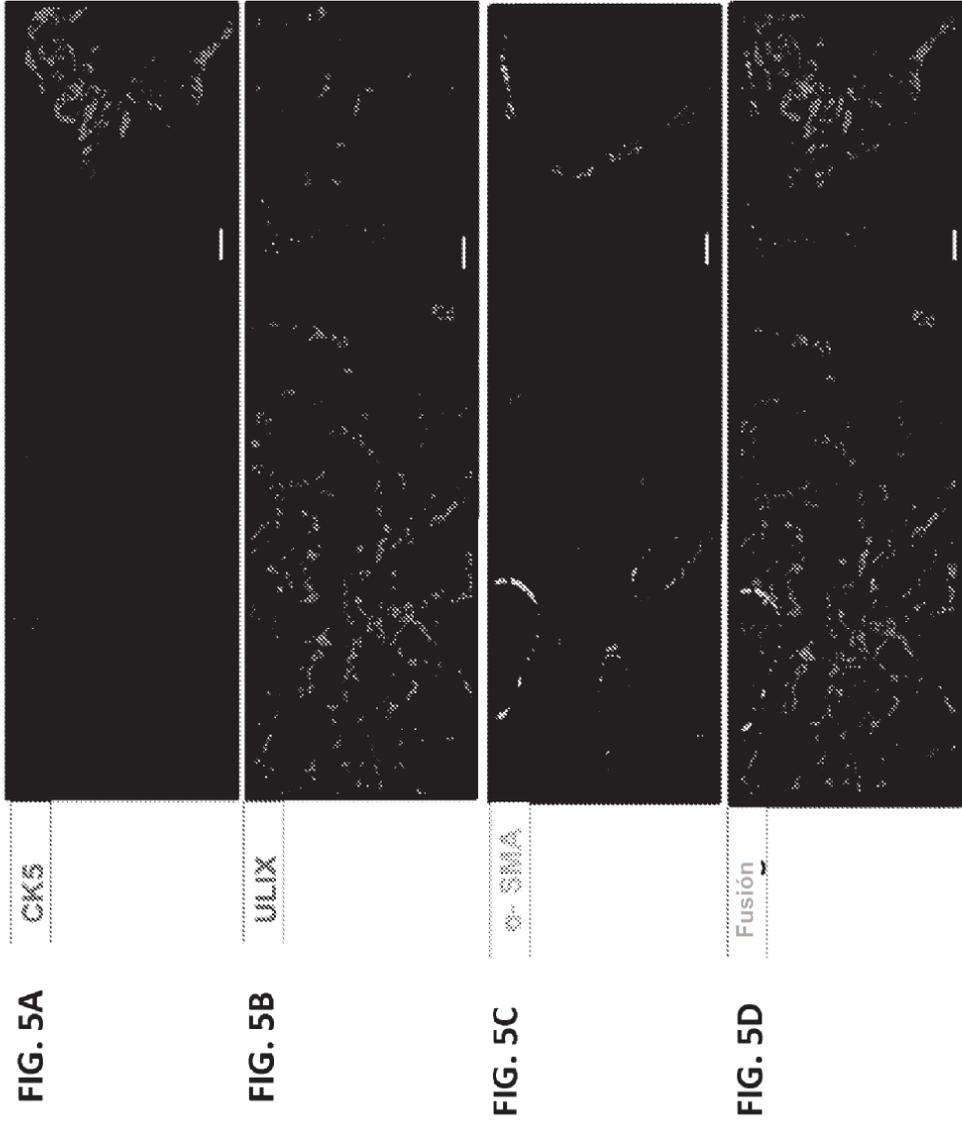


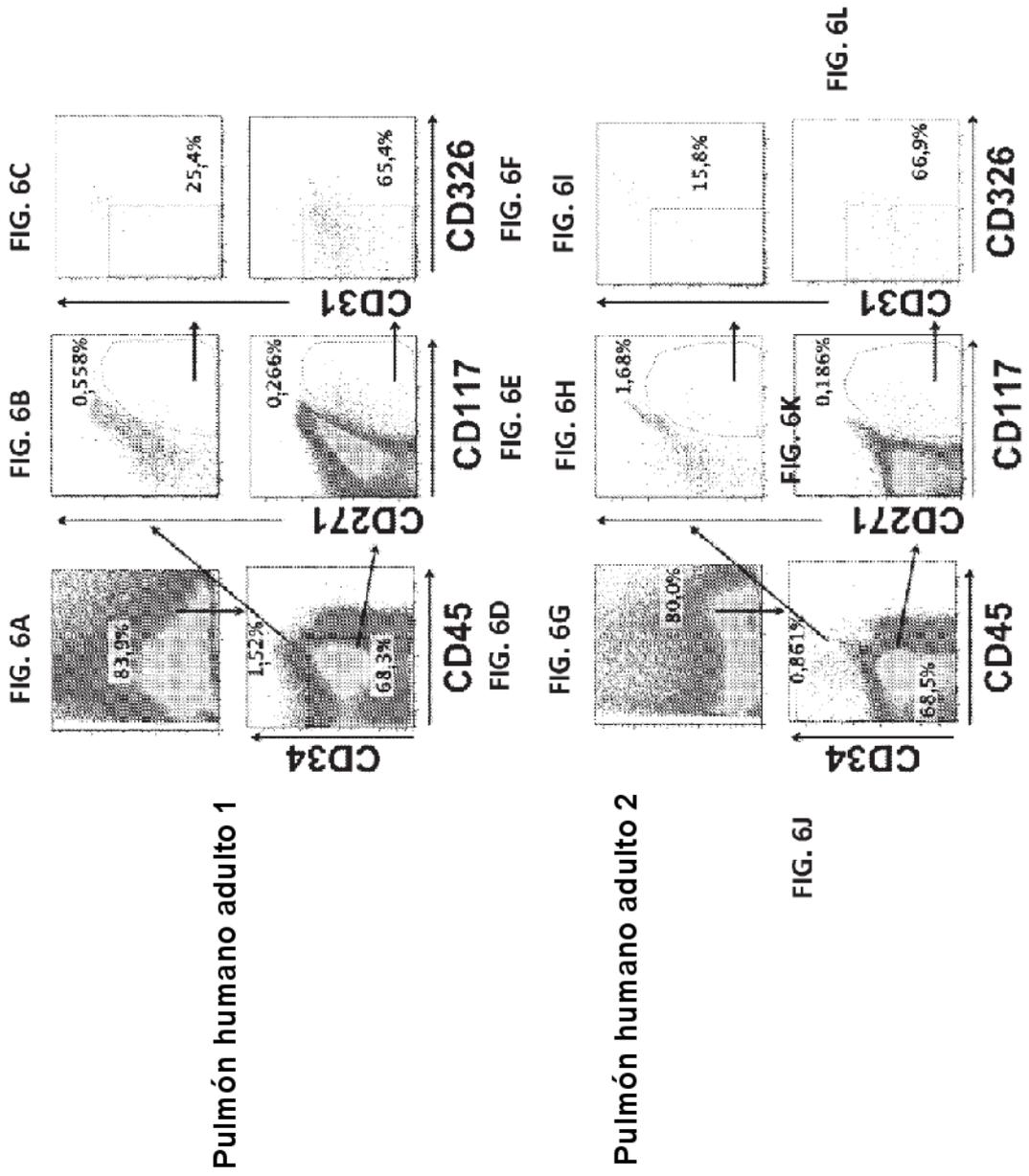
FIG. 3A

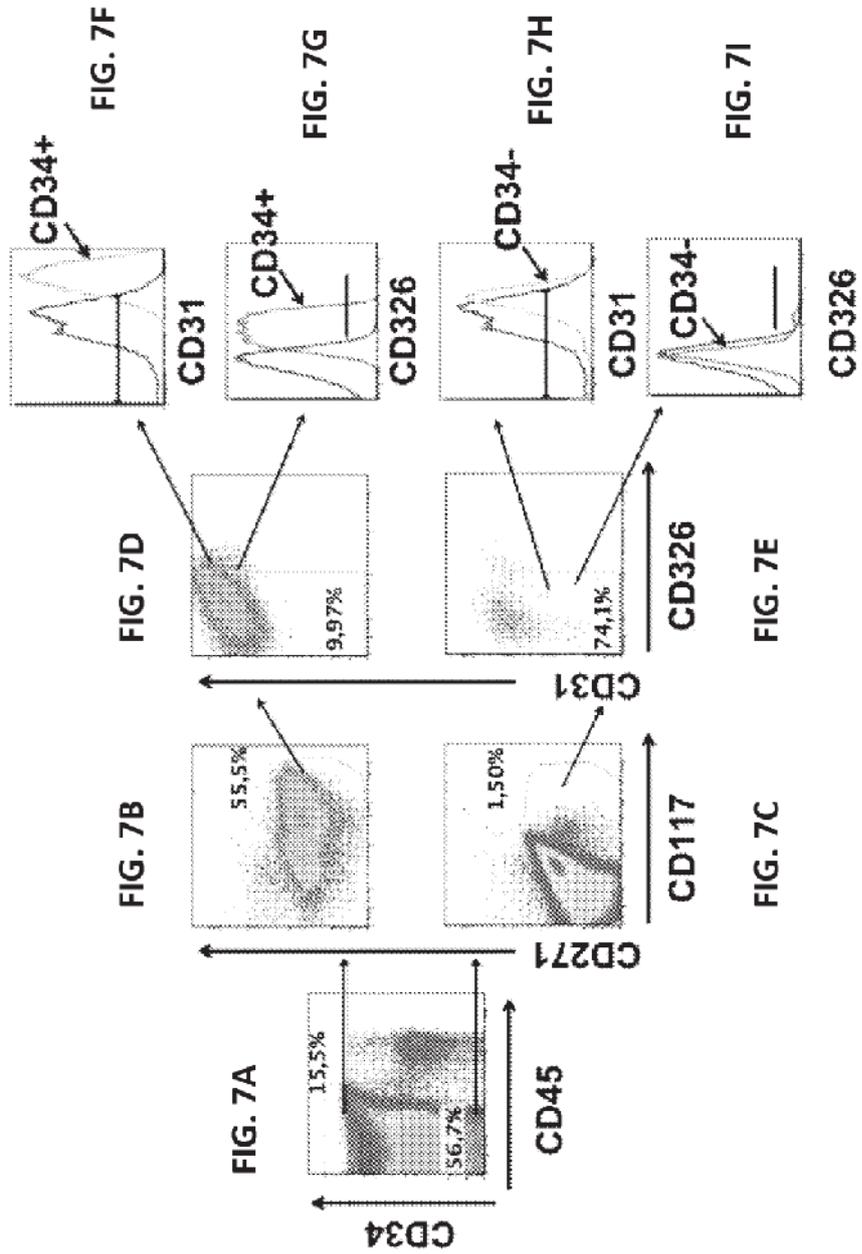
FIG. 3B

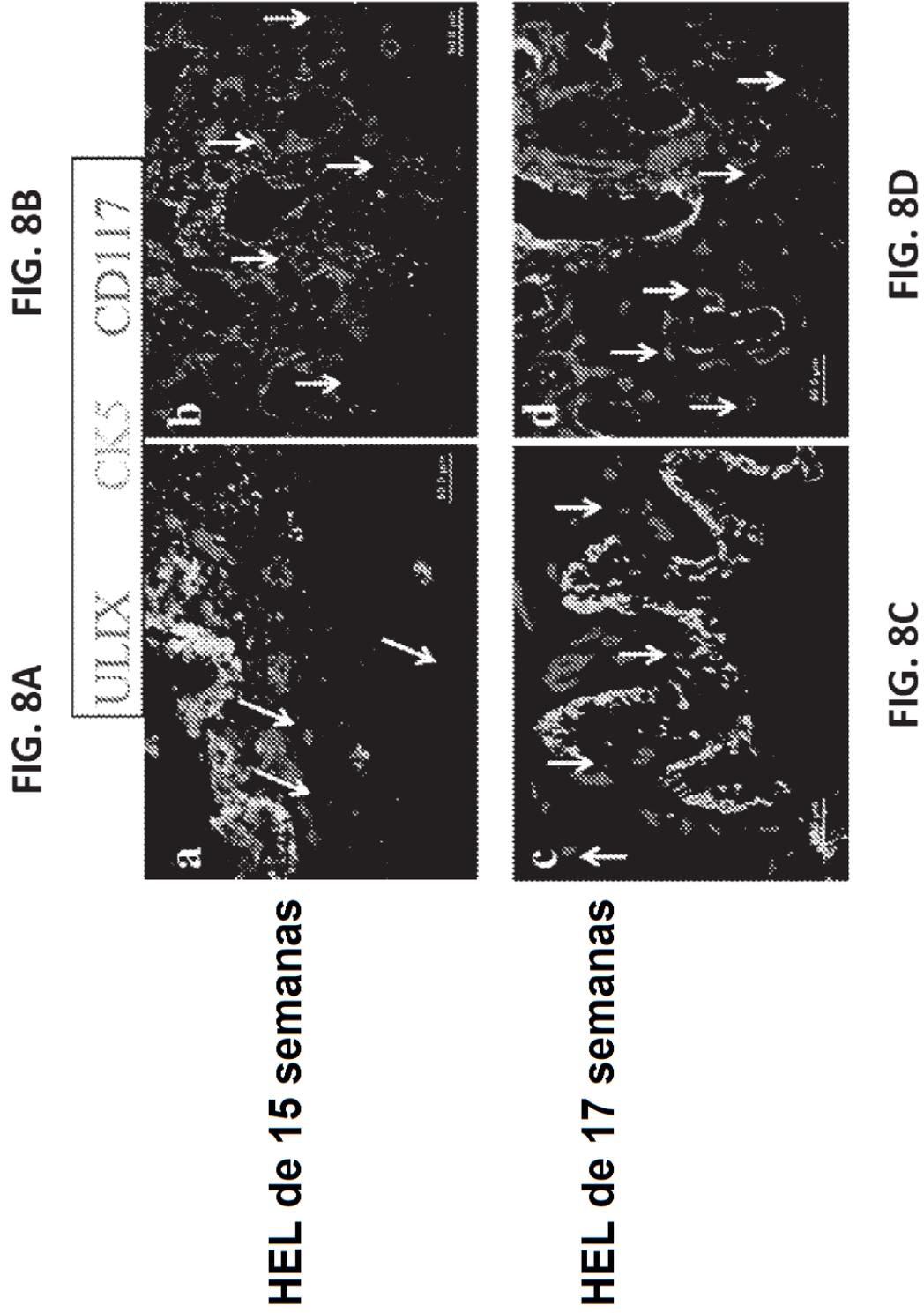
FIG. 3C

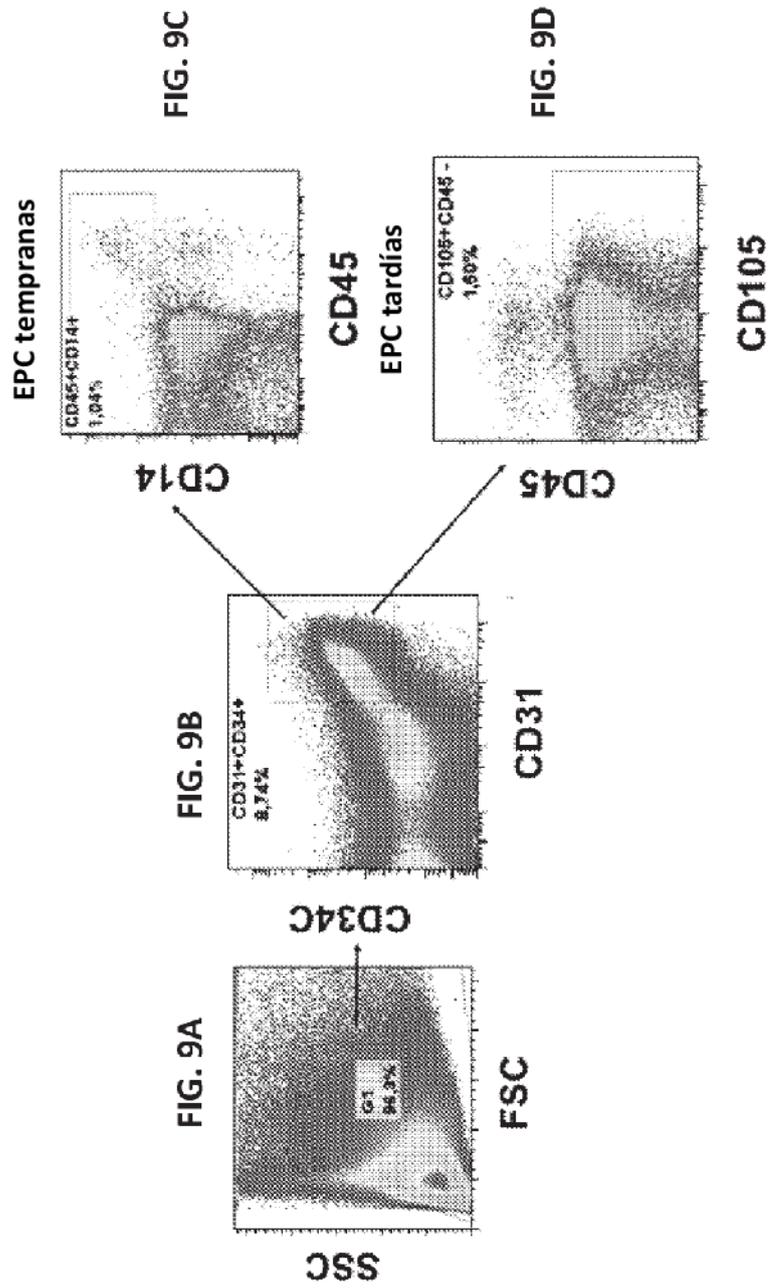












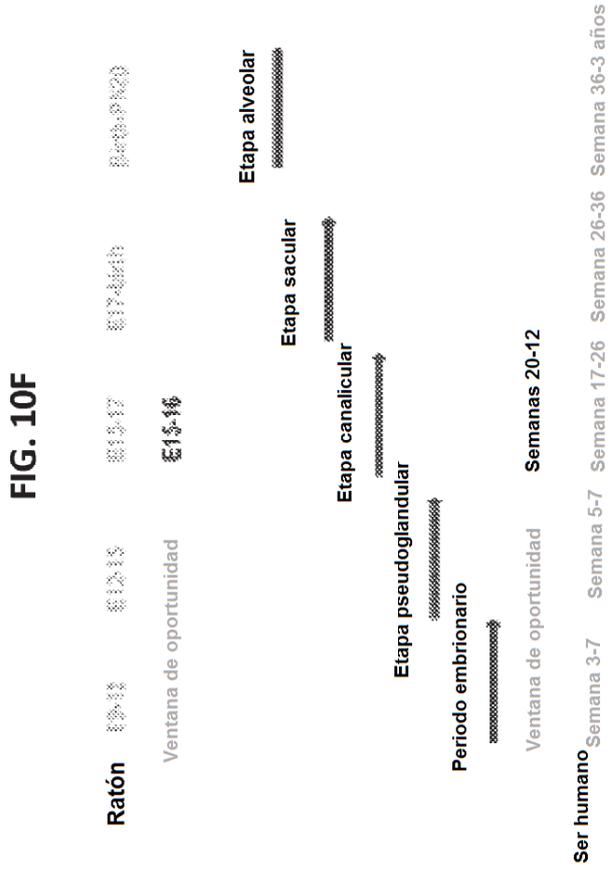


FIG. 10A **FIG. 10B** **FIG. 10C** **FIG. 10E**

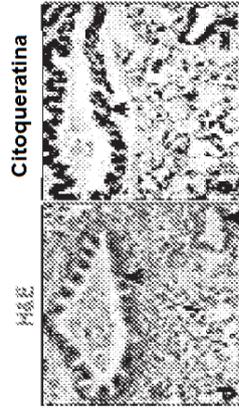
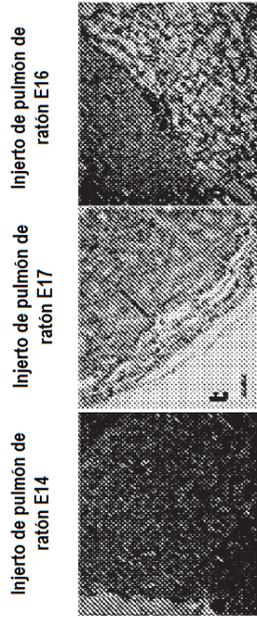
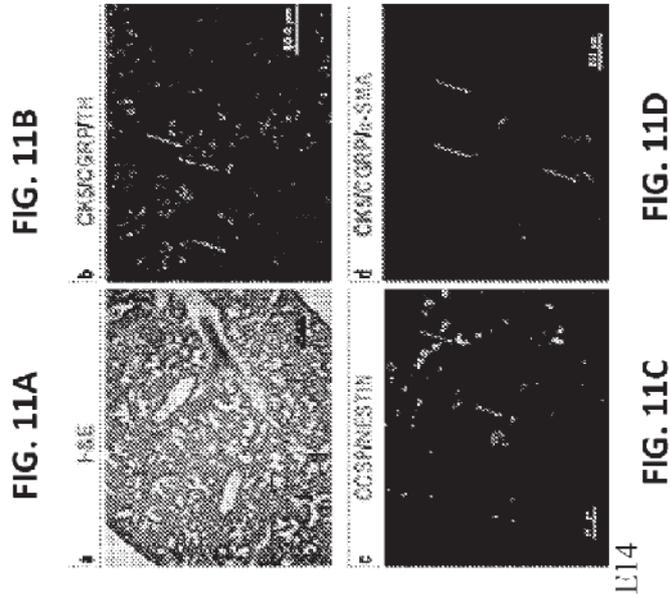
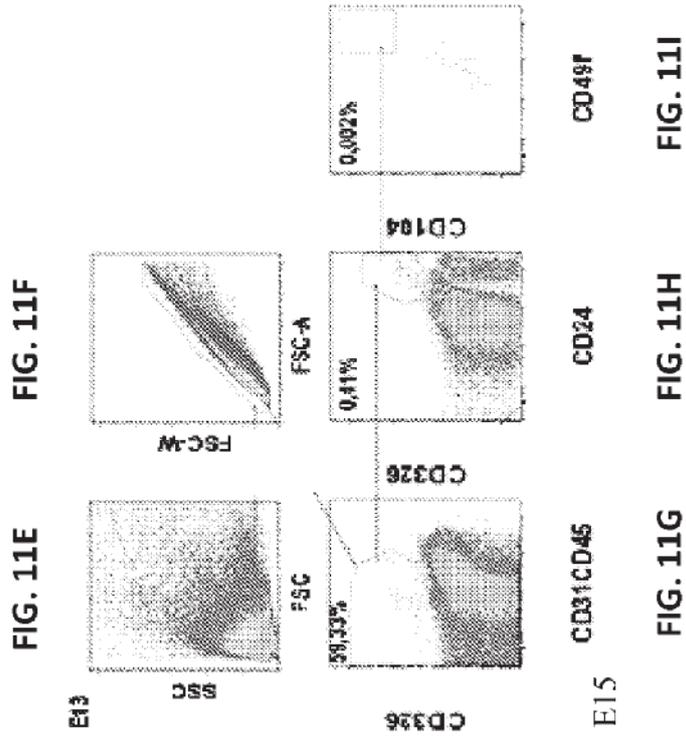
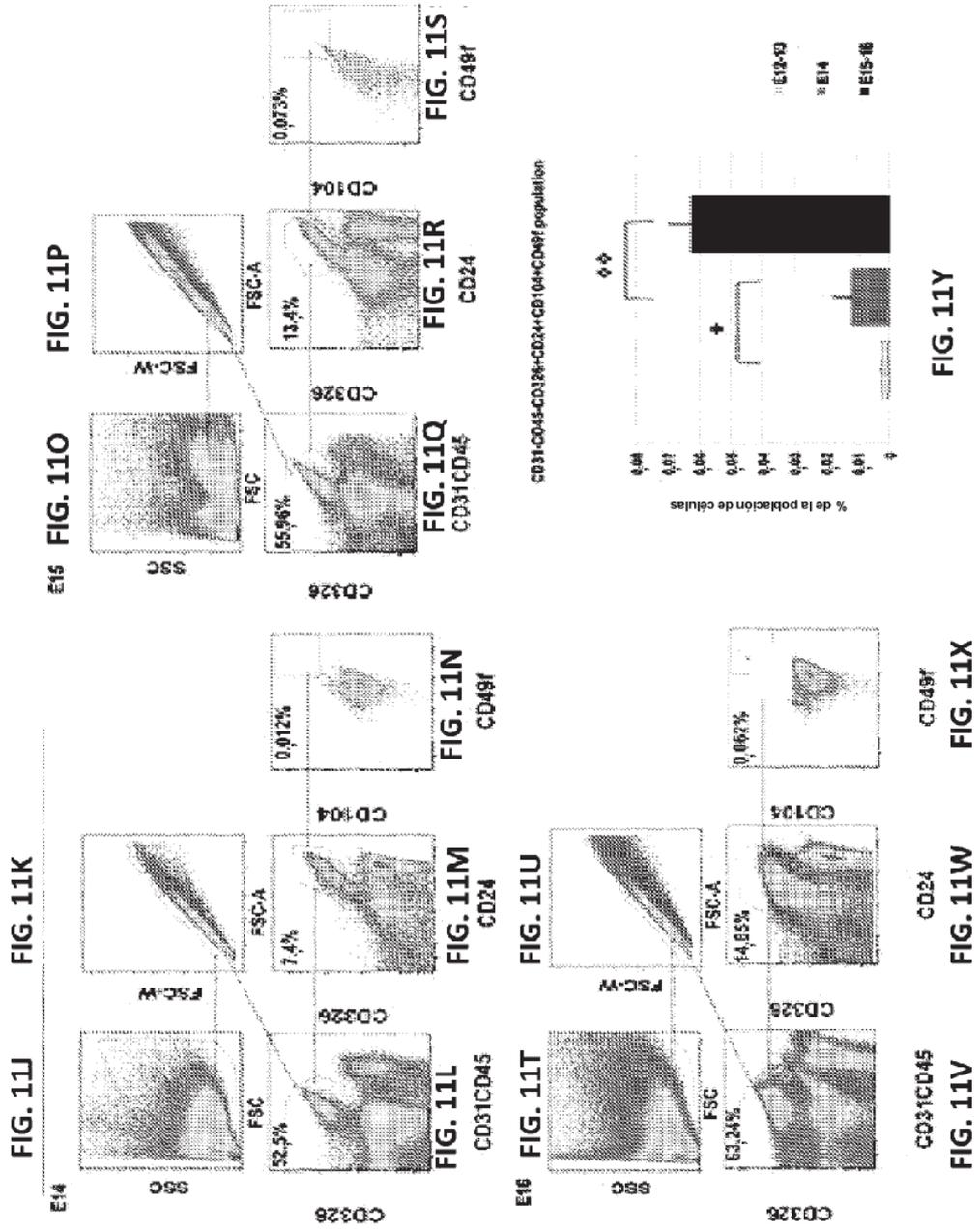
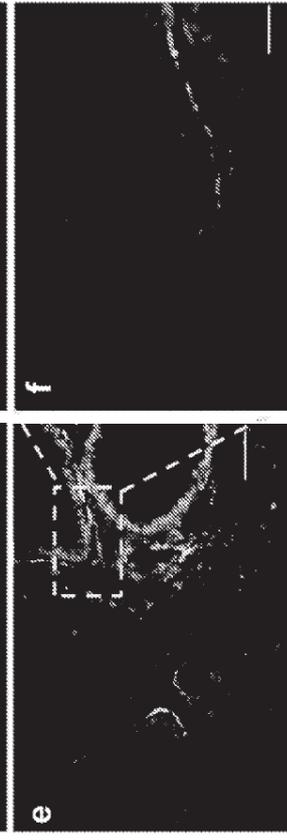
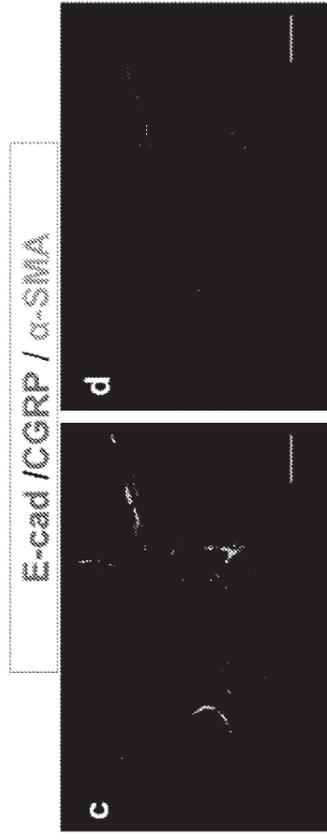
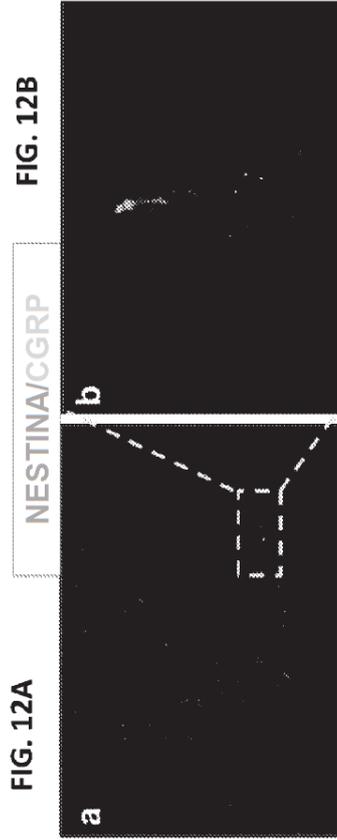


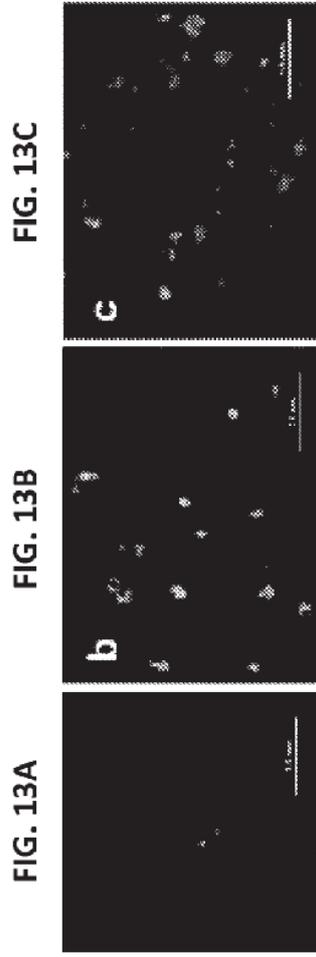
FIG. 10D **FIG. 10E**



L14







Número de focos GFP+ en los pulmones trasplantados

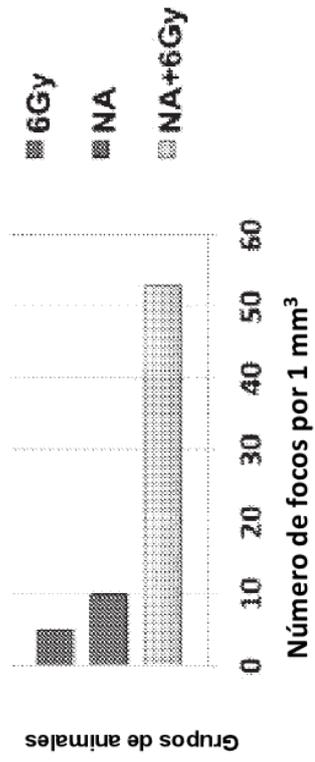


FIG. 13D

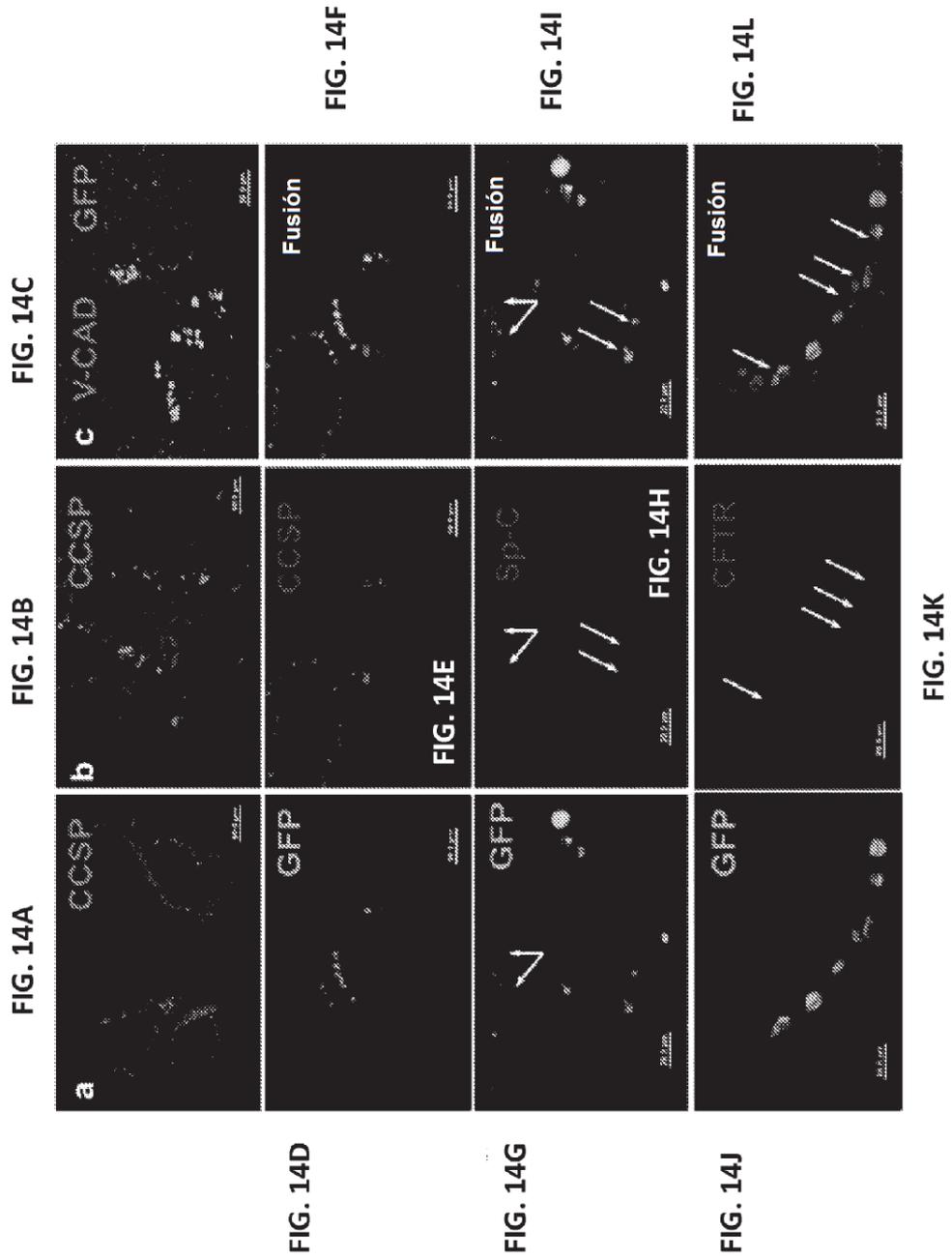


FIG. 15A

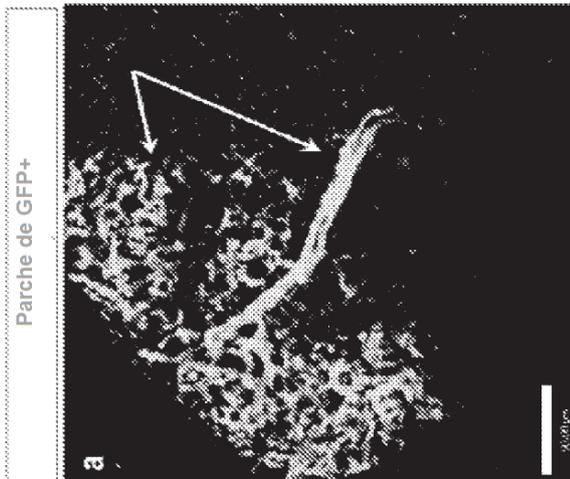


FIG. 15B

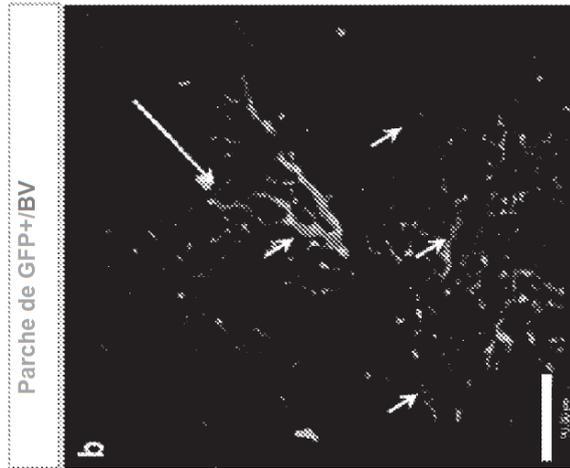
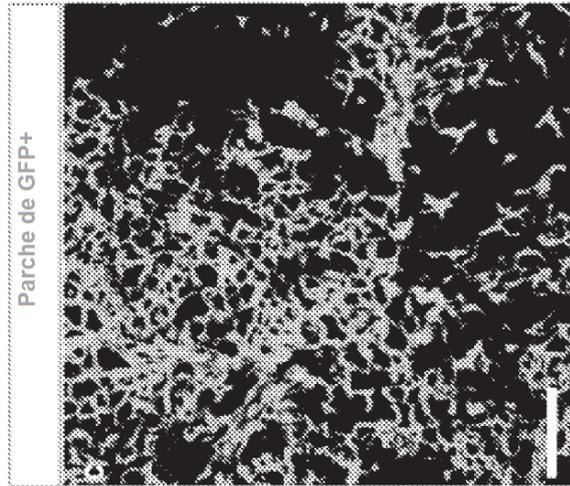


FIG. 15C



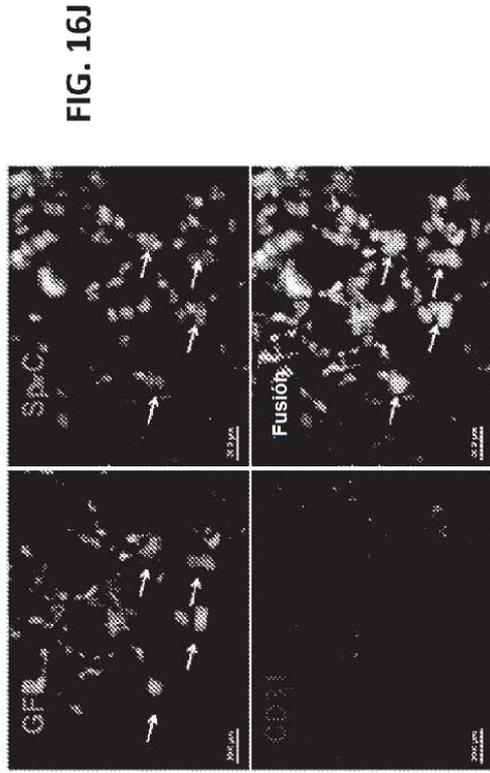
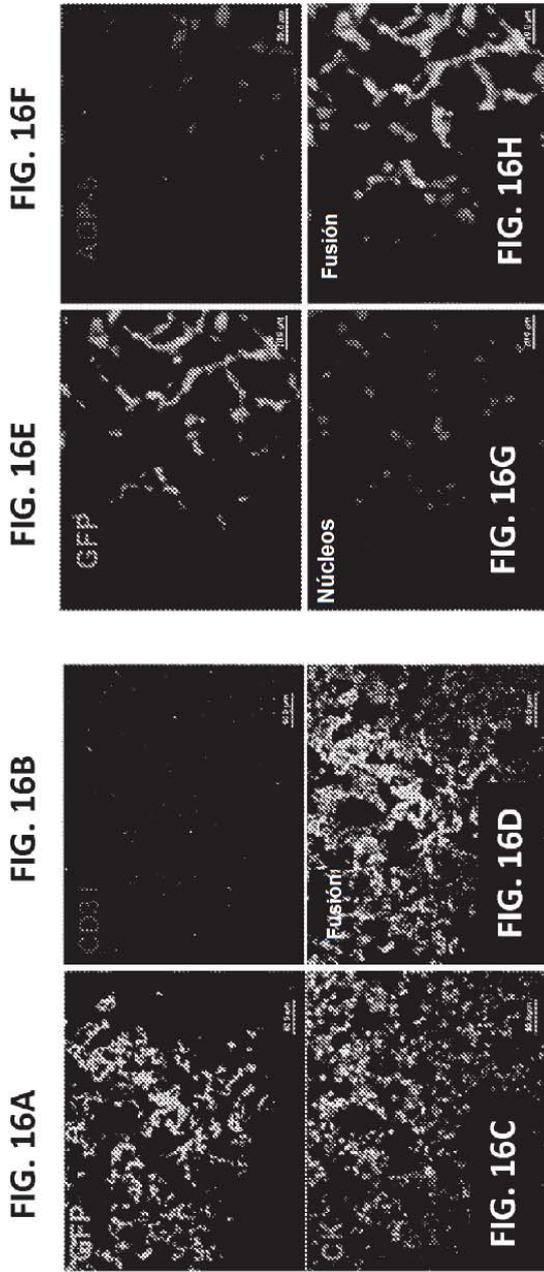


FIG. 17A



b GFP



FIG. 17B

c CK

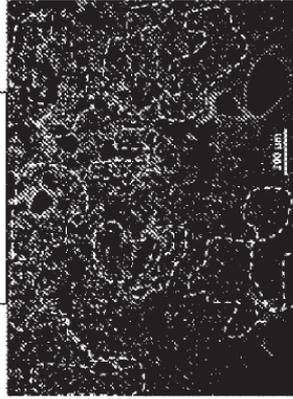


FIG. 17C

d CD31



FIG. 17D

e Fusión

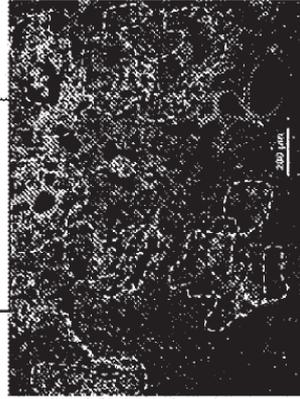


FIG. 17E

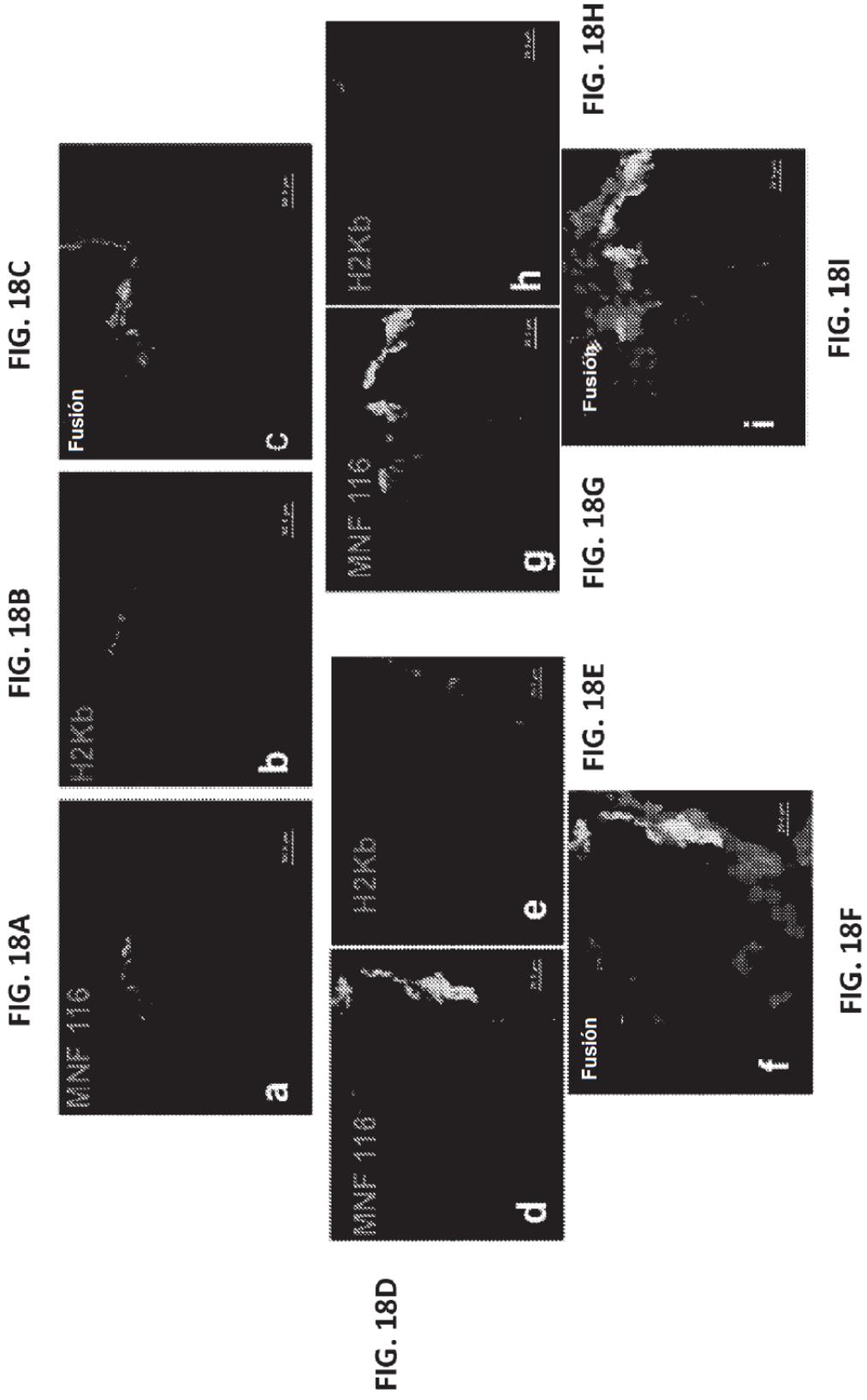


FIG. 19A

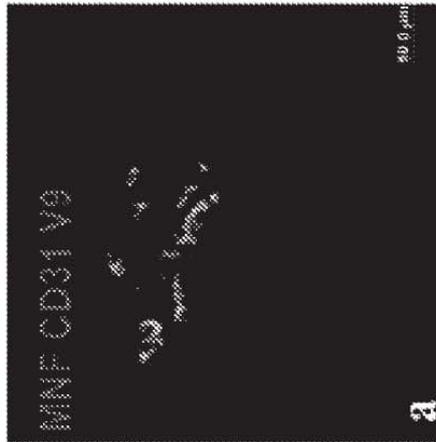


FIG. 19B

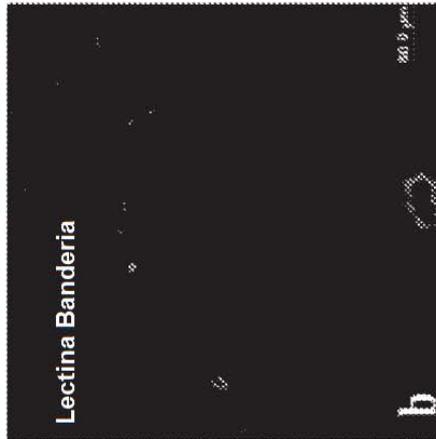


FIG. 19C

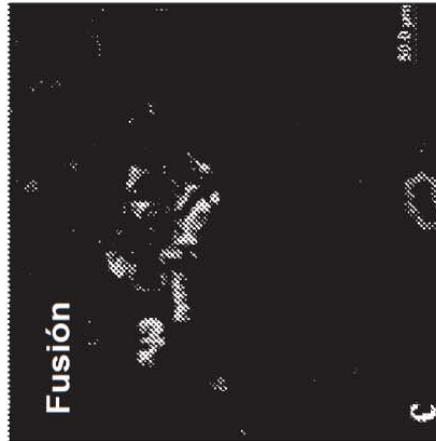


FIG. 19D



FIG. 19E

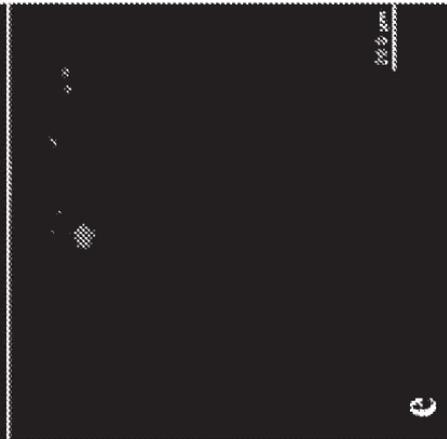


FIG. 19F



FIG. 20A



FIG. 20B



FIG. 20C



FIG. 20D

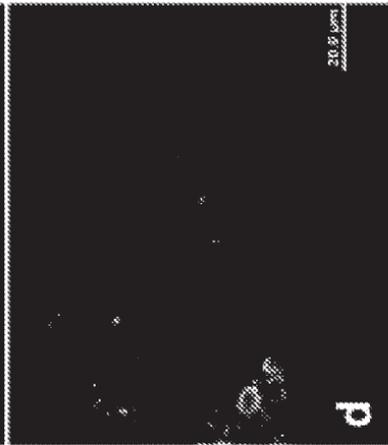
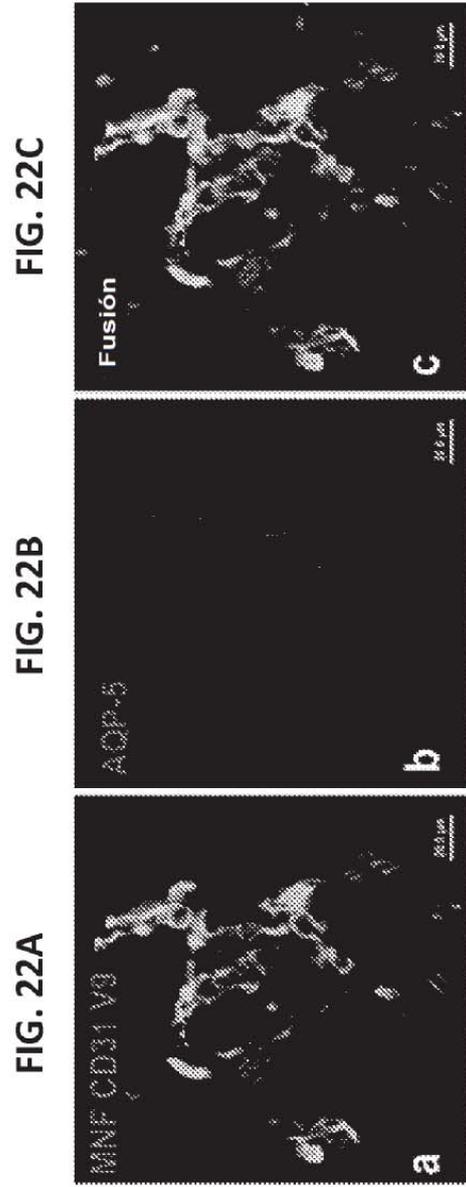
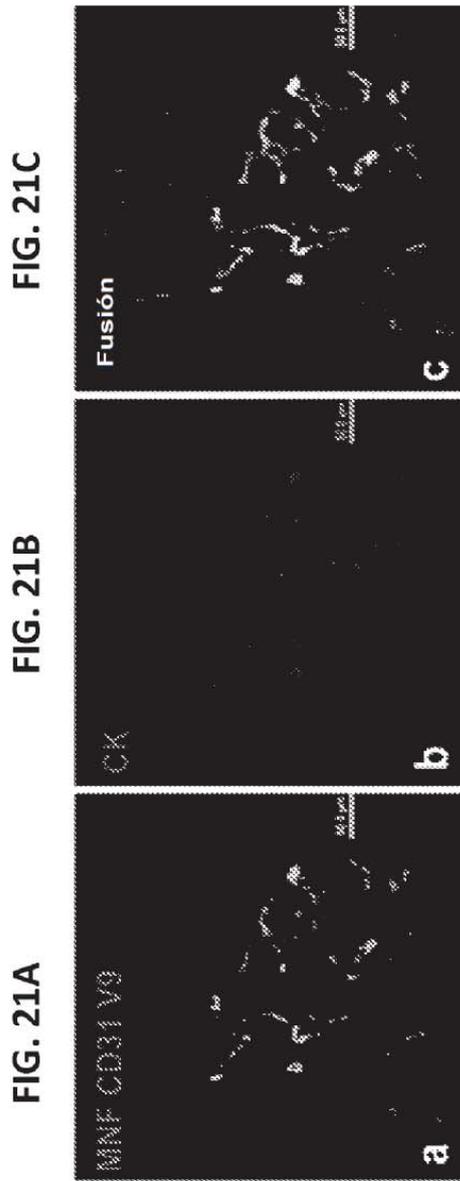


FIG. 20E



FIG. 20F





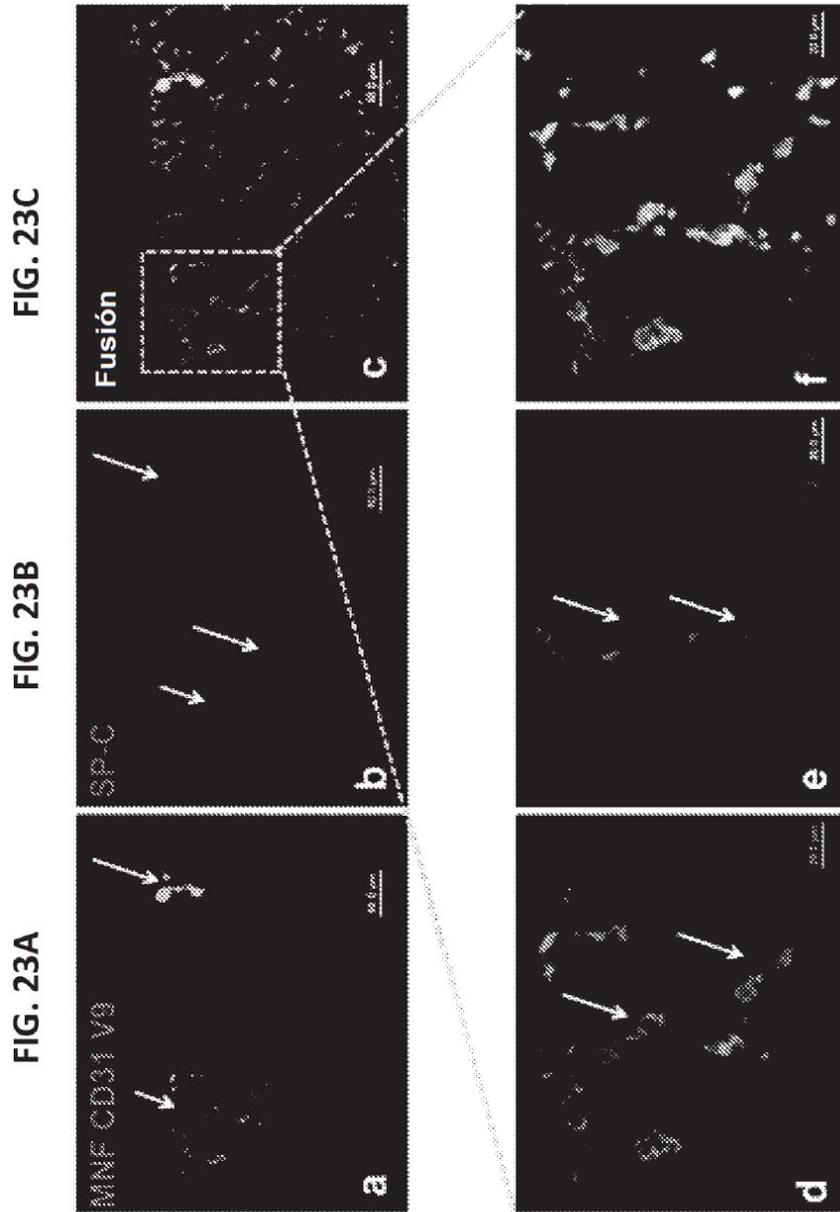


FIG. 23C

FIG. 23B

FIG. 23A

FIG. 23F

FIG. 23E

FIG. 23D

FIG. 24A



FIG. 24B

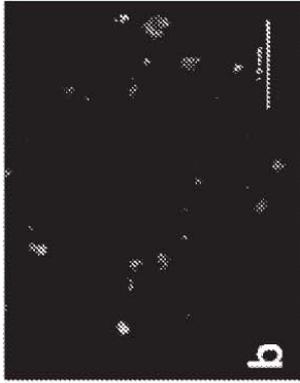


FIG. 24C



FIG. 24E

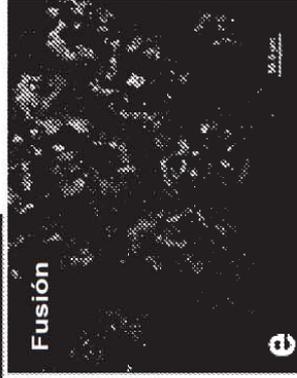


FIG. 24F



FIG. 24H



FIG. 24D



FIG. 24G



FIG. 25A



FIG. 25B



FIG. 25C



FIG. 25D

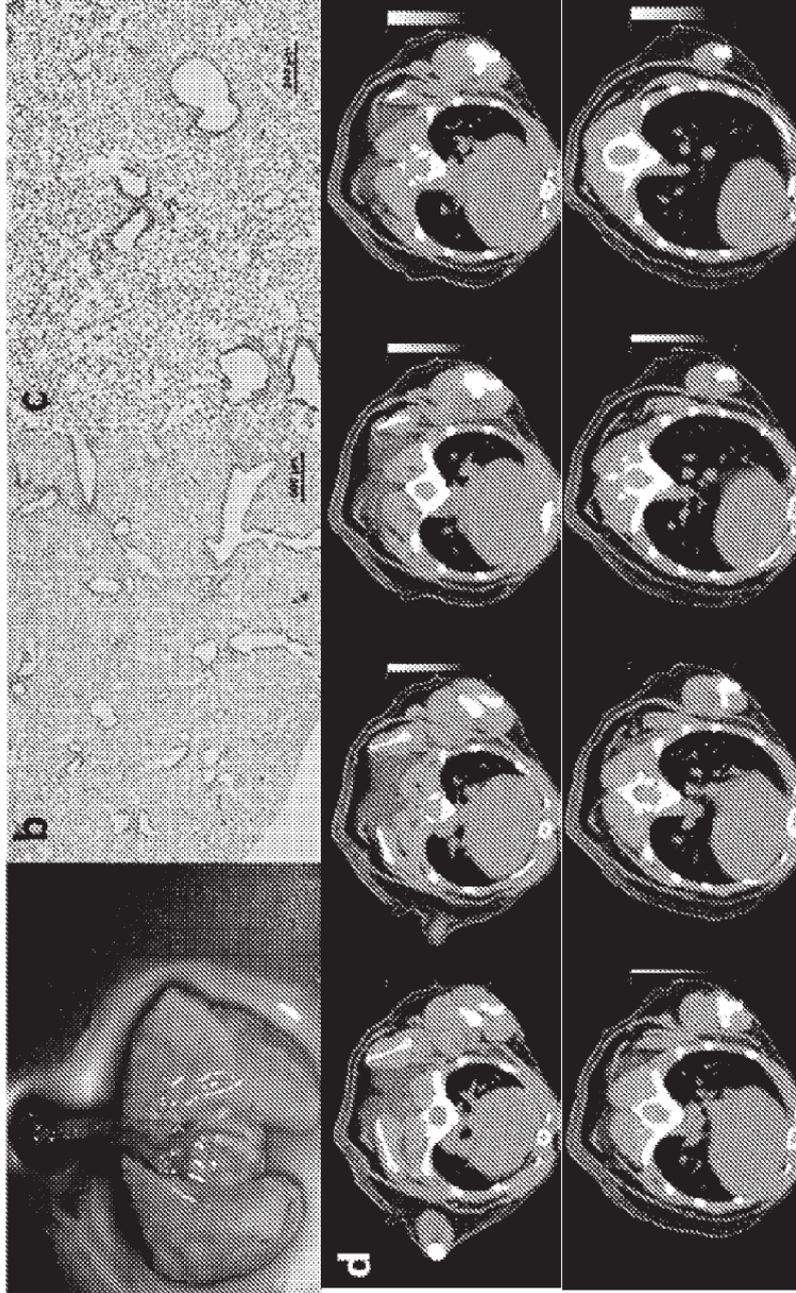


FIG. 25D