

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 845**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 13171217 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2669368**

54 Título: **Aislamiento y purificación de células madre hematopoyéticas a partir de lipoaspirados post-liposucción**

30 Prioridad:

17.05.2006 US 801120 P

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

16.02.2017

73 Titular/es:

**COGNATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
709 East Evelyn Avenue
Sunnyvale CA 94086, US**

72 Inventor/es:

MITCHELL, JAMES B., II

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María del Carmen

ES 2 601 845 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

Aislamiento y purificación de células madre hematopoyéticas a partir de lipoaspirados post-liposucción

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 Las células madre hematopoyéticas (CMH) son células madre que forman células sanguíneas e inmunitarias y son en última instancia responsables de la renovación constante de la sangre en el organismo durante toda la vida del organismo. Las CMH han sido foco de investigación durante muchas décadas y actualmente se utilizan habitualmente para muchas aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento para la leucemia, el linfoma, los trastornos sanguíneos hereditarios, y el rescate de CMH después de regímenes extensos de quimioterapia, entre otros.
- 10 Las CMH son el mejor ejemplo caracterizado de una célula madre multipotencial existente en los tejidos de un organismo adulto. En los estudios seminales de Trentin y colaboradores (Trentin, 1965, Cardiovasc. Res. Cent. Bull 4:38-4; Till & McCulloch, 1961, Rad. Res. 14:213-222) ratones irradiados letalmente murieron porque no pudieron reponer sus células sanguíneas circulantes. Sin embargo, el trasplante de células de médula ósea de animales donantes singénicos rescató al animal huésped. Las células del donante fueron responsables de la repoblación de todas las células de la sangre circulante. Más recientemente, se ha demostrado que las células responsables de la reconstitución de la hematopoyesis en los seres humanos que reciben un trasplante de médula ósea residen en un subconjunto de células que expresan el antígeno CD34 (CD34⁺) (Berenson et al, 1991, Blood 77:1717-1722). En otras palabras, las células CD34⁺ comprenden células madre hematopoyéticas. Se han buscado otros métodos de identificación y aislamiento de poblaciones enriquecidas para células madre hematopoyéticas que no dependan de inmunofenotipos de la superficie celular. Se han aislado progenitores hematopoyéticos primitivos humanos sobre la base de la actividad de aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Storms et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:9118-9123; Hess et al, 2004, Blood 104:1648-1655). Además, el injerto en el ser humano está altamente correlacionado con el número de células infundidas con actividad de ALDH (ALDH^{br}) y baja dispersión lateral (SSC^{lo}) (Fallon et al., 2003, Br. J. Haematol. 122:99-108).
- 15 Una gran cantidad de estudios elegantes han demostrado que la donación de un número finito de células madre hematopoyéticas indiferenciadas es capaz de regenerar cada uno de los ocho o más linajes de células sanguíneas diferentes en un animal huésped. Este gran cuerpo de trabajo ha servido de base para el trasplante de médula ósea, una modalidad terapéutica ampliamente aceptada para el cáncer y los errores congénitos del metabolismo. Por lo tanto, las células madre hematopoyéticas siguen estando presentes en la médula ósea humana normal a lo largo de la vida; no se limitan al periodo neonatal.
- 20 Actualmente, existen tres principales fuentes de células madre hematopoyéticas (CMH) utilizadas para fines de trasplante de médula ósea: la médula ósea de adultos, la sangre periférica de adultos, y la fracción mononuclear de la sangre del cordón umbilical después del nacimiento del niño. Habitualmente, las células aisladas para fines de trasplante son aisladas a partir de la médula ósea o de la sangre periférica de adultos. Sin embargo, de manera desventajosa, las células CD34⁺ son extremadamente raras en la médula ósea de adultos (1-2%), lo que requiere que se tenga que obtener un volumen significativo de médula ósea para generar una cantidad suficiente de CMH para injertar a un adulto. El procedimiento para obtener la médula ósea es un procedimiento largo y desagradable para el donante de médula, que requiere hospitalizaciones prolongadas para permitir la recuperación de la médula ósea. El aislamiento de células CD34⁺ o ALDH^{br} de sangre periférica, que requiere habitualmente múltiples sesiones de citaféresis, es menos desagradable para el donante, sin embargo, se requiere pre-inoculación del donante con citoquinas para movilizar las CMH hacia la sangre periférica. A pesar de la movilización, el número de células CD34⁺ o ALDH^{br}, y, en consecuencia, de las CMH, en la sangre periférica es todavía habitualmente bastante bajo.
- 25 La sangre de cordón umbilical (UCB) es algo más enriquecida para las células CD34⁺, en comparación con la médula ósea o con la sangre periférica movilizada (Wang et al, 1997, Blood 89:3919-3924), pero el pequeño volumen de sangre disponible en un cordón umbilical limita el número absoluto de las CMH injertables que se pueden recuperar, por lo que la UCB resulta menos útil de lo previsto originalmente. En teoría, se podría proporcionar un número suficiente de células madre hematopoyéticas mediante la agrupación de múltiples muestras de sangre de cordón umbilical, sin embargo, la agrupación está mal vista en la práctica clínica. Por lo tanto, las células CD34⁺ derivadas de sangre del cordón umbilical están limitadas en su utilidad en los adultos debido a que como consecuencia las bajas cifras de CMH aisladas son demasiado escasas para injertar con éxito en un adulto maduro. Se han estudiado los protocolos de expansión para tratar de incrementar el número de células. Habitualmente, sin embargo, la expansión de CMH va acompañada de diferenciación sustancial, lo que no siempre resulta deseable.
- 30 Existe una creciente evidencia de que los progenitores hematopoyéticos pueden no estar limitados al microambiente de la médula ósea. Los investigadores de la Universidad de Calgary han examinado células madre neuronales, que se diferencian de forma rutinaria a lo largo de las vías del linaje de células neuronales. Cuando estas células se trasplantaron en huéspedes irradiados letalmente, los investigadores detectaron la presencia de marcadores de células del donante en células mieloides y linfoides producidos recientemente (Bjornson, 1999, Science 283:534-537). Los investigadores del Baylor College of Medicine

han realizado estudios similares utilizando células satélite aisladas de músculo esquelético murino (Jackson et al, 1999, PNAS 96:14482 a 14486). Cuando estas células derivadas de músculo se transplantaron en huéspedes irradiados letalmente, los investigadores detectaron la presencia de los marcadores de genes musculares en todos los linajes de células sanguíneas. La solicitud de PCT internacional no. WO 02/055678 A1 describe que el trasplante de células de la fracción vascular estromal de tejido vascular (SVF) puede rescatar ratones irradiados letalmente al permitir la reconstitución de los principales linajes hematopoyéticos in vivo, y las células derivadas de SVF pueden ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades que requieren una reconstitución hematopoyética, como por ejemplo las hemopatías y condiciones causadas por la radiación o la quimioterapia. En conjunto, estos estudios indican que los tejidos neuronales, musculares y vasculares contienen células madre capaces de diferenciación hematopoyética. Ello sugiere que existen sitios distintos de la médula ósea que pueden proporcionar una fuente renovable de progenitores hematopoyéticos con aplicación potencial en la terapia de enfermedades humanas (Quesenberry et al, 1999, J. Neurotrauma 16:661-666; Scheffler et al, 1999, Trends Neurosci. 22:348-357; Svendsen y Smith, 1999, Trends Neurosci 22:357-364).

Más recientemente, se ha demostrado que las células de la fracción vascular estromal (SVF) derivadas de tejido adiposo reconstituyen con éxito los principales linajes hematopoyéticos en ratones irradiados letalmente (Cousin et al., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 301: 1016-1022 y la publicación de patente de EE.UU. no. 2004/0067218). Las células madre mesenquimales estromales, aisladas a partir de tejido adiposo, también han sido co-infundidas con células CD34⁺, aisladas a partir de sangre periférica movilizada, y se encontró que facilitan el injerto con éxito de las células CD34⁺ (Kim et al., 2005, Biochem. Biophys. Res. Commun. 329(1):25-31).

La publicación de patente de EE.UU. nº 2001/0033834 da a conocer una célula estromal derivada aislada de tejido adiposo de que se ha diferenciado para expresar al menos una característica de una célula progenitora hematopoyética. También se describen células estromales derivadas de tejido adiposo que se des-diferencian en células madre pluripotentes totalmente funcionales y que a continuación pueden diferenciarse en linajes de células hematopoyéticas.

A pesar del trabajo resumido anteriormente, sigue existiendo una necesidad de una fuente abundante de células madre hematopoyéticas para su uso en aplicaciones terapéuticas y otras. La presente invención aborda y cumple estas necesidades.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención abarca un método para aislar una célula madre hematopoyética a partir de tejido adiposo, en que el método comprende las fases de preparar una fracción vascular estromal (SVF) a partir del tejido adiposo; incubar células de la SVF en un medio de células estromales en un aparato de cultivo de células durante un tiempo adecuado para que el cultivo de células in vitro permita que las células adherentes se adhieran al aparato de cultivo; y aislar las células no adherentes del medio de células estromales, en que las células no adherentes comprenden una célula madre hematopoyética, y comprenden además aislar una célula CD34⁺ y / o una célula ALDH^{br} y/o una célula que expresa ABCG2 de las células no adherentes. Preferiblemente, el tejido adiposo es humano y el tejido adiposo ha sido aislado por lipoaspiración.

En una forma de realización, la célula madre hematopoyética se selecciona del grupo que consiste en una célula ALDH^{br}SSC^{lo}, una célula CD34⁺, una célula CD34⁺SSC^{lo}, una célula CD34⁺CD45⁺, una célula CD34⁺CD38⁺CD41⁺, una célula CD34⁺CD45⁺, una célula CD34⁺CD38⁺CD41⁺SSC^{lo}, y una célula que expresa ABCG2. En otra forma de realización, al menos alrededor de un 40% de las células no adherentes son células CD34⁺. En otra forma de realización, la célula madre hematopoyética se selecciona del grupo que consiste en de macrófagos de granulocitos de una unidad formadora de colonias (CFU-GM), un eritrocito de formación de unidades en estallido (BFU-E) y megacariocitos macrófagos de eritrocitos granulocitos de unidad formadora de colonias (CFU-GEMM).

En otra forma de realización, el método para aislar una célula madre hematopoyética comprende además aislar una célula CD34^{hi} a partir de las células no adherentes.

En otra forma de realización, el método comprende además aislar una célula ALDH^{br} a partir de las células no adherentes. En un aspecto, la célula ALDH^{br} es ALDH^{br}SSC^{lo}.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Para el propósito de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas formas de realización de la invención. Sin embargo, la invención no está limitada a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las formas de realización representadas en los dibujos.

La Figura 1 es una serie de gráficos de datos de dispersión de luz de citometría de flujo para varias subpoblaciones de células CD34⁺ aisladas a partir de la fracción vascular estromal no adherente de tejido adiposo (SVF). Los números en las cuatro subpoblaciones incluidas en el panel central

representan el porcentaje de células totales que representa dicha subpoblación. En los dos paneles de la izquierda y los dos paneles de la derecha, la población cerrada se representa gráficamente como puntos negros y la población no cerrada se representa como la densidad de color gris. SSC-H = dispersión lateral; FSC-H = dispersión hacia adelante.

5 La Figura 2 es una serie de gráficos de datos de citometría de flujo para dos poblaciones principales de células CD34⁺ (baja dispersión lateral y alta dispersión lateral) aisladas a partir de SVF no adherente de tejido adiposo. Los dos gráficos en el lado derecho son de células CD34⁺ de baja dispersión lateral.

10 La Figura 3 es una serie de gráficos de datos de citometría de flujo con respecto a la expresión de CD31, CD105 y CD90 para dos poblaciones principales de células CD34⁺ aisladas a partir de SVF no adherente de tejido adiposo. Los tres recuadros en el lado derecho son células CD34⁺ de baja dispersión lateral.

15 La Figura 4 es una imagen de una colonia de BFU-E en el día 14 del cultivo de Methocult® (Stem Cell Technologies). Se observaron las colonias tras el cultivo de 20,000 células de la SVF no adherentes (100 aumentos).

La Figura 5 es una imagen de dos colonias de BFU-E en el día 14 después del cultivo de 20,000 células de la SVF no adherentes (100 aumentos).

La Figura 6 es una imagen de una colonia de CFU-GM en el día 14 después del cultivo de 20,000 células de la SVF no adherentes (10 aumentos).

20 La Figura 7 es una imagen de una colonia de CFU-GEMM en el día 14 después del cultivo de 20,000 células de la SVF no adherentes (100 aumentos).

25 La Figura 8, que comprende la Figura 8A y la Figura 8B, es una serie de dos imágenes que representan la expresión ABCG2 en células de la SVF no adherentes. La Figura 8A es un gráfico de las propiedades de dispersión de luz de las células de la SVF no adherentes. Las células que expresan ABCG2 en las células de la SVF no adherentes se encuentran generalmente en una región discreta (la parte de círculo). La Figura 8B es un gráfico de los datos de expresión ABCG2 para las células de la SVF no adherentes. Estos datos ponen de manifiesto que aproximadamente el 16% de las células de la SVF no adherentes son de expresión ABCG2.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

30 La presente invención se basa, en parte, en la observación de que las células no adherentes en la fracción vascular estromal (SVF) de tejido adiposo están enriquecidas para las células CD34⁺, las células ALDH^{br}, las células ALDH^{br}SSC^o y las células que expresan ABCG2, marcadores críticos para la identificación de CMH. Además, se muestra que estas células comprenden progenitores hematopoyéticos multipotenciales, así como progenitores hematopoyéticos de linaje comprometido. De esta manera, la presente invención
35 proporciona un método de aislamiento de células madre hematopoyéticas a partir de tejido adiposo.

Definiciones

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por parte de un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los que son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

45 Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ácido nucleico y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, y Ausubel et al., 2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY), que se proporcionan a lo largo del presente documento.

50 Los artículos "un" y "una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "aproximadamente" será comprendido por las personas con una experiencia ordinaria en la técnica y variará hasta cierto punto en función del contexto en el que se utiliza.

55 Tal como se utilizan en el presente documento, "in vitro" y "ex vivo" se utilizan indistintamente para referirse a condiciones fuera del cuerpo de un organismo vivo. Por lo tanto, el cultivo in vitro y el cultivo ex vivo se refieren ambos al cultivo fuera del cuerpo de un organismo vivo.

"Adiposo" se refiere a cualquier tejido graso. El tejido adiposo puede ser tejido adiposo marrón, amarillo o blanco. El tejido adiposo incluye adipocitos y estroma. El tejido adiposo se encuentra en todo el cuerpo de un animal. Por ejemplo, en los mamíferos, el tejido adiposo está presente en el omento, la médula ósea, el espacio subcutáneo, las almohadillas de grasa (por ejemplo, almohadillas de grasa escapular o infrarrotuliana), y alrededor de la mayoría de los órganos. El tejido adiposo puede ser de cualquier organismo que tenga tejido graso. Una fuente conveniente y abundante de tejido adiposo humano es la que se deriva de la cirugía de liposucción. Sin embargo, la fuente de tejido adiposo o el método de aislamiento de tejido adiposo no son críticos para la invención.

El término "célula derivada de tejido adiposo" se refiere a una célula que se origina a partir de tejido adiposo. Las células obtenidas a partir de tejido adiposo pueden ser un cultivo celular primario, un cultivo que ha experimentado pasajes, o una línea celular inmortalizada. La población inicial de células aisladas de tejido adiposo es una población heterogénea de células, incluyendo, pero que no se limita a, células de la fracción vascular estromal (SVF).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "células estromales derivadas de adiposas", "células estromales derivadas de tejido adiposo", "células estromales adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS)", o "células madre derivadas de adiposas" (ASC) se utilizan indistintamente y se refieren a células estromales que se originan a partir de tejido adiposo que pueden servir como precursores similares a células madre para una variedad de diferentes tipos de células, como por ejemplo, pero sin limitarse a, los adipocitos, los osteocitos, los condrocitos, los músculos y los linajes celulares neuronales/gliales. Las ASCs son una población subconjunto derivada de tejido adiposo que se puede separar de otros componentes del tejido adiposo utilizando procedimientos de cultivo estándar conocidos en la técnica. Además, las ASC se pueden aislar a partir de una mezcla de células basadas en los marcadores de superficie celular conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "células madre hematopoyéticas derivadas de adiposas" se refiere a células no adherentes presentes en la fracción vascular estromal de tejido adiposo que comprenden una o más características de CMH seleccionadas del grupo que consiste en: CD34⁺, ALDH^{br}, SSC^{lo}, expresión de ABCG2 y capacidad de progenitores hematopoyéticos multipotenciales.

Tal como se utiliza en el presente documento, "células no adherentes" se refiere a células que no se adhieren a un matraz de cultivo de tejidos en condiciones de cultivo de tejidos estándar para células de la SVF. El experto en la materia está familiarizado con las condiciones de cultivo de tejidos estándar para las células de la SVF.

Tal como se utiliza en el presente documento, "ALDH^{br}" se refiere a la fluorescencia intracelular brillante de una célula que expresa un alto nivel de ALDH después de la administración a la célula de un sustrato de ALDH que produce un producto fluorescente. La detección de células ALDH^{br} es bien conocida en la técnica. Además, el kit ALDEFLUOR® (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá), utilizado en la identificación de células que expresan ALDH, está disponible comercialmente. Véase también la patente de EE.UU. N° 5,876,956.

Los términos "célula precursora", "célula progenitora", y "célula madre" se utilizan indistintamente en la técnica y tal como se utiliza en este documento se refieren a una célula pluripotencial o progenitora de linaje no comprometido, que es potencialmente capaz de un número ilimitado de divisiones mitóticas ya sea para renovarse a sí misma o para producir células de progeñie, que se diferenciarán en el tipo celular deseado. En contraste con las células madre pluripotentes, en general se considera que las células progenitoras de linaje comprometido son incapaces de dar lugar a numerosos tipos de células que difieren fenotípicamente entre sí. En lugar de ello, las células progenitoras dan lugar a uno o posiblemente dos tipos de células de linaje comprometido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "multipotencial" o "multipotencialidad" significa que se refiere a la capacidad de una célula madre de diferenciarse en más de un tipo de célula.

Tal como se utiliza en el presente documento, "biocompatible" se refiere a cualquier material que, cuando se implanta en un mamífero, no provoca una respuesta adversa en el mamífero. Un material biocompatible, cuando se introduce en un individuo, no es tóxico ni perjudicial para ese individuo, ni induce el rechazo inmunológico del material en el mamífero.

Tal como se utiliza en el presente documento, "autólogo" se refiere a un material biológico derivado de un mismo individuo en el que más adelante se re-introduce el material.

Tal como se utiliza en el presente documento, "alógeno" se refiere a un material biológico derivado de un individuo genéticamente diferente de la misma especie que el individuo en el que se introducirá el material.

Tal como se utiliza en el presente documento, "singénico" se refiere al material biológico derivado de un individuo genéticamente idéntico (por ejemplo, un gemelo idéntico) al individuo en el que se introducirá el material.

Tal como se utiliza en el presente documento, "aliviar" una enfermedad, defecto, trastorno o afección significa reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad, defecto, trastorno o afección.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "tratar" significa reducir la frecuencia con que los síntomas de una enfermedad, defecto, trastorno o condición adversa, y similares, son experimentados por un paciente.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de una composición de la invención suficiente para proporcionar un efecto beneficioso para el individuo al que se administra la composición. Por ejemplo, con respecto a la administración de células a un individuo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de células que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso para el sujeto al que se administran las células.

Un tratamiento "terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra al menos un síntoma de la patología con el propósito de tratar o aliviar el al menos un síntoma.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "medio de crecimiento" se entiende que se refiere a un medio de cultivo que promueve la proliferación de células. Un medio de crecimiento contendrá generalmente suero animal. En algunos casos, el medio de crecimiento puede no contener suero animal.

20 "Medio de diferenciación" se utiliza en el presente documento para referirse a un medio de crecimiento que comprende un aditivo o una falta de un aditivo de manera que, por ejemplo una célula madre, HSC, una célula CD34⁺, una célula madre adulta derivada de tejido adiposo u otra célula progenitora de ese tipo, que no está completamente diferenciada cuando se incuba en el medio, se desarrolla en una célula con algunas o con todas las características de una célula diferenciada.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, un "factor de crecimiento" es una sustancia que estimula la proliferación, la división y/o la maduración de las células. Los ejemplos no limitadores de factores de crecimiento útiles en la presente invención incluyen la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de macrófagos, la trombopoyetina (TPO), la hormona de crecimiento (GH), la interleucina 1- α y 1- β , la interleucina 3 (IL-3), la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 5 (IL-5), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 7 (IL-7), la interleucina 9 (IL-9), la interleucina 10 (IL-10), la interleucina 11 (IL-11), la interleucina 13 (IL-13), el factor de células ligando c-kit / madre (SCF), la insulina, los factores de crecimiento similares a la insulina, como por ejemplo IGF-2, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), como por ejemplo ligando FGF-1, FLT 3-/ FLK-2, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Los factores de crecimiento se utilizan habitualmente en concentraciones del orden de entre picogramos/ml y miligramos/ml.

30 El "inmunofenotipo" de una célula se utiliza en el presente documento para referirse al fenotipo de una célula en términos del perfil de superficie de la proteína de una célula.

35 Una "célula aislada" se refiere a una célula que ha sido separada de otros componentes y/o células que naturalmente acompañan a la célula en un tejido o en un mamífero.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula sustancialmente purificada" es una célula que ha sido purificada a partir de otros tipos de células con las que se asocia normalmente en su estado de origen natural.

40 La "capacidad de expansión" se utiliza en el presente documento para referirse a la capacidad de una célula para proliferar, por ejemplo, para expandirse en número o, en el caso de una población de células, para someterse a duplicaciones de la población. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que tiene como resultado una mayor población de las células.

45 La "proliferación" se utiliza en el presente documento para referirse a la reproducción o multiplicación de formas similares, en especial de las células. Es decir, la proliferación abarca la producción de un mayor número de células, y se puede medir mediante, entre otros, simplemente contando el número de células, midiendo la incorporación de ³H-timidina en la célula, y similares. La tasa de proliferación celular se mide habitualmente por la cantidad de tiempo necesario para que las células se doblen en número, también conocido como el tiempo de duplicación.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, "cultivo celular" se refiere al proceso mediante el cual las células, tomadas de un organismo vivo, se cultivan en condiciones controladas.

Un "cultivo de células primario" se refiere a un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo y antes del primer subcultivo.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, "subcultivo" se refiere a la transferencia de células desde un recipiente de crecimiento a otro recipiente de crecimiento.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un "pase" se refiere a una ronda de subcultivo. Por lo tanto, cuando se subcultivan las células, se refieren como que han experimentado un pase. A veces una población de células, o una línea celular específica, se refiere o caracteriza por el número de veces que ha experimentado pases. Por ejemplo, una población de células cultivadas que ha experimentado diez pases puede ser denominada como un cultivo P10. El cultivo primario, es decir, el primer cultivo a continuación del aislamiento de células a partir de tejido, se designa como P0. Después del primer subcultivo, las células se describen como un cultivo secundario (P1 o pase 1). Después del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pase 2), y así sucesivamente. Se entenderá por parte de los expertos en la técnica que puede haber muchas duplicaciones de población durante el período de pases; por lo tanto, 10 el número de duplicaciones de la población de un cultivo es mayor que el número de pases. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el periodo comprendido entre los pases depende de muchos factores, incluyendo pero sin limitarse a, la densidad de siembra, el sustrato, el medio, y el tiempo entre los pases.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "no inmunogénico" se refiere a la propiedad de una célula para no inducir la proliferación de las células T, ya sea in vitro en una reacción mixta de linfocitos (MLR) o in vivo.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, "ingeniería de tejidos" se refiere al proceso de generación de tejidos ex vivo para su uso en sustitución o en reconstrucción de tejidos. La ingeniería de tejidos es un ejemplo de la "medicina regenerativa", que abarca métodos para la reparación o sustitución de tejidos y órganos mediante la incorporación de células, genes u otros bloques de construcción biológicos, junto con materiales y tecnologías de bioingeniería.

Tal como se utiliza en el presente documento, "endógeno" se refiere a cualquier material producido dentro o originado dentro de un organismo, célula o sistema.

25 "Exógeno" se refiere a cualquier material introducido en o producido fuera de un organismo, célula o sistema.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "características fenotípicas" se debe interpretar en el sentido de al menos una de las siguientes características: el aspecto morfológico, la expresión de una proteína específica, un patrón de tinción, incluyendo, pero sin limitarse a, un patrón de tinción citoplásmica, la actividad enzimática celular asociada específica, y la capacidad de ser teñida con una sustancia.

30 "Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como por ejemplo un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos de la cual es idéntica a la secuencia de ARNm y por lo general se proporciona en listados de secuencia, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, pueden ser referidas como que codifican la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

40 A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas una de la otra y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

45 Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido separado de las secuencias que lo flanquean en un estado de origen natural, es decir, un fragmento de ADN que ha sido retirado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento, es decir, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se produce naturalmente. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente a partir de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, es decir, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan naturalmente en la célula. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionota o eucariota, o que existe como una molécula separada (es decir, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de una secuencia de polipéptido adicional de codificación de gen híbrido.

55 En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que se producen comúnmente. "A" se refiere a la adenosina, "C" se refiere a la citosina, "G" se refiere a la guanosina, "T" se refiere a la timidina, y "U" se refiere a la uridina.

La frase "bajo el control transcripcional" o "unido operativamente" tal como se utiliza en este documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con los polinucleótidos para controlar la iniciación de ARN polimerasa y la expresión de los polinucleótidos.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico operativamente unido a la secuencia promotora / reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que expresa el producto génico en una forma específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula bajo la mayoría o bajo todas las condiciones fisiológicas de la célula.

15 Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo cuando está presente en la célula un inductor que corresponde al promotor.

20 Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

25 Un "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede ser utilizado para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Existen numerosos vectores que son conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, los polinucleótidos lineales, los polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, los plásmidos y los virus. Así, el término "vector" incluye un plásmido de replicación autónoma o un virus. El término también debe interpretarse para incluir compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico en células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovirales, y similares.

30 "Vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos para ser expresados. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión in vitro. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, como por ejemplo cósmidos, plásmidos (es decir, desnudos o contenidos en liposomas) y virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

35 "Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas de forma natural. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede estar incluido en un vector adecuado, y el vector puede utilizarse para transformar una célula huésped adecuada. Un polinucleótido recombinante puede servir también para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión de ribosomas, etc.).

45 Tal como se utiliza en el presente documento, un "trastorno de la sangre" se refiere a cualquier condición, crónica o aguda, en la que un sujeto carece o tiene un número reducido significativo desde el punto de vista médico de al menos un tipo de célula sanguínea madura funcional, incluyendo, pero sin limitarse a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células T, células B, células NK, eritrocitos, megacariocitos y células dendríticas. La condición puede ser crónica o aguda. La causa subyacente de la condición puede ser conocida, como por ejemplo, pero sin limitarse a, inducida químicamente o inducida genéticamente, o la causa subyacente puede ser desconocida o incierta (es decir, idiopática). Los trastornos de la sangre incluyen trastornos hiperproliferativos y trastornos hipoproliferativos que van acompañados de o se caracterizan por un número insuficiente de al menos un tipo de célula sanguínea madura.

50 Por "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier vehículo, diluyente o excipiente que sea compatible con el componente biológico de una composición farmacéutica y no perjudicial para el receptor.

Descripción de la Invención

55 En la presente invención, se demuestra que las células CD34⁺, las células ALDH^{br} y las células que expresan ABCG2 se obtienen en gran cantidad a partir de un tejido adiposo aislado. Se muestra además que las células obtenidas comprenden una variedad de subpoblaciones características de CMH. Los ejemplos no limitadores de las subpoblaciones incluyen una célula ALDH^{br} SSC^{lo}, una célula CD34⁺ SSC^{lo}, una célula CD34⁺ALDH^{br}, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻ALDH^{br}, una célula

CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}, una célula CD34⁺CD45⁻, una célula CD34⁺CD45⁺, y una célula CD34⁺ALDH^{br}SSC^{lo}. Se muestra además que las células CD34⁺ obtenidas comprenden una variedad de progenitores hematopoyéticos multipotenciales y progenitores hematopoyéticos de linaje comprometido. Por lo tanto, la invención proporciona un método de aislamiento con un alto rendimiento de una población de células CD34⁺, células ALDH^{br} o células que expresan ABCG2, que comprenden CMH, a partir de tejido adiposo. La invención proporciona además una composición de células CD34⁺, células ALDH^{br}, o células que expresan ABCG2, que comprenden CMH, aisladas por el método de la invención para producir una población altamente enriquecida de CMH como un cultivo primario. Las CMH de la presente invención pueden ser utilizadas además en un método de tratamiento de un sujeto en necesidad de CMH. De manera ventajosa, por lo tanto, el método y la composición de la invención reducen o impiden la necesidad de expansión de células CD34⁺, de células ALDH^{br}, o de células que expresan ABCG2 aisladas, que comprenden CMH, antes del uso en un método para un tratamiento terapéutico.

El tejido adiposo ofrece una alternativa ventajosa a la médula ósea o a la sangre de cordón umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas multipotenciales. El tejido adiposo es fácilmente accesible y abundante en muchos individuos. De hecho, la obesidad es una enfermedad de proporciones epidémicas en los Estados Unidos, donde más del 50% de los adultos supera el índice de masa corporal (IMC) recomendado en función de su altura y su peso. El tejido adiposo se puede cosechar por liposucción de forma ambulatoria. La liposucción es un procedimiento mínimamente no invasiva con efectos cosméticos, que son aceptables para la gran mayoría de los pacientes. Además, está bien documentado que los adipocitos son una población celular renovable. De hecho, con el paso del tiempo es común observar la reaparición de los adipocitos en un individuo en el mismo sitio. Por lo tanto, aquellos que no aprecian el efecto cosmético inicial de la extracción de tejido adiposo, sin embargo, deberían ser susceptibles al procedimiento.

En marcado contraste con las fuentes tradicionales, incluyendo la médula ósea, la sangre periférica y la sangre de cordón umbilical, se ha descubierto que el tejido adiposo es una fuente rica en células CD34⁺, células ALDH^{br} y de células que expresan ABCG2. Específicamente, en el presente documento se muestra que las células de la SVF obtenidas a partir de tejido adiposo humano comprenden al menos aproximadamente un 5% y, posiblemente, al menos aproximadamente un 10% de células CD34⁺, que comprenden CMH. Se muestra, además, que al menos entre aproximadamente un 40% y aproximadamente un 60% de las células de la SVF no adherentes son CD34⁺. Se muestra que al menos entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% de las células de la SVF no adherentes son ALDH^{br}. También se muestra que al menos entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 20% de las células no adherentes de SCF son células que expresan ABCG2. Estos altos porcentajes permiten un rendimiento notablemente alto de las células CD34⁺, de las células ALDH^{br} o de las células que expresan ABCG2, que comprenden las CMH, que se pueden obtener a partir de cantidades modestas de tejido adiposo. En una forma de realización del método de la invención, por ejemplo, se pueden aislar al menos aproximadamente 1×10^7 células CD34⁺ a partir de aproximadamente 100 mililitros (ml) de tejido adiposo aislado a partir de un procedimiento de liposucción. En contraste, 100 ml de médula ósea o sangre de cordón umbilical producen habitualmente sólo alrededor de $1-2 \times 10^6$ células CD34⁺.

Un procedimiento típico de liposucción cosmética genera aproximadamente entre 3 y aproximadamente 4 litros de lipoaspirado. Utilizando el método de la invención, esta cantidad de tejido adiposo produciría potencialmente al menos aproximadamente de 3 a 4×10^8 células CD34⁺, sin necesidad de cultivo ni de una expansión prolongada. En un procedimiento típico trasplante de CMH, se requieren aproximadamente 2×10^6 células CD34⁺ por kilogramo de peso corporal a infundir en un receptor para lograr un injerto rápido. Por consiguiente, una persona de 100 kg requiere alrededor de 2×10^8 células CD34⁺. Por lo tanto, el rendimiento de un solo aspirado de liposucción es potencialmente suficiente para tratar e injertar a un adulto de tamaño promedio. En consecuencia, el tejido adiposo puede ser la fuente más clínicamente relevante y más rica en CMH identificada hasta la fecha.

Las composiciones y métodos de la presente invención tienen innumerables aplicaciones útiles. El método de la invención es útil para la preparación de grandes cantidades de células CD34⁺, que comprenden CMH y células ALDH^{br}, que comprenden CMH, o células que expresan ABCG2, que comprenden CMH, de manera rápida y sin necesidad de expansión ni de pases múltiples para lograr un número suficiente de CMH para aplicaciones terapéuticas. La composición de células madre hematopoyéticas derivadas de tejido adiposo se puede utilizar en métodos terapéuticos para aliviar o tratar trastornos de la sangre en un individuo. La composición y el método también se pueden utilizar con fines de investigación, incluyendo, pero sin limitarse a, la identificación de compuestos que afectan a la expansión o a la diferenciación de CMH.

I. Aislamiento de CMH a partir de un Tejido Adiposo Aislado

El tejido adiposo útil en la invención puede haber sido obtenido de cualquier mamífero utilizando cualquier método conocido por el experto en la técnica. Los mamíferos útiles como fuentes de tejido adiposo en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, vacas, ovejas, cabras, perros, caballos, gatos, primates no humanos y seres humanos. Preferiblemente, el tejido adiposo se aísla a partir de un primate y,

más preferiblemente, de un humano. Preferiblemente, el tejido adiposo es tejido adiposo blanco subcutáneo. Una fuente preferida de tejido adiposo es el tejido adiposo omental. En los seres humanos, el tejido adiposo se aísla habitualmente mediante liposucción. Si las células de la invención van a ser utilizadas en un método para un tratamiento terapéutico mediante un trasplante a un ser humano, es preferible que el tejido adiposo haya sido aislado a partir de ese mismo sujeto para proporcionar un trasplante autólogo, o a partir de un hermano genéticamente idéntico (por ejemplo, gemelo idéntico) para prevenir un trasplante singénico. Alternativamente, sin embargo, las CMH administradas pueden ser alogénicas.

De acuerdo con una forma de realización de la invención, las CMH derivadas de tejido adiposo se aíslan mediante el aislamiento de las células CD34⁺ no adherentes de la SVF. En otra forma de realización, las CMH se aíslan a partir de tejido adiposo mediante el aislamiento de las células ALDH^{br} no adherentes de la SVF. En un aspecto, las células ALDH^{br}SSC^{lo} no adherentes de la SVF, que comprenden las CMH derivadas de tejido adiposo, están aisladas. En otra forma de realización, las CMH derivadas de tejido adiposo se aíslan mediante el aislamiento de las células no adherentes que expresan ABCG2 de la SVF.

Cualquier método conocido por parte de un experto para la preparación de SVF a partir de tejido adiposo puede ser utilizado en la práctica de la invención. Por ejemplo, dichos métodos se describen en la patente de EE.UU. No. 6,153,432. Habitualmente, el tejido adiposo se trata con colagenasa en concentraciones de entre un 0.01 y un 0.5%, preferiblemente de entre un 0.04 y un 0.3%, y lo más preferiblemente de aproximadamente un 0,2%, la tripsina en concentraciones de entre un 0.01 y un 0.5%, preferiblemente de un 0.04%, lo más preferiblemente de aproximadamente un 0.2%; y/o la dispasa en concentraciones de 0.5 ng/ml a 10 ng/ml; y/o concentraciones efectivas de hialuronidasa o DNasa; y ácido etilendiamina tetracético (EDTA) en concentraciones de aproximadamente 0.01 a 2.0 mM, preferiblemente de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1.0 mM, más preferiblemente de 0.53 mM; a temperaturas de entre 25° y 50°C, preferentemente de entre 33° y 40°C, lo más preferentemente a 37°C, durante periodos de entre 10 minutos y 3 horas, preferentemente entre 30 minutos y 1 hora, más preferiblemente 45 minutos. Opcionalmente, las células se pasan a través de un filtro de nailon o estopilla de malla de entre 20 micras y 800 micras, más preferiblemente de entre 40 y 400 micras, y lo más preferiblemente de 70 micras. A continuación las células se someten a centrifugación diferencial directamente en los medios o en un Ficoll o Percoll u otro gradiente de partículas. Las células se centrifugan a velocidades de entre 100 y 3000 X g, más preferiblemente de entre 200 y 1500 X g, más preferiblemente al 500 X g durante periodos de entre 1 minuto a 1 hora, más preferiblemente de entre 2 y 15 minutos, lo más preferiblemente de 5 minutos, a temperaturas entre 4° y 50°C, preferentemente entre 20° y 40°C, lo más preferiblemente a aproximadamente 25°C. Este sedimento celular es la SVF. El sedimento de células de la SVF está fijado con placas para obtener células no adherentes.

Las células no adherentes de la SVF son aisladas incubando en primer lugar las células de la SVF en medio de células estromales en un aparato de cultivo durante un período de tiempo. Un "período de tiempo" puede ser cualquier tiempo adecuado para el cultivo de células in vitro y para permitir que las células adherentes se adhieran. En una forma de realización, el período de tiempo es de aproximadamente 12 horas. En una forma de realización preferente, el período de tiempo es de 24 horas. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo de uso común en el cultivo de células in vitro. Un aparato de cultivo preferente es un matraz de cultivo, en que un aparato de cultivo más preferido es un matraz de cultivo T-225. La densidad de las placas puede variar de entre aproximadamente 10,000 células por cm² a aproximadamente 100,000 células por cm². En una forma de realización, las células se colocaron en placas en un frasco de cultivo a aproximadamente 50,000 células por cm² y cualquier número entero entre los mismos. Sin embargo, la invención no está limitada por la densidad de las placas. El experto en la técnica puede determinar la densidad de las placas apropiada con la experimentación de rutina.

Las células no adherentes que comprenden las CMH se recogen del aparato de cultivo en cualquier momento durante el cultivo. Un método no limitativo para la recogida de las células no adherentes comprende la retirada de los medios líquidos desde el aparato de cultivo. El medio puede ser reemplazado durante el cultivo de las células de la SVF en cualquier momento; el medio eliminado que comprende células de la SVF no adherentes (y por lo tanto CMH) puede ser recogido diariamente hasta la primera tripsinización de pase. Preferiblemente, el medio de células estromales se sustituye cada 3 a 4 días.

Si se desea, las células del estroma derivadas de tejido adiposo (ASC), presentes en la fracción adherente, también se recogen del aparato de cultivo. Las ASC se pueden utilizar inmediatamente o pueden ser criopreservadas para ser almacenados para su utilización en un momento posterior. Las células estromales derivadas de tejido adiposo pueden ser cosechadas por tripsinización, por tratamiento con EDTA, o mediante cualquier otro procedimiento utilizado para cosechar las células adherentes de un aparato de cultivo. Las células estromales derivadas de tejido adiposo se pueden administrar a un sujeto que recibe las CMH, por ejemplo, para proporcionar células de soporte hematopoyéticas para ayudar en el injerto de las CMH.

Las CMH se pueden caracterizar por cualquier método conocido por el experto en la materia. El inmunofenotipo de las CMH puede ser explotado para servir como identificadores exclusivos para las CMH. Es decir, los únicos marcadores de superficie celular en las células de interés se pueden utilizar para aislar

una subpoblación específica de células de una población mixta de células derivadas de tejido adiposo. Los marcadores fenotípicos de CMH son bien conocidos por aquellas personas con unos conocimientos ordinarios en la técnica, y están publicados de manera abundante en la literatura. Los marcadores fenotípicos adicionales continúan siendo divulgados o pueden ser identificados sin experimentación indebida. Algunos marcadores fenotípicos específicos para las CMH incluyen CD34, CD45, CD38^{lo/-}, CD41, y ABCG2. Otras características de las CMH son la alta actividad de aldehído deshidrogenasa (ALDH^{br}) y la baja dispersión lateral) (SSC^{lo}). Otros marcadores de CMH y diversos linajes comprometidos hematopoyéticos incluyen CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD32, CD51, CD52, CD53, CD56, CD57, CD60, CD61, CD62L, CD65, CD72, CD73, CD81, CD82, CD83, CD90, CD99, CD100, CD117, TCR, P-selectina, HLA-DR, etc. Una persona con una experiencia ordinaria en la técnica reconocerá que los métodos colorimétricos, fluorescentes, inmunoquímicos, de reacción en cadena de la polimerasa, químicos o radioquímicos conocidos pueden determinar fácilmente la presencia o ausencia de un marcador específico de linaje o la actividad enzimática.

Preferentemente, las CMH derivadas de tejido adiposo se caracterizan por la expresión de la superficie celular de CD34, una alta actividad de ALDH (ALDH^{br}), las propiedades de dispersión de luz (por ejemplo, SSC^{lo}) y/o la expresión de ABCG2. Las células no adherentes aisladas a partir de la SVF comprenden al menos aproximadamente un 10% de células CD34⁺, preferiblemente al menos aproximadamente un 20% de CD34⁺ y más preferiblemente al menos aproximadamente un 40% de células CD34⁺. Las células no adherentes aisladas a partir de la SVF comprenden al menos aproximadamente un 10% de células ALDH^{br}, preferiblemente al menos aproximadamente un 15% de células ALDH^{br} y más preferiblemente al menos aproximadamente un 20% de células ALDH^{br}. Las células no adherentes aisladas a partir de la SVF comprenden al menos aproximadamente un 10% de células que expresan ABCG2, preferiblemente al menos aproximadamente un 15% de células que expresan ABCG2 y más preferiblemente al menos aproximadamente un 20% de células que expresan ABCG2.

Un experto en la técnica apreciará además que un anticuerpo específico para un marcador de superficie celular puede ser conjugado a un soporte físico (es decir, una perla de estreptavidina) y, por lo tanto, ser utilizado para unir y aislar CMH que tienen ese marcador de superficie celular específico. Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a una CMH incluye, pero no se limita a, un anticuerpo anti-CD34⁺. Después de la unión, las CMH unidas se pueden separar de las células restantes mediante, por ejemplo, separación magnética utilizando perlas magnéticas, incluyendo, pero sin limitarse a Dynabeads® (DynaL Biotech, Brown Deer, Wisconsin.). Además de la utilización de Dynabeads®, se pueden utilizar reactivos de separación MACS (Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) para eliminar las CMH a partir de una población mixta de células. Alternativamente, el inmunofenotipo, las propiedades de dispersión de luz, y/o la presencia de un producto de la enzima característica de HCS detectable de CMH permiten la clasificación utilizando un clasificador de células basado en la citometría de flujo. Como resultado de la etapa de separación o clasificación de células, se obtiene una población de células CD34⁺, células ALDH^{br} y/o células que expresan ABCG2, enriquecidas para CMH. En una forma de realización, la población de las CMH es una población de células purificadas. Las CMH aisladas se pueden utilizar inmediatamente en aplicaciones terapéuticas sin expansión adicional, pueden ser criopreservadas utilizando técnicas conocidas en la técnica o pueden ser cultivadas y expandidas y, opcionalmente, diferenciadas in vitro utilizando métodos descritos en el presente documento o procedimientos convencionales.

Las CMH pueden caracterizarse también mediante la realización de ensayos de formación de colonias para evaluar progenitores hematopoyéticos multipotenciales y de linaje comprometido. Cualquier método conocido para el experto en la materia para la realización de ensayos de formación de colonias puede ser utilizado. Preferentemente, las CMH en células no adherentes aisladas del SVF comprenden macrófagos de granulocitos de unidad formadora de colonias (CFU-GM), eritrocitos formadores de unidades en estallido (BFU-E) y los megacariocitos macrófagos eritrocitos de granulocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GEMM).

Un medio útil para el cultivo de ASC se denomina en el presente documento como "medio de células estromales". Un medio útil para el cultivo de células madre hematopoyéticas se denomina en el presente documento como "medio de células madre hematopoyéticas". Se puede utilizar cualquier medio capaz de soportar los fibroblastos en cultivo celular como un medio de células estromales, como un medio de células madre hematopoyéticas o como un medio para el co-cultivo de ASC y CMH. Habitualmente, un medio celular estromal o un medio de células madre hematopoyéticas comprende un medio base, suero y un antibiótico/antimicótico. Un ejemplo no limitador de un medio celular estromal es un medio que comprende DMEM/F 12 de Ham, suero bovino fetal al 10% (FBS), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Pen-Strep) y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Un ejemplo no limitador de un medio de células madre hematopoyéticas es un medio que comprende DMEM, suero bovino fetal al 10% (FBS), 4 mM de L-glutamina, 50 mg/ml de penicilina y estreptomina, y 100 ng/ml cada uno de ligando Fit-3, factor de células madre y factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos (MGDF). Otro ejemplo de un medio de células madre hematopoyéticas es el medio de Iscove con un 2% de FBS. Este medio resulta útil, por ejemplo, en la dilución de las células para los ensayos de CFU. Sin embargo, las ASC y las CMH pueden cultivarse en un medio base suplementado con al menos un factor de crecimiento, citoquina u hormona y sin un antibiótico/antimicótico.

Los medios útiles en el aislamiento y la propagación de las CMH de acuerdo con los métodos de la invención son conocidos en la técnica. Estos medios también resultan útiles en el aislamiento y la propagación de las ASC. Los ejemplos de medios de base no limitadores útiles en los métodos de la invención incluyen medio esencial mínimo de Eagle, ADC-1, LPM (albúmina de suero bovino libre), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, medio BGJ (con y sin Modificación de Fitton-Jackson), medio basal de Eagle (BME-con la adición de base de sal de Earle), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-sin suero), Yamane, IMEM-20, Medio Eagle con Modificación de Glasgow (GMEM), medio L-15 de Leibovitz, medio 5A de McCoy, medio M199 (M199E-con la base de sal de Earle), medio M199 (M199H con base de sal de Hank), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-E con base de sal de Earle), medio esencial mínimo de Eagle (MEM-H con base de sal de Hank) medio mínimo esencial de Eagle y (MEM-NAA con aminoácidos no esenciales), entre muchos otros, incluido el medio 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams 'G, Neuman y Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411, MDBC 153. Un medio preferente para su utilización en la presente invención es DMEM. Estos y otros medios útiles están disponibles en GIBCO, Grand Island, N.Y., EE.UU., y Biological Industries, HaEmek Bet, Israel, entre otros. Un número de estos medios se encuentran resumidos en Methods in Enzymology, Volumen LVIII, "Cellular culture", pp. 62-72, editado por William B. Jakoby e Ira H. Pastan, publicado por Academic Press, Inc. Sigma-Aldrich, STEMCELL Technologies, StemGenix, Mabio y Quality Biological Inc., entre otros, y ofrecen medios patentados para la propagación de las células madre hematopoyéticas.

Los sueros útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, suero fetal de bovino o de otra especie en una concentración de al menos un 1% a aproximadamente un 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente un 5% a un 15%, y lo más preferiblemente de aproximadamente un 10%. El extracto embrionario de pollo o de otras especies puede estar presente en una concentración de aproximadamente un 1% a un 30%, preferiblemente de al menos aproximadamente un 5% a un 15%, más preferiblemente de aproximadamente un 10%. En algunas formas de realización terapéuticas para seres humanos, puede no ser deseable el uso de sueros no humanos, debido a los riesgos de seguridad de la posible transmisión de contaminantes adventicios infecciosos en el suero. El médico experto está familiarizado con la gestión médicamente apropiada de las CMH para aplicaciones terapéuticas.

Por "factores de crecimiento, citoquinas, hormonas" se entienden los siguientes factores específicos, incluyendo, pero sin limitarse a, la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de macrófagos, la trombopoyetina (TPO), la hormona de crecimiento (GH), la interleucina 1- α y 1- β , la interleucina 3 (IL-3), la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 5 (IL-5), la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 7 (IL-7), la interleucina 9 (IL-9), la interleucina 10 (IL-10), la interleucina 11 (IL-11), la interleucina 13 (IL-13), el ligando c-kit / factor de células madre (SCF), la insulina, los factores de crecimiento similares a la insulina, tales como por ejemplo IGF-2, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la proteína inhibidora de macrófagos 1 α (MIP 1 α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), como por ejemplo FGF-1, el ligando FLT 3-/FLK-2, el factor de crecimiento y de desarrollo de megacariocitos (MGDF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en concentraciones en un nivel de entre picogramos/ml a miligramos/ml. Los factores útiles para la expansión de las CMH incluyen, pero no se limitan a, IL-3, SCF, ligando FLT-3 / FLK-2, IL-6 y GM-CSF. Cuando las CMH se van a utilizar en una aplicación terapéutica para ser administrada a un ser humano, cualquier factor de crecimiento, citoquinas y/u hormona en los medios es preferiblemente humano. Se reconoce además que se pueden añadir componentes adicionales al medio de cultivo. Dichos componentes pueden ser antibióticos, antimicóticos, albúmina, aminoácidos y otros componentes conocidos en la técnica para el cultivo de células. Además, se pueden añadir componentes para mejorar el proceso de diferenciación. Los antibióticos que se pueden añadir en el medio incluyen, pero no se limitan a, penicilina y estreptomina. La concentración de la penicilina en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 unidades por ml. La concentración de estreptomina en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 μ g/ml. Sin embargo, la invención de ninguna manera debería ser interpretada como limitada a cualquier medio para cultivar células estromales y/o CMH. Más bien, se puede usar cualquier medio capaz de soportar las células de la SVF de tejido adiposo y las CNH en cultivo de tejidos.

Las CMH derivadas de tejido adiposo, aisladas tal como se describe en el presente documento, pueden ser criopreservadas de acuerdo con los procedimientos de rutina. Preferiblemente, alrededor de uno a diez millones de células son criopreservadas en medio de células del estroma que contiene un 10% de DMSO en fase de vapor de N₂ líquido. Las células congeladas pueden descongelarse por agitación en un baño a 37°C, se resuspenden en medio de cultivo fresco, y se expanden tal como se describe anteriormente.

II. Utilización de CMH

Las CMH derivadas de tejido adiposo obtenidas por el método de la invención se pueden utilizar en cualquier método conocido en la técnica para la utilización de CMH. Además, las CMH se pueden utilizar en métodos y composiciones todavía por descubrir. Las CMH se pueden utilizar en un método para un tratamiento terapéutico administrándolas a un sujeto receptor en necesidad de CMH.

El sujeto receptor puede ser cualquier mamífero, incluyendo caballo, cabra, ganado bovino, perro, oveja, gato, primate no humano, y ser humano. Preferiblemente, el sujeto receptor es un ser humano. La fuente del tejido adiposo aislado utilizado para obtener CMH para el trasplante puede ser la misma que el sujeto receptor de la terapia (trasplante autólogo) o puede ser de un sujeto donante. El sujeto donante puede ser genéticamente idéntico al sujeto receptor (trasplante singénico) o puede ser un sujeto no genéticamente idéntico de la misma especie (trasplante alogénico).

Los trastornos que pueden tratarse por infusión de las células descritas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades resultantes de un fallo de una disfunción de la producción y la maduración normal de células sanguíneas (es decir, anemia aplásica y trastornos de las células madre hipoproliferativas). La administración de las CMH tiene por objeto complementar o sustituir la producción y la maduración defectuosa de glóbulos endógenos. Dichos trastornos pueden ser generalmente enfermedades neoplásicas, malignas en los órganos hematopoyéticos (por ejemplo, leucemia y linfomas); un amplio espectro de tumores sólidos malignos de origen no hematopoyético; enfermedades autoinmunes; o trastornos genéticos. Dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a enfermedades que son el resultado de un fallo o de una disfunción en la producción y la maduración normal de glóbulos, trastornos de células madre hiperproliferativas, incluyendo anemia aplásica, pancitopenia, agranulocitosis, trombocitopenia, aplasia de glóbulos rojos, síndrome de Blackfan-Diamond, debidos a medicamentos, radiación o infección, idiopáticos; neoplasias hematopoyéticas incluyendo leucemia linfoblástica aguda (linfocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, mieloesclerosis maligna aguda, mieloma múltiple, policitemia vera, mielometaplasia agnógena, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin; inmunosupresión en pacientes con tumores malignos sólidos, incluyendo melanoma maligno, carcinoma del estómago, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón de células pequeñas, retinoblastoma, carcinoma testicular, glioblastoma, rabdomiosarcoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, linfoma; enfermedades autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, diabetes tipo I, hepatitis crónica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico; trastornos genéticos (congénitos), incluyendo anemias, aplasia familiar, síndrome de Fanconi, deficiencias de la dihidrofolato reductasa, deficiencia de formamino transferasa, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome diseritropoyético congénito I-IV, síndrome de Chwachmann-Diamond, deficiencias de dihidrofolato reductasa, deficiencia de formamino transferasa, síndrome de Lesch-Nyhan, esferocitosis congénita, eliptocitosis congénita, estomatocitosis congénita, enfermedad de Rh nulo congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna, G6PD (glucosa-6-fosfato dehidrogenasa) variantes 1, 2, 3, deficiencia de piruvato quinasa, sensibilidad de eritropoyetina congénita, deficiencia, enfermedad y características de células falciformes, talasemia alfa, beta, gamma, met-hemoglobinemia, trastornos congénitos de la inmunidad, enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome del linfocito desnudo, inmunodeficiencia combinada sensible al ionóforo, inmunodeficiencia combinada con una anomalía limitadora, deficiencia de nucleósido fosforilasa, deficiencia de actina de granulocitos, agranulocitosis infantil, enfermedad de Gaucher, deficiencia de adenosina deaminasa, síndrome de Kostmann, disgenesia reticular, síndromes de disfunción congénita de leucocitos; y otros tales como osteoporosis, mieloesclerosis, anemias hemolíticas adquiridas, inmunodeficiencias adquiridas, trastornos infecciosos que causan inmunodeficiencias primarias o secundarias, infecciones bacterianas (por ejemplo, Brucelosis, listeriosis, tuberculosis, lepra), infecciones parasitarias (por ejemplo, malaria, leishmaniasis), infecciones por hongos, trastornos que implican desproporciones en conjuntos de células linfoides y deterioro de las funciones inmunes debido al envejecimiento, trastornos de los fagocitos, agranulocitosis de Kostmann, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Chediak-Higachi, deficiencia de actina de neutrófilos, deficiencia de membrana de neutrófilos GP-180, enfermedades de almacenamiento metabólico, mucopolisacaridosis, mucopolidosis, trastornos diversos que implican mecanismos inmunes, síndrome de Wiskott-Aldrich, deficiencia de alfa 1-antitripsina, entre otros.

Las células pueden ser utilizadas en un método para un tratamiento terapéutico mediante administración a un sujeto receptor en una amplia variedad de formas. Los modos de administración preferentes son parenteral, intraperitoneal, intravenoso, intradérmico, epidural, intraespinal, intraesternal, intraarticular, intra-sinovial, intratecal, intra-arterial, intracardiaco, intramuscular, intranasal, subcutáneo, intraorbital, intracapsular, tópico, parche transdérmico, vía rectal, vaginal o uretral incluyendo a través de supositorio, percutánea, aerosol nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión, o mediante catéter. En una forma de realización, el agente y el vehículo se administran en una formulación de liberación lenta como por ejemplo una inyección directa de tejido o bolo, implante, micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera. Un método de administración preferente es infusión intravenosa. Los métodos para trasplantes de médula ósea son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4,678,470, y la patente de EE.UU. No. 5,571,083, muestra métodos para el trasplante de células a cualquier localización anatómica en el cuerpo.

Con el fin de utilizar las células de la presente invención en un método para un tratamiento terapéutico por medio de un trasplante a un ser humano, las células son aisladas tal como se describe en el presente documento. Las CMH aisladas pueden ser tratadas posteriormente en cualquier forma médicamente necesaria para el trasplante. Opcionalmente, las células como por ejemplo las células T, se eliminan de las CMH utilizando métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, elutriación a contracorriente centrífuga, formación de aglutinina de soja/E-roseta, centrifugación en gradiente de

densidad y agotamiento inmunológico. Los métodos de purgar las células tumorales para los trasplantes autólogos como parte del tratamiento del cáncer también son conocidos en la técnica.

5 Preferentemente, las células que van a ser utilizadas en un método para un tratamiento terapéutico mediante trasplante son del sujeto en el que las células van a ser trasplantadas (trasplante autólogo). En el caso en el que las células no son del paciente (trasplante alogénico), se determinan habitualmente el tipo de sangre o la compatibilidad de haplotipo determinada entre la célula del donante y el paciente. Un médico experto en la técnica estará familiarizado con los problemas de compatibilidad en los trasplantes alogénicos.

10 Entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} células CD34⁺, ALDH^{br} y/o que expresan ABCG2 por cada 100 kg de peso son necesarias en un método para un tratamiento terapéutico mediante administración a un ser humano. En algunas formas de realización, se administran entre aproximadamente 1.5×10^6 y aproximadamente 1.5×10^{12} células por cada 100 kg de peso. En algunas formas de realización, son necesarias entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 5×10^{11} células por cada 100 kg de peso. En algunas formas de realización, entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 2×10^{11} células son necesarias por cada 100 kg de peso. En otras formas de realización, son necesarias entre aproximadamente 5×10^8 células y aproximadamente 1×10^{10} células por cada 100 kg de peso. Las células pueden ser utilizadas en un método para un tratamiento terapéutico mediante la administración a una persona por varios métodos que incluyen pero no se limitan a la infusión y la administración intravenosa.

20 En algunas formas de realización, se proporciona una administración única de células. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones a lo largo de 3-7 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan 3-7 administraciones a lo largo de 3-7 días consecutivos. En otras formas de realización, se proporcionan 5 administraciones en el transcurso de 5 días consecutivos.

25 En algunas formas de realización, se proporciona una administración única de entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporciona una sola administración de entre aproximadamente 1.5×10^8 y alrededor de 1.5×10^{12} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporciona una sola administración de entre aproximadamente 1×10^8 y alrededor de 5×10^{11} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporciona una administración única de aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{10} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporciona una administración única de 1×10^{10} células por 100 kg de peso.

30 En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones de entre aproximadamente 10^5 y aproximadamente 10^{13} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones de entre aproximadamente 1.5×10^8 y alrededor de 1.5×10^{12} células por 100 kg de peso. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones de entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 5×10^{12} células por 100 kg de peso en el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones de aproximadamente 4×10^9 células por 100 kg de peso en el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan múltiples administraciones de aproximadamente 2×10^{11} células por 100 kg de peso en el transcurso de 3-7 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan 5 administraciones de aproximadamente 3.5×10^9 células en el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan 5 administraciones de aproximadamente 4×10^9 células en el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan 5 administraciones de aproximadamente 1.3×10^{11} células en el transcurso de 5 días consecutivos. En algunas formas de realización, se proporcionan 5 administraciones de aproximadamente 2×10^{11} células en el transcurso de 5 días consecutivos.

45 En otra forma de realización, las CMH son tratadas con un factor de crecimiento, citoquinas u hormonas para inducir el compromiso de un estado diferenciado particular, antes de su administración. Las CMH derivadas de tejido adiposo pueden diferenciarse in vitro mediante el tratamiento de las células con factores de diferenciación tal como se describe en otro punto en el presente documento y por métodos estándar conocidos en la técnica.

50 Las células diferenciadas de forma parcial o terminal se pueden caracterizar por la identificación de proteínas de superficie e intracelulares, genes y/u otros marcadores indicativos del compromiso de linaje de la CMH a un estado diferenciado terminal particular. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, (a) la detección de proteínas de superficie celular por métodos de inmuno-fluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos de proteínas vinculados mediante una etiqueta fluorescente secundaria, incluyendo la utilización de métodos de citometría de flujo; (b) la detección de proteínas intracelulares por medio de métodos inmunofluorescentes que utilizan anticuerpos monoclonales específicos de proteínas vinculadas mediante una etiqueta fluorescente secundaria, incluyendo la utilización de métodos de citometría de flujo; (c) la detección de genes celulares mediante la reacción en cadena de la polimerasa, hibridación in situ, y/o análisis de transferencia Northern.

60 En otra forma de realización, las células estromales derivadas de tejido adiposo (ASC) también se utilizan en un método para un tratamiento terapéutico mediante la administración al sujeto receptor con el fin de

proporcionar células de soporte hematopoyéticas con el fin de ayudar en el injerto de la CMH. Las ASC pueden co-infundidas con las CMH o se pueden administrar antes o después de la administración de las CMH. Las ASC se pueden administrar utilizando unas pautas de dosificación similares de acuerdo con lo previsto para las CMH.

5 III. Modificación genética

10 En otra forma de realización, las CMH derivadas de tejido adiposo de la invención son modificadas genéticamente, por ejemplo, para expresar genes exógenos o secuencias de codificación o para reprimir o de alguna otra forma alterar la expresión de genes endógenos. Dicha modificación genética puede tener un beneficio terapéutico cuando se administran las CMH a un sujeto. Como alternativa, la modificación genética puede proporcionar un medio para realizar un seguimiento o identificar las células modificadas de este modo, por ejemplo, después del trasplante de dichas CMH modificadas genéticamente, derivadas de tejido adiposo en un sujeto. El seguimiento de una célula puede incluir el seguimiento de la migración, la asimilación y la supervivencia de una célula modificada genéticamente y trasplantada. La modificación genética también puede incluir al menos un segundo gen. Un segundo gen puede codificar, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos seleccionable u otro marcador seleccionable.

Las proteínas útiles para el seguimiento de una célula incluyen, pero no se limitan a, proteína verde fluorescente (GFP), cualquiera de las otras proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteínas fluorescentes aumentadas verdes, cian, amarillas, azules y rojas; Clontech, Palo Alto, CA.), u otras proteínas con etiqueta (por ejemplo, LacZ, etiqueta FLAG, Myc, His 6, y similares).

20 El seguimiento de la migración, la diferenciación y la integración de las células de la presente invención no se limita a la utilización de moléculas detectables expresadas a partir de un vector o virus. La migración, integración y diferenciación de una célula se pueden determinar utilizando una serie de sondas que permitirían la localización de las CMH trasplantadas. El seguimiento de las células trasplantadas puede llevarse a cabo además mediante el uso de anticuerpos o sondas de ácidos nucleicos para los marcadores específicos de células que se detallan en otro punto del presente documento.

25 Las CMH modificadas genéticamente pueden ser utilizadas terapéuticamente en un método para, que incluye pero no se limita a, proporcionar la expresión de una proteína que es mutada, deficiente o de otra manera disfuncional en el paciente. Por ejemplo, las CMH pueden ser modificadas genéticamente para proporcionar hemoglobina A en lugar de, o además de la hemoglobina S, para el tratamiento de la anemia de células falciformes. La Talasemia y Inmunodeficiencia combinada severa de enlace X son otros candidatos, no limitativos, para la terapia génica que utiliza CMH modificadas genéticamente ex vivo. Se puede utilizar una célula que expresa un ácido nucleico aislado deseado para proporcionar el producto del ácido nucleico aislado a otra célula, tejido, o mamífero completo en que un nivel más alto del producto génico resulta útil para tratar o aliviar una enfermedad, trastorno o afección asociada con la expresión y/o la actividad anormal. Por lo tanto, la invención incluye una CMH que expresa un ácido nucleico aislado que codifica una secuencia deseada en la que el aumento de la expresión, el nivel de proteína, y/o la actividad de la proteína deseada pueden ser útiles en un método para tratar o aliviar una enfermedad, trastorno o condición que implica al sistema hematopoyético.

40 La invención también incluye una CMH que, cuando un ácido nucleico aislado se introduce en la misma, y la proteína codificada por el ácido nucleico se expresa a partir del mismo, en la que no estaba presente o expresada en la célula o en la que se expresa ahora a un nivel o en circunstancias diferentes que antes de la introducción del transgén, se obtiene un beneficio. Dicho beneficio puede incluir el hecho de que se ha proporcionado un sistema en el que la expresión del ácido nucleico deseado puede ser estudiada in vitro en el laboratorio o en un mamífero en el que reside la célula, un sistema en el que las células que comprenden el ácido nucleico introducido puede ser utilizado como herramienta de investigación, de diagnóstico y terapéutica, y un sistema en el que se generan modelos de mamíferos que resultan útiles para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y terapéuticas para estados de enfermedad seleccionados en un mamífero.

50 Por lo tanto, la invención abarca vectores de expresión y métodos para la introducción de ADN exógeno en las CMH con la expresión del ADN exógeno en las células. El experto en la técnica está familiarizado con las técnicas para la generación de vectores de expresión y para la transformación de células con ellos. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), y Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

55 El vector de expresión es un vector genético adecuado para suministrar el casete de expresión a la célula. Dependiendo de la aplicación final deseada, cualquiera de dichos vectores puede ser empleado de esta manera para modificar genéticamente las células (por ejemplo, plásmidos, ADN desnudo, virus tales como adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus, lentivirus, virus del papiloma, retrovirus, etc.). Cualquier método de construcción de la casette de expresión deseada dentro de dichos vectores puede ser empleado, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica, como por ejemplo la clonación directa, la recombinación homóloga, etc. El vector deseado determinará en gran medida el método utilizado para

introducir el vector en las células, que son generalmente conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas incluyen fusión de protoplastos, precipitación con fosfato cálcico, pistola de genes, electroporación, fotorporación, transfección e infección mediada por DEAE dextrano o vehículo lipídico con vectores virales.

5 El vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que va a ser expresada operativamente unida a secuencias de control de expresión, como por ejemplo un promotor. La secuencia de nucleótidos que va a ser expresada puede codificar una proteína, o puede codificar ARN biológicamente activo, como por ejemplo ARN antisentido, ARNsi o una ribozima. Por lo tanto, el polinucleótido codificante puede codificar un gen que confiere, por ejemplo, resistencia a una toxina, una hormona (como por ejemplo hormonas del crecimiento peptídicas, factor de liberación de la hormona, y citoquinas como por ejemplo interferones, interleucinas, y linfoquinas), una fracción de señalización intracelular unida a la superficie celular (como por ejemplo moléculas de adhesión celular y receptores de hormonas), y factores que promueven un linaje de diferenciación determinado, o cualquier otra secuencia de codificación.

15 Los ejemplos de promotores adecuados incluyen promotores procariotas y promotores virales (por ejemplo, RTI y LTR retrovirales, promotores virales tempranos inmediatos (IEP), como el virus del herpes (IEP, por ejemplo, ICP4-IEP y OIPC-IEEP), citomegalovirus (CMV) IEP, y otros promotores virales, como por ejemplo promotores del Virus del Sarcoma de Rous (RSV) y promotores del virus de la leucemia murina (MLV)). Otros promotores adecuados son los promotores eucariotas, tales como los potenciadores (por ejemplo, los elementos reguladores de β -globina de conejo), promotores constitutivamente activos (por ejemplo, el promotor de P-actina, etc.), promotores específicos de señal (por ejemplo, promotores inducibles tales como un promotor sensible a RU486, etc.), y promotores específicos de tejido. Entra dentro de la experiencia de la técnica seleccionar un promotor adecuado para activar la expresión génica en un contexto celular predefinido. El casete de expresión puede incluir más de un polinucleótido de codificación, y puede incluir otros elementos (por ejemplo, secuencias de poliadenilación, secuencias que codifican una señal de inserción de membrana o un líder de secreción, secuencias de entrada de ribosomas, elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores, silenciadores, etc.), y similares), tal como se desee.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

30 La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se proporcionan con fines de ilustración solamente, y no se pretende que sean limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debería en modo alguno interpretarse como limitada a los siguientes ejemplos, sino más bien, debe interpretarse que abarca cualquiera y todas las variaciones que resultan evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

35 Ejemplo 1: Aislamiento de Células Madre Hematopoyéticas a partir de Tejido Adiposo Lipoaspirado

40 El tejido adiposo se obtuvo a partir de lipoaspirado de liposucción realizada en seres humanos por razones cosméticas. 50 mililitros (ml) de un material lipoaspirado se lavaron mediante la mezcla con 50 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato) y la aspiración de la capa acuosa por debajo de la grasa. La suspensión de células se lavó dos veces más con PBS, hasta que el lavado fue de color pajizo. Los lavados acuosos se agruparon y se guardaron como "sedimento post-lavado aspirado" (APWP). Se añadieron cincuenta (50) ml de 95 mg de colagenasa disueltos en 50 ml de PBS + 1% de albúmina de suero bovino (BSA) a la suspensión de células lavada y la mezcla se transfirió a un matraz T-185. El matraz se incubó a 37°C en un agitador Belly Dancer® (Stovall Life Sciences, de Greensboro, Carolina del Norte) durante 1 hora.

45 La grasa disuelta se centrifugó a aproximadamente 550 x g (1600 rpm) durante 6 minutos. Se vertió La capa superior, grasa, alrededor de 10-20 ml. El sedimento celular se resuspendió en el sobrenadante restante y se vertió a través de un filtro de células de 100 micrómetros para eliminar los residuos. El flujo a través se centrifugó a aproximadamente 550 x g (1600 rpm) durante 6 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante se descartó.

50 El sedimento celular se suspendió en tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience). Las células suspendidas se dejaron en hielo durante 3 minutos, y a continuación se centrifugaron a aproximadamente 550 x g (1600 rpm) durante 6 minutos. El sobrenadante se descartó. (El trabajo posterior indicó que la etapa de lisis de glóbulos rojos no era necesaria ni conveniente para el aislamiento de CMH a partir de la SVF).

55 El sedimento celular se suspendió en PBS para lavar las células, y las células se sedimentaron tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, el sedimento se suspendió en 5 ml de medio de cultivo (de DMEM/F12 Ham suplementado con 10% de suero bovino fetal, penicilina, estreptomycin y antibióticos y 0,25 microgramos (g) por ml de anfotericina B). Estas células son la "SVF no fraccionada".

Las células de la SVF no fraccionadas se contaron y se determinó la viabilidad mediante exclusión con azul de tripano. A continuación, las células se sembraron en placa a aproximadamente 50.000 células vivas por cm² en matraces T-185.

5 Los matraces se incubaron en un incubador a 37°C en 5% de CO₂. Después de 24 horas, el medio de cultivo, que contenía las células no adherentes, se eliminó y se reemplazó con medio de cultivo fresco. La fracción de células no adherentes se mantuvo como "SVF no adherente".

10 El inmunotipo de superficie de las células de la SVF no adherentes se caracterizó por citometría de flujo. En primer lugar se examinó la expresión de CD34 y CD45, los marcadores clásicos de las CMH. Tal como se muestra en la Figura. 1, panel central, se encontraron aproximadamente 40.88% de las células de la SVF no adherentes a partir de esta muestra de tejido adiposo para expresar CD34⁺, un marcador bien conocido para las CMH. (Los experimentos con tejido adiposo de otros donantes indicaron que hasta entre aproximadamente un 50% y aproximadamente un 60% de las células de la SVF no adherentes expresan CD34⁺). Estos datos indicaron que es posible un rendimiento de al menos aproximadamente 1x10⁷ CD34⁺ células a partir de 100 ml de tejido adiposo humano.

15 Se observaron múltiples subpoblaciones de CD34⁺ en la población de SVF no adherente. Se observaron dos poblaciones de dispersión lateral distintas para este donante representativo, una baja de CD34⁺ (CD34^{lo}) y una alta de CD34⁺ (CD34^{hi}CD34^{hi}). Las células CD34^{hi} comprendían aproximadamente un 27.2% (23%+4.29%) de las células de la SVF no adherentes y CD34^{lo} comprendían aproximadamente un 13.59% (8.88%+4.71%). La población de CD34^{hi}CD45⁻ comprendía aproximadamente el 23% de las células. La población de CD34^{lo}CD45⁻ comprendía aproximadamente el 8,88% de las células de la SVF no adherentes. La población de CD34⁺CD45⁺ comprendía aproximadamente el 9% de las células de la SVF no adherentes (4.29%+4.71%).

25 También se realizó una retroactivación para examinar la dispersión lateral y hacia adelante de las diversas subpoblaciones de CD34⁺. Este análisis reveló que se encuentran presentes varios grupos distintos de dispersión lateral (Figura 1, dos paneles de la izquierda y dos paneles de la derecha). Se descubrió que la población de CD34^{hi} (paneles de la parte superior izquierda y de la parte superior derecha) tiene una dispersión lateral inferior (SSC^{lo}), en comparación con la población de CD34^{lo} (paneles de la parte inferior izquierda y de la parte inferior derecha). La baja dispersión lateral se asocia habitualmente con poblaciones de células madre hematopoyéticas.

30 CD38 y CD41 son marcadores de superficie celular que se han utilizado para identificar subpoblaciones de células CD34⁺ y son moderadamente útiles para predecir el injerto de CMH mejorado. La expresión CD41 indica el inicio de la hematopoyesis y también se utiliza para distinguir entre células progenitoras endoteliales (células CD34⁺CD41⁺) y CMH (células CD34⁺CD38⁻CD41⁻) en poblaciones mixtas de células CD34⁺. Tal como se muestra en la Figura 2 (dos paneles de la izquierda), la población CD34⁺ de alta dispersión lateral, que comprende alrededor del 13% de la población de la SVF no adherente, contenía un número significativo de células CD41⁺. En particular, la población de CD34⁺ de baja dispersión lateral (16% de la población de SVF no adherente) carecía de expresión tanto de CD38 como de CD41, de acuerdo con el inmunofenotipo típico de CMH.

40 A continuación de la identificación de las dos poblaciones principales de células de CD34⁺ en el gráfico de puntos de adquisición de dispersión de la luz, las células fueron aisladas por separado para determinar si los marcadores endoteliales (CD31) o estromales (CD105 y CD90) se co-expresaban con CD34. Aunque CD90 también se puede expresar en las células hematopoyéticas, la Endoglina (CD105) es exclusivamente un marcador de linaje estromal. Tal como se muestra en la Figura 3, se observaron diferentes niveles de poblaciones negativas de co-expresión y de linaje en células CD34⁺ con baja dispersión lateral y células CD34⁺ con alta dispersión lateral. No se espera que se expresen CD31 y CD105 en células CD34⁺CMH. Es probable que las células CD34⁺CD31⁺ y las células CD34⁺ CD105⁺ sean linajes de células endoteliales y del estroma.

45 Por lo tanto, las células de la SVF no adherentes comprendieron múltiples permutaciones de diferentes expresiones de marcador fenotípico dentro de la mezcla heterogénea que incluye: una población de CD34⁺SSC^{lo}, una población de CD34⁺SSC^{hi}, una población de CD34^{hi}SSC^{lo}, una población de CD34^{hi}CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}; una población de CD34^{lo}CD45⁻; y una población de CD34^{lo}CD45⁺. La expresión de c-kit (CD117), un marcador también asociado con las CMH, también se observó en aproximadamente el 2-3% de las células de la SVF no adherentes.

50 Se observó expresión de ABCG2, otro marcador de CMH, en alrededor del 16% de las células de la SVF no adherentes (Figura 8B). Ventajosamente, las células de la SVF no adherentes con fluorescencia brillante ABCG2 tienen un perfil de dispersión de luz discreto. En la Figura 8A, la región con un círculo de las células, que representan aproximadamente un 25% de las células totales, incluye las células que tienen fluorescencia ABCG2 brillante. Esta característica permite la posibilidad de enriquecimiento para aquellas células basadas únicamente en los datos de dispersión de luz y sin el uso de anticuerpos ni de cualquier otra manipulación química. Por lo tanto, la SVF no adherente comprende células que exhiben inmunofenotipos y potencial de diferenciación comparable a CMH derivadas de médula ósea.

Los ensayos de unidades formadoras de colonias utilizan métodos de dilución límite para cuantificar la frecuencia de los progenitores de linaje específicos. Las poblaciones separadas de células marcadas como el "sedimento de aspiración post-lavado" (APWP) la "SVF no fraccionada" y la "SVF no adherente" se sembraron en medio Methocult® (Stem Cell Technologies, Canadá) para el ensayo de la existencia de progenitores de formación de colonias hematopoyéticas. Las diversas fracciones celulares se sembraron a dos concentraciones celulares, 25.000 células por ml y 50.000 células por ml. Se añadió una alícuota de 1,1 ml de suspensión celular en medio Methocult a placas de cultivo de 35 mm duplicadas. Después de 14 días en el cultivo, se contó el número de CFU por placa y se analizó para determinar la frecuencia de las colonias de BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM. Los resultados de un experimento se muestran en la Tabla 1.

Mientras que los tres tipos de colonias, que incluyen BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM, se observaron en cada una de las tres poblaciones de células ensayadas, la frecuencia más alta se observó en la población de "SVF no adherente". Las Figuras 4-7 muestran colonias representativas observadas en las células de la SVF no adherentes. Las Figuras 4 y 5 muestran colonias de BFU-E de 40 aumentos. La Figura 6 muestra una colonia de CFU-GM y la Figura 7 muestra una colonia de CFU-GEMM.

Tabla 1

	APWP	SVF	SVF no adherente
BFU-E	1:25,000	1:2,000	1:600
CFU-GM	Ninguno observado	1:7,000	1:5,000
CFU-OEMM	Ninguno observado	1:50,000	1:25,000

Nota: APWP = Gránulos de aspirado post-lavado;
 BFU-E = Unidad formadora por estallido – eritroide;
 GM = granulocitos, macrófagos;
 GEMM = granulocitos, eritroides, macrófagos, megacariocitos

La expresión de aldehído deshidrogenasa (ALDH) también se ha utilizado para identificar subpoblaciones hematopoyéticas. El análisis de la actividad de ALDH y la disposición de PCR se llevaron a cabo para identificar potenciales subpoblaciones hematopoyéticas dentro de la población no adherente de la fracción vascular estromal de los aspirados de liposucción. Los datos preliminares indicaron que la población de ALDH^{br>SSC} lo comprende aproximadamente el 17% de la población de células de la SVF no adherentes.

Ejemplo 2: Ensayo de Repoblación de Médula Ósea utilizando CMH derivadas de tejido adiposo

Se someten a prueba células madre hematopoyéticas derivadas de tejido adiposo humano obtenido en el Ejemplo 1 para la diferenciación hematopoyética basándose en un ensayo de repoblación de médula ósea. Ratones desnudos/beige o inmunodeficientes en SCID se irradian letalmente con 11 Gy de γ -irradiación en una dosis dividida y se mantienen en una dieta de agua acidificada y comida en autoclave. Las células hematopoyéticas se aíslan en cantidades de aproximadamente 10^7 células por células hematopoyéticas de trasplante cuando son de origen murino (10^7 células derivadas de la médula ósea) o aproximadamente 10^6 células por trasplante cuando son de origen humano (10^6 células de CMH derivadas de tejido adiposo o 10^6 células de la SVF) y se introducen en los ratones 16 horas después de la irradiación letal por inyección a través de la vena de la cola o la vena retro-orbital o por vía intraperitoneal. Alternativamente, las células humanas se mezclan con las células hematopoyéticas murinas en una relación de aproximadamente 1:10 antes del trasplante en un animal huésped irradiado sub-letalmente para someter a ensayo de repoblación competitiva. A los animales se les transfusiona anestesia con metoxiflurano.

Entre seis y doce semanas después del trasplante, se recoge sangre de los animales receptores y se somete a análisis citométrico de flujo con anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de células hematopoyéticas humanas, incluyendo pero sin limitarse a, Thy 1 (marcador de células T), B220 (marcador de células B), Mac 1 (marcador de macrófagos) y HLA (H-2K, marcador humano). Se determina el porcentaje de células hematopoyéticas periféricas totales de ser humano en relación con las de origen murino. En estudios similares, se cosechan la médula ósea y el bazo de los ratones receptores y se someten a ensayos clonogénicos in vitro para los linajes hematopoyéticos específicos. Estos estudios utilizan ensayos basados en colonias de metilcelulosa. Las células se analizan mediante métodos de inmunofluorescencia comparables para el compromiso de linaje específico.

Ejemplo 3: Ensayo de Repoblación de Médula Ósea utilizando CMH derivadas de tejido adiposo

Se aísla tejido adiposo humano de un donante humano individual por liposucción y CMH derivadas de tejido adiposo se aíslan in vitro de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de hasta aproximadamente los 5 días siguientes a la placa inicial en medio de Iscove que contiene suero bovino fetal al 10%, 5% de extracto de embrión de pollo, factor de células madre, ligando flt-3 y antibióticos a 37°C.

Las células se utilizan inmediatamente en pacientes con trastornos hematopoyéticos, como por ejemplo a continuación de altas dosis de quimioterapia, o son criopreservadas para su uso futuro en el caso de una necesidad médica aguda por parte del donante o de un receptor histocompatible. Las CMH derivadas de tejido adiposo se infunden en el receptor, ya sea como un trasplante autólogo o alogénico, después de cualquier evento, como la quimioterapia o la radiación, que compromete gravemente la función de la médula ósea y la competencia inmunitaria. Las CMH derivadas de tejido adiposo se marcan con un marcador fluorescente para permitir que el médico siga su destino después de un trasplante. La evidencia de recuperación de la médula ósea acelerada se controla sobre la base de la detección de células hematopoyéticas recién sintetizadas (células linfoides, células mieloides, células eritroides y plaquetas) en el torrente sanguíneo periférico basándose en métodos de citometría de flujo.

Otras formas de realización preferentes se proporcionan en los párrafos siguientes:

1. Un método para aislar una célula madre hematopoyética a partir de tejido adiposo, en que el método comprende:
la obtención de tejido adiposo;
la preparación de una fracción vascular estromal (SVF) a partir del tejido adiposo; y
el aislamiento de las células no adherentes en la SVF,
en que las células no adherentes comprenden una célula madre hematopoyética.
2. El método de la forma de realización 1, en que la fase de obtención comprende lipoaspiración.
3. El método de la forma de realización 1, en que el tejido adiposo es humano.
4. El método de la forma de realización 1, en que la célula madre hematopoyética se selecciona entre el grupo que consiste en una célula ALDH^{br}SSC^{lo}, una célula CD34⁺, una célula CD34⁺ SSC^{lo}, una célula CD34⁺CD45⁺, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻, una célula CD34⁺CD45⁻, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}, y una célula que expresa ABCG2.
5. El método de la forma de realización 1, que comprende además la fase de aislar una célula CD34^{hi} a partir de las células no adherentes.
6. El método de la forma de realización 1, que comprende además la fase de aislar una célula ALDH^{br} a partir de las células no adherentes.
7. El método de la forma de realización 6, en que la célula ALDH^{br} es ALDH^{br}SSC^{lo}.
8. El método de la forma de realización 1, en que la célula madre hematopoyética se selecciona entre el grupo que consiste en un macrófago de granulocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GM), un eritrocito de unidades de formación en estallido (BFU-E) y un megacariocito macrófago de granulocitos eritrocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GEMM).
9. Un método para aislar una célula CD34⁺, en que el método comprende:
la obtención de tejido adiposo;
la preparación de una fracción vascular estromal (SVF) a partir del tejido adiposo;
la separación de las células no adherentes en la SVF a partir de las células adherentes, y
el aislamiento de una célula CD34⁺ a partir de las células no adherentes, aislando de esta forma una célula CD34⁺
10. El método de la forma de realización 9, en que la SVF comprende al menos alrededor del 40% de células CD34⁺.
11. El método de la forma de realización 10, en que la célula CD34⁺ se aísla en la proporción de al menos aproximadamente 1×10^7 células CD34⁺ aisladas por aproximadamente 100 ml de tejido adiposo.
12. El método de la forma de realización 9, en que la fase de obtención comprende lipoaspiración.
13. El método de la forma de realización 9, en que el tejido adiposo es humano.
14. El método de la forma de realización 9, en que la célula CD34⁺ se selecciona entre el grupo que consiste en una célula CD34⁺SSC^{lo}, una célula CD34⁺CD45⁺, una célula CD34^{hi}CD38⁻CD41⁻, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}, una célula CD34^{lo}CD45⁻, una célula CD34^{lo}CD45⁺, una célula CD34⁺ALDH^{br} y una célula CD34⁺ALDH^{br}SSC^{lo}.

ES 2 601 845 T3

15. El método de la forma de realización 9, que comprende además la fase de aislar una célula CD34^{hi} o una célula CD34^{lo}.
- 5 16. Una composición que comprende células CD34⁺, en que las células CD34⁺ son aisladas de acuerdo con el método de la forma de realización 9, en que las células CD34⁺ se aíslan en la proporción de al menos aproximadamente 1×10⁵ células CD34⁺ aisladas por aproximadamente 1 mililitro de tejido adiposo.
- 10 17. La composición de la forma de realización 16 en que el tejido adiposo es humano.
- 15 18. Un método para proporcionar células madre hematopoyéticas a un sujeto que comprende, la obtención de tejido adiposo de un sujeto donante; la preparación de una fracción vascular estromal (SVF) a partir del tejido adiposo; el aislamiento de células no adherentes en la SVF; el aislamiento de células madre hematopoyéticas de las células no adherentes; y la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de las células madre hematopoyéticas a un sujeto receptor en necesidad de las mismas.
- 20 19. El método de la reivindicación 18, en que el sujeto donante y el sujeto receptor son seres humanos.
- 20 20. El método de la reivindicación 19, en que el sujeto donante y el sujeto receptor son el mismo ser humano.
- 25 21. El método de la forma de realización 19, en que el sujeto donante y el sujeto receptor no son el mismo ser humano.
- 25 22. El método de la forma de realización 18, en que las células madre hematopoyéticas son CD34⁺ y se aíslan en la proporción de al menos aproximadamente 1×10⁷ células CD34⁺ aisladas por aproximadamente 100 ml de tejido adiposo.
- 30 23. El método de la forma de realización 20, en que la fase de obtención comprende lipoaspiración.
- 30 24. El método de la forma de realización 18, en que la fase de aislamiento comprende aislar células ALDH^{br}SSC^{lo} o células CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}.
- 35 25. Una composición de células aisladas que comprende alrededor de por lo menos el 40% de células CD34⁺ de fracción vascular estromal (SVF) no adherentes.
- 40 26. La composición de la forma de realización 25, en que las células aisladas comprenden al menos aproximadamente un 20% de células CD34⁺CD45⁻.
- 40 27. La composición de la forma de realización 25, en que la fracción vascular estromal se obtiene a partir de tejido adiposo humano.
- 45 28. La composición de la forma de realización 25, en que las células CD34⁺ comprenden células CD34⁺CD38⁻CD41⁻ALDH^{br}.
- 45 29. La composición de la forma de realización 25, en que las células CD34⁺ comprenden células CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo}.
- 50 30. La composición de la forma de realización 25, en que las células CD34⁺ comprenden macrófagos de granulocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GM), eritrocitos de unidades de formación en estallido (BFU-E) y megacariocitos macrófagos de granulocitos eritrocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GEMM).
- 55 31. La composición de la forma de realización 25, en que las células se modifican genéticamente.
- 55 32. Una composición de células aisladas que comprende al menos aproximadamente el 10% de células ALDH^{br} no adherentes de fracción vascular estromal (SVF).
- 60 33. La composición de la forma de realización 32, que comprende al menos aproximadamente un 15% de células ALDH^{br} SVF no adherentes.
- 60 34. La composición de la forma de realización 32, en que las células ALDH^{br} son células ALDH^{br} SSC^{lo}.

ES 2 601 845 T3

35. La composición de la forma de realización 32, en que la SVF se obtiene a partir de tejido adiposo humano.
- 5 36. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la forma de realización 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
37. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la forma de realización 25 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 38. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la forma de realización 32 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Reivindicaciones

- 5

1. Un método para aislar una célula madre hematopoyética a partir de tejido adiposo, que comprende: preparar una fracción vascular estromal (SVF) a partir de un tejido adiposo aislado; incubar células de la SVF en un medio de célula estromal en un aparato de cultivo celular durante un tiempo adecuado para que el cultivo de células in vitro permita que las células adherentes se adhieran al aparato de cultivo; y aislar células no adherentes a partir del medio de célula estromal, en que las células no adherentes comprenden una célula madre hematopoyética, que comprende además aislar una célula CD34⁺ y/o una célula ALDH^{br} y/o una célula que expresa ABCG2 a partir de las células no adherentes
- 10

2. El método de la reivindicación 1, en que el tejido adiposo ha sido aislado por lipoaspiración, y en que el tejido adiposo es humano.
- 15

3. El método de la reivindicación 1, en que la célula madre hematopoyética se selecciona entre el grupo que consiste en una célula ALDH^{br}SSC^{lo}, una célula CD34⁺, una célula CD34⁺SSC^{lo}, una célula CD34⁺CD45⁺, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻, una célula CD34⁺CD45⁻, una célula CD34⁺CD38⁻CD41⁻SSC^{lo} y una célula que expresa ABCG2.
- 20

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además la fase de aislar una célula CD34^{hi} de las células no adherentes.
- 25

5. El método de la reivindicación 1, en que la célula ALDH^{br} es ALDH^{br}SSC^{lo}.
6. El método de la reivindicación 1, en que al menos aproximadamente un 40% de las células no adherentes son células CD34⁺.
- 30

7. El método de la reivindicación 1, en que la célula CD34⁺ se selecciona entre el grupo que consiste en un macrófago de granulocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GM), un eritrocito de unidades de formación en estallido (BFU-E) y un megacariocito macrófago de granulocitos eritrocitos de unidades formadoras de colonias (CFU-GEMM).

FIGURA 1

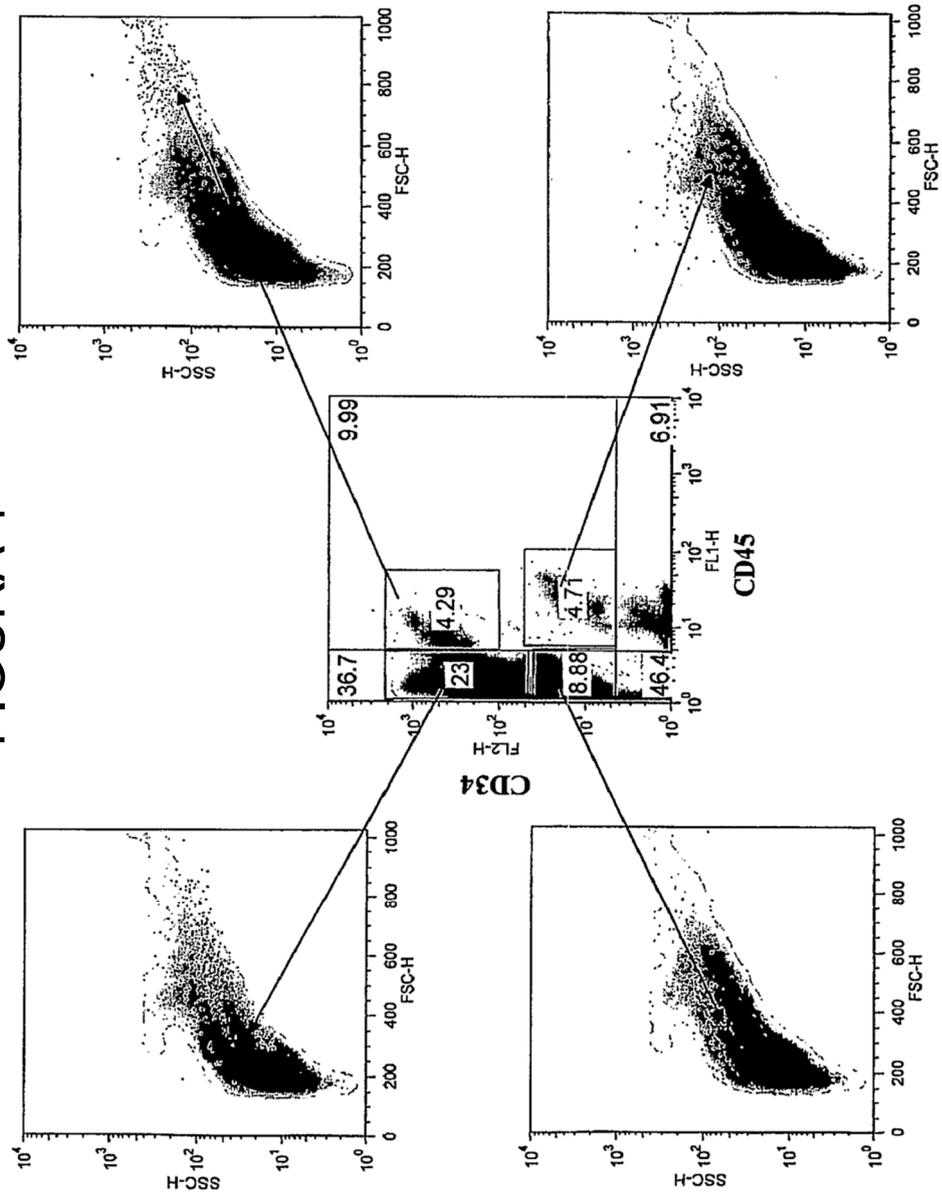
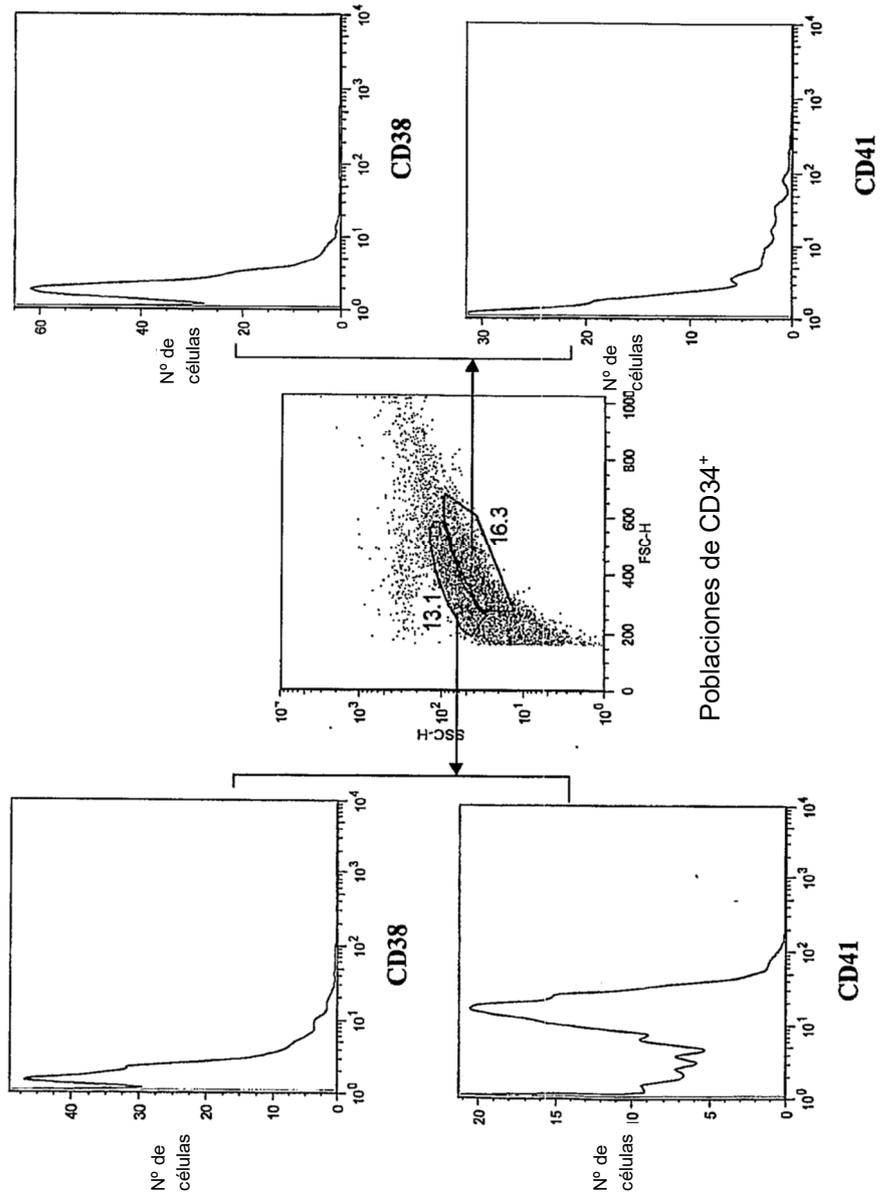


FIGURA 2



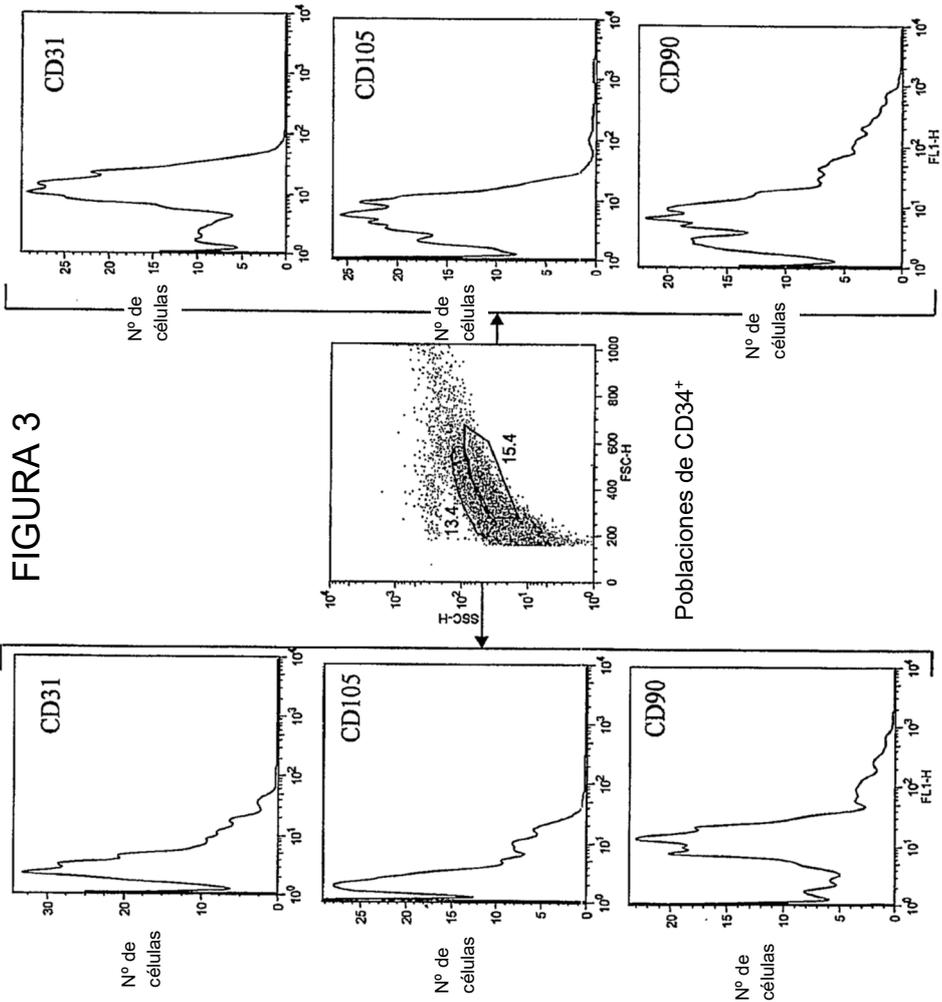


FIGURA 4

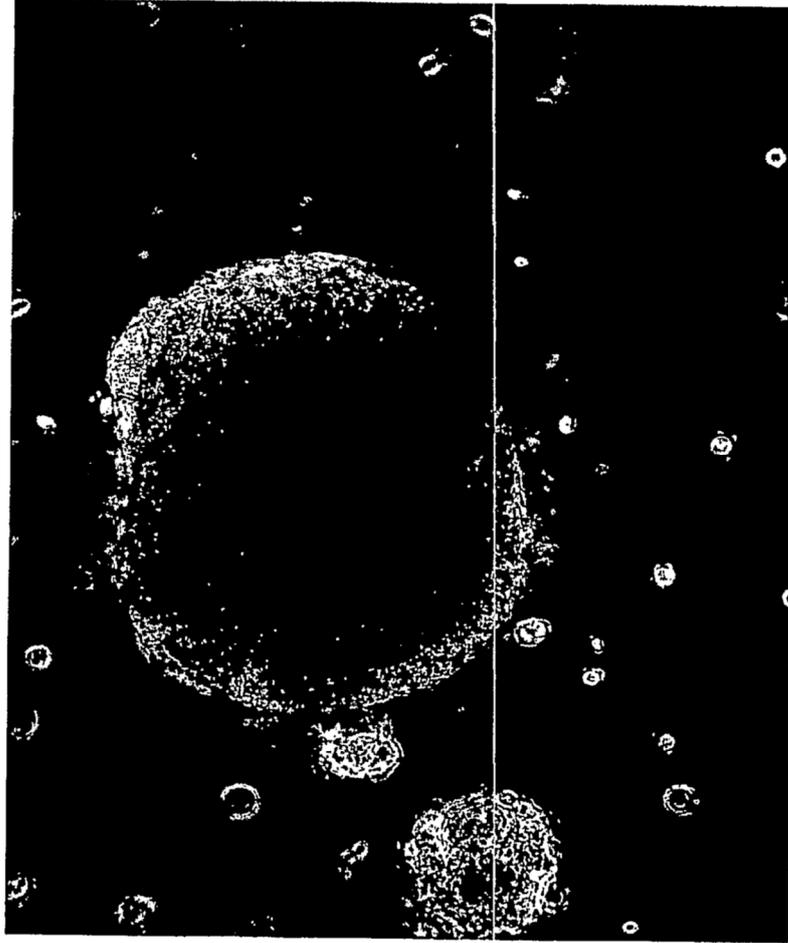


FIGURA 5

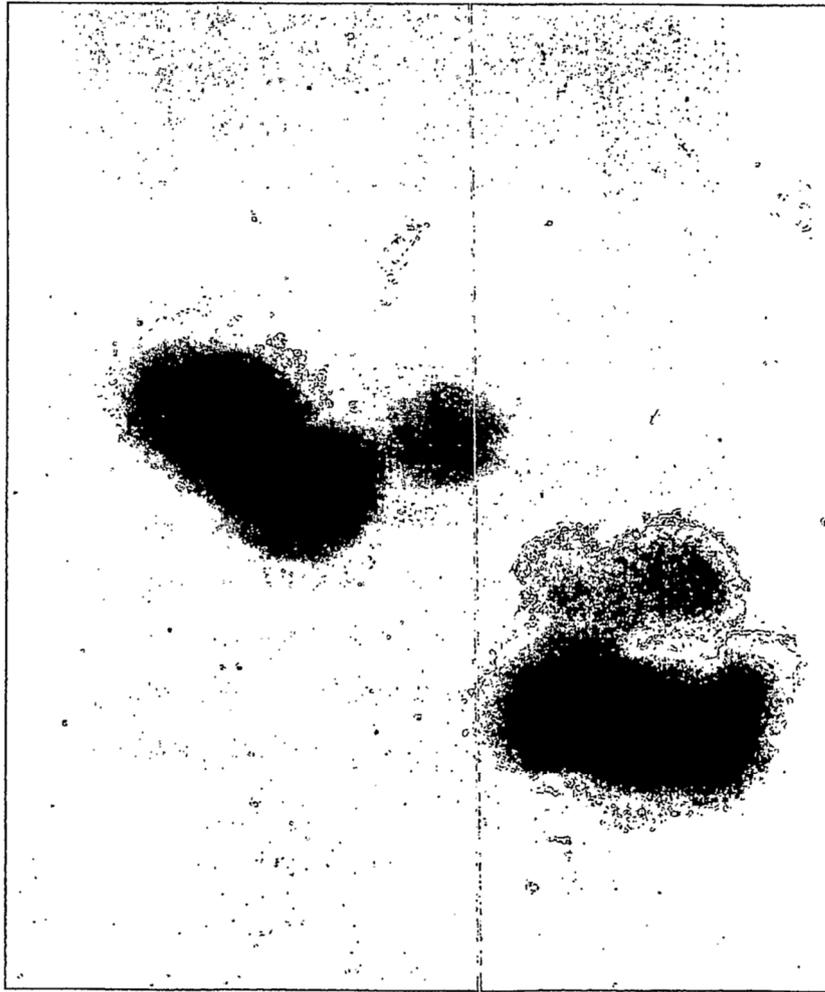


FIGURA 6

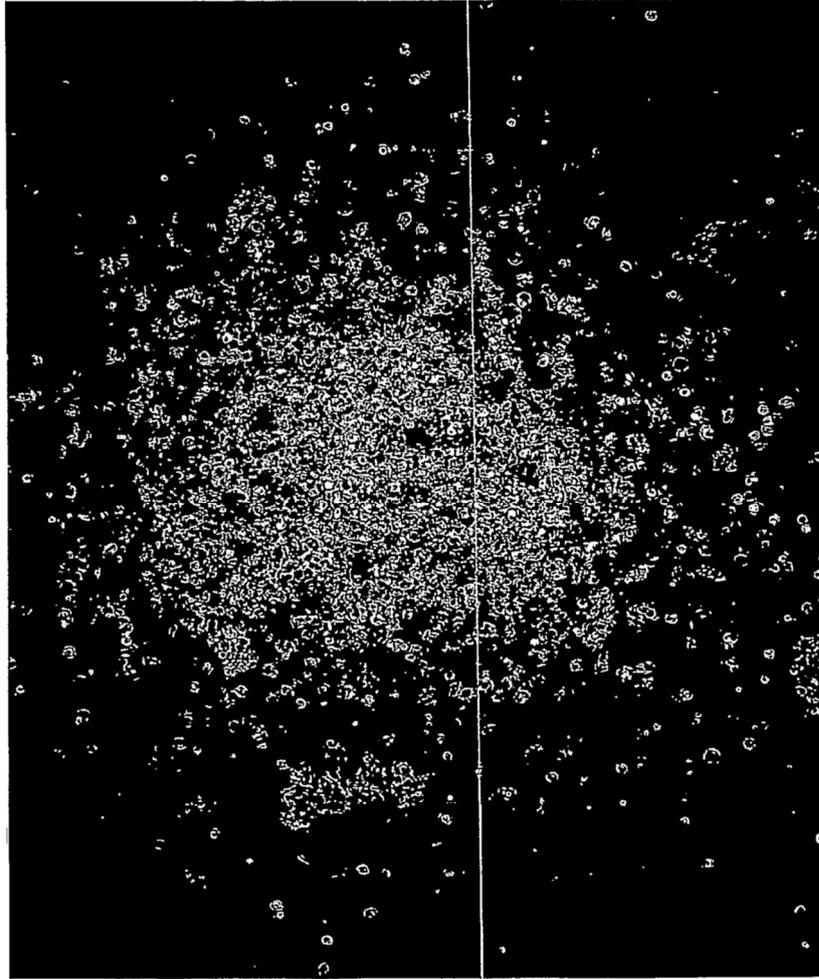


FIGURA 7

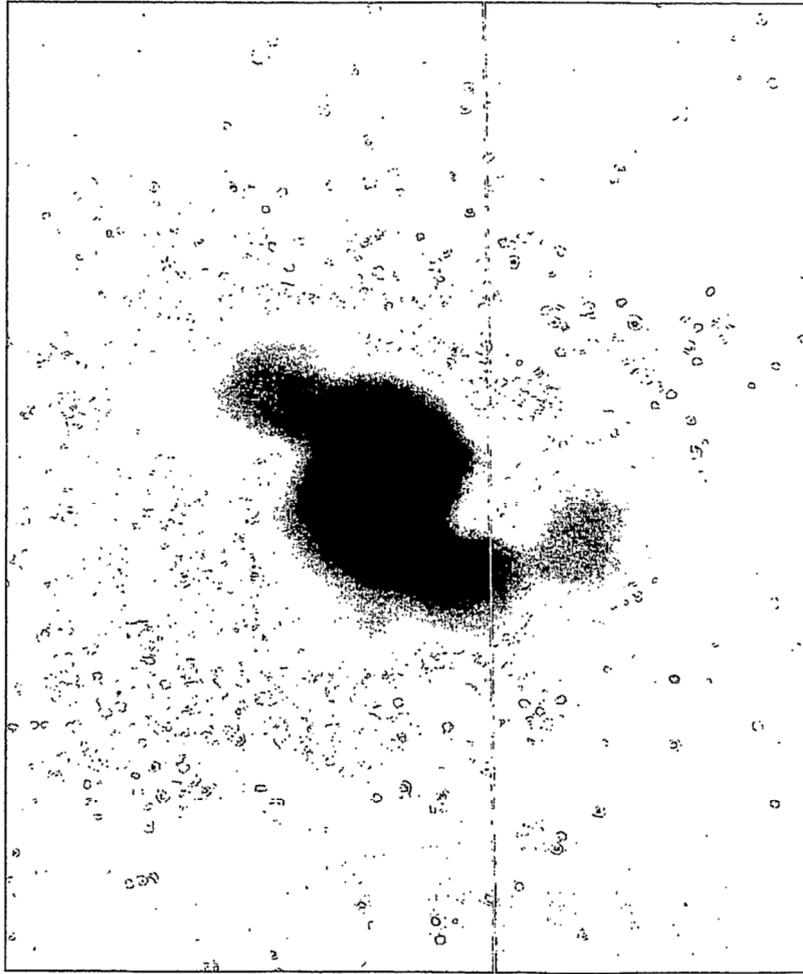


FIGURA 8B

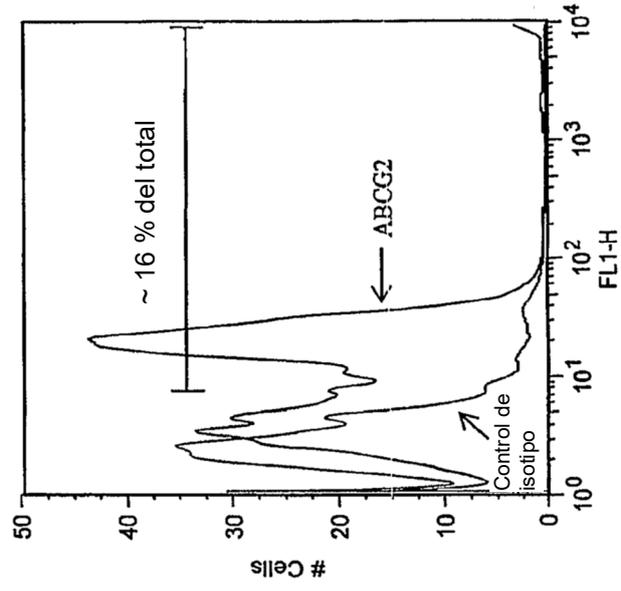


FIGURA 8A

