

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 397**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/078** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2015 PCT/GB2015/051673**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189587**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015 E 15729886 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2984163**

54 Título: **Célula progenitora inmunomoduladora (IMP)**

30 Prioridad:

**12.06.2014 GB 201410504**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**CELL THERAPY LIMITED (100.0%)  
Institute of Life Sciences First Floor, Room 137  
School of Medicine Swansea University Singleton  
Park  
Swansea SA2 8PP, GB**

72 Inventor/es:

**REGINALD, AJAN;  
EVANS, MARTIN JOHN y  
SULTAN, SABENA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 622 397 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**

Célula progenitora inmunomoduladora (IMP)

**5 Campo de la invención**

La invención se refiere a células progenitoras inmunomoduladoras (IMP) y a su uso en terapia.

**Antecedentes de la invención**

10 Las células mesodérmicas derivan de varios tejidos y actúan como estructura de soporte para otros tipos celulares. La médula ósea, por ejemplo, está compuesta tanto de células hematopoyéticas como derivadas del mesénquima. Se han descrito previamente y caracterizado dos tipos celulares mesenquimáticos principales, concretamente (i) células madre mesenquimáticas (MSC) y sus precursores y (ii) células precursoras mesenquimáticas (MPC) encontradas en la médula ósea. Las células madre mesenquimáticas (MSC) son células madre adultas multipotentes. Las MSC se diferencian para formar las diferentes células especializadas encontradas en los tejidos esqueléticos. Por ejemplo, pueden diferenciarse en células de cartílago (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipocitos).

20 Las MSC se usan en una diversidad de terapias, tales como el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad (AMD) e infarto de miocardio. Una vez administradas al paciente las MSC típicamente migran (o se autodirigen) al tejido dañado y ejercen sus efectos terapéuticos a través de señalización paracrina y promoviendo la supervivencia, reparación y regeneración de las células adyacentes en el tejido dañado.

25 Las terapias actuales típicamente implican la infusión de una mezcla de subtipos de MSC algunos de los cuales no migran de forma eficaz al tejido de interés. Esto necesita el uso de una alta dosis celular que pueda conducir a efectos laterales fuera de diana y efectos laterales relacionados con el volumen. Las MSC típicamente se obtienen de médula ósea y por tanto es difícil obtener grandes cantidades.

**30 Sumario de la invención**

Esta invención se refiere a un novedoso tipo celular que no se ha identificado o aislado previamente, la célula progenitora inmunomoduladora. Esta célula IMP es bastante distinta y diferente tanto a las MSC como a las MPC en su composición, función y características que confieren una capacidad inmunomoduladora potenciada.

35 Los inventores han identificado sorprendentemente una nueva célula progenitora inmunomoduladora (IMP) que tiene un patrón de expresión de marcadores específico. En particular, la célula IMP expresa en su superficie MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126. La célula IMP expresa cantidades significativamente mayores de estos marcadores en sus superficies que una célula madre mesenquimática (MSC). Las células IMP de la invención pueden aislarse de células mononucleares (MC), tales como MC de sangre periférica. Las células IMP son capaces de migrar de forma eficaz a y reparar tejidos dañados. En particular, son capaces de autodirección, adherencia, trans migración, proliferación, efectos angiogénicos y señalización paracrina. Por consiguiente, la invención proporciona una célula progenitora inmunomoduladora (IMP), donde la célula expresa en su superficie niveles detectables de MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126.

50 La invención también proporciona:

- una población de dos o más células IMP de la invención;
- una población de células progenitoras inmunomoduladoras (IMP), donde

55 (i) al menos el 90 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de MIC A/B,  
 (ii) al menos el 60 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD304 (neuropilina 1),  
 (iii) al menos un 45 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD178 (ligando de FAS),  
 60 (iv) al menos el 10 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD289 (receptor 9 de tipo Toll),  
 (v) al menos el 15 % de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato),  
 (vi) al menos el 20 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD99,  
 65 (vii) al menos el 80 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1),

(viii) al menos el 30 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R),

(ix) al menos el 60 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CXCR2 y

5 (x) al menos el 5 % de las células en la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD126;

- una composición farmacéutica que comprende (a) una célula IMP de la invención o una población de la invención y (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, uno o más liposomas y/o una o más microburbujas;
- 10 - un método de producción de una población de células IMP de la invención, que comprende (a) cultivar células mononucleares (MC) durante 15 a 25 días en un medio que comprende lisado de plaquetas, a menos del 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) y en condiciones que permiten que las células IMP se adhieran para inducir que las MC se diferencien en células IMP y (b) recoger y cultivar esas células IMP que tienen un patrón de expresión como se define anteriormente y producir de ese modo una población de la invención;
- 15 - una población de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de reparación de un tejido dañado en un paciente; y
- una población de la invención o una composición farmacéutica de la invención para su uso en un método de tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente.

## 20 Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que diferentes aplicaciones de los productos y métodos descritos pueden adaptarse a las necesidades específicas en la técnica. También tiene que entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitante.

25 Además, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las forman singulares "uno", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una célula" incluye "células", una referencia a "un tejido" incluye dos o más de dichos tejidos, una referencia a "un paciente" incluye dos o más de dichos pacientes, y similares.

### 30 Célula IMP de la invención

La presente invención proporciona una célula progenitora inmunomoduladora (IMP). La célula IMP expresa en su superficie niveles detectables de MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126.

MIC permite la adaptación de células y su comportamiento inmunitario en un contexto inflamatorio disminuyendo su susceptibilidad a eliminación por NK.

40 CD304 (nombre alternativo neuropilina 1) es un correceptor para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y tiene funciones en la angiogénesis, la supervivencia, migración e invasión celular.

45 CD178 (nombre alternativo ligando de FAS) mantiene el fenotipo celular y controla la diferenciación. También es capaz de inducir la proliferación de células. Aunque el ligando de FAS se conoce principalmente en la señalización apoptótica, se ha demostrado que células que expresan FAS y el ligando de FAS son resistentes a apoptosis inducida por FAS.

50 CD289 (nombre alternativo receptor 9 de tipo Toll) está implicada en la modulación de respuestas inmunitarias y puede facilitar la migración celular hacia un tejido diana.

La activación sostenida de CD363 (el nombre alternativo es receptor 1 de esfingosina-1-fosfato) ha provocado el implante aumentado de células *in vivo*. CD363 también promueve la angiogénesis, modula la autodirección celular, modula el tráfico y migración de células y regula la quimiotaxis.

55 CD99 está implicada en la adhesión y transmigración celular.

Hay dos clases de receptores de interleucina-8 (IL-8), CXCR1 (o CD181) y CXCR2. Ambos receptores se unen a IL-8 con alta afinidad, en contraste con otras quimiocinas CXC. Funcionalmente, CXCR1 y CXCR2 han demostrado desempeñar funciones significativas en la proliferación, migración, invasión y angiogénesis. Los tejidos dañados liberan una diversidad de factores inflamatorios solubles, tales como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la interleucina-8, y estos factores pueden atraer a las células IMP de la invención (y otras células inflamatorias) a tejido dañado a través de la unión a CXCR1 y/o CXCR2.

65 EGF-R está implicado en la migración, adhesión y proliferación celular.

CD126 (el nombre alternativo es IL-6R1) aumenta el privilegio inmunitario.

Las células IMP de la invención tienen numerosas ventajas. Las ventajas clave se resumirán en este documento. Sin embargo, llegarán a ser evidentes ventajas adicionales a partir del análisis a continuación.

5 Las células IMP de la invención pueden usarse ventajosamente para reparar tejidos dañados en pacientes. Las células IMP son capaces de migrar de forma eficaz (o autodirigirse) a un tejido dañado y ejercer efectos antiinflamatorios en el tejido. Esto se analiza en más detalle a continuación. Una de las capacidades más importantes de las células IMP es migrar (o autodirigirse) a sitios lesionados, que implica quimiotaxis. Esto se basa  
10 en la señalización de quimiocinas y utiliza mecanismos tales como rodamiento, adhesión y trans migración. Los efectos antiinflamatorios de las células IMP promueven la supervivencia, reparación y regeneración de las células adyacentes en el tejido dañado. Las células también son capaces de ejercer efectos paracrinos tales como la secreción de factores angiogénicos, quimiotácticos y antiapoptóticos. Esto también se analiza en más detalle a continuación.

15 Como se analiza en más detalle a continuación, las células IMP se producen a partir de células mononucleares (MC), tales como MC periféricas, recogidas de un individuo, tal como un individuo humano. Como las células IMP se producen a partir de las MC, se pueden producir fácilmente (tal como de sangre periférica) y pueden ser autólogas para el paciente a tratarse y evitar de ese modo el riesgo de rechazo inmunológico por el paciente.

20 Es posible, en principio, producir una cantidad ilimitada de células IMP a partir de un único individuo, ya que pueden obtenerse diversas muestras de MC (es decir, diversas muestras de sangre). Ciertamente es posible producir cantidades muy grandes de células IMP a partir de un único individuo. Las células IMP de la invención pueden prepararse, por lo tanto, en grandes cantidades.

25 Las células IMP de la invención se producen en condiciones clínicamente relevantes, por ejemplo, en ausencia de cantidades traza de endotoxinas y otros contaminantes ambientales, así como productos animales tales como suero fetal de ternera. Esto hace que las células IMP de la invención sean particularmente adecuadas para su administración a pacientes.

30 Como las células IMP de la invención se producen a partir de MC, son sustancialmente homólogas y pueden ser autólogas. También evitan la variación entre donantes, que sucede frecuentemente con las MSC. Pueden producirse numerosas poblaciones de células IMP de la invención a partir de una única muestra recogida del paciente antes de que cualquier otra terapia, tal como quimioterapia o radioterapia, haya comenzado. Por lo tanto, las células IMP de la  
35 invención pueden evitar cualquiera de los efectos perjudiciales de esos tratamientos.

Las células IMP de la invención pueden prepararse rápidamente. Las células IMP puede producirse a partir de MC en menos de 30 días, tal como en aproximadamente 22 días.

40 La producción de células IMP a partir de MC evita las implicaciones morales y éticas implicadas con el uso de células madre mesenquimáticas MSC derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC).

45 Las células IMP de la invención típicamente se producen a partir de MC humanas. Las células IMP de la invención son, por lo tanto, típicamente humanas. Como alternativa, las células IMP pueden producirse a partir de MC de otros animales o mamíferos, por ejemplo, de animales de granjas comerciales, tales como caballos, ganado bovino, ovejas o cerdos, de animales de laboratorio, tales como ratones o ratas, o de mascotas, tales como gatos, perros, conejos o cobayas.

50 Las células IMP de la invención pueden identificarse como células progenitoras inmunomoduladoras usando métodos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo la expresión de marcadores restringidos a linaje, características estructurales y funcionales. Las células IMP expresarán en sus superficies niveles detectables de marcadores de superficie celular que se sabe que son características de las IMP. Estos se analizan a continuación.

55 Las células IMP de la invención son capaces de completar satisfactoriamente ensayos de diferenciación *in vitro* para confirmar que son de linaje mesodérmico. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, ensayos de diferenciación adipogénica, ensayos de diferenciación osteogénica y ensayos de diferenciación neurogénica (Zaim M *et al.* Ann Hematol. Agosto de 2012; 91(8):11175-86).

60 Las células IMP de la invención no son células madre. En particular, no son MSC. Se diferencian de forma terminal. Aunque pueden forzarse en las condiciones adecuadas *in vitro* a diferenciarse, por ejemplo, en cartílago o células óseas, típicamente no se diferencian *in vivo*. Las células IMP de la invención tienen sus efectos migrando al tejido dañado y ejerciendo señalización paracrina en el tejido dañado. En particular, las células IMP preferiblemente son capaces de inducir efectos antiinflamatorios en el tejido dañado. Esto se analiza en más detalle a continuación.

65 Las células IMP de la invención típicamente se caracterizan por una morfología con forma de huso. Las células IMP son típicamente de tipo fibroblasto, es decir, tienen un pequeño cuerpo celular con unas pocas proyecciones

celulares que son largas y delgadas. Las células típicamente son de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 µm de diámetro.

Las células IMP de la invención se distinguen de las células conocidas, incluyendo MSC, a través de su patrón de expresión de marcadores. Las IMP expresan en sus superficies niveles detectables de MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126. Las IMP preferiblemente expresan en sus superficies una cantidad aumentada de estos marcadores en comparación con MSC. Esto puede determinarse comparando el nivel/cantidad de expresión de los marcadores en una IMP de la invención con el nivel/cantidad de expresión en una MSC usando la misma técnica en las mismas condiciones. Las MSC adecuadas están disponibles en el mercado. Las MSC usada para la comparación es preferiblemente una MSC humana. Las MSC humanas están disponibles en el mercado en Mesoblast® Ltd, Osiris Therapeutics® Inc. o Lonza®. Las MSC humana se obtiene preferiblemente de Lonza®. Dichas células se usaron para la comparación en el ejemplo. La MSC puede obtenerse de cualquiera de los animales o mamíferos analizados anteriormente.

Las células IMP preferiblemente expresan en sus superficies una cantidad aumentada de uno o más de MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126 en comparación con una MSC. Las células IMP preferiblemente expresan en sus superficies una cantidad aumentada de los diez marcadores en comparación con una MSC.

Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para determinar la expresión detectable o expresión aumentada de diversos marcadores analizados anteriormente (y a continuación). Los métodos adecuados incluyen, aunque sin limitación, inmunocitoquímica, inmunoensayos, citometría de flujo, tal como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Los inmunoensayos adecuados incluyen, aunque sin limitación, transferencia de Western, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), ensayos de deposición inmunoabsorbente ligados a enzimas (ensayos ELISPOT), técnicas de inmunoensayo múltiple enzimático, ensayos de radioalergosorbentes (RAST), radioinmunoensayos, ensayos de radiounión e inmunofluorescencia. La transferencia de Western, los ELISA y la RT-PCR son todos cuantitativos y por tanto pueden usarse para medir el nivel de expresión de los diversos marcadores si estuvieran presentes. El uso de FACS de alto rendimiento (HT-FACS) se describe en el ejemplo. La expresión o expresión aumentada de cualquiera de los marcadores descritos en este documento se hace preferiblemente usando HT-FACS. Los anticuerpos y anticuerpos marcados de forma fluorescente para todos los diversos marcadores analizados en este documento están disponibles en el mercado.

Las células IMP de la invención preferiblemente muestran una intensidad de fluorescencia media (MFI) de anticuerpo de al menos 330, tal como al menos 350 o al menos 400, para MIC A/B. Una MFI de al menos 210, tal como al menos 250 o al menos 300, para CD304 (neuropilina 1), una MFI de al menos 221, tal como al menos 250 o al menos 300, para CD178 (ligando de FAS), una MFI de al menos 186, tal como al menos 200 o al menos 250, para CD289 (receptor 9 de tipo Toll), una MFI de al menos 181, tal como al menos 200 o al menos 250, para CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), una MFI de al menos 184, tal como al menos 200 o al menos 250, para CD99, una MFI de al menos 300, tal como al menos 350 o al menos 400, para CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), una MFI de al menos 173, tal como al menos 200 o al menos 250, para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), una MFI de al menos 236, tal como al menos 250 o al menos 300, para CXCR2 y una MFI de al menos 160, tal como al menos 200 o al menos 250, para CD126. La intensidad de fluorescencia media (MFI) es una medida de la intensidad, el flujo de energía promedio en el tiempo medido en vatios por metro cuadrado. Es una unidad SI. La MFI para cada marcador se mide típicamente usando HT-FACS. La MFI para cada marcador se mide preferiblemente usando HT-FACS como se describe en el ejemplo.

Además de los diez marcadores especificados anteriormente, las células IMP de la invención típicamente expresan en sus superficies niveles detectables de uno o más de los otros marcadores mostrados en la tabla 1 en el ejemplo. Las células IMP pueden expresar en sus superficies niveles detectables de cualquier cantidad y combinación de esos marcadores.

Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de migrar a un tejido dañado específico en un paciente. En otras palabras, cuando las células se administran a un paciente que tienen un tejido dañado, las células son capaces de migrar (o autodirigirse) al tejido dañado. Esto es ventajoso porque significa que las células pueden infundirse a través de vías convencionales, por ejemplo, por vía intravenosa, y entonces abordarán el sitio del daño. Las células no tienen que suministrarse al tejido dañado. El daño puede deberse a lesión o enfermedad como se analiza en más detalle a continuación.

El tejido específico es preferiblemente tejido cardíaco, óseo, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepático, renal o pulmonar. Esto se aplica no solamente a la migración, sino también a la adherencia, la transmigración, la proliferación, los efectos antiinflamatorios y la angiogénesis como se analiza en más detalle a continuación.

La capacidad de las células IMP de la invención de migrar al tejido dañado puede medirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, aunque sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR con o sin genes indicadores) y técnicas de marcaje.

5 La RT-PCR es el medio más directo y simple para rastrear las células IMP de la invención dentro de un paciente. Puede usarse un transgén transducido o marcadores donantes individuales para este propósito y se han obtenido señales específicas de célula trasplantada en varios estudios en pacientes. Los resultados son generalmente semicuantitativos.

10 Como alternativa, las células IMP de la invención pueden teñirse con un colorante de interés, tal como un colorante fluorescente, y pueden controlarse en el paciente a través de la señal del colorante. Dichos métodos son rutinarios en la técnica.

15 La migración (o autodirección) se determina típicamente midiendo la cantidad de células que llegan al tejido dañado. También puede medirse indirectamente observando las cantidades de células que se han acumulado en los pulmones (en lugar de en el tejido dañado).

20 El tejido cardíaco dañado libera quimiocinas y citocinas inflamatorias, tales como factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Además, el infarto de miocardio aumenta los niveles de VEGF y de eritropoyetina (EPO). CXCR4 se une a su ligando SDF-1 y de ese modo las células IMP de la invención que expresan CXCR4 migrarán hacia el gradiente de SDF-1 generado por el tejido cardíaco dañado. Otros tejidos dañados, tales como hueso, también liberan SDF-1. Si el tejido dañado específico es tejido cardíaco, las células IMP de la invención preferiblemente expresan niveles detectables de CXCR4 o expresan una cantidad aumentada de CXCR4 en comparación con las MSC.

30 Si el tejido dañado específico es tejido óseo, las células IMP de la invención preferiblemente expresan niveles detectables de TGF-beta 3, proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno-2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina-8 (IL-8), factor-A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , CXCR4, receptor de tipo 1 de quimiocina C-C (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB. Las células IMP de autodirección al hueso de la invención preferiblemente expresan una cantidad aumentada de uno o más, o incluso todos, estos factores en comparación con células madre mesenquimáticas MSC. La expresión detectable de estos marcadores puede medirse como se analiza anteriormente.

40 Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de adherirse a un tejido dañado específico en un paciente. El ensayo de adherencia y adhesión es conocido en la técnica (Humphries, *Methods Mol Biol.* 2009;522:203-10).

Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de transmigrar a través del endotelio vascular hasta un tejido dañado específico en un paciente. Los ensayos de trans migración son conocidos en la técnica (Muller y Luscinskas, *Methods Enzymol.* 2008; 443: 155-176).

45 Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de proliferar en un tejido dañado específico en un paciente. Los ensayos de proliferación celular son bien conocidos en la técnica. Dichos ensayos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Life Technologies®.

50 Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de promover la angiogénesis en un tejido dañado específico en un paciente. Los ensayos de angiogénesis son conocidos en la técnica (Auerback et al., *Clin Chem.* enero de 2003;49(1):32-40).

55 Las células IMP de la invención preferiblemente son capaces de tener efectos antiinflamatorios en un tejido dañado de un paciente. La capacidad de las células IMP de la invención de tener efectos antiinflamatorios también puede medirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la secreción de citocinas, reacciones potenciadas de leucocitos mixtos y regulación positiva de moléculas co-estimuladoras y marcadores de maduración, medidos por citometría de flujo. Los métodos específicos que pueden usarse se describen en el ejemplo. Las citocinas medidas típicamente son interleucinas, tales como interleucina (IL-8), selectinas, moléculas de adhesión, tales como molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y proteínas quimioatrayentes, tales como proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Los ensayos para estas citocinas están disponibles en el mercado. Los factores antiinflamatorios preferiblemente se detectan y miden usando el ensayo Luminex® descrito en los ejemplos. Dichos ensayos están disponibles en el mercado en Life Technologies®.

65 Las células IMP preferiblemente secretan niveles detectables de una o más de interleucina-6 (IL-6), IL-8, quimiocina 10 de motivo C-X-C (CXCL10; proteína 10 inducida por interferón gamma; IP-10), ligando 2 de quimiocina (motivo C-

C) (CCL2; proteína-1 quimiotáctica de monocitos; MCP-1) y ligando-5 de quimiocina (motivo C-C) (CCL5; regulada en activación, célula T normal expresada y secretada; RANTES). Las células IMP pueden secretar cualquier cantidad y combinación de estos factores. Las células IMP preferiblemente secretan todos estos marcadores.

5 Las células IMP preferiblemente secretan una cantidad aumentada de uno o más de IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 y RANTES en comparación con una MSC. Las células IMP pueden secretar una cantidad aumentada de cualquier cantidad y combinación de estos factores. Las células IMP preferiblemente secretan una cantidad aumentada de todos estos marcadores.

10 Las células IMP preferiblemente secretan una cantidad disminuida de interleucina-10 (IL-10) y/o de IL-12 en comparación con una célula madre mesenquimática MSC. IL-10 e IL-12 son citocinas proinflamatorias.

15 Las células IMP de la invención más preferiblemente son capaces de migrar a un tejido dañado en un paciente y tener efectos antiinflamatorios en el tejido dañado. Esto permite que el daño se repare de forma eficaz y reduce la cantidad de células que tienen que administrarse.

20 Las células IMP de la invención expresarán una diversidad de otros marcadores diferentes más allá de los analizados anteriormente. Algunos de estos ayudarán a las células IMP a su capacidad de migrar a un tejido dañado y tener efectos inflamatorios una vez allí. Cualquiera de las células IMP de la invención puede expresar adicionalmente niveles detectables de uno o más de (i) factor-1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), (ii) receptor de IGF-1; (iii) receptor de tipo 1 de quimiocina C-C (CCR1), (iv) factor-1 derivado de células del estroma (SDF-1), (v) factor-1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 alfa), (vi) Akt1 y (vii) factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF).

25 Los receptores de IGF-1 promueven la capacidad de migración hacia un gradiente de IGF-1. Uno de los mecanismos por los cuales IGF-1 aumenta la migración es por regulación positiva de CXCR4 sobre la superficie de las células, que las hace más sensibles a la señalización de SDF-1. Esto se analiza anteriormente.

30 CCR1 es el receptor de CCL7 (previamente conocido como MCP3) que aumenta la capacidad de autodirección e implante de las MSC (y por tanto se esperaría que tuviera el mismo efecto para las células IMP de la invención) y puede aumentar la densidad de capilares en miocardio lesionado a través de señalización paracrina.

35 HIF-1 alfa activa rutas que aumentan el suministro de oxígeno y promueven respuestas pro-supervivencia adaptativas. Entre los muchos genes diana de HIF-1 alfa están la eritropoyetina (EPO), endotelina y VEGF (con su receptor Flk-1). Las células IMP que expresan o expresan una cantidad aumentada de HIF-1 alfa tendrán expresión regulada positivamente de estímulos paracrinos de, por ejemplo, varios factores de crecimiento vasculogénico que pueden promover un subtipo más terapéutico. Como se describe en más detalle a continuación, las células IMP de la invención pueden pre-condicionarse en un subtipo más terapéutico cultivándolas en células hipóxicas (menos del 20 % de oxígeno), tal como, por ejemplo, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 0 % de oxígeno.

40 Akt1 es una serina/treonina proteína quinasa intracelular que desempeña una función clave en múltiples procesos celulares tales como metabolismo de la glucosa, proliferación celular, apoptosis, transcripción y migración celular. La sobreexpresión de Akt1 ha demostrado prevenir que las MSC de rata que experimenten apoptosis y tendrá el mismo efecto en las células IMP de la invención. La protección de la apoptosis potenciará el efecto terapéutico de las células IMP.

45 La sobreexpresión de HGF por las MSC ha demostrado prevenir la insuficiencia cardíaca post-isquémica por inhibición de la apoptosis a través de la ruta mediada por calcineurina y la angiogénesis. HGF y G-CSF muestran efectos sinérgicos a este respecto. Las MSC que tienen una alta expresión de HGF y su receptor c-met también tienen una capacidad aumentada de migración al tejido dañado, conseguido a través de señalización hormonal, paracrina y autocrina. Lo mismo será cierto para las células IMP de la invención que expresan HGF y/o G-CSF.

50 Las células IMP pueden expresar niveles detectables de uno o más de (i) a (vii) definidos anteriormente. Las células IMP de la invención preferiblemente expresan una cantidad aumentada de uno o más de (i) a (vii) en comparación con las MSC. Los ensayos cuantitativos para marcadores celulares se describen anteriormente. La expresión detectable de estos detectable y su nivel de expresión pueden medirse como se analiza anteriormente.

55 Cualquiera de las células IMP de la invención puede expresar niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), (ii) factor beta de crecimiento transformante (TGF-beta), (iii) factor-1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), (iv) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), (v) factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), (vi) interferón gamma (IFN-gamma) y (vii) interleucina-1 alfa (IL-1 alfa). El medio acondicionado de las células que sobreexpresan VEGF ha demostrado aliviar la insuficiencia cardíaca en un modelo de hámster. Por tanto, las células IMP de la invención que expresan o expresan una cantidad aumentada de VEGF tendrán el mismo efecto del tejido cardíaco dañado.

65



aproximadamente  $1,0 \times 10^8$ , al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^9$ , al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^{10}$ , al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^{11}$  o al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^{12}$  células IMP de la invención o incluso más.

La población que comprende dos o más células IMP de la invención puede comprender otras células además de las células IMP de la invención. Sin embargo, al menos el 70 % de las células de la población son preferiblemente células IMP de la invención. Más preferiblemente, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de las células de la población son células IMP de la invención.

La invención también proporciona poblaciones específicas de células IMP. La invención proporciona una población de células progenitoras inmunomoduladoras (IMP), donde

- (i) al menos el 90 %, preferiblemente al menos el 97 % y más preferiblemente al menos el 97,1 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de MIC A/B,
- (ii) al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 65 % y más preferiblemente al menos el 65,2 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD304 (neuropilina 1),
- (iii) al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 51 % y más preferiblemente al menos el 51,6 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD 178 (ligando de FAS),
- (iv) al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 11 % y más preferiblemente al menos el 11,3 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD289 (receptor 9 de tipo Toll),
- (v) al menos el 15 %, preferiblemente al menos el 18 % y más preferiblemente al menos el 18,7 %, de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato),
- (vi) al menos el 20 %, preferiblemente al menos el 24 % y más preferiblemente al menos el 24,8 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD99,
- (vii) al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1),
- (viii) al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 33 % y más preferiblemente al menos el 33,3 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R),
- (ix) al menos el 60 %, preferiblemente al menos el 68 % y más preferiblemente al menos el 68,8 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CXCR2 y
- (x) al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 7 % y más preferiblemente al menos el 7,05 %, de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD126.

Las células de estas poblaciones preferidas pueden expresar adicionalmente en sus superficies niveles detectables de cualquiera de los marcadores analizados anteriormente con referencia a la IMP de la invención. Las células de estas poblaciones preferidas pueden tener cualquiera de las propiedades ventajosas de las células IMP analizadas anteriormente.

Al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-microglobulina, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 y CD276. Al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las células de la población puede expresar en sus superficies niveles detectables de cualquier cantidad y combinación de estos marcadores. Al menos el 90 %, tal como al menos el 95 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de todos estos marcadores.

Al menos el 80 %, tal como al menos el 85 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 y CD140b. Al menos el 80 %, tal como al menos el 85 % de las células de la población puede expresar en sus superficies niveles detectables de cualquier cantidad y combinación de estos marcadores. Al menos el 80 %, tal como al menos el 85 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de todos estos marcadores.

Al menos el 70 %, tal como al menos el 75 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de of CD318, CD351, CD286, CD46, CD119 y CD132. Al menos el 70 %, tal como al menos el 75 % de las células de la población puede expresar en sus superficies niveles detectables de cualquier cantidad y combinación de estos marcadores. Al menos el 70 %, tal como al menos el 75 % de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de todos estos marcadores.

El 1 % o menos, tal como el 0,5 % o menos de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64,

- 5 DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR alfa beta, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 y CD24. El 1 % o menos, tal como el 0,5 % o menos de las células de la población puede expresar en sus superficies niveles detectables de cualquier cantidad y combinación de estos marcadores. El 1 % o menos, tal como el 0,5 % o menos de las células de la población preferiblemente expresa en sus superficies niveles detectables de todos estos marcadores.
- 10 En cualquiera de las realizaciones anteriores donde las poblaciones se definen con referencia al porcentaje de células que expresan ciertos marcadores en sus superficies, las poblaciones preferiblemente comprenden al menos 5.000 células, tal como al menos 6.000, al menos 7.000, al menos 8.000, al menos 9.000, al menos 10.000, al menos 20.000, al menos 30.000 o al menos 40.000 células. Estas poblaciones pueden comprender cualquiera de las varias células analizadas anteriormente.
- 15 Cualquiera de las poblaciones de células descritas en este documento puede diluirse con otras células antes de su uso. Por ejemplo, la población puede combinarse con sangre del paciente, células mononucleares (MC), MSC, células progenitoras de linaje mesodérmico (PML) o una combinación de las mismas. Las PML se describen en el documento PCT/GB2012/051600 (publicado como WO 2013/005053).
- 20 Las poblaciones de la invención son ventajosas para terapia como se analiza a continuación. Esta capacidad de producir poblaciones que comprenden grandes cantidades de células IMP de la invención es una de las ventajas clave de la invención. La invención permite el tratamiento de pacientes con una población de células de las que la mayoría, sino todas, migran de forma eficaz al tejido de interés y tienen efectos antiinflamatorios una vez allí. Esto permite el uso de una baja dosis celular y evita los efectos secundarios fuera de diana y los efectos secundarios relacionados con el volumen.
- 25 La población de la invención es preferiblemente homóloga. En otras palabras, todas las células IMP de la población son preferiblemente idénticas genotípica y fenotípicamente. La población es preferiblemente autóloga o alogénica como se define anteriormente.
- 30 Sin embargo, la población también puede ser semi-alogénica. Las poblaciones semi-alogénicas típicamente se producen a partir de células mononucleares de dos o más pacientes que son inmunológicamente compatibles con el paciente en que se administrará la población. En otras palabras, todas las células de la población son preferiblemente idénticas genéticamente o suficientemente idénticas genéticamente, es decir la población es inmunológicamente compatible con el paciente en que se administrará la población. Como las células IMP de la invención pueden obtenerse de un paciente, pueden ser autólogas con el paciente a tratarse (es decir, idénticas genéticamente con el paciente o suficientemente idénticas genéticamente, es decir, son compatibles para la administración al paciente).
- 35 La población de la invención puede estar aislada, sustancialmente aislada, purificada o sustancialmente purificada. Una población está aislada o purificada si está completamente libre de cualquier otro componente, tal como medio de cultivo u otras células. Una población está sustancialmente aislada si está mezclada con vehículos o diluyentes, tales como medio de cultivo, que no interferirán con su uso pretendido. Otros vehículos y diluyentes se analizan en más detalle a continuación. Una población sustancialmente aislada o sustancialmente purificada no comprende células diferentes de las células IMP de la invención. En algunas realizaciones, la población de la invención puede estar presente en una matriz de crecimiento o inmovilizada sobre una superficie como se analiza a continuación.
- 40 La población típicamente se cultiva *in vitro*. Las técnicas para cultivar células son bien conocidas para un experto en la materia. Las células pueden cultivarse en condiciones convencionales de 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % en medio sin suero. Las células preferiblemente se cultivan en condiciones de bajo contenido de oxígeno como se analiza en más detalle a continuación. Las células pueden cultivarse en cualquier matraz o recipiente adecuado, incluyendo pocillos de una placa plana tal como una placa convencional de 6 pocillos. Dichas placas están disponibles en el mercado en Fisher scientific, VWR suppliers, Nunc, Starstedt o Falcon. Los pocillos típicamente tienen una capacidad de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 4 ml.
- 45 El matraz, recipiente o pocillos, dentro de los que está contenida o se cultiva la población pueden modificarse para facilitar la manipulación de las células IMP. Por ejemplo, el matraz, recipiente o pocillos pueden modificarse para facilitar el cultivo de las células, por ejemplo, incluyendo una matriz de cultivo. El matraz, recipiente o pocillos pueden modificarse para permitir la adhesión de las células IMP o para permitir la inmovilización de las células IMP en una superficie. Puede recubrirse, una o más superficies con proteínas de la matriz extracelular tales como laminina o colágeno o cualquier otra molécula de captura que se una a las células o las inmovilice o capture sobre la superficie.
- 50 La población puede modificarse *ex vivo* usando cualquiera de las técnicas descritas en este documento. Por ejemplo, la población puede transfectarse o cargarse con agentes terapéuticos o de diagnóstico. La población después puede usarse en los métodos de tratamiento analizados en más detalle a continuación.
- 55
- 60
- 65

Método de producción de una célula IMP de la invención

La invención también proporciona un método para producir una población de la invención. El método implica cultivar células mononucleares (MC) durante 15 a 25 días en un medio que comprende lisado de plaquetas, a menos del 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) y en condiciones que permiten que las IMP se adhieran para inducir que las MC se diferencien en células IMP. El método entonces implica recoger y cultivar las células IMP que expresan en sus superficies niveles detectables de MIC A/B CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126. Las células recogidas pueden expresar en sus superficies niveles detectables o cantidades aumentadas de cualquiera de los marcadores y factores descritos anteriormente con referencia a las células de la invención.

Las células mononucleares (MC) y los métodos de aislamiento de las mismas son conocidos en la técnica. Las MC pueden ser MC primarias aisladas de médula ósea. Las MC preferiblemente son MC de sangre periférica (PBMC), tales como linfocitos, monocitos y/o macrófagos. Las PBMC pueden aislarse de la sangre usando un polisacárido hidrófilo, tal como Ficoll®. Por ejemplo, las PBMC pueden aislarse de la sangre usando Ficoll-Paque® (un medio de densidad disponible en el mercado) como se describe en el ejemplo.

Antes de cultivarse, las MC pueden exponerse a un cóctel de enriquecimiento de células madre mesenquimáticas. El cóctel preferiblemente comprende anticuerpos que reconocen CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b (que están presentes en células indeseadas) y un componente de glóbulos rojos. Dicho cóctel entrecruza las células indeseadas con los glóbulos rojos que forman inmunorosetas que pueden retirarse de las MC deseadas. Un cóctel preferido es RosetteSep®.

Las condiciones adecuadas para inducir que las MC se diferencien en células mesenquimáticas (tejido principalmente derivado del mesodermo) son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se describen condiciones adecuadas en Capelli, C., *et al.* (Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplantation*, 2007. 40: pág. 785-791). Estas condiciones también pueden usarse para inducir que las MC se diferencien en células IMP de acuerdo con la invención.

El método comprende cultivar las MC con lisado plasmático para inducir que las MC se diferencien en células IMP. El lisado de plaquetas se refiere a la combinación de factores naturales de crecimiento contenidos en las plaquetas que se han liberado a través de la lisis de esas plaquetas. La lisis puede conseguirse a través de medios químicos (es decir, CaCl<sub>2</sub>), medios osmóticos (uso de H<sub>2</sub>O destilada) o a través de procedimientos de congelación/descongelación. El lisado de plaquetas puede obtenerse de sangre completa como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.198.357. El lisado de plaquetas preferiblemente se prepara como se describe en el documento PCT/GB12/052911 (publicado como WO 2013/076507). El lisado plasmático preferiblemente es lisado plasmático humano.

La etapa (a) del método de la invención comprende cultivar las MC en un medio que comprende lisado de plaquetas durante un tiempo suficiente para inducir que las MC se diferencien en células IMP. El tiempo suficiente es de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 días, preferiblemente aproximadamente 22 días. El medio preferiblemente comprende aproximadamente un 20 % o menos de lisado de plaquetas en volumen, tal como aproximadamente un 15 % o menos en volumen o aproximadamente un 10 % o menos en volumen. El medio preferiblemente comprende de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % de lisado de plaquetas en volumen, tal como de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 % en volumen. El medio preferiblemente comprende aproximadamente un 10 % de lisado de plaquetas en volumen.

En otra realización preferida, la etapa (a) del método de la invención comprende exponer las MC a un cóctel de enriquecimiento mesenquimático y después cultivar las MC en un medio que comprende lisado de plaquetas durante un tiempo suficiente para inducir que las MC se diferencien en células IMP. El tiempo suficiente es de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 días, preferiblemente aproximadamente 22 días.

En la etapa (a) el medio es preferiblemente medio esencial mínimo (MEM). El MEM está disponible en el mercado en diversas fuentes incluyendo Sigma-Aldrich. El medio preferiblemente comprende adicionalmente uno o más de heparina, L-glutamina y penicilina/estreptavidina (P/S). La L-glutamina puede remplazarse con GlutaMAX® (que está disponible en el mercado en Life Technologies).

Como se analiza anteriormente, algunas de las células IMP de la invención expresan niveles detectables de CXCR4. La expresión de CXCR4 es dependiente de citocinas y aumenta cuando las células se exponen al factor de células madre (SCF), interleucina-6 (IL-6), ligando de Flt-3, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) e IL-3. El medio puede comprender uno o más de (i) SCF, (ii) IL-6, (iii) ligando de Flt-3, (iv) factor de crecimiento de hepatocitos y (v) IL-3, tal como (i); (ii); (iii); (iv); (v); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iv) y (v); (i), (ii) y (iii); (i), (ii) y (iv); (i), (ii) y (v); (i), (iii) y (iv); (i), (iii) y (v); (i), (iv) y (v); (ii), (iii) y (iv); (ii), (iii) y (v); (ii), (iv) y (v); (iii), (iv) y (v); o (i), (ii), (iii), (iv) y (v). Cualquiera de (i) a (v) puede estar presente de aproximadamente 10 a

aproximadamente 150 ng/ml.

La etapa (a) comprende cultivar las MC en condiciones que permiten que las células IMP se adhieran. Las condiciones adecuadas se analizan en más detalle anteriormente.

En la etapa (a) las MC se cultivan en menos de aproximadamente el 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>), tal como menos de aproximadamente el 19 %, menos de aproximadamente el 18 %, menos de aproximadamente el 17 %, menos de aproximadamente el 16 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 14 %, menos de aproximadamente el 13 %, menos de aproximadamente el 12 %, menos de aproximadamente el 11 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 6 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de oxígeno (O<sub>2</sub>). Las MC preferiblemente se cultivan en aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 19 % de O<sub>2</sub>, tal como de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 15 % de O<sub>2</sub>, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 10 % de O<sub>2</sub> o de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 8 % de O<sub>2</sub>. Las MC mucho más preferiblemente se cultivan en aproximadamente un 0 % de O<sub>2</sub>. Las cifras para el % de oxígeno (o % de O<sub>2</sub>) citadas anteriormente se refieren a % en volumen de oxígeno en el gas suministrado a las células durante el cultivo, por ejemplo, por la incubadora celular. Es posible que algo de oxígeno filtre a la incubadora o entre cuando se abre la puerta.

Las MC mucho más preferiblemente se cultivan en presencia de lisado de plaquetas y menos de aproximadamente el 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>). Esta combinación imita las condiciones naturales en el tejido dañado y de ese modo producen células más sanas y más potentes terapéuticamente. El cultivo celular convencional se realiza en un 20 % o un 21 % de oxígeno (aproximadamente el contenido atmosférico), pero no hay lugar en el cuerpo humano que tengo este nivel de oxígeno. Las células epiteliales en los pulmones "presenciarían" este nivel de oxígeno, pero una vez el oxígeno se ha disuelto y abandona los pulmones, disminuye hasta aproximadamente el 17 %. Desde ahí, disminuye incluso adicionalmente hasta aproximadamente un 1-2 % en la mayoría de los tejidos, pero siendo tan bajo como del 0,1 % en tejidos avasculares tales como el cartílago en las articulaciones.

En la etapa (b), el método comprende adicionalmente recoger y cultivar células IMP que tienen el patrón de expresión de marcadores necesario como se analiza anteriormente. Las células IMP que tienen el patrón de expresión de marcadores necesario pueden recogerse usando cualquier técnica basada en anticuerpos, incluyendo clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y separación con perlas magnéticas. Se prefiere FACS. HT-FACS es más preferido.

Cualquiera de los métodos para cultivar células IMP descrito en relación a la etapa (a) tiene la misma aplicación para etapa (b). En particular, las células se cultivan en la etapa (b) en presencia de lisado de plaquetas y menos de aproximadamente el 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) como se analiza anteriormente en relación a la etapa (a).

Como estará claro a partir del análisis anterior, el método de la invención se realiza en condiciones clínicamente relevantes, es decir, en ausencia de cantidades traza de endotoxinas y otros contaminantes ambientales, tales como lipopolisacáridos, lipopéptidos y peptidoglicanos, etc. Esto hace que las células IMP de la invención sean particularmente adecuadas para su administración a pacientes.

Las MC se obtienen preferiblemente de un paciente o un donante alogénico. La invención también proporciona un método para producir una población de la invención que es adecuada para su administración a un paciente, donde el método comprende cultivar las MC obtenidas del paciente durante 15 a 25 días en un medio que comprende lisado de plaquetas, a menos del 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) y en condiciones que permiten que la IMP se adhieran para inducir que las MC se diferencien en células IMP y (b) recoger y cultivar esas células progenitoras que tienen un patrón de expresión como se define anteriormente y producir de ese modo una población de la invención que es adecuada para su administración al paciente. La población será autóloga con el paciente y, por lo tanto, no se rechazará tras el implante. La invención también proporciona una población de la invención que es adecuada para su administración a un paciente y se produce de esta manera.

Como alternativa, la invención proporciona un método para producir una población de la invención que es adecuada para su administración a un paciente, donde el método comprende cultivar las MC obtenidas de un paciente diferente que es inmunológicamente compatible con el paciente en que se administrarán las células durante 15 a 25 días en un medio que comprende lisado de plaquetas, a menos del 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) y en condiciones que permiten que las IMP se adhieran para inducir que las MC se diferencien en célula IMP y (b) recoger y cultivar esas células IMP que tienen el patrón de expresión como se define anteriormente y producir de ese modo una población de la invención que es adecuada para su administración al paciente. La población será alogénica con el paciente y, por lo tanto, reducirá la posibilidad de rechazo tras el implante. La invención también proporciona una población de la invención que es adecuada para su administración a un paciente y se produce de esta manera.

Medicamentos, métodos y uso terapéutico

- 5 Las células IMP de la invención pueden usarse en un método de terapia de un organismo humano o animal. Por tanto, la invención proporciona una célula IMP de la invención o una población de la invención para su uso en un método de tratamiento del organismo humano o animal por terapia. En particular, la invención se refiere al uso de las células IMP de la invención o una población de la invención para reparar un tejido dañado en un paciente. La invención también se refiere al uso de las células IMP de la invención o una población de la invención para tratar una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en el paciente.
- 10 La invención también proporciona una población de la invención para su uso en la reparación de un tejido dañado en el paciente. La invención también proporciona el uso de una población de la invención en la fabricación de un medicamento para reparar un tejido dañado en un paciente.
- 15 El tejido preferiblemente se obtiene del mesodermo. El tejido es más preferiblemente tejido cardíaco, óseo, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepático, renal o pulmonar.
- 20 El daño al tejido puede estar causado por lesión o enfermedad. La lesión o enfermedad es preferiblemente una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente. La invención, por lo tanto, proporciona un método de tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente, que comprende administrar al paciente una población de la invención, donde la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células y tratar de ese modo la lesión o enfermedad en el paciente. La invención también proporciona una población de la invención para su uso en el tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente. La invención también proporciona el uso de una población de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar una lesión o enfermedad cardíaca, ósea, de cartilago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente.
- 25 La lesión o enfermedad cardíaca se selecciona preferiblemente de infarto de miocardio (MI), hipertrofia del ventrículo izquierdo, hipertrofia del ventrículo derecho, embolia, insuficiencia cardíaca, déficit cardíaco congénito, enfermedad de la válvula cardíaca, arritmia y miocarditis.
- 30 El MI aumenta los niveles de VEGF y EPO liberados por el miocardio. Además, el MI está asociado con una reacción inflamatoria y el tejido infartado también libera factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), interleucina (IL-6) y KC/Gro-alfa. CCL7 (previamente conocido como MCP3), CXCL1, CXCL2 están significativamente regulados positivamente en el corazón después de un infarto de miocardio (MI) y podrían estar implicados en la regulación del implante y la autodirección de MSC al miocardio infartado.
- 35 En un modelo de ratón de infarto de miocardio, IL-8 demostró regular positivamente elevadamente la expresión génica principalmente en los dos primeros días pos-MI. De forma notable, la expresión aumentada de IL-8 estaba localizada predominantemente en el área infartada y la zona limítrofe, y solamente a un grado mucho menor en el miocardio conservado. Activando CXCR2, MIF presenta funciones de tipo quimiocina y actúa como regulador principal del reclutamiento de células inflamatorias y aterogénesis.
- 40 La enfermedad o lesión ósea se selecciona preferiblemente de fractura, fractura de Salter-Harris, fractura en tallo verde, espolón óseo, craneosinostosis, síndrome de Coffin-Lowry, fibrodisplasia osificante progresiva, displasia fibrosa, enfermedad de Fong (o síndrome de uña-rótula), hipofosfatasa, síndrome de Klippel-Feil, enfermedad ósea metabólica, artrooncodisplasia, osteoartritis, osteítis deformante (o enfermedad de Paget del hueso), osteítis fibrosa quística (u osteítis fibrosa o enfermedad de Von Recklinghausen del hueso), osteítis púbrica, osteítis condensante (u osteítis condensans), osteítis condensante iliaca, osteocondritis desecante, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteopenia, osteopetrosis, osteoporosis, osteonecrosis, hiperostosis porótica, hiperparatiroidismo primario, osteodistrofia renal, cáncer de huesos, una lesión ósea asociada con cáncer metastásico, síndrome de Gorham Stout, hiperparatiroidismo primario, enfermedad periodontal y pérdida aséptica de remplazo de articulaciones. El cáncer de huesos puede ser sarcoma de Ewing, mieloma múltiple, osteosarcoma (tumor gigante del hueso), osteocondroma u osteoclastoma. El cáncer metastásico que provoca lesión ósea puede ser cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer pulmonar y/o leucemia de células T en el adulto.
- 45 Si el tejido dañado es tejido cardíaco o tejido óseo, las células IMP en la población preferiblemente expresan en sus superficies niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CXCR1, CXCR2 y CXCR4 y no expresan en sus superficies niveles detectables de CD14, CD34 y CD45. Si el tejido dañado es tejido óseo, las células IMP de la población más preferiblemente pueden expresar en sus superficies niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, TGF-beta 3, proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6), SOX-9, colágeno-2, CD117 (c-kit), quimiocina (motivo C-C), ligando 12 (CCL12), CCL7, interleucina-8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R $\alpha$ , PDGF-R $\beta$ , CXCR4, receptor de tipo 1 de quimiocina C-C (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y
- 60
- 65

NFkappaB y no expresan en sus superficies niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

La enfermedad o trastorno puede ser enfermedad periodontal, endometriosis o rotura de menisco.

5 En todos los casos, las células IMP de la invención preferiblemente se obtienen del paciente o un donante alogénico. Obtener las células IMP de la invención del paciente debe asegurar que las células IMP no se rechacen por sí mismas por el sistema inmunitario del paciente. Cualquier diferencia entre el donante y el receptor finalmente causaría eliminación de las células IMP, pero no antes de que hayan reparado al menos una parte del tejido dañado.

10 La invención se refiere a la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de células IMP de la invención al paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que mejora uno o más síntomas del daño, enfermedad o lesión. Una cantidad terapéuticamente eficaz es preferiblemente una cantidad que repara el tejido dañado o trata la enfermedad o lesión. Las cantidades adecuadas se analizan en más detalle a continuación.

15 Las células IMP de la invención pueden administrarse a cualquier paciente adecuado. El paciente generalmente es un paciente humano. El paciente puede ser cualquiera de los animales o mamíferos mencionados anteriormente con referencia a la fuente de las células IMP.

20 El paciente puede ser un lactante, un menor o un adulto. El paciente puede tener un tejido dañado conocido o ser sospechoso de tener un tener un tejido dañado. El paciente puede ser susceptible a, o estar en riesgo de, la enfermedad o la lesión relevante. Por ejemplo, el paciente puede estar genéticamente predispuesto a insuficiencia cardíaca.

25 La invención puede usarse en combinación con otros medios de, y sustancias para, la reparación de tejido dañado o para proporcionar alivio del dolor. En algunos casos, las células IMP de la invención pueden administrarse de forma simultánea, secuencial o por separado con otras sustancias que están pretendidas para reparar el tejido dañado o para proporcionar alivio del dolor. Las células IMP pueden usarse en combinación con tratamientos existentes para tejido dañado y, por ejemplo, pueden mezclarse simplemente con dichos tratamientos. Por tanto, la invención puede usarse para aumentar la eficacia de tratamientos existentes de tejido dañado.

30 La invención preferiblemente se refiere al uso de células IMP cargadas o transfectadas con un agente terapéutico y/o de diagnóstico. Un agente terapéutico puede ayudar a reparar el tejido dañado. Un agente de diagnóstico, tal como una molécula fluorescente, puede ayudar a identificar la localización de las células IMP en el paciente. Las células IMP pueden cargarse o transfectarse usando cualquier método conocido en la técnica. La carga de células IMP puede realizarse *in vitro* o *ex vivo*. En cada caso, las células IMP simplemente pueden ponerse en contacto con el agente en cultivo. Como alternativa, las células IMP pueden cargarse con un agente usando un vehículo de suministro, tal como liposomas. Dichos vehículos son conocidos en la técnica.

40 La transfección de células IMP puede realizarse *in vitro* o *ex vivo*. Como alternativa, la transfección estable puede realizarse en la fase MC que permite que las células IMP que expresen el transgén se diferencien a partir de ellas. Las células IMP se transfectan con un ácido nucleico que codifica el agente. Por ejemplo, pueden emplearse partículas víricas u otros vectores que codifican el agente. Los métodos para hacer esto son conocidos en la técnica.

45 El ácido nucleico da lugar a la expresión del agente en las células IMP. La molécula de ácido nucleico preferiblemente comprenderá un promotor que está unido de forma funcional a las secuencias que codifican el agente y que es activo en las células IMP o que puede introducirse en las células IMP.

50 En una realización particularmente preferida, el ácido nucleico que codifica el agente puede suministrarse a través de una partícula vírica.

La partícula vírica puede comprender una molécula de dirección para asegurar la transfección eficaz. La molécula de dirección típicamente se proporcionará completa o parcialmente sobre la superficie del virus para que la molécula sea capaz de dirigir el virus a las células IMP.

55 Cualquier virus adecuado puede usarse en dichas realizaciones. El virus puede ser, por ejemplo, un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus adenoasociado, un virus vaccinia o un virus del herpes simple. En una realización particularmente preferida el virus puede ser un lentivirus. El lentivirus puede ser un virus VIH modificado adecuado para su uso en el suministro de genes. El lentivirus puede ser un VIS, VIF o un vector basado en el virus de la anemia infecciosa equina (EQIA). El virus puede ser un virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). Los virus usados en la invención preferiblemente son deficientes en replicación.

60 No tienen que usarse partículas víricas. Puede usarse cualquier vector capaz de transfectar las células IMP de la invención, tal como transfección convencional con ADN o ARN plasmídico.

65 La captación de las construcciones de ácido nucleico puede potenciarse por carias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato calcio y DEAE-dextrano y lipofectanos, por ejemplo, lipofectAmine, fugene y

transfectam.

La célula puede cargarse o transfectarse en condiciones adecuadas. La célula y el agente o vector puede ponerse en contacto, por ejemplo, durante entre cinco minutos y diez días, preferiblemente de una hora a cinco días, más  
5 preferiblemente de cinco horas a dos días e incluso más preferiblemente de doce horas a un día.

La invención también proporciona células IMP que se han cargado o transfectado con un agente como se analiza anteriormente. Dichas células IMP pueden usarse en las realizaciones terapéuticas de la invención.

10 En algunas realizaciones, las MC pueden recuperarse de un paciente, convertirse en células IMP usando la invención, cargarse o transfectarse *in vitro* y después devolverse al mismo paciente. En dichos casos, las células IMP empleadas en la invención serán células autólogas y completamente coincidentes con el paciente. En un caso preferido, las células empleadas en la invención se recuperan de un paciente y se utilizan *ex vivo* y posteriormente se devuelven al mismo paciente.

#### 15 Composiciones farmacéuticas y administración

La invención adicionalmente proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula IMP de la invención o una población de la invención en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable,  
20 (ii) uno o más liposomas y/o (iii) una o más microburbujas. La composición puede comprender (i); (ii); (iii); (i) y (ii); (i) y (iii); (ii) y (iii); o (i), (ii) y (iii). La célula IMP o la población está contenida preferiblemente dentro del uno o más liposomas y/o una o más microburbujas. Puede estar presente cualquier cantidad de liposomas y/o microburbujas. Cualquiera de los números analizados anteriormente con referencia a la población de la invención tiene la misma aplicación a los liposomas y/o microburbujas. Un liposoma o microburbuja puede contener una célula IMP o más de  
25 una célula IMP.

La composición puede comprender cualquiera de las células IMP o poblaciones mencionadas en este documento y, en algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico, vectores o virus descritos en este documento. La invención proporciona un método de reparación de un tejido dañado en un paciente, que comprende administrar al  
30 paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. Cualquiera de las realizaciones terapéuticas analizadas anteriormente se aplica igualmente a esta realización.

Las diversas composiciones de la invención pueden formularse usando cualquier método adecuado. La formulación de células con vehículos y/o con excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales puede realizarse usando métodos rutinarios en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de una formulación dependerá de varios factores, incluyendo las células a administrarse y la vía deseada de administración. Los tipos adecuados de formulación se describen completamente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, EE. UU.

40 Las células pueden administrarse por cualquier vía. Las vías adecuadas incluyen, aunque sin limitación, vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal u otra vía apropiada de administración. Si el tejido dañado es tejido cardíaco, las células pueden administrarse a través de una vía endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, intracoronaria, por el seno coronario retrogrado, intraarterial, intrapericárdica o intravenosa. Si el tejido dañado es hueso, las células pueden administrarse a través de una vía intraósea o al sitio de la lesión, tal como una fractura o enfermedad. Si el tejido dañado es cartílago, tendón, ligamento, tejido hepático, renal o pulmonar, las células pueden administrarse directamente al tejido. Si el tejido dañado es tejido pulmonar, las células pueden introducirse a través de una vía intrapulmonar. Si el tejido dañado es hígado o riñón, las células pueden introducirse a través de una vía intraperitoneal. Las células preferiblemente se administran por vía intravenosa.

50 Las composiciones pueden prepararse junto con un vehículo o diluyente fisiológicamente aceptable. Típicamente, dichas composiciones se preparan como suspensiones líquidas de células. Las células pueden mezclarse con un excipiente que es farmacéuticamente aceptable y compatible con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o similares y combinaciones de los mismos.

55 Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia. La composición preferiblemente comprende albúmina sérica humana.

60 Un vehículo o diluyente adecuado es Plasma-Lyte A®. Este es una solución isotónica no pirogénica estéril para administración intravenosa. Cada 100 ml contiene 526 mg de cloruro sódico, USP (NaCl); 502 mg de gluconato sódico (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NaO<sub>7</sub>); 368 mg de acetato sódico trihidrato, USP (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>•3H<sub>2</sub>O); 37 mg de cloruro potásico, USP (KCl); y 30 mg de cloruro de magnesio, USP (MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O). No contiene agentes antimicrobianos. El pH se ajusta con hidróxido sódico. El pH es 7,4 (6,5 a 8,0).

65 Las células IMP pueden estar contenidas dentro de uno o más liposomas y/o en una o más microburbujas. Los liposomas adecuados son conocidos en la técnica. Los liposomas adecuados se describen en, por ejemplo,

Akbarzadeh et al. *Nanoscale Research Letters* 2013, 8:102 y Meghana et al., *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*, 2012, 1(1): 1-10. Los lípidos adecuados para su uso en la formación de liposomas se analizan a continuación con referencia a las microburbujas.

5 Las microburbujas, su formación y usos biomédicos son conocidos en la técnica (por ejemplo, Sirsi y Borden, *Bubble Sci Eng Technol.* Nov 2009; 1(1-2): 3-17). Las microburbujas son burbujas más pequeñas de un milímetro de diámetro y más grandes de un micrómetro de diámetro. La microburbuja usada en la presente invención es preferiblemente de 8  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro, tal como 7  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro, 6  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro, 5  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro, 4  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro, 3  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro o 2  $\mu\text{m}$  o menos de diámetro.

10 La microburbuja puede formarse a partir de cualquier sustancia. La composición general de una microburbuja es un núcleo gaseoso estabilizado por un revestimiento. El núcleo de gas puede comprender aire o un gas pesado, tal como perfluorocarbono, nitrógeno o perfluoropropano. Los gases pesados son menos solubles en agua y por tanto tienen menor probabilidad de filtrar de la microburbuja, lo que conduce a disolución de la microburbuja. Las microburbujas con núcleos de gas pesado típicamente duran más en circulación.

15 El revestimiento puede formarse de cualquier material. El material de revestimiento preferiblemente comprende una proteína, un tensioactivo, un lípido, un polímero o una mezcla de los mismos.

20 Las proteínas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, albúmina, lisozima y avidina. Las proteínas dentro del revestimiento pueden reticularse químicamente, por ejemplo, por enlace cisteína-cisteína. Se conocen en la técnica otras reticulaciones.

25 Los tensioactivos adecuados incluyen, aunque sin limitación, monopalmitato de sorbitán (tal como SPAN-40), detergentes de polisorbato (tal como TWEEN-40), mezclas de SPAN-40 y TWEEN-40 y estearato de sacarosa (mono y diéster).

30 Los polímeros adecuados incluyen, aunque sin limitación, polímeros de alginato, polímeros de doble éster de etilideno, el copolímero poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(alcohol vinílico) (PVA), el copolímero poli(perfluorooctiloxycarbonil)poli(ácido láctico) (PLA-PFO) y otros copolímeros de bloque. Los copolímeros de bloque son materiales poliméricos en que dos o más subunidades monoméricas se polimerizan juntas para crear una única cadena polimérica. Los copolímeros de bloque típicamente tienen propiedades a las que contribuye cada subunidad monomérica. Sin embargo, un copolímero de bloque puede tener propiedades únicas que los polímeros formados a partir de las subunidades individuales no poseen. Los copolímeros de bloque pueden diseñarse de modo que una de las subunidades monoméricas sea hidrófoba (es decir, lipófila), mientras que la otra u otras subunidades sean hidrófilas en medio acuoso. En este caso, el copolímero de bloque puede poseer propiedades anfífilas y puede formar una estructura que imita una membrana biológica. El copolímero de bloque puede ser un dibloque (que consiste en dos subunidades monoméricas), pero también puede construirse a partir de más de dos subunidades monoméricas para formar disposiciones más complejas que se comportan como anfífilos. El copolímero puede ser un copolímero tribloque, tetrabloque o pentabloque. Los copolímeros de bloque también pueden construirse a partir de subunidades que no se clasifican como submateriales lipídicos; por ejemplo, un polímero hidrófobo puede prepararse a partir de siloxano u otros monómeros no basados en hidrocarburo. La subsección hidrófila del copolímero de bloque también puede poseer bajas propiedades de unión a proteína, lo que permite la creación de una membrana que sea altamente resistente cuando se expone a muestras biológicas sin procesar. Esta unidad de grupo de cabeza también puede obtenerse de grupos de cabeza lipídicos no clásicos.

45 Puede usarse cualquier material lipídico que forme una microburbuja. La composición lipídica se elige de modo que la microburbuja tenga las propiedades requeridas, tal como carga superficial, densidad de compactación o propiedades mecánicas. La composición lipídica puede comprender uno o más lípidos diferentes. Por ejemplo, la composición lipídica puede contener hasta 100 lípidos. La composición lipídica preferiblemente contiene de 1 a 10 lípidos. La composición lipídica puede comprender lípidos de origen natural y/o lípidos artificiales.

50 El lípido típicamente comprende un grupo de cabeza, un resto interfacial y dos grupos de cola hidrófoba que pueden ser iguales o diferentes. Los grupos de cabeza adecuados incluyen, aunque sin limitación, grupos de cabeza neutros, tales como diacilglicéridos (DG) y ceramidas (CM); grupos de cabeza zwitteriónicos, tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM); grupos de cabeza cargados negativamente, tales como fosfatidilglicerol (PG); fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfático (PA) y cardiolipina (CA); y grupos de cabeza cargados positivamente, tales como trimetilamonio-propano (TAP). Los restos interfaciales adecuados incluyen, aunque sin limitación, restos interfaciales de origen natural, tales como restos basados en glicerol o basados en ceramida. Los grupos de cola hidrófoba adecuados incluyen, aunque sin limitación, cadenas de hidrocarburo saturado, tales como ácido láurico (ácido n-dodecanólico), ácido mirístico (ácido n-tetradecanoico), ácido palmítico (ácido n-hexadecanoico), ácido esteárico (ácido n-octadecanoico) y ácido araquídico (ácido n-eicosanoico); cadenas de hidrocarburo insaturado, tales como ácido oleico (ácido cis-9-octadecanoico); y cadenas de hidrocarburo ramificado, tales como fitanoilo. La longitud de la cadena y la posición y número de los dobles enlaces en las cadenas de hidrocarburo insaturado pueden variar. La longitud de las cadenas y la posición y número de las ramificaciones, tales como grupos metilo, en las cadenas de hidrocarburo ramificado pueden variar. Los

grupos de cola hidrófoba pueden unirse al resto interfacial como un éter o un éster.

Los lípidos también pueden modificarse químicamente. El grupo de cabeza o el grupo de cola de los lípidos puede modificarse químicamente. Los lípidos adecuados cuyos grupos de cabeza se han modificado químicamente incluyen, aunque sin limitación, lípidos modificados con PEG, tales como 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000]; lípidos PEG funcionalizados, tales como 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[biotinil(polietilenglicol)2000]; y lípidos modificados para conjugación, tales como 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(succinilo) y 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(biotinilo). Los lípidos adecuados cuyos grupos de cola se han modificado químicamente incluyen, aunque sin limitación, lípidos polimerizables, tales como 1,2-bis(10,12-tricosadiinilo)-sn-glicero-3-fosfocolina; lípidos fluorados, tales como 1-palmitoil-2-(16-fluoropalmitoil)-sn-glicero-3-fosfocolina; lípidos deuterados, tales como 1,2-dipalmitoil-D62-sn-glicero-3-fosfocolina; y lípidos unidos por éter, tales como 1,2-di-O-fitanil-sn-glicero-3-fosfocolina. Los lípidos pueden modificarse químicamente o funcionalizarse para facilitar el acoplamiento de los ligandos, receptores o anticuerpos como se analiza anteriormente.

La composición lipídica puede comprender uno o más aditivos que afectaran a las propiedades de la microburbuja. Los aditivos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido mirístico y ácido oleico; alcoholes grasos, tales como alcohol palmítico, alcohol mirístico y alcohol oleico; esteroides, tales como colesterol, ergosterol, lanosterol, sitosterol y estigmasterol; lisofosfolípidos, tales como 1-acil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina; y ceramidas.

El revestimiento de las microburbujas se forma preferiblemente a partir de un fosfolípido. Los fosfolípidos adecuados son conocidos en la técnica.

Hay varias formulaciones de revestimiento lipídico de microburbujas disponibles en el mercado tales como Definity (Lantheus Medical Imaging) y Sonovue® (Bracco Diagnostics).

La microburbuja también puede formarse a partir de un híbrido de polímero-tensioactivo que implica la formación de revestimientos de multicapa de polielectrolito (PEM) en una microburbuja preformada. La microburbuja preformada se recubre con un tensioactivo cargado o capa proteica, que sirve como sustrato para la deposición de PEM. La técnica de ensamblaje capa por capa se usa para adsorber secuencialmente poliones cargados de forma opuesta al revestimiento de la microburbuja. Por ejemplo, puede depositarse PEM en microburbujas usando poli(clorhidrato de alilamina) (PAH) y poli(sulfonato de estireno) (PSS) para un par de poliones. También se han desarrollado microburbujas de PEM con fosfolípido que contienen el grupo de cabeza catiónico trimetilamonio propano (TAP) como revestimiento subyacente y ADN y poli(L-lisina) (PLL) como el par de poliones.

La microburbuja típicamente se forma proporcionando una superficie de contacto entre un gas y un material de revestimiento de microburbuja. Puede usarse cualquiera de los materiales analizados anteriormente. Algunos materiales, tales como fosfolípidos, forman espontáneamente microburbujas. Los fosfolípidos se autoensamblan en una microburbuja. Otros materiales requieren sonicación de la superficie de contacto, es decir, la aplicación de energía sónica u ondas sónicas a la superficie de contacto. Típicamente se usan ondas ultrasónicas. Los métodos adecuados son conocidos en la técnica para sonicación.

La microburbuja puede cargarse con las células IMP después de la formación de la microburbuja o durante la formación de la microburbuja.

Las células IMP se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación y en dicha cantidad serán terapéuticamente eficaces. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratarse, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto y el grado de reparación deseado. Las cantidades precisas de células IMP requeridas a administrarse pueden depender del criterio del facultativo y pueden ser particulares para cada sujeto.

Cualquier cantidad adecuada de células puede administrarse a un sujeto. Por ejemplo, pueden administrarse al menos, o aproximadamente,  $0,2 \times 10^6$ ,  $0,25 \times 10^6$ ,  $0,5 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $4,0 \times 10^6$  o  $5,0 \times 10^6$  células por kg de paciente. Por ejemplo, pueden administrarse al menos, o aproximadamente  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  células. Como guía, la cantidad de células de la invención a administrarse puede ser de  $10^5$  a  $10^9$ , preferiblemente de  $10^6$  a  $10^8$ . Típicamente, se administran hasta  $2 \times 10^8$  células IMP a cada paciente. Puede administrarse cualquiera de las cantidades específicas analizadas anteriormente con referencia a las poblaciones de la invención. En dichos casos en que las células se administran o están presentes, el medio de cultivo puede estar presente para facilitar la supervivencia de las células. En algunos casos, las células de la invención pueden proporcionarse en alícuotas congeladas y pueden estar presentes sustancias tales como DMSO para facilitar la supervivencia durante la congelación. Dichas células congeladas típicamente se descongelarán y después se colocarán en un tampón o medio para su mantenimiento o para su administración.

Composición híbrida

Una o más células IMP de la invención pueden formar parte de una composición híbrida como se describe en la solicitud internacional n.º PCT/GB2015/051672 (WO 2015/189586) y se administran preferiblemente a un paciente como parte de dicha composición. En particular, la invención proporciona una composición híbrida, que comprende:

- (a) una o más fibras biocompatibles;
- (b) una o más células IMP de la invención; y
- (c) uno o más componentes biocompatibles que (i) adhieren la una o más células terapéuticas a la una o más fibras y/o incluyen la una o más células terapéuticas y la una o más fibras y/o (ii) son capaces de adherir la composición a un tejido.

La composición híbrida de la invención comprende una o más fibras biocompatibles. Una fibra es biocompatible sino causa ninguna reacción adversa o efecto secundario cuando se pone en contacto con un tejido dañado.

Puede estar presente cualquier cantidad de fibras biocompatibles en la composición. La composición puede comprender solamente una fibra. La composición típicamente comprende más de una fibra, tal como al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 500 fibras, al menos 1000 fibras o incluso más fibras.

Las fibras biocompatibles adecuadas son conocidas en la técnica. La una o más fibras biocompatibles puede ser naturales o sintéticas. Las fibras biocompatibles preferidas incluyen, aunque sin limitación, fibras de celulosa, fibras de colágeno, fibras de colágeno-glucosaminoglucano, fibras de gelatina, fibras de fibroína de la seda, una o más fibras de fibrina, fibras de quitosana, fibras de almidón, fibras de alginato, fibras de hialuronano, fibras de poloxámero o una combinación de las mismas. El glucosaminoglucano es preferiblemente condroitina. La celulosa es preferiblemente carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o metilcelulosa. El poloxámero es preferiblemente ácido plurónico, opcionalmente Pluronic F-127.

Si está más de una fibra en la composición, la población de fibras puede ser homogénea. En otras palabras, todas las fibras de la población pueden ser del mismo tipo de fibra, por ejemplo, fibras de celulosa. Como alternativa, la población de fibras puede ser heterogénea. En otras palabras, la población de fibras puede contener diferentes tipos de fibra, tales como fibras de celulosa y fibras de colágeno.

La una o más fibras pueden ser de cualquier longitud. La una o más fibras son preferiblemente de aproximadamente la misma longitud que la profundidad del daño en el tejido que se tiene que tratar usando la composición. La longitud de una o más fibras se designa preferiblemente de modo que la composición pueda penetrar en el tejido dañado hasta una profundidad estipulada. La una o más fibras pueden ser de cualquier longitud. El límite inferior de la longitud de la una o más fibras se determina típicamente por el diámetro de la una o más células terapéuticas. Las longitudes adecuadas incluyen, aunque sin limitación, al menos 1 µm de longitud, al menos 10 µm de longitud, al menos 100 µm de longitud, al menos 500 µm de longitud, al menos 1 mm de longitud, al menos 10 mm (1 cm) de longitud, al menos 100 mm (10 cm) de longitud, al menos 500 mm (50 cm) de longitud o al menos 1000 mm (100 cm o 1 m) de longitud. La una o más fibras pueden ser incluso más largas. Por ejemplo, la una o más fibras pueden ser de hasta 5 m o 10 m de longitud, por ejemplo, que se usan para reparar daños a lo largo del tracto intestinal humano, o incluso más largas si se están usando en animales más grandes, tales como caballos. La longitud de la una o más fibras se determina típicamente por su uso pretendido y/o su capacidad de manipularse, por ejemplo, por un cirujano, por un robot o a través de algún otro medio, tal como de forma magnética.

La una o más fibras pueden estar cargadas. La una o más fibras están preferiblemente cargadas positivamente. La una o más fibras están preferiblemente cargadas negativamente.

La una o más fibras pueden ser magnéticas. La una o fibras pueden modificarse para incluir uno o más átomos o grupos magnéticos. Esto permite dirigir de forma magnética de la composición. Los átomos o grupos magnéticos pueden ser paramagnéticos o superparamagnéticos. Los átomos o grupos adecuados incluyen, aunque sin limitación, átomos de oro, átomos de hierro, átomos de cobalto, átomos de níquel y grupos quelantes de metal, tales como ácido nitrilotriacético, que contiene cualquiera de estos átomos. El grupo quelante de metales pueden comprender, por ejemplo, un grupos seleccionado de -C(=O)O-, -C-O-C-, -C(=O)-, -NH-, -C(=O)-NH-, -C(=O)-CH<sub>2</sub>-I, -S(=O)<sub>2</sub>- y -S-.

La composición también comprende uno o más componentes biocompatibles. El uno o más componentes biocompatibles (i) adhieren la una o más células terapéuticas a la una o más fibras y/o incluyen la una o más células terapéuticas y la una o más fibras y/o (ii) son capaces de adherir la composición a un tejido. El uno o más componentes biocompatibles pueden (a) adherir la una o más células terapéuticas a la una o más fibras, (b) incluir la una o más células terapéuticas y la una o más fibras, (c) son capaces de adherir la composición a un tejido, (d) adhieren la una o más células terapéuticas a la una o más fibras e incluyen la una o más células terapéuticas y la una o más fibras, (e) adhieren la una o más células terapéuticas a la una o más fibras y son capaces de adherir la composición a un tejido, (f) incluyen la una o más células terapéuticas y la una o más fibras y son capaces de

adherir la composición a un tejido o (g) adhieren la una o más células terapéuticas a la una o más fibras, incluyen la una o más células terapéuticas y la una o más fibras y son capaces de adherir la composición a un tejido.

5 Un componente es biocompatible sino causa ninguna reacción adversa o efecto secundario cuando entra en contacto con un tejido dañado.

10 Puede estar presente cualquier cantidad de componentes biocompatibles en la composición. La composición típicamente comprende solamente un componente o dos componentes. La composición puede comprender más de dos componentes, tal como al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50 componentes o incluso más componentes.

15 El uno o más componentes biocompatibles preferiblemente comprenden un adhesivo biocompatible que adhiere la una o más células terapéuticas a la una o más fibras. El adhesivo biocompatible puede adherir la una o más células terapéuticas (a) sobre la superficie de la una o más fibras, (b) dentro de la una o más fibras o (c) tanto sobre la superficie como dentro de la una o más fibras.

20 El adhesivo biocompatible puede ser natural o sintético. Los adhesivos biocompatibles adecuados son conocidos en la técnica. Los adhesivos adecuados incluyen, aunque sin limitación, fibrina, gel de fibrina, integrina, gel de integrina, cadherina y gel de cadherina.

25 El uno o más componentes biocompatibles preferiblemente comprenden un gel biocompatible que incluye la una o más células terapéuticas y la una o más fibras. Los geles biocompatibles adecuados son conocidos en la técnica. El biocompatible puede ser natural o sintético. Los geles biocompatibles preferidos incluyen, aunque sin limitación, un gel de celulosa, un gel de colágeno, un gel de gelatina, un gel de fibrina, un gel de quitosana, un gel de almidón, un gel de alginato, un gel de hialuronano, un gel de agarosa, un gel de poloxámero o una combinación de los mismos.

30 El gel de celulosa puede formarse a partir de cualquiera de las celulosas analizadas anteriormente. La concentración de polímero de celulosa es preferiblemente de aproximadamente el 1,5 % (p/p) a aproximadamente 4,0 % (p/p), tal como de aproximadamente 2,0 % (p/p) a aproximadamente 3,0 % (p/p). El polímero de celulosa preferiblemente tiene un peso molecular de aproximadamente 450.000 a aproximadamente 4.000.000, tal como de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 3.500.000, de aproximadamente 500.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 750.000 a aproximadamente 2.500.000 o de aproximadamente 1.000.000 a aproximadamente 2.000.000.

35 El gel de poloxámero es preferiblemente un gel de ácido plurónico, opcionalmente un gel de Pluronic F-127.

40 El adhesivo y/o el gel preferiblemente tienen una viscosidad en el intervalo de 1000 a 500.000 mPa\*s (cps) a temperatura ambiente, tal como de aproximadamente 1500 a aproximadamente 450.000 mPa\*s a temperatura ambiente, de aproximadamente 2000 a aproximadamente 400.000 mPa\*s a temperatura ambiente, de aproximadamente 2500 a aproximadamente 350.000 mPa\*s a temperatura ambiente, de aproximadamente 5000 a aproximadamente 300.000 mPa\*s a temperatura ambiente, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 250.000 mPa\*s a temperatura ambiente, de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 200.000 mPa\*s a temperatura ambiente o de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 150.000 mPa\*s a temperatura ambiente.

45 La viscosidad es una medida de la resistencia del adhesivo y/o del gel a deformarse por tensión de corte o por tensión de tracción. La viscosidad puede medirse usando cualquier método conocido en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, aunque sin limitación, el uso de viscosímetro o un reómetro.

50 La temperatura ambiente es típicamente de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 25 °C, tal como de aproximadamente 19 °C a aproximadamente 24 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 23 °C o de aproximadamente 21 °C a aproximadamente 22 °C. La temperatura ambiente es preferiblemente cualquiera de 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C y 25 °C. La viscosidad se mide mucho más preferiblemente a 25 °C.

55 El uno o más componentes biocompatibles preferiblemente comprenden un adhesivo biocompatible que adhiere la una o más células terapéuticas a la una o más fibras y un gel biocompatible que incluye la una o más células terapéuticas y la una o más fibras. Por ejemplo, la composición puede comprender un gel de fibrina que adhiere la una o más células terapéuticas a la una o más fibras y un gel de celulosa que incluye la una o más células terapéuticas y la una o más fibras.

60 En cualquiera de las realizaciones analizadas anteriormente, el adhesivo biocompatible y/o el gel biocompatible preferiblemente comprenden lisado de plaquetas. Por ejemplo, el adhesivo y/o el gel puede ser un gel de lisado de plaquetas. El lisado de plaquetas se refiere a la combinación de factores naturales de crecimiento contenidos en plaquetas que se han liberado a través de la lisis de esas plaquetas. La lisis puede conseguirse a través de medios químicos (es decir, CaCl<sub>2</sub>), medios osmóticos (uso de H<sub>2</sub>O destilada) o a través de procedimientos de congelación/descongelación. El lisado de plaquetas puede obtenerse de sangre completa como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.198.357. El lisado de plaquetas preferiblemente se prepara como se describe en el

documento PCT/GB12/052911 (publicado como WO 2013/076507). Por ejemplo, puede prepararse sometiendo una población de plaquetas a al menos un ciclo de congelación-descongelación, donde la parte de congelación de cada ciclo se realiza a una temperatura inferior o igual a - 78 °C.

- 5 El adhesivo y/o el gel preferiblemente comprende (a) lisado de plaquetas, (b) al menos un polímero farmacéuticamente aceptable y (c) al menos una especie química cargada positivamente farmacéuticamente aceptable seleccionada del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, metionina, prolina, serina, asparagina, cisteína, poliaminoácidos, protamina, aminoguanidina, iones de cinc e iones de magnesio, donde la composición es un gel acuoso que tiene una viscosidad en el intervalo de 1000 a 500.000 mPa•s (cps) a temperatura ambiente. El polímero farmacéuticamente aceptable preferiblemente es celulosa o un poloxámero. Puede ser cualquiera de las celulosas y poloxámeros analizados anteriormente.

10 El lisado de plaquetas preferiblemente es lisado de plaquetas humanas. El lisado de plaquetas se analiza en más detalle anteriormente.

15 La composición híbrida puede estar contenida dentro de uno o más liposomas o una o más microburbujas. Dichas estructuras son conocidas en la técnica.

20 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - Aislamiento de médula ósea y sangre periférica y expansión de células IMP

25 Se diluye una muestra de médula ósea con solución salina tamponada de Hank y se estratificó sobre Ficoll-Paque para el aislamiento de células mononucleares (MC) por centrifugación. Las MC después se resuspendieron en solución salina tamponada de Hank y se contaron usando el ensayo de exclusión de azul de tripano al 0,4 % para evaluar la viabilidad celular. Las células se sembraron en matraces T25 (en 5 ml de medio de cultivo celular,  $\alpha$ MEM, GlutaMAX, penicilina-estreptomina, lisado de plaquetas, heparina), y se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. En el día 8 se cambió el medio. Las células se controlaron diariamente para la observación de células de tipo IMP y, si estaban presentes, se recogían usando solución de disociación celular de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sub-cultivaron en el mismo medio que anteriormente. Las células se crioconservaron en el pase 2 en medio de cultivo suplementado con dimetilsulfóxido al 10 % hasta - 80 °C y se almacenaron en nitrógeno líquido para su uso posterior.

#### Ejemplo 2 - Análisis por HT-FACS

40 El análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia de alto rendimiento (HT-FACS) es una plataforma de selección de alto rendimiento que puede caracterizar rápidamente el fenotipo de superficie celular de células en suspensión, con más de 370 marcadores de superficie celular actualmente en el panel. Esta plataforma ha experimentado una extensa validación y se ha realizado sobre muchos tipos de tejidos y de células humanas. El panel consiste en 375 anticuerpos específicos de superficie de células humanas dispuestos en serie en placas de 96 pocillos.

45 El objetivo fue determinar el perfil de expresión de antígenos superficiales de IMP humanas de la invención y de MSC humanas obtenidas de Lonza®. La plataforma FACS de alto rendimiento (HT-FACS) permite la selección de 375 antígenos superficiales.

50 Se sembró un vial de PB-MSc crioconservadas ( $1 \times 10^6$  células/ml) en un matraz T75 cm<sup>2</sup> que contenía 15 ml de medio CTL (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Las células se cultivaron hasta confluencia del 80-90 % cambiando el medio cada 2-3 días. Para pasar las células, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células se trataron con 3 ml de tripsina al 0,25 % hasta desprenderse. Se añadieron 8 ml de medio para inactivar la tripsina y las células se recogieron por centrifugación a 400 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 5 ml de medio y se sembraron en un matraz T175 cm<sup>2</sup> que contenía 30 ml de medio CTL (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %). Se requirieron entre 8 a 10 matraces T175 cm<sup>2</sup> a confluencia del 80-90 % para recoger 20-30 millones de células (en el pase 4) para la selección por HT-FACS. Para obtener una cantidad suficiente de "eventos" de citometría de flujo por anticuerpo, lo óptimo aproximadamente 20 millones de células viables. Para recoger las células, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con PBS. Las células se trataron con 5 ml de tripsina al 0,25 % hasta desprenderse. Se añadió medio (8 ml) para inactivar la tripsina y recoger las células. Las células se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos.

60 Los sedimentos celulares se resuspendieron (suspensión de células individuales) en 5 ml en total de HBSS (solución salina equilibrada de Hank menos calcio/magnesio, suplementada con EDTA 2 mM y BSA al 1 %). Se usó una alícuota de la muestra (10  $\mu$ l) para determinar la cantidad total de células viables usando colorante de exclusión (azul de tripano al 0,2 %).

65 Se cargaron 100  $\mu$ l de muestra en cada pocillo (aproximadamente 40.000 células por pocillo, que asegura la recogida de 10.000 a 20.000 eventos en FACS). Las muestras se procesaron en un BD FACSDiva mejorado con un

tomamuestras automático de alto rendimiento BD (tomamuestras automatizado). El análisis de los datos de citometría de flujo se realizó usando el software FlowJo. Los resultados se proporcionaron en diagramas, y una hoja de cálculo de Excel que contenía el porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada anticuerpo.

5

Tabla 1 - Resultados del análisis por HT-FACS

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
1	BLTR-1		6,7	1,37
2	B2-microglobulina		99,8	100
3	CA9	Anhidrasa carbónica 9	5,22	0
4	CDH3	Cadherina-3 / P-Cadherina	2,93	0,475
5	CDH6	Cadherina-6	0,6	0,235
6	CDH11	Cadherina-11	61,6	0,88
7	CDw93		11,5	4,75
8	CDw198	CCR8	10,6	5,17
9	CDw199	CCR9	17,2	2,54
10	CDw210	Receptor de interleucina 10, subunidad alfa (IL10RA)	10,8	0,622
11	CDw218a	Receptor 1 de interleucina 18 (IL18R1)	0,384	0
12	CDw329	Lectina 9 de tipo Ig de unión a ácido siálico (Siglec 9)	0,182	0
13	CD1a		0,338	0,28
14	CD1b		0,766	0,745
15	CD1c		15,7	0,926
16	CD1d	R3G1	2,7	0
17	CD2	LFA-2	0,292	0,526
18	CD3		0,158	0
19	CD3e		0,087	0
20	CD4		1,11	0,157
21	CD5	Leu-1	0,151	0,34
22	CD6		1,04	2,68
23	CD7	GP40/Leu-9	0,239	0,24
24	CD8		0,214	0
25	CD8b		4,34	0,705
26	CD9	BTCC-1	38,1	51,9
27	CD10	Nepilisinina (NEP)/antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA)	90,6	87,1
28	CD11a	ITGAL, LFA-1	1,57	0
29	CD11b	Integrina alfa M (ITGAM)	6,24	0
30	CD11c	Integrina, alfa X (ITGAX)	1,8	0
31	CD13	Alanina aminopeptidasa (ANPEP)	100	100
32	CD14		8,03	6,25
33	CD15	SSEA-1	0,137	0,474
34	CD16	Receptor Fc	10,1	3,73
35	CD16b	Fragmento Fc de IgG, receptor IIIb de baja afinidad (FCGR3B)	0,331	0
36	CD17	Lactosilceramida (LacCer)	20,9	0,462
37	CD18	Integrina beta-2	0,65	0
38	CD19		0,21	0
39	CD20		0,176	0
40	CD21	Receptor de tipo 2 del complemento (Cr2) / receptor del virus de Epstein-Barr (EBV R)	0,66	0
41	CD22	BL-CAM/Siglec-2	0,596	0
42	CD23	Receptor Fc de inmunoglobulina épsilon de baja afinidad (FCER2)	0,551	0,234
43	CD24		0,987	4

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
44	CD25	Subunidad alfa del receptor de interleucina-2 (IL2RA)	1,44	1,67
45	CD26	Dipeptidil peptidasa IV (DPP4)	21,3	6,33
46	CD27	Miembro 7 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF7)	0,409	0
47	CD28		0,643	0
48	CD29	Integrina beta-1 (ITGB1)	100	100
49	CD30	Miembro 8 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF8)	0,446	0
50	CD31	PECAM	1,29	0,214
51	CD32	Receptor II-b de la región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad	0,698	3,46
52	CD33	Siglec-3	1,25	0,372
53	CD34		0,287	0,885
54	CD35	Receptor de tipo 1 de complemento (Cr1)	0,134	0
55	CD36	Glucoproteína 4 de plaquetas / receptor de trombospondina	0,458	3,57
56	CD37	Tetraspanina-26 (TSPAN26)	0,0917	0,182
57	CD38	ADP-ribosil ciclasa 1	0,28	0
58	CD39	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa NTPdasa 1	0,126	21,8
59	CD40	Miembro 5 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF5)	0,132	3,12
60	CD41a		0,293	0
61	CD41b		0,075	0
62	CD42a	Glucoproteína IX de plaquetas	0,528	0,131
63	CD42b	Cadena alfa de glucoproteína Ib de plaquetas	7,29	0
64	CD43	Leucosialina	0,406	1,81
65	CD44	Epican	99,9	99,7
66	CD45	Receptor de tipo tirosina-proteína fosfatasa C, antígeno común de leucocitos	0,271	0
67	CD45RA		5,18	2,99
68	CD45RB		0,283	0,671
69	CD45RO		0,57	0
70	CD46	Proteína de cofactor de membrana, antígeno común de leucocitos trofoblastos	78,1	22,5
71	CD47	Proteína determinante de superficie antigénica OA3	92,3	99,9
72	CD48	SLAM F2	0,141	0,125
73	CD49a	Integrina alfa-1 (ITGA1)	24	51,5
74	CD49b	Integrina alfa-2 (ITGA2)	97,7	45,8
75	CD49c	Integrina alfa-3 (ITGA3)	99,9	99,6
76	CD49d	Integrina alfa-4 (ITGA4)	93,7	26
77	CD49e	Integrina alfa-5 (ITGA5)	100	99,8
78	CD49f	Integrina alfa-6 (ITGA6)	93,3	24,1
79	CD50	ICAM-3	0,244	0,8
80	CD51/CD61		92,7	68
81	CD52	Antígeno CAMPATH-1	0,218	0,128
82	CD53		1,66	0,292
83	CD54	ICAM-1	23,1	23,7
84	CD55	Factor que acelera la descomposición del complemento	94,5	52,5
85	CD56	NCAM	3,05	4,71
86	CD57	Miembro 1 de la subfamilia G del receptor de tipo lectina de células citolíticas	0,193	0
87	CD58	LFA-3	99,7	98,1
88	CD59	Protectina	100	100

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
89	CD60b		34	10,9
90	CD61	Integrina beta-3 ITGB3	81,8	56,7
91	CD62E	Ligando de E-Selectin	2,33	1,03
92	CD62L	Ligando de L-Selectin	0,432	0,151
93	CD62P	Ligando de P-Selectin	0,325	0,924
94	CD63	Proteína 3 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-3)	99,1	95,8
95	CD64	Receptor Fc I de inmunoglobulina gamma de alta afinidad (Fc-gamma RI)	0,263	0,225
96	CD65		0,825	0
97	CD65s		7,62	0,539
98	CD66	Beta-1-glucoproteína 1 específica de embarazo PSGB1	0,474	0,737
99	CD66b		0,129	0
100	CD66c	Molécula 6 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario	23,4	7,33
101	CD66d	Molécula 3 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario	2,06	0,322
102	CD66e	Molécula 5 de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario	56,1	13,6
103	CD69	Molécula inductora de activación (AIM)	0,296	0,279
104	CD70	Miembro 7 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF7)	0,36	0,187
105	CD71	Proteína 1 del receptor de transferrina	51	4,71
106	CD72		0,036	0,334
107	CD73	5'-nucleotidasa / SH3/SH4	100	99,8
108	CD74	Cadena gamma de antígeno de histocompatibilidad de HLA clase II	0,177	0,587
109	CD75	Beta-galactósido alfa-2,6-sialiltransferasa 1	0,0789	0,304
110	CD77	Lactosilceramida 4-alfa-galactosiltransferasa	7,15	2,4
111	CD79a	Cadena alfa de proteína asociada al complejo del receptor de antígenos de células B	15,4	0,45
112	CD79b	Cadena beta de proteína asociada al complejo del receptor de antígenos de células B	4,87	0,317
113	CD80	Antígeno B7-1 de activación	2,94	4,57
114	CD81	Tetraspanina-28	100	99,9
115	CD82	Tetraspanina-27	96,3	82,7
116	CD83		27,9	1,34
117	CD84	SLAM F5	7,94	4,1
118	CD85a	Miembro 3 de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LIR-3)	6,76	0,971
119	CD85d	Miembro 2 de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LIR-2)	17	0,98
120	CD85g	Miembro 4 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos	47,2	6,15
121	CD85h	Miembro 2 de la subfamilia A del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LILRA2)	15,6	0
122	CD85j	Miembro 1 de la subfamilia B del receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos (LIR-1)	20,6	0,221
123	CD86		24,7	0,702
124	CD87	Receptor superficial activador de plasminógeno de uroquinasa (uPAR)	0,178	1,61
125	CD88	Receptor 1 quimiotáctico de anafilotoxina C5a	1,32	0,352
126	CD89	Receptor FC de inmunoglobulina alfa	5,73	0,244
127	CD90	Glucoproteína de membrana Thy-1	100	99,3
128	CD91	Proteína 1 relacionada con el receptor de prolipoproteína de baja	95,5	63,4

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
		densidad (LRP-1)		
129	CD92	Proteína 1 de tipo transportador de colina	35,4	33,3
130	CD94	Antígeno CD94 de células citolíticas naturales KLRD1	0,121	0,321
131	CD95	CD95L (ligando) / miembro 6 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF6)	98,9	66,7
132	CD96	Proteína táctil de superficie de células T	21	2,63
133	CD97		1,64	0,434
134	CD98	Subunidad 1 pequeña del transportador de aminoácidos neutro grande	100	99,9
135	CD99	Glucoproteína E2 de superficie de células T	24,8	0,224
136	CD100	Semaforina-4D	0,103	0,132
137	CD101	Miembro 2 de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF2)	0,29	0
138	CD102	ICAM-2	9,24	2,91
139	CD103	Integrina alfa-E (ITGAE)	0,152	0,297
140	CD104	Integrina beta-4 (ITGB4)	4,06	99,3
141	CD105	Endoglina (SH2)	99,9	100
142	CD106	VCAM	6,93	4,64
143	CD107a	Glucoproteína 1 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1)	0,717	0,337
144	CD107b	Glucoproteína 2 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-2)	0,221	0,225
145	CD108	Semaforina-7A	99,7	78
146	CD109		1,89	0,253
147	CD110	Receptor de trombopoyetina (TPO-R)	55,6	16,6
148	CD111	Mediador C de la entrada del virus del herpes	90,7	0
149	CD112	Proteína 2 relacionada con el receptor de poliovirus	12,1	0,64
150	CD114	Receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos (GCSFR/CSF3R)	54,9	4,83
151	CD115	Receptor del factor 1 estimulador de colonias de macrófagos receptor de CSF-1 (CSF-1-R)	8,41	0
152	CD116	Subunidad alfa del receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos GM-CSF-R-alfa	17	2,61
153	CD117	Receptor del factor de crecimiento de mastocitos / células madre Kit (c-kit)	31,5	2,56
154	CD118	Receptor del factor inhibidor de leucemia (LIF-R)	67,4	0
155	CD119	Receptor 1 de interferón gamma (IFNgammaR)	78,5	24,8
156	CD120a	Miembro 1A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1)	38,1	0
157	CD120b	Miembro 1B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR2)	1,11	0,297
158	CD121b	Receptor de tipo 2 de interleucina-1 (IL1R2)	39,8	2,75
159	CD122	Subunidad beta del receptor de interleucina-2 (IL2RB)	41,7	4,56
160	CD 123	Subunidad alfa del receptor de interleucina-3 (IL3RA)	46,9	7,06
161	CD 124	Subunidad alfa del receptor de interleucina-4 (IL4RA)	1,52	0,225
162	CD 125	Subunidad alfa del receptor de interleucina-5 (IL5RA)	19,5	0
163	CD126	Subunidad alfa del receptor de interleucina-6 (IL-6R 1)	7,05	0,709
164	CD127	Subunidad alfa del receptor de interleucina-7 (IL7RA)	18,5	12,5
165	CD129	Receptor de interleucina-9 (IL9R)	0,178	0
166	CD130	Subunidad beta del receptor de interleucina-6 (IL6ST)	83,6	8,15
167	CD131	Subunidad beta del receptor común de citocinas	0,684	0
168	CD132	Subunidad gamma del receptor común de citocinas (IL2RG)	78,8	3,43
169	CD133	AC-133 (Prominina-1)	0,054	0
170	CD134	Miembro 4 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFSF4)	8,15	1,29

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
171	CD135	Receptor de tipo tirosina-proteína quinasa FLT3	5,18	0,575
172	CD136	Receptor de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-R)	0,302	0
173	CD137	Miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF9)	0,392	0
174	CD137L	¿Ratón?	13,5	15,6
175	CD138	Syndecan-1 (SYND1)	0,227	0
176	CD140a	Receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA)	4,1	0,98
177	CD140b	Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRB)	89,1	97,8
178	CD141	Trombomodulina	21	0,385
179	CD142	Factor tisular / tromboplastina	0,478	0,555
180	CD143	Enzima convertidora de angiotensina (ACE)	29,3	0
181	CD144	Cadherina-5	0,0728	0,159
182	CD146	MUC18	94,2	89,5
183	CD147	Basigina	100	100
184	CD148	Receptor de tipo tirosina-proteína fosfatasa eta	84,6	0
185	CD150	Molécula de activación linfocítica de señalización (SLAMF-1)	0,467	0,364
186	CD151	PETA-3	100	99,9
187	CD152	Proteína 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)	6,45	5,87
188	CD153	Miembro 8 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF8)	10,9	1,19
189	CD154	Ligando de CD40	0,357	0,893
190	CD155	Receptor de poliovirus (PVR)	99,8	100
191	CD156b	Disintegrina y proteína 17 que contiene el dominio de metaloproteínasa (ADAM-17)	81	36,4
192	CD157	ADP-ribosil ciclasa 2 / antígeno 1 del estroma de médula ósea (BST-1)	0,713	6,33
193	CD158a	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DL1	0,0919	0,22
194	CD158b	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DL2	0,129	0,195
195	CD158b2	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DL3	2,54	0
196	CD158d	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DL4	56,3	1,56
197	CD158e2	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 3DL1	0,254	0
198	CD158f	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DL5A	25	0
199	CD158i	Receptor de tipo inmunoglobulina de células citolíticas 2DS4	21,9	3,12
200	CD159a	Proteína de membrana integral de tipo II NKG2-A/NKG2-B (KLR-C1)	6,57	0,462
201	CD159c	Proteína de membrana integral de tipo II NKG2-C (KLR-C2)	2,44	0,917
202	CD160		1,07	0,9
203	CD161	Miembro 1 de la subfamilia B del receptor de tipo lectina de células citolíticas (KLRB1)	5,95	3,64
204	CD162	Ligando 1 de glucoproteína P-selectina (PSGL-1)	13,2	4,41
205	CD163	Proteína M130 de tipo 1 rica en cisteína del receptor Scavenger	0,197	0
206	CD164	Proteína 24 del núcleo de sialomucina (MUC-24)	11,9	27
207	CD165		0,716	3,55
208	CD166	Molécula de adhesión celular de leucocitos activados	99,9	99,8
209	CD167	Receptor 2 que contiene el dominio de discoidina (DDR2)	0,496	7,69
210	CD169	Sialoadhesina/Siglec-1	1,76	0,178
211	CD170	Lectina 5 de tipo Ig de unión a ácido siálico (Siglec-5)	11,9	74,3
212	CD171	Molécula L1 de adhesión a células neurales (NCAM-L1)	1,9	0
213	CD172a	Sustrato 1 de tipo tirosina-proteína fosfatasa no receptora (SHP- 1)	61,8	3,33
214	CD172b	Proteína beta-1 reguladora de señales (SIRP-beta-1)	0,0955	0,285
215	CD172g	Proteína gamma reguladora de señales (SIRP-gamma)	14,5	7,14

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
216	CD175s		96,2	27,1
217	CD177	Aloantígeno 2a de neutrófilos humanos (HNA-2a)	0,477	0,46
218	CD178	CD95L (ligando)/miembro 6 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF6)	51,6	0,49
219	CD179a		6,31	1,84
220	CD180		0,824	0,478
221	CD181	CXCR1	85	2,55
222	CD182	CXCR2	68,8	4,31
223	CD183	CXCR3	3,08	0
224	CD184	CXCR4	0,219	0,775
225	CD185	CXCR5	6,04	1,39
226	CD186	CXCR6	1,48	41,5
227	CD191	CCR1	12,6	0
228	CD192	CCR2	0,0662	0,0497
229	CD193	CCR3	51	8,16
230	CD194	CCR4	7,13	0
231	CD195	CCR5	1,02	1,94
232	CD196	CCR6	46,3	2,8
233	CD197	CCR7	0,159	0
234	CD200	Glucoproteína de membrana OX-2 (MOX-1)/(MOX-2)	0,594	0,912
235	CD201	Receptor de proteína C endotelial	55,7	0,858
236	CD202b	Receptor de angiopoyetina-1 TIE2/TEK	82,7	23,2
237	CD203c	Miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP3)	8,66	0
238	CD204	Receptor scavenger de macrófagos de tipos I y II (MSR1)	13,7	1,44
239	CD205	Antígeno 75 de linfocitos (Ly-75)	4,94	0
240	CD206	Receptor 1 de manosa de macrófagos (MMR)	0,205	0
241	CD207	Miembro K de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C (Langerin)	0,0679	2,7
242	CD208	Glucoproteína 3 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-3)	3,27	0
243	CD209		0,153	0
244	CD212	Subunidad beta-1 del receptor de interleucina-12 (IL12RB1)	0,476	0,127
245	CD213a2	Subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL13RA2)	8,7	8
246	CD215	Subunidad alfa del receptor de interleucina-15	14,6	0,86
247	CD217	Receptor A de interleucina-17 (IL17RA)	29,8	35,8
248	CD218b	Proteína accesoria del receptor de interleucina-18 (IL-18 R-beta)	23,4	0,463
249	CD220	Receptor de insulina IR	2,93	1,5
250	CD221	Receptor del factor 1 de crecimiento de tipo insulina IGF-1R	3,16	1,1
251	CD222	Receptor del factor 2 de crecimiento de tipo insulina IGF-2R	8,09	0,768
252	CD223	Proteína del gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3)	38,9	0
253	CD226	Molécula 1 accesoria DNAX (DNAM-1)	1,15	0,22
254	CD227	Mucina-1 (MUC-1)	4,87	5,79
255	CD229	Antígeno de superficie de linfocitos T Ly-9	0,579	5,56
256	CD230	Proteína principal de priones (PrP)	99,9	100
257	CD231	Tetraspanina-7 (TSPAN-7)	34,2	34,8
258	CD234	Receptor de antígeno Duffy/quimiocinas (DARC)	7,7	0,397
259	CD235a	Glucoforina-A	55,8	5,11
260	CD243 (BC)		20,8	2,31
261	CD243 (BD)		0,208	0
262	CD244	Receptor 2B4 de células citolíticas naturales	0,548	0
263	CD245		99,2	13,3
264	CD249	Glutamil aminopeptidasa (EAP)	19,7	0

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
265	CD252	Miembro 4 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF4)	21,4	20,6
266	CD253	Miembro 10 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF10)	44,1	7,07
267	CD254	RANKL, TNFSF11	12,3	3,85
268	CD255		10,1	0,437
269	CD256	Miembro 13 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF13)	7,94	0,792
270	CD257	Miembro 13B de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF13B)	63,2	5,03
271	CD258	Miembro 14 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF14)	3,17	0
272	CD261	Miembro 10A de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10A)	30,3	21,4
273	CD262	Miembro 10B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B)	12,1	4,55
274	CD263	Miembro 10C de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10C)	1,47	0
275	CD264	Miembro 10D de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10D)	44,9	9,09
276	CD267	Miembro 13B de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF13B)	91,8	36,6
277	CD268	Miembro 13C de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral / (BAFF-R)	64,6	13,5
278	CD269	Miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF17)	8,51	2,4
279	CD270	Miembro 14 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	31,6	8,79
280	CD271	Receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR)	1,63	10,4
281	CD272	Atenuador de linfocitos B y T	33,2	12,3
282	CD273	Ligando 2 de muerte celular programada 1	92,4	51,7
283	CD274	Ligando 1 de muerte celular programada 1	23,9	1,12
284	CD275	Ligando de ICOS	26	0,904
285	CD276	4Ig-B7-H3	100	97,8
286	CD277	Miembro A1 de la subfamilia 3 de butirofilina	1,55	0
287	CD278	Coestimulador de células T inducible	0,147	0,0836
288	CD279	Proteína 1 de muerte celular programada	5,5	0,492
289	CD281	Receptor 1 de tipo Toll	54,7	2,12
290	CD282	Receptor 2 de tipo Toll	0,101	0,529
291	CD283	Receptor 3 de tipo Toll	68,9	6,92
292	CD284	Receptor 4 de tipo Toll	7,94	0,84
293	CD286	Receptor 6 de tipo Toll	76,9	11,4
294	CD288	Receptor 8 de tipo Toll	85,6	11,2
295	CD289	Receptor 9 de tipo Toll	11,3	0,359
296	CD290	Receptor 11 de tipo Toll	45,1	9,5
297	CD292	Receptor de tipo 1A de proteína morfogenética ósea	2,39	0,522
298	CD294	Receptor 2 de prostafandina D2	8,81	34,1
299	CD295	Receptor de leptina (Lep-R)	49	73,7
300	CD298	Subunidad beta-3 de ATPasa transportadora de sodio / potasio	99,8	98,9
301	CD299	Miembro M de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C	29,5	1,07
302	CD300a	Molécula 8 de tipo CMRF35 (CLM-8)	1,82	0,222
303	CD300c	Molécula 6 de tipo CMRF35 (CML-6)	37,3	3,76
304	CD300e	Molécula 2 de tipo CMRF35 (CML-2)	38,7	0,697

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
305	CD301	Miembro A de la familia 10 del dominio de lectina de tipo C	3,39	0,626
306	CD303	Miembro C de la familia 4 del dominio de lectina de tipo C	66,8	3,33
307	CD304	Neuropilina-1 (NRP-1)	65,2	0,502
308	CD305	Receptor 1 de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos (LIAR-1)	4,12	0,972
309	CD307		7,08	0,305
310	CD309	VEGFR2 / FLK-1 / KDR	34,4	14,2
311	CD312	Receptor de tipo 2 de hormonas de tipo mucina que contiene módulo de tipo EGF	24,8	12,2
312	CD314	Proteína de membrana integral de tipo II NKG2-D	38,5	11,6
313	CD317	Antígeno 2 del estroma de médula ósea	48,9	25
314	CD318	Proteína 1 que contiene el dominio CUB	71,7	12,3
315	CD319	Miembro 7 de la familia SLAM	27,8	21,9
316	CD321	Molécula A de adhesión de unión (JAM-A)	3,81	5,04
317	CD322	Molécula B de adhesión de unión (JAM-B/2)	4,37	0,248
318	CD324	Cadherina-1	17,2	0,387
319	CD325	Cadherina-2 / N-cadherina	3,83	0,501
320	CD326	Molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM)	18,1	0,463
321	CD328	Siglec-7	32	1,99
322	CD332	FGFR2	0,814	0,181
323	CD333	FGFR3	7,78	1,01
324	CD334	FGFR4	1,35	1,76
325	CD335	NCR1	0,669	0,274
326	CD336	NCR2	0,544	0,212
327	CD337		87,3	26,4
328	CD338	Miembro 2 de la subfamilia G del casete de unión a ATP	49	19,5
329	CD339	Proteína jagged-1	1,76	1,22
330	CD340	Tirosina-proteína quinasa receptora erbB-2	94,9	41
331	CD344	Frizzled 4	65,5	17,5
332	CD349	Frizzled 9	87,6	80,3
333	CD351	FCAMR	76,4	28,1
334	CD352	SLAM-6	0,518	0,394
335	CD354	TREM-1	13,6	1,66
336	CD355	Molécula de células T citotóxicas y reguladoras	10,4	1,24
337	CD357	Miembro 18 de la subfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	10,4	1,95
338	CD358/DR6		45,1	7,63
339	CD360 (BD)		24,9	3,53
340	CD360 (BL)		33	4,5
341	CD362	Syndecan-2	14,7	0,774
342	CD363	Receptor 1 de esfingosina 1-fosfato	18,7	0,757
343	CLA		0,277	9,23
344	CLIP		0,138	0
345	DCIR		0,264	0,15
346	EGF-R		33,3	2,02
347	FMC7		0,0776	0
348	HLA-ABC		99,9	99,8
349	HLA-A2		3,52	20,9
350	HLA-DM		0,172	0,14
351	HLA-DR		0,247	0,481
352	HPC		2,14	6,31
353	ITGB7		0,34	0,159

ES 2 622 397 T3

N.º	Marcador	Nombre alternativo:	% de IMP	% de Lonza® MSC
354	LTBR	Miembro 3 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral	34,5	87,6
355	MIC A/B		97,1	0,328
356	Notch1		20,5	4,01
357	Notch2		95,8	22,8
358	Notch3		5,37	2,15
359	PAC-1		0,137	0,971
360	Podoplanina		8,81	2,91
361	SSEA-3		20,7	0,395
362	SSEA-4		87,4	2,44
363	Stro-1		18,5	6,27
364	TCR alfa beta		0,327	0,195
365	TCR gamma delta		52,9	11,1
366	TPBG		0,197	0,178
367	VB8TCR		25,1	3,93
368	VD2TCR		13,2	12,1
369	fMLP-R		11,4	0,641

Ejemplo 3 - Ensayo Luminex

5 Se usó un ensayo Luminex para cuantificar diferentes citocinas en el medio acondicionado de células Lonza y cultivos de células IMP. Los datos se muestran en pg/µg de ARN, esto es para normalizar los datos relevantes a la cantidad de células en cultivo.

Citocina/quimiocina	pg/ug de ARN		Resultado
	MSC	IMP	
IL-6	162,4	596	Aumento
IL-8	6,9	59,8	Aumento
IP-10	1,4	13,7	Aumento
MCP-1	75,8	322,5	Aumento
RANTES	1,07	125,3	Aumento
IL-10	0,8	0,1	Disminución
IL-12 (p70)	41,6	21,9	Disminución

**REIVINDICACIONES**

1. Una célula progenitora inmunomoduladora (IMP), en la que la célula expresa en su superficie niveles detectables de MIC A/B, CD304 (neuropilina 1), CD178 (ligando de FAS), CD289 (receptor 9 de tipo Toll), CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato), CD99, CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), CXCR2 y CD126.
2. Una célula IMP de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
- (a) la célula IMP es capaz de migrar a, adherirse a, proliferar en, tener efectos antiinflamatorios en y/o promover la angiogénesis en un tejido dañado específico en un paciente;
  - (b) la célula IMP es capaz de transmigrar a través del endotelio vascular hasta un tejido dañado específico en un paciente;
  - (c) la célula IMP es capaz de migrar a, adherirse a, proliferar en, tener efectos antiinflamatorios en y/o promover la angiogénesis en tejido cardíaco, óseo, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepático, renal o pulmonar dañado en un paciente; o
  - (d) la célula IMP es capaz de transmigrar a través del endotelio vascular hasta tejido cardíaco, óseo, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepático, renal o pulmonar dañado en un paciente.
3. Una célula IMP de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que:
- (a) la célula IMP es capaz de diferenciarse en una célula mesodérmica *in vitro*;
  - (b) la célula IMP es autóloga o alogénica; y/o
  - (c) la célula IMP se carga o transfecta *in vitro* o *ex vivo* con un agente terapéutico y/o de diagnóstico.
4. Una población de dos o más células IMP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
5. Una población de células progenitoras inmunomoduladoras (IMP), en la que
- (i) al menos el 90 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de MIC A/B,
  - (ii) al menos el 60 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD304 (neuropilina 1),
  - (iii) al menos el 45 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD 178 (ligando de FAS),
  - (iv) al menos el 10 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD289 (receptor 9 de tipo Toll),
  - (v) al menos el 15 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato),
  - (vi) al menos el 20 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD99,
  - (vii) al menos el 80 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD181 (receptor de tipo 1 de quimiocina C-X-C; CXCR1),
  - (viii) al menos el 30 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R),
  - (ix) al menos el 60 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CXCR2 y
  - (x) al menos el 5 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD126.
6. Una población de acuerdo con la reivindicación 5, en la que
- (a)**
- (i) al menos el 97 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de MIC A/B,
  - (ii) al menos el 65 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD304 (neuropilina 1),
  - (iii) al menos el 51 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD178 (ligando de FAS),
  - (iv) al menos el 11 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD289 (receptor 9 de tipo Toll),
  - (v) al menos el 18 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD363 (receptor 1 de esfingosina-1-fosfato),
  - (vi) al menos el 24 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de CD99,
  - (vii) al menos el 85 % de las células de la población expresa niveles detectables de CD181 (CXCR1),
  - (viii) al menos el 33 % de las células de la población expresa niveles detectables de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R),
  - (ix) al menos el 68 % de las células de la población expresa niveles detectables de CXCR2 y
  - (x) al menos el 7 % de las células de la población expresa niveles detectables de CD126;

- 5 (b) al menos el 90 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de, o de todos, CD10, CD111, CD267, CD47, CD273, CD51/CD61, CD49f, CD49d, CD146, CD55, CD340, CD91, Notch2, CD175s, CD82, CD49b, CD95, CD63, CD245, CD58, CD108, B2-microglobulina, CD155, CD298, CD44, CD49c, CD105, CD166, CD230, HLA-ABC, CD13, CD29, CD49e, CD59, CD73, CD81, CD90, CD98, CD147, CD151 y CD276;
- (c) al menos el 80 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de, o de todos, CD156b, CD61, CD202b, CD130, CD148, CD288, CD337, SSEA-4, CD349 y CD140b;
- 10 (d) al menos el 70 % de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de, o de todos, CD318, CD351, CD286, CD46, CD119 y CD132;
- 15 (e) el 1 % o menos de las células de la población expresa en sus superficies niveles detectables de uno o más de, o de todos, CD72, CD133, CD192, CD207, CD144, CD41b, FMC7, CD75, CD3e, CD37, CD158a, CD172b, CD282, CD100, CD94, CD39, CD66b, CD158b, CD40, CD35, CD15, PAC-1, CLIP, CD48, CD278, CD5, CD103, CD209, CD3, CD197, HLA-DM, CD20, CD74, CD87, CD129, CDw329, CD57, CD163, TPBG, CD206, CD243 (BD), CD19, CD8, CD52, CD184, CD107b, CD138, CD7, CD50, HLA-DR, CD158e2, CD64, DCIR, CD45, CLA, CD38, CD45RB, CD34, CD101, CD2, CD41a, CD69, CD136, CD62P, TCR alfa beta, CD16b, CD1a, ITGB7, CD154, CD70, CDw218a, CD137, CD43, CD27, CD62L, CD30, CD36, CD150, CD66, CD212, CD177, CD142, CD167, CD352, CD42a, CD336, CD244, CD23, CD45RO, CD229, CD200, CD22, CDH6, CD28, CD18, CD21, CD335, CD131, CD32, CD157, CD165, CD107a, CD1b, CD332, CD180, CD65 y CD24;
- 20 (f) la población tiene las propiedades definidas en la reivindicación 2 o 3; y/o
- (g) la población comprende al menos 5000 células, al menos 50.000 células o al menos 250.000 células.

7. Una composición farmacéutica que comprende (a) una célula IMP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una población de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 y (b) un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable, uno o más liposomas y/o una o más microburbujas.

25 8. Un método de producción de una población de células IMP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende (i) cultivar células mononucleares (MC) durante 15 a 25 días en un medio que comprende lisado de plaquetas, a menos del 20 % de oxígeno (O<sub>2</sub>) y en condiciones que permitan que las células IMP se adhieran para inducir que las MC se diferencien en células IMP y (ii) recoger y cultivar esas células IMP que tienen un patrón de expresión como se define en la reivindicación 1 y producir de ese modo una población de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:

- 35 (a) las MC son células mononucleares de sangre periférica (PBMC); y/o
- (b) las MC se obtienen de un paciente o de un donante alogénico.

40 10. Una población de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en un método de reparación de un tejido dañado en un paciente o de tratamiento de una lesión o una enfermedad cardíaca, ósea, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepática, renal o pulmonar en un paciente.

11. Una población de la reivindicación 10 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que:

- 45 (i) el tejido dañado se obtiene del mesodermo;
- (ii) el tejido dañado es tejido cardíaco, óseo, de cartílago, de tendón, de ligamento, hepático, renal o pulmonar; y/o
- (iii) el tejido dañado está dañado por lesión o por enfermedad; o

50 (i) la lesión o la enfermedad cardíaca se selecciona de infarto de miocardio, hipertrofia del ventrículo izquierdo, hipertrofia del ventrículo derecho, embolia, insuficiencia cardíaca, déficit cardíaco congénito, enfermedad de la válvula cardíaca, arritmia y miocarditis, y/o la población se produce usando MC obtenidas del paciente o de un donante alogénico; o

55 (ii) la lesión o la enfermedad ósea se selecciona de fractura, fractura de Salter-Harris, fractura en tallo verde, espolón óseo, craneosinostosis, síndrome Coffin-Lowry, fibrodisplasia osificante progresiva, displasia fibrosa, enfermedad de Fong (o síndrome de uña-rótula), hipofosfatasa, síndrome de Klippel-Feil, enfermedad ósea metabólica, artrooncodisplasia, osteoartritis, osteítis deformante (o enfermedad de Paget de los huesos), osteítis fibrosa quística (u osteítis fibrosa o enfermedad de Von Recklinghausen de los huesos), osteítis púbrica, osteítis condensante (u osteítis condensans), osteítis condensante ilíaca, osteocondritis desecante, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteopenia, osteopetrosis, osteoporosis, osteonecrosis, hiperostosis porótica, hiperparatiroidismo primario, osteodistrofia renal, cáncer óseo, una lesión ósea asociada con cáncer metastásico, enfermedad de Gorham Stout, hiperparatiroidismo primario, enfermedad periodontal y pérdida aséptica de remplazo de articulaciones, y/o la población se produce usando MC

60 obtenidas del paciente o de un donante alogénico.

65

12. Una población de la reivindicación 10 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que la población se produce usando MC obtenidas del paciente o de un donante alogénico.