

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 043**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2009 PCT/US2009/046800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09152187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2009 E 09763477 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2300599**

54 Título: **Aumento de la eficacia de la terapia celular incluyendo tratamiento con alfa 1-3 fucosiltransferasa**

30 Prioridad:

09.06.2008 US 60084 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2017

73 Titular/es:

**TARGAZYME, INC. (100.0%)
2100 Palomar Airport Rd, Suite 214-19
Carlsbad, CA 92011, US**

72 Inventor/es:

**MILLER, LEN;
KOH, LYNNET y
ICHIM, THOMAS E.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 627 043 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).

Aumento de la eficacia de la terapia celular incluyendo tratamiento con alfa 1-3 fucosiltransferasa

Descripción

5 FONDO

Campo

10 **[0001]** Las presentes realizaciones se refieren en general al campo de la terapia celular. Más específicamente, algunas realizaciones se refieren a métodos para mejorar el proceso natural de migración de células mediante el aumento de características de glicosilación específicas en la superficie de diversos tipos de células. Más concretamente, algunas realizaciones se refieren al tratamiento de células con fucosiltransferasas con el fin de potenciar la interacción entre células madre transmitidas por la sangre, células progenitoras y células endoteliales que facilitan la entrada en nichos y tejidos biológicos donde pueden funcionar en una serie de niveles diferentes para intervención terapéutica y restaurativa.

Descripción de la técnica relacionada

20 **[0002]** La terapia celular ofrece inmensas posibilidades para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones médicas. Actualmente, la terapia celular se practica en numerosas realizaciones, por ejemplo, trasplante de médula ósea para el tratamiento de neoplasias malignas hematopoyéticas y no hematopoyéticas. El establecimiento exitoso de procedimientos para el trasplante de células donantes en receptores cuya función es maligna (leucemia) o alterada (accidente cerebrovascular, isquemia de extremidades, etc.) o insuficiente (debido a quimioterapia, radioterapia o anomalía congénita) constituye un importante avance médico en el tratamiento terapéutico de estas afecciones.

30 **[0003]** Un factor de cualquier terapia celular limitante es la necesidad de células transmitidas por la sangre o directamente inyectadas a migrar a los tejidos objetivo con el fin de maximizar su potencial terapéutico. Con respecto a las células madre hematopoyéticas como un ejemplo particular, se sabe que sólo un pequeño porcentaje de estas células cuando se administra sistémicamente al microambiente de la médula ósea. Esta migración está regulada en parte por factores adhesivos presentes en la superficie luminal de células endoteliales que constituyen el revestimiento microvascular de la médula ósea y en parte por gradientes quimiotácticos secretados a una velocidad constante por células estromales de médula ósea. Además, para el tratamiento de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, sólo una pequeña fracción de células madre inyectadas en realidad entran en el área de daño tisular. Por lo tanto, existe la necesidad de administrar un alto número de células madre, a veces prohibitivamente demasiado altas para ser obtenidas en un entorno autólogo e incluso alogénico.

RESUMEN

40 **[0004]** La capacidad de las células tales como leucocitos para interactuar con el endotelio ha sido conocida durante décadas. También se ha sabido que diversos patrones de glicosilación son críticos para que células tales como leucocitos "rueden" sobre el endotelio antes de la extravasación. Lo que es deseable es la identificación de nuevos métodos que mejorar el tráfico de células y el injerto en áreas de necesidad de una manera sencilla y clínicamente aplicable.

50 **[0005]** Por consiguiente, se proporcionan aquí métodos para la mejora de la vivienda y el injerto de células administradas terapéuticamente en un paciente. Debe observarse que el término "paciente" pretende incluir ampliamente cualquier animal. Por ejemplo, el animal puede ser un mamífero, un pájaro, un pez, un reptil, un pez, un insecto o cualquier otro animal. Algunos ejemplos no limitativos de mamíferos pueden incluir humanos y otros primates, equinos tales como caballos, bovinos tales como vacas, ratones, ratas, conejos, cobayas, cerdos y similares. También es digno de mención que las composiciones y métodos se pueden utilizar con o aplicarse a las células individuales (por ejemplo *ex vivo* de tratamiento o modificación), para células de insectos, etc. También se proporcionan células que han sido modificadas para mejorar el guiado y el injerto. Las realizaciones proporcionadas en la presente memoria se basan en parte en el hallazgo sorprendente de que mediante la modificación de moléculas implicadas en la interacción de célula-endotelio, es posible mejorar el guiado y la subsiguiente eficacia de la terapia celular.

60 **[0006]** Una realización proporciona un método para mejorar el guiado y el injerto de una célula administrada terapéuticamente en un paciente en necesidad de tratamiento con una población de células; proporcionar células que pueden haber estado en contacto con un agente que modifica al menos una molécula superficial en las células, dando como resultado una población de células modificadas; y proporcionar o administrar la población de células modificadas a un paciente que la necesita. En ciertos aspectos, la molécula de la superficie celular puede modificarse para dar como resultado una alteración de la carga celular.

65 **[0007]** En una realización, un método para mejorar el guiado y el injerto de una célula, puede comprender la

proporción de una o más células seleccionadas a partir de células madre, células progenitoras, neutrófilos, macrófagos y células T. Las células madre o progenitoras pueden ser células madre embrionarias, células madre adultas, células madre expandidas, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de líquido amniótico, células madre neuronales, células madre cardiomiocíticas, células madre placentarias, células progenitoras endoteliales, células madre circulantes y células madre de sangre periféricas movilizadas, células madre musculares, células madre germinales, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre de folículos pilosos, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente, células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o transferencia nuclear somática y células madre de población lateral. Una o más células pueden haberse puesto en contacto con un agente que modifica al menos una molécula superficial en la célula que puede dar como resultado una unión mediada por selectina mejorada. Esto puede resultar en una población de células modificadas. Estas células pueden proporcionarse a animales. Tales animales pueden incluir aves, reptiles, peces, insectos y mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, humanos, equinos tales como caballos, bovinos tales como vacas, perros, ratones, ratas, cerdos, cobayas, conejos y similares.

[0008] En ciertos aspectos de las realizaciones anteriores, la molécula de superficie celular se puede modificar por tratamiento con una enzima y el sustrato apropiado en condiciones suficientes para causar una alteración de la carga de la superficie celular. En ciertos aspectos, la enzima puede ser una glicosidasa, glicosiltransferasa, una fucosiltransferasa, una neuraminidasa, una acetilglucosaminiltransferasa, o cualquier glicosiltransferasa capaz de aumentar el número o la afinidad de los componentes de unión a la selectina de superficie celular. En ciertos aspectos, la enzima puede ser 1,3-fucosiltransferasa I alfa, 1,3-fucosiltransferasa III alfa, 1,3-fucosiltransferasa IV alfa, 1,3-fucosiltransferasa V alfa, 1,3-fucosiltransferasa VI alfa, 1,3-fucosiltransferasa VII alfa, o 1,3-fucosiltransferasa IX alfa.

[0009] En otro aspecto de la realización anterior, la célula se puede tratar con un reactivo o reactivos que enlazan una unidad de unión a la superficie celular. La unidad de unión puede consistir en una partícula así como un ligando de azúcares naturales o no naturales que muestran poseer afinidad de unión para receptores presentes en células endotérmicas similares a las observadas con azúcares naturales. La unidad de unión añadida puede incrementar la funcionalización de la célula.

[0010] En ciertos aspectos adicionales de la realización anterior, la célula se puede tratar con una única o una pluralidad de moléculas que tienen la capacidad de causar 1-3 fucosilación alfa de determinantes de glicano. En ciertos aspectos, la molécula puede ser una 1-3-fucosiltransferasa alfa mezclada junto con una concentración de un portador de fucosa en condiciones suficientes para proporcionar una 1-3-fucosilación alfa mejorada de determinantes de glicano. En ciertos aspectos, el portador de fucosa puede ser fucosa de difosfato de guanosina. En ciertos aspectos, la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa VI alfa. En otros aspectos, la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa VII alfa. En otros aspectos, la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa IV alfa.

[0011] En ciertos aspectos de la realización anterior, antes de la proporción o administración, la población de células modificadas ha sido contactada aún más durante un período de tiempo suficiente para la división celular que se produzca con un inhibidor de peptidasa CD26 en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de peptidasa CD26 y eficaz para aumentar la respuesta migratoria a CXCL12. El N° de Solicitud PCT PCT/US2009 /, presentada el 9 de junio de 2009, titulada METHODS FOR ENHANCING CELL THERAPY EFFICACY INCLUDING TREATMENT WITH CD26 PEPTIDASE INHIBITORS, divulga y describe métodos y composiciones, cualquiera de las cuales puede usarse con la tecnología de esta solicitud en cualquier combinación.

[0012] En ciertos aspectos, antes de proporcionar células modificadas, un destinatario puede ser contactado por un período de tiempo y con una dosificación suficiente de un inhibidor de peptidasa CD26 en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de peptidasa de receptor CD26 eficaz para aumentar la respuesta migratoria de células donante a agentes quimiotractantes tales como el factor derivado de células estromales.

[0013] En ciertos aspectos, la población de células puede comprender o consistir esencialmente de una población de células madre, tanto embrionarias y poblaciones de células expandidas y adultas. En ciertos aspectos, las células madre pueden ser células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de fluido amniótico, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neuronales, células madre cardiomiocíticas, células madre progenitoras endoteliales inmovilizadas, células progenitoras endoteliales, células madre derivadas de monocitos, células madre musculares, células madre germinales, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre de folículos pilosos, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente, células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o transferencia nuclear somática y células madre de población lateral. En ciertos aspectos, las células madre embrionarias pueden ser totipotentes. En ciertos aspectos, la célula madre puede ser células madre hematopoyéticas, mesenquimales, neurales o cardiomiocíticas. En ciertos aspectos, las células madre hematopoyéticas pueden definirse adicionalmente y diferenciarse como células brillantes CD38, lin o ALDH.

[0014] En ciertos aspectos, la población de células puede comprender o consistir esencialmente de una población de células progenitoras comprometidas o células diferenciadas. En ciertos aspectos, la población celular puede ser una población madura de células sanguíneas. En ciertos aspectos, las células sanguíneas maduras pueden ser neutrófilos, macrófagos, células T, células T activadas, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células T reguladoras o células reprogramadas. En ciertos aspectos, las células T pueden ser de una población heterogénea de células T.

[0015] En ciertos aspectos, el paciente en necesidad de tratamiento con una población de células sufre de un trastorno de la sangre maligna o no maligna, tal como una leucemia aguda, una leucemia crónica, un síndrome mielodisplásico, un trastorno de células madre, un trastorno mieloproliferativo, un trastorno linfoproliferativo, un trastorno de fagocito, un trastorno histiocítico, una enfermedad de almacenamiento lisosomal, un trastorno relacionado con la edad, un vaso sanguíneo o un trastorno cardiovascular, un trastorno de deficiencia enzimática, un trastorno congénito del sistema inmune, una anomalía hereditaria de eritrocitos, una anomalía de plaquetas heredadas, un trastorno de células plasmáticas, un tumor o una enfermedad autoinmune. En ciertos aspectos, el paciente que necesita tratamiento con una población celular puede sufrir de enfermedades arteriales periféricas, lesión isquémica de las extremidades, diabetes, enfermedad cardíaca, enfermedad ósea, enfermedad hepática, distrofia muscular, enfermedad de Alzheimer, ALS, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular o infertilidad.

[0016] En ciertos aspectos, la población de células modificadas puede administrarse por vía intravenosa, intraarterial, por vía intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal, intratecal intracraneal, por vía intravítrea, o directamente en el compartimiento microvascular del hueso o en el fluido espinal. En ciertos aspectos, la población de células modificadas puede administrarse en o proximal a un sitio de lesión. En ciertos aspectos, el guiado y el injerto pueden tener lugar dentro de la médula ósea del paciente que lo necesite.

[0017] En otra realización, una composición puede comprender una población aislada de células modificadas para unión mediada por selectina mejorada. La población aislada de células puede ser neutrófilos, macrófagos, células T, subpoblación de células T o células madre o progenitoras seleccionadas de un grupo que consiste en: células madre embrionarias, células madre adultas, células madre expandidas, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de líquido amniótico, células madre neuronales, células madre de cardiomiocitos, células progenitoras endoteliales, células madre circulantes y movilizadas de sangre periférica, células madre musculares, células madre germinales, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre del folículo, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente o células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o células nucleares somáticas de transferencia nuclear y de células laterales y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0018] En ciertos aspectos, la población aislada puede comprender una modificación de la superficie celular. En ciertos aspectos, la molécula de la superficie celular puede ser modificada por tratamiento con una enzima y un sustrato o sustratos apropiados bajo condiciones suficientes para causar una alteración de la carga de la superficie celular.

[0019] En ciertos aspectos, la enzima se selecciona de un grupo que comprende: una glicosidasa, una glicosiltransferasa, una fucosiltransferasa, una neuraminidasa, y una acetilglucosaminiltransferasa o cualesquiera otras glicosiltransferasas capaces de aumentar componentes de unión de la superficie celular de selectina. En ciertos aspectos, la enzima se selecciona de un grupo que comprende 1,3-fucosiltransferasa I alfa, 1,3-fucosiltransferasa III alfa, 1,3-fucosiltransferasa IV alfa, 1,3-fucosiltransferasa V alfa, 1,3-fucosiltransferasa VI alfa, 1,3-fucosiltransferasa VII alfa y 1,3-fucosiltransferasa IX alfa.

[0020] En ciertos aspectos, la célula se puede tratar con una única o una pluralidad de moléculas que tienen la capacidad de causar 1-3 fucosilación alfa de determinantes de glicano. En ciertos aspectos, la molécula puede ser una 1-3 fucosiltransferasa alfa mezclada junto con una concentración de un portador de fucosa en condiciones suficientes para proporcionar una 1-3 fucosilación alfa mejorada de determinantes de glicano. En ciertos aspectos, el portador de fucosa puede ser fucosa de difosfato de guanosina. En ciertos aspectos, la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa VI alfa. En ciertos aspectos, la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa VII alfa. En ciertos aspectos la 1-3 fucosiltransferasa alfa puede ser 1-3 fucosiltransferasa IV alfa. En ciertos aspectos, la molécula puede ser una enzima no natural que tiene la capacidad de añadir un determinante de glicano o un azúcar no natural que imita la actividad de fucosa u otros azúcares que mejoran el proceso de unión a selectina.

[0021] En ciertos aspectos, la población de células puede comprender o consistir esencialmente de una población de células madre tanto embrionarias como adultas. En ciertos aspectos, las células madre pueden ser células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de fluido amniótico, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neuronales, células madre cardiomiocíticas, células madre derivadas de células madre periféricas movilizadas, células progenitoras endoteliales, células madre derivadas de monocitos, células madre de músculo, células madre germinales, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células

madre de folículos pilosos, células madre derivadas partenogénicas, células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o transferencia nuclear somática y células madre de población lateral. En ciertos aspectos, las células madre embrionarias pueden ser totipotentes. En ciertos aspectos, la célula madre puede ser células madre hematopoyéticas, mesenquimales, neurales o cardiomiocitos.

5 **[0022]** En ciertos aspectos, la célula puede ser una célula de sangre madura. En ciertos aspectos, la célula sanguínea madura puede ser un neutrófilo, un macrófago o una célula T. En ciertos aspectos, las células T pueden ser de una población heterogénea de células T o de una población celular expandida ex vivo.

10 **[0023]** Otra realización proporciona un método para mejorar el guiado y el injerto de una célula, que comprende proporcionar una o más células seleccionadas a partir de células madre, células progenitoras, neutrófilos, macrófagos y células T. Las células madre o progenitoras pueden ser células madre embrionarias, células madre adultas, células madre expandidas, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de líquido amniótico, células madre neuronales, células madre de cardiomiocitos, células progenitoras endoteliales, células madre de sangre periférica circulantes e inmovilizadas, células madre germinales, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre de folículos pilosos, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente, células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o transferencia nuclear somática y las células madre de la población lateral. Una o más células pueden ponerse en contacto con un agente que modifica al menos una molécula superficial en la célula o células para dar lugar a una unión mejorada mediada por selectina, dando como resultado una población de células modificadas.

25 **[0024]** También se proporciona en la presente memoria un método de fucosilación de las células a fin de aumentar la capacidad de las células para el tráfico, el hogar y el injerto en un área de necesidad biológica. Las células pueden ser células maduras completamente diferenciadas, cuyo guiado a dianas específicas se desea, tales como islotes, hepatocitos o neutrófilos o células pueden ser células progenitoras capaces de diferenciarse en células funcionales tales como progenitoras hepáticas, renales, cardíacas o de islotes o, alternativamente, las células pueden ser células madre con capacidad de diferenciación multilineal tales como células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón, células madre placentarias, células madre de médula ósea, células madre de líquido amniótico, células madre neuronales, células madre circulantes y movilizadas de sangre periférica, células madre endoteliales, células madre endoteliales, células madre germinales, células progenitoras endoteliales comprometidas, células progenitoras comprometidas, células madre derivadas de tejido adiposo, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre de folículos pilosos, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente, células madre, químicamente, biológicamente o electrónicamente reprogramadas como células madre pluripotentes inducidas o y transferencia nuclear somática y población lateral de células madre.

35 **[0025]** Otros aspectos se refieren a la mejora de la capacidad de las células para modular el sistema inmune permitiendo que las células funcionen con eficiencia aumentada en el tráfico y el guiado. En otro aspecto, las células útiles para inmunoterapia son "reprogramadas" ex vivo con dotación de propiedades inmunológicas distintas. La modificación de la superficie puede realizarse antes de la reprogramación, durante la reprogramación o después de la reprogramación. La reprogramación puede realizarse para aumentar las propiedades inmunoestimuladoras de las células inmunitarias, o puede realizarse para permitir que las células inmunitarias supriman otras células inmunes. La reprogramación puede realizarse durante la expansión de células, o a células que ya se han expandido.

45 **[0026]** En ciertos aspectos, las células se pueden fucosilar con el fin de mejorar la capacidad de casa. La fucosilación puede realizarse sobre moléculas específicas presentes en las células, o puede realizarse globalmente de una manera no específica. Las células pueden ser fucosiladas a través de cultivo con una enzima tal como una fucosiltransferasa capaz de transferir grupos de fucosa tales como una fucosiltransferasa. En ciertos aspectos, la fucosiltransferasa puede ser una 1,3 fucosiltransferasa alfa. En otro aspecto, la enzima se selecciona de un grupo que comprende 1,3-fucosiltransferasa IX alfa, 1,3-fucosiltransferasa III alfa, 1,3-fucosiltransferasa IV alfa, 1,3-fucosiltransferasa V alfa, 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y 1,3-fucosil-transferasa VII alfa. También se proporcionan condiciones de cultivo y sustratos apropiados dentro del alcance de las realizaciones para permitir que se produzca fucosilación apropiada. Las condiciones pueden incluir la adición de sustratos tales como GDP-fucosa u otros compuestos similares que proporcionan una fuente de fucosa.

55 **[0027]** En ciertos aspectos, las células se pueden tratar con un único o una pluralidad de agentes con el fin de aumentar la expresión de proteínas implicadas en la migración. Dado que las proteínas implicadas en la migración, cuando se expresan de novo, no se fucosilan adecuadamente, la adición de grupos exógenos de fucosa aumenta la capacidad de las proteínas expresadas de novo para interactuar con el endotelio y el hogar adecuadamente. Las moléculas específicas pueden incluir inhibidores de desacetilasa de histona o inhibidores de metiltransferasa de ADN.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 **[0028]** Figura 1 el efecto del pretratamiento de HNSCs con FTVI en el nivel de fucosilación. La expresión de CLA se usó para determinar los niveles de fucosilación. La expresión de CLA por hNSCs se determinó mediante análisis

FACS con células no tratadas (A) o después de la preincubación con la mezcla de fucosilación (GDP-Fucosa, manganeso y medio condicionado FTVI) (B). Se usó IgG igualada con isotipo como control negativo. La intensidad de fluorescencia (FL2) de las muestras fue evaluada por FACScanto. Se muestran los resultados de un experimento.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0029] Algunas realizaciones se refieren en general a composiciones y métodos para la mejora de la vivienda y el injerto de una célula administrada terapéuticamente en un paciente. También, algunas realizaciones se refieren a células que han sido modificadas para mejorar el guiado y el injerto. Las realizaciones proporcionadas en la presente memoria se basan en parte en el hallazgo sorprendente de que mediante la modificación de moléculas implicadas en la interacción célula-endotelio, es posible mejorar el guiado y la subsiguiente eficacia de la terapia celular.

[0030] El proceso por el cual las células salen de la circulación sistémica y entran en nichos biológicamente diferentes es un proceso coordinado complejo que implica numerosas moléculas. El proceso de salida celular es una comunicación bidireccional entre las células del endotelio vascular y el tronco circulante y las células progenitoras. Este proceso se ha caracterizado mejor en la descripción de la salida de leucocitos de la circulación sistémica. Una importante familia de moléculas implicadas críticamente e inicialmente en el proceso del tráfico celular son las selectinas. Estas moléculas son proteínas de transmembrana de tipo 1 que contienen lo que se conoce como dominios de lectina tipo C. Las lectinas son proteínas que se unen a los azúcares. Las lectinas más comúnmente conocidas incluyen conconavalina-A y fitohemaglutinina. Los dominios de lectina de tipo C sobre las selectinas residen en el N-terminal de las selectinas e interactúan con una amplia gama de ligandos de glicoproteína. Puesto que los dominios de lectina se unen a los restos de azúcar, es importante que se coloquen adecuadamente azúcares sobre las proteínas de tal manera que se produzca la interacción de las selectinas. Dado que la colocación de azúcares (glicosilación) suele ocurrir como un evento post-traducciona, la mera manipulación genética de las células no es suficiente por lo general para alterar la capacidad de las células para interactuar con selectinas. La excepción a esto es, por supuesto, la manipulación genética en el sentido de transfectar células con enzimas que están implicadas en la adición de azúcares.

[0031] El presente documento prevé medios de dotar capacidades mejoradas de tráfico/guiado en células para su uso en terapia celular, consistiendo dichos medios en la modificación de varios patrones de glicosilación en las células con el fin de aumentar la capacidad de "rollar", "atarse", y "adherirse" al endotelio. El concepto de rotación de células, fijación y adhesión sobre el endotelio se conoce comúnmente en la técnica y los medios de aumento de este proceso de laminación se han descrito estrictamente en las áreas de células hematopoyéticas, así como células tumorales.

[0032] Estudios previos con células hematopoyéticas han demostrado que es posible alterar los patrones de glicosilación y fucosilación en la superficie de las células mediante el tratamiento de las células con enzimas tales como fucosiltransferasas. Además de establecer la capacidad de modificar la superficie de las células, se han documentado las consecuencias funcionales de esta modificación. Específicamente, varios informes (Xia et al., Blood 2004 104: 3091 - 3096, Hidalgo, et al., J. Clin. Invest. 2002 110: 559-569, demuestran que la fucosilación de las células hematopoyéticas de la sangre del cordón mejora la unión de la selectina P y E, mejora la unión ex vivo a las placas recubiertas con selectina P y E en condiciones fisiológicas de estrés por cizallamiento y mejora el guiado y el injerto en la médula ósea de ratones NOD - SCID. (Véase también la Patente de EE.UU. Nº 7.332.334 y la Publicación de EE.UU. Nº 2006/0228340 de Xia y McEver). Estos hallazgos en las células hematopoyéticas han sido descritas por otros, incluyendo Sackstein et al. (US 2003/0040607 y US 2008/0044383).

[0033] Sin embargo otro informe demostró que mientras que la adhesión temprana (de minutos a horas después de la inyección iv) de las células hematopoyéticas de sangre de cordón se incrementa después fucosilación ex vivo, no se observó ningún aumento de guiado de médula ósea a las 16 - 24 horas (Hidalgo y Frenette, Blood 2005 105: 567 - 575).

[0034] Se ha sugerido por Sackstein et al. que las células madre mesenquimales, que no expresan ligandos de selectina E, pueden ser glicosiladas enzimáticamente en un esfuerzo para aumentar la migración de estas células a la médula ósea (Sackstein y col., Nature Medicine 2008 14: 181-187).

[0035] Por lo tanto, las realizaciones presentadas en este documento se basan en parte en la novedosa observación de que fucosilación de ligandos aumenta la unión al tejido y se puede utilizar para mejorar la migración de diversos tipos de células, enumerados en el presente documento, a un área de necesidad. Específicamente, algunas realizaciones proporcionadas en la presente memoria se refieren en parte al sorprendente hallazgo de que el aumento del proceso de atadura y laminación a través de diversos medios es útil para mejorar las capacidades funcionales de una amplia variedad de células no hematopoyéticas y células madre. Por consiguiente, los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de una amplia variedad de afecciones médicas que son susceptibles de terapia celular.

65 Métodos Terapéuticos

[0036] De acuerdo con lo anterior, se proporcionan aquí métodos para mejorar el guiado y el injerto de una célula administrada terapéuticamente en un paciente. Específicamente, se proporcionan aquí métodos de modificación de residuos de azúcar, tanto naturales como no naturales, en la superficie de células usadas para terapia celular, de manera que mejoren su interacción con miembros de la familia de selectinas, mejorando así el tráfico de las células administradas sistémicamente a un área de necesidad.

[0037] También se proporcionan células que han sido modificadas para mejorar el guiado y el injerto. Las realizaciones proporcionadas en la presente memoria se basan en parte en el hallazgo sorprendente de que mediante la modificación de moléculas implicadas en la interacción célula-endotelio, es posible mejorar el guiado y la subsiguiente eficacia de la terapia celular.

[0038] Los ejemplos de células incluyen, sin limitarse a los mismos, neutrófilos, macrófagos y células T, en donde las células madre o progenitoras se seleccionan de un grupo que consiste en: células madre embrionarias, células madre adultas, células madre expandidas, células madre de la placenta, células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre de líquido amniótico, células madre neuronales, células madre de cardiomiocitos, células progenitoras endoteliales, células madre circulantes y movilizadas de sangre periférica, células madre musculares, células madre germinales, células madre adiposas derivadas de tejidos, células madre derivadas de dientes exfoliados, células madre de folículos pilosos, células madre dérmicas, células madre derivadas partenogénicamente, células madre reprogramadas tales como células madre pluripotentes inducidas o células nucleares somáticas de transferencia nuclear y células madre de población lateral. En algunos aspectos, uno o más de los tipos de células mencionados pueden excluirse específicamente de los métodos o composiciones descritas en la presente memoria. Como ejemplo, en algunos aspectos se pueden excluir células madre mesenquimales o hematopoyéticas.

[0039] En una realización se proporciona un método para mejorar el guiado y el injerto de una célula administrada terapéuticamente en un paciente que comprende la selección de un paciente en necesidad de tratamiento con una población de células; proporcionar células que han sido puestas en contacto con un agente que modifica al menos una molécula superficial en las células, dando como resultado una población de células modificadas; y proporcionar o administrar la población de células modificadas a un paciente que la necesita. En ciertos aspectos, la molécula de la superficie celular se modifica para dar lugar a una alteración de la carga celular.

Enzimas de modificación

[0040] En ciertos aspectos de las realizaciones anteriores, la molécula de superficie celular se modifica mediante tratamiento con una enzima y el sustrato apropiado en condiciones suficientes para causar una alteración de la carga de la superficie celular. Las enzimas que modifican las moléculas de la superficie celular son conocidas en la técnica. Tales enzimas incluyen un polipéptido de glicosiltransferasa purificado. La glicosiltransferasa incluye, por ejemplo, fucosiltransferasa, galactosiltransferasa, sialiltransferasa y N-acetilglucosaminotransferasa. La fucosiltransferasa puede ser, por ejemplo, una 1,3 fucosiltransferasa alfa tal como una 1,3-fucosiltransferasa I alfa, 1,3-fucosiltransferasa III alfa, 1,3-fucosiltransferasa IV alfa, 1,3-fucosiltransferasa V alfa, 1,3-fucosiltransferasa VI alfa, 1,3-fucosiltransferasa VII alfa y 1,3-fucosiltransferasa IX alfa. Debe observarse que en algunas realizaciones, una o más de las enzimas enumeradas en la presente memoria pueden excluirse específicamente. Por ejemplo, en algunos aspectos, FTVI puede excluirse específicamente de los métodos y composiciones descritas en la presente memoria.

[0041] En ciertos aspectos, la molécula de superficie celular se modifica en presencia de un donante de azúcar adecuado para la glicosiltransferasa específica. Los donantes de azúcar para las glicosiltransferasas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, cuando la glicosiltransferasa es una fucosiltransferasa, el donante es GDP-fucosa. Considerando que, cuando la glicosiltransferasa es una sialiltransferasa, el donante es CMP-ácido siálico. En algunos casos, el azúcar puede ser un azúcar no natural añadido por una glicosiltransferasa natural o modificada.

[0042] Las glicosiltransferasas son biológicamente activas. Por biológicamente activo se entiende que las glicosiltransferasas son capaces de transferir una molécula de azúcar de un donante a un aceptor. Por ejemplo, la glicosiltransferasa es capaz de transferir 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5, 10 o más μ moles de azúcar por minuto a pH 6,5 a 37°C.

[0043] La solución fisiológicamente aceptable es cualquier solución que no causa daño a las células, por ejemplo, la muerte. Por ejemplo, la viabilidad de la célula o partícula celular es al menos del 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más después del tratamiento de acuerdo con los métodos presentados aquí. Las soluciones fisiológicamente aceptables adecuadas incluyen, por ejemplo, la solución de sal equilibrada de Hank (HBSS), el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), un tampón de Good (véase N.E. Good, GD Winget, W. Winter, T. N. Conolly, S. Izawa y RMM Singh, *Biochemistry* 5, 467 (1966), N.E. Good, S. Izawa, *Methods Enzymol.*, 24, 62 (1972) como un tampón HEPES, un tampón de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

[0044] Por lo tanto, en ciertas realizaciones proporcionadas en este documento, las células pueden ser tratadas ex

vivo con un kit que contiene todos o algunos de los agentes, tales como enzimas, tampón, cofactores y el sustrato necesario para alcanzar fucosilación de las glicoproteínas de la superficie celular que median interacciones de adhesivo entre las células circulantes después de la administración iv y las células endoteliales en los sitios de tejido objetivo. En otra realización proporcionada en este documento, las células tales como la sangre del cordón se pueden pretratar con el kit de fucosilación antes de la congelación o el almacenamiento.

[0045] En ciertos aspectos, el syn-anti, y o sustitución - y la orientación del polisacárido se modulan para proporcionar el efecto deseado. Oligosacáridos de la superficie celular están altamente diversificados en sus estructuras y están asociados con una variedad de funciones celulares. En una respuesta inflamatoria, por ejemplo, neutrófilos o leucocitos se unen a los tejidos lesionados donde se produce el proceso de adhesión. Este proceso se ha encontrado que es mediado por el tetrasacárido sialilo Lewis X en neutrófilos o leucocitos y el receptor de ELAM-1 (molécula de adhesión de leucocitos endoteliales 1), una glicoproteína de la familia de las selectinas. Varios análogos y miméticos de sialilo Lewis han sido analizados, en parte, para entender los efectos de syn frente anticónceros de azúcar. Estudios similares han examinado conformeros de fucosilo y galactosilo, diastereómeros, epímeros y análogos quirales para examinar la adhesión y propiedades inhibitoras. Véase Ichikawa Y et al; Mermelada. Chem. Soc. 1992, 114, 9.283-9.298; Nelson, Richard M. et al. J. Clin. Invertir. 1993, 1157-1166; Chun-Cheng Lin et al, J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6.826 a 6.840; Clarke Julia LJ Am. Chem. Soc. 1996, 118, 6.826 a 6.840; Chikara Ohyama, et al, Las pp.1516-1525 No.6 The EMBO Journal Vol.18, 1999; cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

[0046] La introducción de fucosa en glicanos de superficie de las células de interés puede realizarse mediante transferencia enzimática de un sustrato donante utilizando una 1-3-fucosiltransferasa alfa (FT) por un proceso bien conocido para alguien experto en la técnica. Para que se produzca esta transferencia las células a concentraciones variables pueden estar expuestas a un tampón de incubación que contiene un número de ingredientes cada uno de los cuales puede ser optimizado para la transferencia eficiente de la fucosa. La selección de tampón puede venir de un número de memorias intermedias disponibles con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que sirve como el ejemplo primario. El sustrato, guanosina difosfato-fucosa (GDP-fucosa), a 1 mM se puede mezclar con el FT añadió a una actividad suficiente, expresado como unidades/ml, para lograr la transferencia máxima de fucosa a las células de interés. Además, MnCl₂ a una concentración final de 0 - 10 mM se puede añadir, si es necesario, dependiendo de la población de células para acelerar aún más la reacción de transferencia enzimática. La temperatura y tiempo de incubación también se pueden optimizar para la transferencia máxima de fucosa en condiciones prácticas de aplicación con toxicidad mínima para las células de interés pero se realiza generalmente a 37°C durante 40 minutos.

[0047] La confirmación de epítomos fucosilados en las células de interés como medio de confirmación de los niveles máximos de fucosilación puede ser verificada mediante citometría de flujo utilizando agentes y procedimientos bien conocidos por alguien experto en la técnica. Por ejemplo, sialilo LewisX es un epítomo de fucosilación encontrado en selectinas de P y E. Por incubación de las células tratadas con FT con anti-sLeX mAb HECA 452 (IgM), seguido de tratamiento con el fragmento conjugado con FITC a la IgM, los epítomos sLex en la superficie celular puede visualizado utilizarse procedimientos de citometría de flujo estándar.

Tratamiento de combinación con inhibidores de Peptidase CD26

[0048] En ciertos aspectos de la realización anterior, antes de la administración, la población de células modificadas ha sido contactada aún más durante un período de tiempo suficiente para la división celular que se produzca con un inhibidor de peptidasa CD26 en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de peptidasa CD26 y eficaz para aumentar la respuesta migratoria a CXCL12.

[0049] Los métodos ejemplares para el tratamiento de células madre con inhibidores de CD26 (dipeptidilpeptidasa) se describen en Christopherson et al. (Pub. de Estados Unidos N° 2004/0247574, incorporada por referencia en su totalidad). En ciertos aspectos, el inhibidor de CD26 se selecciona del grupo que consiste de Diprotin A (Ile-Pro-Ile), valina-pirrolidida, sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina o cualquier otra clase de compuestos demostrados que presentan una potente inhibición de cualquiera dipeptidilpeptidasa purificada, soluble o de superficie celular (CD26). Solicitud PCT N° PCT/US2009/____, presentada el 9 de junio de 2009, titulada METHODS FOR ENHANCING CELL THERAPY EFFICACY INCLUDING TREATMENT WITH CD26 PEPTIDASE INHIBITORS, da a conocer y describe métodos y composiciones, cualquiera de los cuales pueden ser utilizados con la tecnología de la presente solicitud en cualquier combinación.

[0050] En ciertos aspectos, la población de células se pone en contacto con dicho inhibidor de CD26 durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 12 horas o condiciones adecuadas para la inhibición suficiente de CD26 de la superficie celular que conduce a una respuesta migratoria mejorada para factores quimiotácticos tales como el factor derivado de células del estroma. En ciertos aspectos, la población de células se pone en contacto con dicho inhibidor de CD26 durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 12 horas. En ciertos aspectos, la población de células se pone en contacto con dicho inhibidor de CD26 por menos de 6 horas. En ciertos aspectos, la población de células se pone en contacto con dicho inhibidor de CD26 durante menos de 2 horas. En ciertos aspectos, la población de células se pone en contacto con dicho inhibidor de CD26 por menos de 1 hora.

[0051] En ciertos aspectos, el inhibidor se administra en una concentración de menos de aproximadamente 1 nM, aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 50 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM o aproximadamente 5 mM. En ciertos aspectos, el inhibidor se administra en una concentración de no menos de aproximadamente 5 mM.

[0052] En ciertos aspectos, al menos 1 célula donante es tratada. En realizaciones seleccionadas, al menos 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 células donantes por mL como tratadas.

[0053] En ciertos aspectos el destinatario puede ser tratado con inhibidor CD26 simultáneamente con la inyección de células modificadas de la superficie celular. En ciertos aspectos el destinatario puede ser tratado con inhibidor CD26 antes de la inyección de células modificadas de la superficie celular. En ciertos aspectos el destinatario se trata previamente con dosis únicas o múltiples del inhibidor de CD26, ya sea simultáneamente o anteriormente a la célula de inyección para alcanzar una inhibición sostenida de una o ambas células administradas y la actividad de receptor de CD26 que conduce a un mayor guiado de células administradas.

Poblaciones de célula terapéutica

[0054] Células madre. En ciertos aspectos, la población de células comprende o consiste esencialmente de una población de células madre. En ciertos aspectos, las células madre se seleccionan de un grupo que consiste en: células madre embrionarias, células madre de sangre de cordón, células madre de la placenta, células madre de médula ósea, células madre de líquido amniótico, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, células madre neuronales, células madre de cardiomiocitos, que circula y se inmovilizan las células madre de sangre periférica, células madre mesenquimales, células madre germinales, células madre de tejido derivadas de tejido adiposo, los dientes exfoliados derivados de células madre, células madre del folículo piloso, células madre dérmicas, células madre partenogenéticamente derivados, reprogramadas células madre tales como células madre pluripotentes inducidas o transferencia nuclear somática y células madre de población lateral o células transdiferenciadas. En ciertos aspectos, las células madre embrionarias son totipotentes.

[0055] Tal como se usa en el presente documento, una "célula mesenquimal" significa la formación de una célula de un tejido mesenquimal, tales como osteoblastos, condrocitos, mioblastos, adipocitos, células del estroma, células de tendón, y similares, una célula madre mesenquimal capaz de diferenciarse en estas células, y su célula madre premesenquimal. Las células mesenquimales generadas durante el desarrollo del embrión, células mesenquimales dentro de un cuerpo animal, y las células mesenquimales diferenciadas y generadas a partir de células madre pluripotentes in vitro o in vivo están comprendidas en el término "célula mesenquimal."

[0056] Tal como se usa en el presente documento, una "célula madre mesenquimal" significa una célula mesenquimal que posee la capacidad de diferenciarse en células mesenquimales de uno o más tipos y la capacidad de autorreplicación. La célula madre mesenquimal diferenciada de una célula madre pluripotente in vitro es positiva para PDGFR y negativa para FLK1. Las células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, mioblastos, adipocitos, células del estroma, células de los tendones, y similares, como con células mesodérmicas.

[0057] Tal como se usa en este documento, una "célula madre premesenquimal" significa una célula mesenquimal que posee la capacidad de diferenciarse en células madre mesenquimales de uno o más tipos y la capacidad de autorreplicación. La célula madre premesenquimal diferenciada de una célula madre pluripotente in vitro expresa Sox1, un marcador neuroectodérmico. La célula madre premesenquimal es capaz de diferenciarse en una célula madre mesenquimal que es PDGFR -positiva y FLK1-negativa.

[0058] Tal como se usa en el presente documento, una "célula madre neural" se refiere a una célula multipotente obtenida del sistema nervioso central que puede ser causada para diferenciarse en células que poseen una o más actividades biológicas de un tipo de célula neuronal. Las células madre neurales se diferencian en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos después de la siembra sobre sustratos que estimulan la adherencia y la diferenciación, por ejemplo, orlaminina de poli-L-ornitina. Además, estas células madre del SNC multipotentes proliferan y se expanden en respuesta al factor de crecimiento epidérmico ("EGF") y factor de crecimiento de fibroblastos básico ("bFGF") y se diferencian en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células madre de músculo.

Células progenitoras comprometidas y células diferenciadas.

[0059] En ciertos aspectos, la población de células comprende o consiste esencialmente de una población de células progenitoras comprometidas o células diferenciadas o células transdiferenciadas. En ciertos aspectos, la población de células es una población de células sanguíneas maduras. En ciertos aspectos, la célula de sangre madura se selecciona del grupo que consiste en: neutrófilos, macrófagos y células T. En ciertos aspectos, las células T son de una población heterogénea de células T.

Pacientes que necesitan tratamiento con poblaciones de células modificadas

[0060] En ciertos aspectos, el paciente en necesidad de tratamiento con una población de células sufre de una condición seleccionada del grupo que consiste en: una leucemia aguda, una leucemia crónica, un síndrome mielodisplásico, un trastorno de células madre, un trastorno mieloproliferativo, un trastorno linfoproliferativo, un trastorno de los fagocitos, un trastorno histiocítico, una enfermedad lisosomal de almacenamiento, un trastorno del sistema inmunitario congénito, una anomalía de eritrocitos heredada, una anomalía de plaquetas hereditaria, un trastorno de las células de plasma, un tumor y una enfermedad autoinmune. En ciertos aspectos, el paciente en necesidad de tratamiento con una población de células sufre de una condición seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades arteriales periféricas, lesiones de extremidad isquémica, diabetes, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, enfermedad de los huesos, distrofia muscular, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesión de la médula espinal, apoplejía e infertilidad. Otros ejemplos de las condiciones descritas anteriormente se exponen en la Tabla I a continuación.

Tabla I

<p><u>Leucemias agudas</u> Leucemia aguda bifenotípica Leucemia linfocítica aguda (LLA) Leucemia mielógena aguda (LMA) Leucemia aguda indiferenciada</p>	<p><u>Leucemias crónicas</u> Leucemia linfocítica crónica (LLC) Leucemia mielógena crónica (CML) Leucemia mielógena crónica juvenil (JCML) Leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ)</p>
<p><u>Síndromes mielodisplásicos</u> Amiloidosis Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) Anemia refractaria (RA) Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-T) Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)</p>	<p><u>Trastornos de células madre</u> Anemia aplástica (severa) Congénita citopenia Disqueratosis congénita Anemia de Fanconi Hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH)</p>
<p><u>Trastornos mieloproliferativos</u> Mielofibrosis aguda Metaplasia mioide agnógena (mielofibrosis) Trombocitemia esencial Policitemia vera</p>	<p><u>Trastornos linfoproliferativos</u> Enfermedad de Hodgkin Linfoma no de Hodgkin Leucemia prolinfocítica</p>
<p><u>Trastornos de los fagocitos</u> Síndrome de Chediak-Higashi Enfermedad de granulomatosa crónica Deficiencia de actina de neutrófilos Disgenesias reticulares</p>	<p><u>Trastornos histiocitarios</u> Linfocitosis eritrofagocitaria familiar Hemofagocitosis Histiocitosis-X Histiocitosis de células de Langerhans</p>
<p><u>Enfermedades de almacenamiento lisosomal</u> Adrenoleucodistrofia Manosidosis Alfa Enfermedad de Gaucher Síndrome de Hunter (MPS-II) Síndrome de Hurler (MPS-IH) Enfermedad de Krabbe Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS-VI) Leucodistrofia Metacromática Síndrome de Morquio (MPS-IV)</p>	<p><u>Trastornos del sistema inmunológico congénito (heredados)</u> Ausencia de células T y B SCID Ausencia de células T, células B normales SCID Ataxia-Telangiectasia Síndrome de infocito desnudo Inmunodeficiencia variable común Síndrome de DiGeorge Síndrome de Kostmann Deficiencia de adhesión leucocitaria</p>
<p>Mucopolisacaridosis II (enfermedad de células I) Mucopolisacaridosis (MPS) Enfermedades de Niemann-Pick Síndrome de Sanfilippo (MPS-III) Síndrome de Scheie (MPS-IS) Síndrome de Sly, Deficiencia de beta-glucuronidasa (MPS-VII) Enfermedad de Wolman</p>	<p>Síndrome de Omenn inmunodeficiencia severa combinada (SCID) SCID de deficiencia de deaminasa de adenosina Síndrome de Wiskott-Aldrich Trastorno linfoproliferativo ligado a X</p>

5	<p><u>Anomalías heredadas de eritrocitos</u> Talasemia mayor beta Anemia Blackfan-Diamond Aplasia de glóbulos rojos puros Enfermedad de células falciformes</p>	<p><u>Otros trastornos hereditarios</u> Hipoplasia de cartílago-pelo Lipofuscinosis ceroide Porfiria eritropoyética congénita Trombastenia de Glanzmann Síndrome de Lesch-Nyhan Osteopetrosis Enfermedad de Sandhoff</p>
10	<p><u>Anomalías plaquetarias hereditarias</u> Amegacariocitosis/trombocitopenia congénita</p>	<p><u>Trastornos de células plasmáticas</u> Mieloma múltiple Leucemia de células plasmáticas Macroglobulinemia de Waldenstrom</p>
15	<p><u>Otras malignidades</u> Tumores cerebrales Sarcoma de Ewing Neuroblastoma Cáncer de ovario Carcinoma de células renales Cáncer de pulmón de células pequeñas Cáncer testicular</p>	<p><u>Enfermedades autoinmunes</u> Esclerosis múltiple Artritis reumatoide Lupus Eritematoso Sistémico Diabetes Mellitus Enfermedades inflamatorias del intestino</p>
20	<p><u>Otras aplicaciones</u> Trasplantes de médula ósea Enfermedad cardíaca (infarto de miocardio), ya sea solo o en combinación con agentes potenciadores, tales como eritropoyetina Enfermedad de hígado Distrofia muscular Enfermedad de Alzheimer Enfermedad de Parkinson Lesión de la médula espinal Infarto, ya sea solo o en combinación con agentes potenciadores</p>	
25	<p>tales como eritropoyetina Enfermedad vascular periférica Trauma a la cabeza Poblaciones de células madre y progenitoras expandidas ex vivo e in vivo Aplicación de fertilización in vitro y situaciones de rescate hematopoyéticas mejoradas (quimio intenso/radiación) Células madre y células progenitoras derivadas de diversas fuentes de tejidos Aplicación en seres humanos y animales Regeneración de extremidades, solo o en combinación con agentes de mejora</p>	
30		
35		
40		
45		

50 **[0061]** La terapia celular es también deseable para el tratamiento de enfermedades en las que se solicita el sistema inmune para ser mejorada. Una forma particular de la terapia celular implica la expansión de células T que poseen una especificidad para un antígeno distinto, por ejemplo un antígeno de tumor. En otros tipos de terapia celular, se generan las células T, y se reprograman ex vivo para la capacidad de matar a una pluralidad de células que expresan una pluralidad de marcadores. Los ejemplos de tal terapia celular incluyen la expansión de células T autólogas con IL-2, la estimulación con lisados de células tumorales, y la reintroducción de dichas células en el paciente.

60 **[0062]** Por otra parte, la terapia celular se puede realizar en situaciones donde se desea la supresión de una respuesta inmune. En tales situaciones es deseable la expansión de las células, tales como CD4 + CD25 + células T reguladoras, ya que estas células son capaces de inhibir las respuestas inmunitarias de una manera específica de antígeno. Los métodos para la expansión de estas células son comúnmente conocidas e incluyen el uso de citoquinas tales como TGF-b.

65 **[0063]** Un problema en guiado de médula ósea es que los receptores en las células endoteliales para los ligandos glicosilados de células circulantes se expresan constitutivamente. Estos receptores, tales como selectinas P y E, inducen numerosas actividades después de interactuar con las células, incluyendo la causación de apoptosis o

detención proliferativa (Winkler et al, Blood 2004 103: 1685-1692.). Por consiguiente, la administración de células hematopoyéticas y su posterior guiado a la médula ósea es dependiente en las moléculas que se expresan constitutivamente.

5 **[0064]** Para el propósito de una aplicación más amplia de este enfoque para la medicina regenerativa en la que las células se administran para fines no hematopoyéticos, el tráfico/guiado de las células a la ubicación de orientación es mucho más complejo e implica ligandos que no son constitutivamente expresados, pero expresados como resultado de la inflamación o daño tisular. Por ejemplo, la administración de células madre para el propósito de tratar el infarto de miocardio depende de guiado de estas células a las zonas bañadas en citocina liberada localmente, lo que no sólo induce la expresión de selectina E y selectina P en el endotelio, pero también media quimioatracción al sitio. Esta regulación positiva localizada del tejido de los receptores y agentes quimioatrayentes permite guiado de células madre en áreas de lesión.

Rutas de administracion

15 **[0065]** La administración de las células modificadas se lleva a cabo de acuerdo con las prácticas estándar que son conocidas para un experto en la técnica. Varias formas de realización son posibles. Por ejemplo, vías de administración parenteral pueden incluir, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, lecho microvascular de la médula ósea, subcutánea, oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. En ciertos aspectos particulares, la población de células modificadas se administra a partir de una ruta seleccionada de un grupo que consiste en: vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, por vía subcutánea, por vía transdérmica, por vía intratraqueal, intraperitoneal, por vía intravítrea, por medio de inyección directa, en compartimentos de hueso o en la médula fluida. En algunos aspectos las células, composiciones u otros materiales se pueden utilizar con un soporte de andamios. En ciertos aspectos, la población de células modificadas se administra en o proximal a un sitio de la lesión. En ciertos aspectos, el guiado y el injerto se llevan a cabo dentro de la médula ósea del paciente en necesidad del mismo. En ciertos aspectos las células son administradas por múltiples rutas y sitios de forma simultánea o secuencial.

30 **[0066]** En otra realización, los métodos, composiciones, células y otros materiales pueden ser útiles para mejorar las capacidades funcionales en una amplia variedad de no sólo trastornos hematológicos, sino también trastornos no hematológicos. Específicamente, los métodos, composiciones, células y otros materiales pueden ser útiles para el tratamiento de condiciones médicas que son susceptibles a la terapia celular. Más específicamente, los métodos, composiciones, células y otros materiales pueden ser útiles para el tratamiento de leucemias agudas, leucemias crónicas, síndromes mielodisplásicos, trastornos de las células, trastornos mieloproliferativos, trastornos linfoproliferativos, trastornos fagocitos, trastornos histiocíticos, enfermedades de almacenamiento lisosomal madre, trastornos del sistema inmunitario congénito, anomalías de eritrocitos heredadas, otros trastornos hereditarios, anomalías de plaquetas heredadas, trastorno de las células de plasma, diversos tumores malignos, tales como tumores cerebrales o sarcoma de Ewing, enfermedades autoinmunes, y otras aplicaciones tales como trasplantes de médula ósea, diabetes, enfermedad cardíaca, enfermedad hepática, situaciones de rescate hematopoyéticas tras quimio intenso/radiación, isquemia de las extremidades y la regeneración de miembros (incluyendo la regeneración del cartílago, regeneración de la piel, regeneración de los vasos sanguíneos, etc), la regeneración del cartílago, regeneración de la piel, regeneración de los vasos sanguíneos, etc.

45 **[0067]** Por otra parte, aquí se presenta el hallazgo de que la adhesión aumentada general de células que han sido fucosiladas *ex vivo* puede utilizarse para la unión aumentada para las áreas de nicho localizadas en ausencia de gradiente quimiotáctico tal como en el contexto de la inyección en la vena portal o inyección en la arteria pulmonar.

50 **[0068]** Para P-selectina las células de unión de se pueden incubar con anti-CD34+-PE y con P-selectina aislada de plaquetas humanas. La unión de P-selectina se puede detectar con S12 marcado con FITC, un mAb no bloqueante a P-selectina humana. Para E-selectina, las células de unión pueden ser incubadas con E-selectina/IgM después de bloqueo del receptor de Fc. E-selectina se puede detectar con anticuerpos policlonales IgM anti-humanos de cabra marcados con FITC. La visualización de la unión se puede lograr usando análisis FACS. La incubación tanto para P-selectina como E-selectina se puede llevar a cabo a 4°C durante 20 min.

55 **[0069]** Para confirmar una consecuencia funcional de fucosilación después del tratamiento con fucosiltransferasa las células pueden ser examinadas para la adhesión a cualquiera de E-selectina o P-selectina bajo fuerzas de cizallamiento fisiológicas usando una cámara de flujo de sistema de ensayo de rodadura *in vitro*. P-selectina aislada de plaquetas humanas se puede inmovilizar en placas en una cámara de flujo de platos paralelos. Una densidad de sitio de P-selectina de alrededor de 145 sitios/m² se puede utilizar y se mide por la unión de marcado con mAb S12 de anti-P-selectina marcado con 125I. Para E-selectina, E-selectina humana soluble también puede ser inmovilizada en placas en una cámara de flujo de placas paralelas a una densidad de 200 sitios/μm², medida por la unión de mAb ES1 de E-selectina anti-humana marcado con 125I. Células con tratamiento simulado o tratadas con FTVI (en solución salina equilibrada de Hanks y albúmina humana al 0,5%) puede perfundirse a través de placas de P-selectina o E-selectina recubiertas en una tensión de cizallamiento de 1 dina/cm². El número acumulado de células de rodadura se puede medir con la ayuda de un sistema de videomicroscopía acoplado a un sistema de análisis de imagen. La especificidad de la interacción de las células con las placas recubiertas se puede confirmar con la inclusión de inhibidores específicos de la unión y el examen de rodar sobre placas recubiertas solamente con

albúmina de suero humano.

EJEMPLOS

5 EJEMPLO 1

PARÁMETROS PARA ACTIVIDAD MAXIMAL FTVI EN SANGRE DE CORDÓN

10 **[0070]** Fucosilación mediada enzimática (adición de fucosa 1-3 ligada a glicanos de la superficie celular) ha demostrado cambios tanto fenotípicos y funcionales en poblaciones de células MNC y CD34+.

15 **[0071]** Estos estudios *in vitro* están estructurados para examinar los diversos componentes integrales a la fucosilación enzimática mediada por el uso de un procedimiento de preparación de células practicadas habitualmente en la clínica. Una población de células mononucleares de sangre de cordón humano descongelado
20 congelado se lava por un procedimiento que consiste en una dilución 1 a 10 con solución enfriada 10% de dextrano-40/5% de HSA, la colocación de esta solución diluida en una centrífuga pre-enfriada (2- 6°C) durante 5 - 10 min, seguido por centrifugación suave a aproximadamente 550 g durante 20 min. El sobrenadante se desecha mientras que el sedimento se resuspende en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contiene 1% de HSA a una concentración de células diana que van desde $0,5 \times 10^6$ a 1×10^9 por ml. Esta población de células en suspensión
25 en medios de reacción de fucosiltransferasa VI (FTVI) constituye la preparación del núcleo utilizado para examinar una gama de diversos parámetros con el fin de identificar las condiciones óptimas para la actividad máxima de FTVI dentro de esta población celular. Los parámetros examinados son Mn ++ (sobre concentración final que va desde 0,0 a 10 mM), GDP-fucosa (sobre concentración final en el intervalo de 0,3 a 10 mM), tiempo de análisis con diferentes períodos de incubación (que van desde 15 min a 60 min), FTVI (en un intervalo de 20 veces de la
30 concentración de la enzima), la temperatura [10°C, 25°C (considerado como la temperatura ambiente) y 37°C] y la concentración de células (sobre concentración final que varía de $0,5 \times 10^6$ a 1×10^9 por ml). Actividades dentro de estos esfuerzos de optimización incluyen la evaluación de la estabilidad del producto fucosilado con un examen de HECA-452 de unión a los 30, 60, 120, 180 y 240 minutos después de la terminación de la reacción y la evaluación de la extensión de la fucosilación de poblaciones celulares adicionales. Se incuba la preparación de células en la
35 mezcla de reacción durante 30 min (a excepción de tiempo de estudio) con mezclado ocasional suave. Las soluciones se diluyeron luego con HBSS 1% de HSA fría, se filtró a través de un tamiz celular de 70 micras y se sometió a centrifugación refrigerada durante 12 min. Se desecha el sobrenadante, el gránulo se aflojó y se resuspendió, ya sea para inyección o análisis por FACS usando un procedimiento que es familiar para alguien experto en la técnica. Para el análisis FACS, alícuotas de las células, a aproximadamente 5×10^5 , se centrifugan a
40 500 xg durante 13 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha, el gránulo se afloja para la adición de cóctel de mancha de flujo que contiene la mancha apropiada o cóctel de control. La mezcla se almacena en la oscuridad durante 30 - 40 min con mezcla ocasional. Cada tubo se diluye con 3 ml de tampón de lavado de flujo en frío seguido de centrifugación a 500 xg durante 12 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante, el gránulo se afloja con la adición de aproximadamente 200 µl de tampón de flujo en frío o tampón fijo flujo. Las alícuotas de cada muestra son
45 examinadas por FACS para el porcentaje de positivos dobles para CD34+ vs HECA-452 que es la medida de resultado primaria para determinar la expresión máxima de la actividad FTVI en la mezcla de células. También generada como una medida de resultado para la evaluación de la actividad enzimática es la intensidad de fluorescencia media.

45 EJEMPLO 2

INJERTO MEJORADO EN LA MÉDULA ÓSEA UTILIZANDO UN ENFOQUE DE COMBINACIÓN QUE CONSISTE DE FUCOSILACIÓN MÁXIMA DE PREPARACIÓN CELULAR MÁS EXPOSICIÓN A UN INHIBIDOR DE CD26

50 **[0072]** En primer lugar, se realiza fucosilación máxima de células *in vitro*. Para lograr esto, las células mononucleares lavadas (CMN) se resuspenden en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) a una concentración de $0,5 \times 10^6$ - 1×10^9 por ml y después se incubaron con una mezcla de fucosilación que consiste en concentración final de 5 mM GDP-fucosa, 1-3 fucosiltransferasa VI purificada recombinante humana en Unidades predeterminadas por ml (para fucosilación máxima), y 1 - 10 mM $MnCl_2$ en HBSS. Se incuba esta mezcla durante 30
55 min a 37°C o temperatura ambiente en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO_2 . El período de incubación puede tardar más o menos en función de la temperatura de incubación elegida. Tras la finalización de la fucosilación y para lograr la inhibición de CD26 (dipeptidilpeptidasa, DPPIV) como parte del enfoque de combinación, esta preparación de células mononucleares de fucosilados (MNC) se lava primero o directamente se incuba con un inhibidor de DPPIV potente durante 5 - 15 min a temperatura ambiente a una concentración suficiente para lograr la inhibición completa o casi completa de DPPIV. Después de la incubación, la suspensión de células se
60 ajusta por volumen con HBSS u otra solución clínicamente compatible para obtener la concentración adecuada de las células en la preparación para la inyección iv. Como un escenario alternativo para un enfoque de combinación, los pacientes se someten a la administración sistémica del inhibidor de DPP-IV en una dosis suficiente para alcanzar un nivel sostenido en el cuerpo para la inhibición significativa de la médula ósea y la actividad de DPP-IV en plasma circulante. Con posterioridad al tratamiento previo sistémico, MNC expuestos a condiciones de fucosilación máxima se inyectan en el paciente. El inhibidor de DPP-IV se puede añadir simultáneamente con la inyección de la

preparación de células fucosiladas o poco antes. Los pacientes se preparan para este enfoque combinado sometiéndolos a condiciones de mieloablación o incluso mieloablación parcial (mini) antes de la inyección de las células fucosiladas y tratadas con inhibidor. La tasa de recuperación y el grado de quimerismo se evalúa con un examen de muestras de sangre recogidas en serie, además de un examen de las células obtenidas a partir de la médula ósea. Un análisis multilínea de la tasa de recuperación y el grado de injerto y quimerismo se logra usando marcadores de superficie celular específicos para tipos de células además de un examen de las células hematopoyéticas maduras en la corriente sanguínea. Estos marcadores y las células se detectan usando técnicas de preparación y procedimientos de análisis de FACS que son familiares para un experto en la técnica.

10 EJEMPLO 3

FUCOSILACIÓN *EX VIVO* DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

[0073] La introducción de fucosa en glicanos de superficie de las células madre mesenquimales (MSC) se lleva a cabo mediante transferencia enzimática de un sustrato donante utilizando una 1-3-fucosiltransferasa alfa (FT). Para que esta transferencia se produzca, las células a concentraciones variables se exponen a un tampón de incubación que contiene un número de ingredientes cada uno de los cuales ha sido optimizado para la transferencia eficiente de la fucosa, y realizadas en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS). El sustrato, difosfato guanosina-fucosa (GDP-fucosa), a 1 mM se mezcla con el FT añadido a una actividad suficiente, con el fin de lograr la transferencia máxima de fucosa a MSCs. Además, $MnCl_2$ a una concentración final de 0 - se añade 10 mM, según sea necesario, para acelerar aún más la reacción de transferencia enzimática. La incubación se realizó a 37°C durante 40 minutos con toxicidad mínima para las células.

[0074] La confirmación de epítomos fucosilados en las células de interés como medio de confirmación de los niveles máximos de fucosilación se verifica mediante citometría de flujo con el fin de detectar sialilo LewisX (sLeX), un epítomo de fucosilación encontrado tanto en P-selectina como E-selectina. Las células tratadas con FT se incuban con anti-sLeX mAb HECA 452 (IgM), seguido por tratamiento con el fragmento conjugado con FITC a IgM. Por último, los epítomos sLeX en la superficie celular se visualizaron utilizando procedimientos estándar de citometría de flujo.

[0075] Para medir la unión P-selectina, las células se incubaron con anti-CD34+ -PE y con P-selectina aislada de plaquetas humanas. P-selectina se detecta la unión con marcado con FITC S12, un mAb no bloqueante a P-selectina humana. Para medir la unión E-selectina, las células se incuban con E-selectina/IgM después de bloqueo del receptor de Fc. E-selectina se detecta a continuación con anticuerpos policlonales de IgM anti-humanos de cabra marcados con FITC. La visualización de la unión se consigue utilizando el análisis FACS. La incubación tanto para P-selectina como E-selectina se lleva a cabo a 4°C durante 20 min.

[0076] Para confirmar una consecuencia funcional de fucosilación después del tratamiento con FT se examinan las células para la adhesión a cualquiera de E-selectina o P-selectina bajo fuerzas de cizallamiento fisiológico usando sistema de ensayo por rodadura de una cámara de flujo *in vitro*. P-selectina aislada de plaquetas humanas se inmoviliza en placas en una cámara de flujo de placas paralelas. Una densidad de sitio de P-selectina de alrededor de 145 sitios/ μm^2 se utiliza y se mide por la unión de anti-P-selectina mAb S12 marcado con ^{125}I . Para E-selectina, E-selectina humana soluble también se inmoviliza en placas en una cámara de flujo de placas paralelas a una densidad de 200 sitios/ μm^2 como se mide por la unión de E-selectina mAb ES1 anti-humana marcada con ^{125}I . Células de tratamiento simulado o tratadas con FTVI (en solución salina equilibrada de Hanks y 0,5% de albúmina humana) se perfunde sobre placas recubiertas con P-selectina o E-selectina a una tensión de cizallamiento de 1 dina/cm². El número acumulado de células de rodadura se mide con la ayuda de un sistema de videomicroscopía acoplado a un sistema de análisis de imagen. La especificidad de la interacción de las células con las placas recubiertas se confirma a continuación, con la inclusión de inhibidores específicos de la unión y el examen de rodar sobre placas recubiertas solamente con albúmina de suero humano.

EJEMPLO 4

ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE MODIFICADAS A LOS PACIENTES DE TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

[0077] Los pacientes en necesidad de un trasplante de médula ósea son sometidos a cualquiera de condiciones mieloablativas o no mieloablativas. Las células madre obtenidas a partir de uno de un número de diferentes fuentes se incuban *ex vivo* con fucosiltransferasa + GDPfucosa a concentraciones suficientes y por un periodo de tiempo suficiente para resultar en la formación máxima de producto fucosilado, tal como sialilo Lewis X, en la superficie celular. Después del tratamiento, la preparación de células se lava o se inyecta directamente en el paciente. La eficacia de esta aplicación en el paciente se determina con apariencia acelerada con el tiempo de neutrófilos y plaquetas en la corriente de la sangre en comparación con los pacientes inyectados con células madre no tratadas de control.

EJEMPLO 5

MODIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURALES

[0078] Una población de células consiste en células madre neurales se trata con condiciones a fin de dotar a un aumento de ligandos de la superficie de interacción mejorada con endotelio. Las células se modifican con la adición de alfa 1-3 enlazada fucosa a glicanos de superficie celular mediante tratamiento ex vivo de células con la enzima alfa 1-2 fucosiltransferasa VI. Específicamente, las células se tratan con 1 mM GDP fucosa, 20 mU/mL {alfa} 1-3 fucosiltransferasa VI, y 10 mM MnCl₂ en 0,5 ml HBSS que contiene 1% de albúmina de suero humano (HSA) durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ en condiciones que causan la toxicidad mínima para células CD34+ examinada por tinción con yoduro de propidio medida por citometría de flujo. Otras modificaciones de este procedimiento de tratamiento pueden llevarse a cabo sobre la base del conocimiento de un experto en la técnica. Dichas células madre neuronales tratadas se evalúan posteriormente para fucosilación usando la metodología de citometría de flujo. Las células se colocan en hielo durante 5 min seguido de lavado con PBS (1 ml). Para detectar la presencia de nuevas unidades fucosiladas en la célula de la superficie, la preparación de células se trata con el 1^{er} anticuerpo anti-CLA dilución 1: 200 en tampón de bloqueo (400 ul), y después se incubó durante una hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°. Después las células se lavaron tres veces con PBS. Se añade a continuación en tampón de bloqueo (400 ul): El anticuerpo secundario (anti-rata-IgM-PE, 1:200). La preparación se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y después se enjuaga con PBS. El resultado de este tratamiento y el análisis se muestra en la Fig. 1.

EJEMPLO 6

MODIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOMODULADORAS

[0079] Una población de células consiste en células con potencial inmunomodulador son tratadas con ciertas condiciones con el fin de dotar a un aumento de ligandos de la superficie de endotelio. Las células se modifican con fucosa alfa 1-3 enlazada a glicanos de la superficie celular mediante el tratamiento de las células con la enzima alfa 1-2 fucosiltransferasa VI. Específicamente, las células se diluyen a una concentración de 10(7) por ml y se trataron con 1 mM GDP fucosa (EMD Biosciences, San Diego, CA), 20 mU/mL {alpha} 1-3 fucosiltransferasa VI (FTVI; EMD Biosciences), y 10 mM MnCl₂ en 0,5 ml de HBSS que contiene albúmina de suero humano al 1% (HSA) durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ en las condiciones que causan toxicidad mínima para las células CD34+ examinadas por tinción con yoduro de propidio medida por citometría de flujo. Otras modificaciones de este procedimiento de tratamiento pueden llevarse a cabo sobre la base del conocimiento de un experto en la técnica. Dichas células inmunes tratadas se evalúan posteriormente para estado de fucosilación utilizando una metodología de citometría de flujo (evaluación de HECA-453 de unión) o metodología funcional (evaluación de rodadura en el endotelio). Las células son posteriormente administradas a un paciente para la modulación inmune.

EJEMPLO 7

EFICACIA DE AUMENTO DE LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES DESPUÉS DE LA EXPANSIÓN EX VIVO

[0080] Linfocitos infiltrantes de tumores se recogen como se describe por Zhou et al The Journal of Immunology, 2005, 175: 7046-7052. Brevemente, los explantes de fragmentos de tumor pequeño (2 mm³) o 1 x 10⁶ células viables de digestos de tejido tumoral se utilizan para iniciar el cultivo TIL en 2 ml de medio basado en 1.640 de RPMI (Invitrogen Life Technologies) que contiene suero humano al 10% y 6.000 UI/ml de IL-2 (Chiron). Después de 2-4 semanas de cultivo, se obtienen por lo general varios millones de células TIL y se rastrearán por ensayo de secreción de IFN para el reconocimiento de células tumorales. Cultivos antitumorales TIL se expandieron adicionalmente en medio AIM V (Invitrogen Life Technologies) suplementado con células alimentadoras alogénicas irradiadas, anti-CD3 Ab (Ortho Biotech), y 6000 UI/ml de IL-2. Este protocolo de expansión típicamente resultó en expansiones de 1000 veces de las células por el tiempo de administración 14-15 días después de la iniciación de las expansiones. Con posterioridad a las células de expansión se cosechan, se centrifugan, se diluyen hasta una concentración de 10(7) por ml y se trató con 1 mM GDP de fucosa (EMD Biosciences, San Diego, CA), 20 mU/ml alfa 1-3 fucosiltransferasa VI (FTVI; EMD Biosciences), y 10 mM MnCl₂ en 0,5 ml de HBSS que contiene albúmina de suero humano al 1% (HSA) durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ en las condiciones que causan toxicidad mínima para las células como probado por propidio tinción con yoduro de medida por citometría de flujo. Las células se administran sobre una base semanal a una concentración de al menos aproximadamente 1 millón de células, pero en algunas situaciones de hasta 100 millones en un período de 60-120 minutos. Después de 4 ciclos de terapia, se observa regresión del tumor.

[0081] Un experto en la técnica apreciará que estos métodos, composiciones, y las células son y pueden ser adaptadas para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionadas, así como aquellos inherentes a las mismas. Los métodos, procedimientos y dispositivos descritos en este documento son actualmente representativos de las realizaciones preferidas y son ejemplares y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la tecnología. Ejemplos de tales sustituciones son enzimas no naturales y azúcares. Los expertos en la técnica

reconocen que los aspectos y realizaciones expuestas en el presente documento pueden ponerse en práctica por separado el uno del otro o en combinación uno con otro. Por lo tanto, las combinaciones de realizaciones separadas están dentro del alcance de la tecnología como se describe aquí. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la tecnología.

5

[0082] Se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de las realizaciones descritas. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente tecnología se ha descrito específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en este documento pueden empleados por los expertos en la técnica, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de esta tecnología como se define por la divulgación.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 **Reivindicaciones**

1. Células fucosiladas T para su uso en el injerto en un paciente en necesidad del mismo mediante la administración de las células T fucosiladas al paciente, en el que las células T fucosiladas se obtienen por:

- 10 (a) proporcionar células T de una población celular expandida *ex vivo*; y
 (b) modificar dichas células T, poniendo en contacto dichas células T con 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VII alfa para proporcionar las células T fucosiladas.

15 2. Una composición que comprende una población aislada de células T fucosiladas obtenidas por las etapas (a) y (b) de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Las células T fucosiladas para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 2, en las que al menos uno de:

- 20 (a) las células T son, además, en contacto con un portador de fucosa;
 (b) las células T son, además, en contacto con un portador de fucosa, y en las que la 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VI alfa se mezcla junto con dicho portador de fucosa; y
 (c) las células T son, además, en contacto con un portador de fucosa, y en las que dicho portador fucosa es fucosa de guanosina difosfato.

25 4. Un método de mejorar guiado y la capacidad de injerto de células T, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 (a) proporcionar células T de una población celular expandida *ex vivo*; y
 (b) modificar dichas células T, poniendo en contacto dichas células T con la 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VII alfa proporcionan células T fucosiladas.

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además al menos una etapa adicional seleccionada del grupo que consiste en:

- 35 (a) poner en contacto las células T con un vehículo de fucosa, en el que la 1,3-fucosiltransferasa alfa se mezcla con dicho vehículo de fucosa, y en el que dicho vehículo de fucosa es fucosa de guanosina difosfato; y
 (b) combinar dichas células T fucosiladas con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar una composición capaz de administración a través de una ruta seleccionada de un grupo que consiste en: vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal, por vía intravítrea, en compartimentos de hueso, o en el líquido cefalorraquídeo.

45 6. Células progenitoras endoteliales fucosiladas para su uso en el injerto en un paciente en necesidad del mismo mediante la administración de las células progenitoras endoteliales fucosiladas al paciente, en donde las células progenitoras endoteliales fucosiladas se obtienen mediante:

- 50 (a) la proporción de células progenitoras endoteliales de una población celular expandida *ex vivo*; y
 (b) la modificación de dichas células progenitoras endoteliales poniéndose en contacto con dichas células progenitoras endoteliales con 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VI alfa para proporcionar las células progenitoras endoteliales fucosiladas.

7. Una composición que comprende una población aislada de células progenitoras endoteliales fucosiladas obtenidas por las etapas (a) y (b) de la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 8. Las células progenitoras endoteliales fucosiladas para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la composición de la reivindicación 7, en la que al menos una de:

- 60 (a) las células progenitoras endoteliales son, además, en contacto con un vehículo de fucosa;
 (b) las células progenitoras endoteliales son, además, en contacto con un vehículo de fucosa, y en el que la 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VI alfa se mezcla junto con dicho vehículo de fucosa; y
 (c) las células progenitoras endoteliales son, además, en contacto con un vehículo de fucosa, y en el que dicho vehículo de fucosa es fucosa de guanosina difosfato.

65 9. Un método de mejorar la capacidad de guiado y el injerto de las células progenitoras endoteliales, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar células progenitoras endoteliales de una población celular expandida *ex vivo*; y

(b) modificar dichas células progenitoras endoteliales poniendo en contacto dichas células progenitoras endoteliales con 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VI alfa para proporcionar las células progenitoras endoteliales fucosiladas.

5 **10.** El método de la reivindicación 9, que comprende además al menos una etapa adicional seleccionada del grupo que consiste en:

10 (a) poner en contacto las células progenitoras endoteliales con un vehículo de fucosa, en el que la 1,3-fucosiltransferasa VI alfa y/o 1,3-fucosiltransferasa VI alfa se mezcla junto con dicho vehículo de fucosa, y en el que dicho vehículo de fucosa es fucosa de guanosina difosfato; y

(b) combinar dichas células progenitoras endoteliales fucosiladas con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar una composición capaz de administración a través de una ruta seleccionada de un grupo que consiste en: vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratraqueal, intraperitoneal, vía intravítrea, en compartimentos de hueso, o en el fluido espinal.

15

20

25

30

35

40

45

50

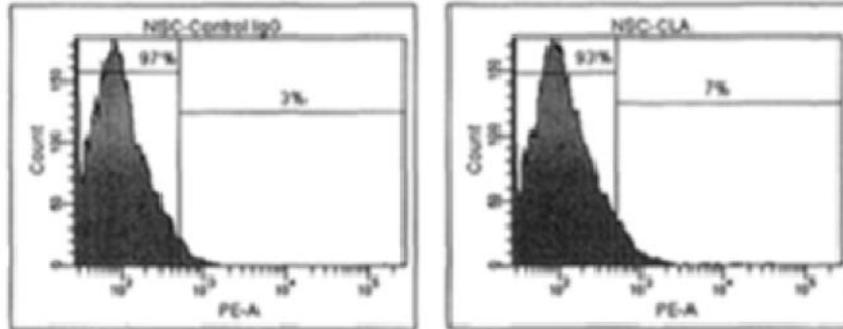
55

60

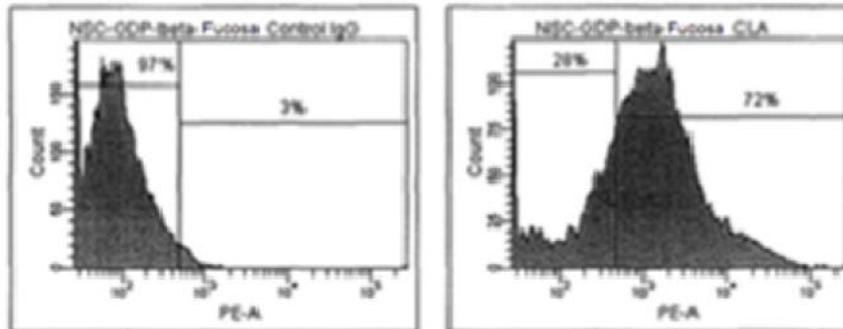
65

FIG 1

A



B



I. EFECTO DE PRETRATAMIENTO DE HNSCS CON FTVI EN EL NIVEL DE FUCOSILACIÓN. LA EXPRESIÓN DE CLA SE UTILIZÓ PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE FUCOSILACIÓN. LA EXPRESIÓN DE CLA POR HNSCS SE DETERMINÓ POR ANÁLISIS DE FACS CON CÉLULAS NO TRATADAS (A) O TRAS PREINCUBACIÓN CON LA MEZCLA DE FUCOSILACIÓN (GDP-FUCOSA, MANGANESO Y MEDIO ACONDICIONADO POR FTVI) (B). IGG DE ISOTIPO AJUSTADO SE UTILIZÓ CON EL CONTROL NEGATIVO. LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA (FL2) DE LAS MUESTRAS SE EVALUÓ POR FACSCANTO. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS DE UN EXPERIMENTO.