

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 362**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2008 PCT/IB2008/003005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09040666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08834068 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2160100**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador**

30 Prioridad:

25.05.2007 US 940349 P
31.05.2007 KR 20070053298

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
(100.0%)
100, Inha-ro, Nam-gu
Incheon 402-752, KR

72 Inventor/es:

LEE, MOON HEE y
KIM, CHUL SOO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 628 362 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

Tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención:**

10 La presente invención se refiere a un agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica. La presente invención también se refiere a un agente terapéutico para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica, que contiene células madre mesenquimatosas como ingrediente activo.

15 **2. Antecedentes generales y estado de la técnica:**

La enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) se refiere a una enfermedad en la que el cuerpo del paciente tiene una reacción inmunitaria contra la sangre periférica del donante o los linfocitos T en la médula ósea que se inyecta durante trasplante homogéneo. Concretamente, es una enfermedad que se induce por linfocitos vivos que se transfundieron, causando una reacción inmunitaria que conduce a problemas en la función hepática, lesiones cutáneas, ictericia, diarrea, fiebre, pancitopenia y similares, y en casos graves muerte del paciente.

25 La enfermedad de injerto contra hospedador puede clasificarse en gran medida en enfermedad de injerto contra hospedador grave (aGVHD) y enfermedad de injerto contra hospedador crónica (cGVHD). La cGVHD es el efecto secundario más principal y común, que se produce en el 20 %-70 % de los pacientes que viven pasados 100 días después de trasplante de sangre y células progenitoras de médula, y una causa principal de muerte después de trasplante. Como cGVHD y aGVHD no son enfermedades sucesivas, aGVHD requiere una estrategia diferente y cGVHD se está convirtiendo en un problema mayor debido a desarrollos en métodos terapéuticos de trasplante de sangre y células progenitoras de médula.

30 La cGVHD en el caso de trasplantes homogéneos, se produce habitualmente 4-6 meses después del trasplante y su aparición en 80 días o después de 1 año es infrecuente. Por consiguiente, puede observarse que una reacción homogénea es un prerrequisito principal para causar cGVHD y la patogénesis de cGVHD llega a través de un largo periodo de incubación o el efecto sobre el órgano diana aparece lentamente. Se están descubriendo diversos problemas en la función de la glándula del timo y se están descubriendo en la cGVHD, y se cree que si no se eliminan las glándulas normales del timo a través del daño causado por el tratamiento previo al trasplante o isoantígeno/autoantígeno a través de mecanismos periféricos, las células T patológicas del injerto aumentan como reacción, y este tipo de células T CD positivas patológicas como una reacción inmunológica Th2 causan deficiencias inmunitarias similares a enfermedades autoinmunitarias incluyendo ataque citolítico, secreción de citoquina de fibrosis inflamada, activación de células B y daño a órganos diana a través de la formación de autoanticuerpos.

40 Los síntomas clínicos de cGVHD incluyen cambios en la piel tales como eritema, sequedad, prurito, cambio de pigmentación y erupciones maculopapulares; cambios en el cabello tales como adelgazamiento del cabello y pérdida del cabello y cambios en la boca tal como encías inflamadas, mucositis y atrofia de los labios. Aparte de las diversas lesiones que aparecen en los ojos, los órganos reproductores, el hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal, la fascia, el sistema esquelético, las membranas serosas y así sucesivamente.

45 Aunque la cGVHD generalmente se define como GVHD que se produce después de 100 días después de trasplante de médula ósea, las afecciones manifestadas son más importantes para el diagnóstico que el periodo de tiempo manifestado. De acuerdo con el periodo de tiempo manifestado de los síntomas, la clasificación puede hacerse entre una aparición progresiva en que aGVHD no se está curando ya que la aparición se desplaza a cGVHD, una aparición quiescente en que cGVHD aparece después de que aGVHD se haya curado completamente, y *de novo* en que se produce sin aparición previa de aGVHD. La morbilidad y tasa de muerte es máxima en la aparición progresiva, a continuación está la aparición quiescente y es mínima en el caso de *de novo*. En cuanto a las afecciones manifestadas, en muchos casos las erupciones con forma liquenosa en la piel y el recubrimiento mucoso de la boca son los primeros síntomas, y aunque pueden aparecer en las mismas partes que en el aGVHD, las lesiones son papulosas, invasivas y cubiertas con escamas blancas. En comparación con aGVHD desde la perspectiva de histología patológica, aunque aún pueden encontrarse grandes cantidades de necrosis de células satélite, la infiltración de linfocitos muestra una banda sobreconsolidada. Aparte de eso, el conducto de la glándula biliar disminuye y puede observarse acumulación de bilis blanca, porque puede haber casos en que puede estar mezclado con grandes cantidades relacionadas con la medicación o hepatitis vírica, puede haber casos en que es difícil diferenciar de cGVHD.

50 En el caso de cGVHD, como las funciones inmunitarias ya están disminuidas, hay temor de infección grave durante el tratamiento, y un nuevo tratamiento eficaz con pocos efectos secundarios por el tratamiento es muy necesario. En relación a esto, muchos investigadores están siendo informados de que se indica que hay capacidad de que las células madre mesenquimatosas se diferencien en muchas células orgánicas y que pueden mejorarse las

reacciones de injerto contra hospedador suprimiendo las células T.

Aunque las células madre mesenquimatosas pueden propagarse en una situación indiferenciada como células primordiales del mesodermo original y separarse de diversos órganos, tales como la médula ósea, tejido adiposo, hígado, tendón, membrana sinovial y cordón umbilical, no existe un único marcador que pueda definir las de forma precisa como células madre mesenquimatosas. Sin embargo, CD14, CD34, y CD45 son bien conocidos como marcadores de médula ósea y SH-2(CD105), SH-3(CD73), SH-4, y Th7-1 son bien conocidos como marcadores para el mesénquima. Las células madre mesenquimatosas o las células estromáticas mesenquimatosas (MSC) expresan el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase 1 y la clase de MHC puede inducir manifestación a través de interferón gamma (IFN- γ), y como no manifiesta moléculas coestimuladoras de tipo FAS o FAS L(CD40), no induce reacciones inmunológicas y está libre de citólisis debido a linfocitos T citotóxicos (CTL) y células citolíticas naturales (NK). Además, aunque las células madre mesenquimatosas suprimen la proliferación de células T a través de la dependencia de densidad en el momento de la reacción mixta de linfocitos (MLR) y suprimen la proliferación de células B, así como la formación de inmunoglobulina, se sabe que la compatibilidad de MHC no es necesaria para la supresión inmunitaria de MSC. Además, se sabe que no hay cambios en la actividad de los cariotipos o telomerasas en MSC cuando se divide 50 veces.

Sin embargo, como la MSC que existe en el organismo es muy poco frecuente, es importante el desarrollo de tecnología que la aisle. Actualmente, la separación por centrifugación en gradiente de densidad, método que usa anticuerpos monoclonales específicos para Sca-1 o STRO-1, y el método de separación de acuerdo con el tamaño celular son métodos conocidos para separar MSC. Los autores del presente documento han desarrollado previamente un método de separación eficaz de MSC (patente pública de la República de Corea n.º 10-0802011) que no requiere un dispositivo mecánico o reactivo particular, y el método anterior se caracteriza por el hecho de que la médula recogida de individuos se cultiva y el líquido superior cultivado se cultiva adicionalmente retirándolo repetidamente a un nuevo recipiente.

Respecto a los métodos de tratamiento de cGVHD, la patente de Estados Unidos n.º 6.544.506 presenta un método de prevención y tratamiento de GVHD que tiene como característica distintiva la eliminación de linfocitos T citotóxicos inyectando linfocitos anticitotóxicos no alorreactivos en pacientes con trasplante de órganos. La patente de Estados Unidos n.º 6.936.281 describe un método de tratamiento de GVHD usando células madre mesenquimatosas. La patente de Estados Unidos n.º 7.173.016 describe un método de tratamiento de GVHD que incluye la etapa de inyectar inhibidores de la adenosina desaminasa. La patente de Estados Unidos n.º 6.328.960 describe un método de tratamiento de GVHD que tiene como característica distintiva la inyección de células madre mesenquimatosas en una cantidad que puede reducir la reacción inmunológica de las células efectoras contra los antígenos en el paciente con trasplante del órgano diana para reducir la reacción inmunológica de las células efectoras contra el aloantígeno en el paciente con trasplante diana. La patente de Estados Unidos n.º 6.368.636 describe un método de reducción de la reacción inmunológica causada por células efectoras, que incluye la etapa de poner en contacto las células efectoras con el líquido superior de las células madre mesenquimatosas en una cantidad de inyección que puede reducir la reacción inmunológica contra el aloantígeno.

Hasta ahora, no hay informes de un caso en que se haya tratado cGVHD satisfactoriamente usando células madre mesenquimatosas o de médula. Por consiguiente, los autores de la presente invención a través del intento de tratar cGVHD, completaron esta invención verificando clínicamente que las células madre mesenquimatosas o de médula que se separaron usando un método de cultivo de subfraccionamiento trata de forma eficaz cGVHD.

Sumario de la invención

Un objetivo de esta invención es proporcionar un agente terapéutico para enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar un tratamiento para la enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica.

Para conseguir los objetivos mencionados anteriormente, esta invención proporciona un agente terapéutico que incluye células madre clonales y homogéneas de médula para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica, donde las células madre clonales y homogéneas de médula se aíslan por el método que comprende: i) permitir que una muestra de células de médula ósea sedimente en un recipiente; ii) transferir el sobrenadante de i) a un nuevo recipiente y cultivar; iii) transferir el sobrenadante de ii) a un nuevo recipiente y cultivar; iv) transferir el sobrenadante de iii) a un nuevo recipiente; v) permitir que las células formen colonias derivadas de células individuales; y vi) aislar una población homogénea de células madre clonales de médula.

La invención proporciona adicionalmente células madre clonales y homogéneas de médula para su uso en el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador, donde las células madre clonales y homogéneas de médula se aíslan por el método que comprende:

- i) permitir que una muestra de células de médula ósea sedimente en un recipiente;
- ii) transferir el sobrenadante de i) a un nuevo recipiente y cultivar;
- iii) transferir el sobrenadante de ii) a un nuevo recipiente y cultivar;
- iv) transferir el sobrenadante de iii) a un nuevo recipiente;
- v) permitir que las células formen colonias derivadas de células individuales; y
- vi) aislar una población homogénea de células madre clonales de médula.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de inhibición de la actividad de las células T de médula donante en un sujeto identificado como que está padeciendo la enfermedad de injerto contra hospedador, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células madre clonales y homogéneas de médula.

Una dosificación de células madre por cada administración puede ser entre 1×10^4 células/kg de peso corporal a 1×10^8 células/kg de peso. Las células madre se aíslan usando un método de cultivo de subfraccionamiento. Las células madre pueden expresar los antígenos de superficie celular CD29, CD44 y CD105, pero no el antígeno de superficie celular HLA-DR. Las células madre puede expresar los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166, pero no los antígenos de superficie celular CD106, CD119 o HLA-DR. Las células madre clonales y homogéneas de médula pueden secretar interleuquina-10 a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de tratamiento de los síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador en un sujeto identificado como que está padeciendo la enfermedad de injerto contra hospedador, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células madre clonales y homogéneas de médula ósea.

El síntoma de la enfermedad de injerto contra hospedador puede ser del tracto gastrointestinal, piel esclerótica, limitación de ingesta oral, sequedad ocular, síntomas hepáticos, disnea o rigidez de los brazos o las piernas. El síntoma gastrointestinal puede ser volumen diario elevado de heces o colon inflamado. El síntoma hepático puede ser nivel elevado de fosfatasa alcalina en el suero sanguíneo.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de inhibición de la actividad de las células T de médula donante en un sujeto identificado como que está padeciendo la enfermedad de injerto contra hospedador, que comprende:

(A) manipular una muestra biológica de células de médula ósea, que comprende:

- (i) permitir que la muestra de células sedimente en un recipiente;
- (ii) transferir el sobrenadante del recipiente a otro recipiente; y
- (iii) aislar las células del sobrenadante, que tiene comparativamente menor densidad en la muestra para obtener una población de células madre clonales y homogéneas de médula; y

(B) administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células madre clonales y homogéneas de médula obtenidas en (A).

En el método anterior, el recipiente puede tratarse con un recubrimiento. El recubrimiento puede ser colágeno, polilisina, fibrinógeno o gelatina.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de tratamiento de los síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador en un sujeto identificado como que está padeciendo la enfermedad de injerto contra hospedador, que comprende:

(A) manipular una muestra biológica de células de médula ósea, que comprende:

- (i) permitir que la muestra de células sedimente en un recipiente;
- (ii) transferir el sobrenadante, del recipiente a otro recipiente; y
- (iii) aislar las células del sobrenadante, que tiene comparativamente menor densidad en la muestra para obtener una población de células madre clonales y homogéneas de médula; y

(B) administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la población de células madre clonales y homogéneas de médula obtenidas en (A).

Una dosificación de las células puede ser entre 1×10^4 células/kg a 1×10^8 células/kg. Las células pueden expresar los antígenos de superficie celular CD29, CD44 y CD105, pero no los antígenos de superficie celular HLA-DR. Las células pueden expresar los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD73 CD90, CD105 y CD166, pero no los antígenos de superficie celular CD106, CD119 o HLA-DR. La población de células puede secretar interleuquina-10 a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml.

Estos y otros objetivos de la invención se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción de la invención, los dibujos mencionados adjuntos a la misma y las reivindicaciones adjuntas a la misma.

Breve descripción de los dibujos

5 La presente invención llegará a entenderse más completamente a partir de la descripción detallada dada en este documento a continuación, y los dibujos adjuntos que se dan a modo de ilustración solamente y, por tanto, no son limitantes de la presente invención, y donde;

10 La figura 1 muestra un diagrama del procedimiento de aislamiento de células madre clonales de médula o células estromáticas mesenquimatosas por el método de cultivo de subfraccionamiento usado en esta invención.

La figura 2 muestra un resultado de fenotipado por FACS de los epítomos de superficie celular sobre células madre clonales de médula aisladas por el método de cultivo de subfraccionamiento y usadas para el tratamiento de un paciente con GVHD.

15 Las figuras 3A-3B muestran gráficos de la cantidad de (A) TGF- β y (B) IL-10 secretadas de las células madre clonales de médula (cMSC-15) usadas en el tratamiento del paciente con GVHD y células madre mesenquimatosas de control aisladas por el método convencional de centrifugación en gradiente de densidad.

La figura 4 muestra un gráfico de los cambios en el volumen de la cantidad diaria de heces y la actividad de fosfatasa alcalina después de la administración de células madre clonales de médula en el paciente con GVHD.

20 Las figuras 5A-5D muestran imágenes de colonoscopia del paciente con GVHD al que se le inyectó células madre clonales de médula. (A) Es una imagen antes del tratamiento, (B) es una imagen tomada 10 días después del tratamiento, (C) es una imagen tomada 1 mes después del tratamiento y (D) es una imagen tomada 3 meses después del tratamiento.

25 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En la presente solicitud, "uno" y "una" se usan para hacer referencia tanto a un objeto individual como a una pluralidad de objetos.

30 Como se usa en este documento, "muestra corporal" se refiere a cualquier muestra obtenida de un mamífero del que se desea aislar un único tipo de célula. Dicha muestra corporal incluye muestra de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, muestra de tejido adiposo y sangre periférica con citoquinas activadas.

35 Como se usa en este documento "células madre clonales de médula" se refiere a células que derivan de una única célula madre. Esta expresión se usa como sinónimo de "célula madre multilinaje", que se obtienen por métodos de cultivo de subfraccionamiento.

40 Como se usa en este documento, una población "homogénea" de células generalmente indica que está presente el mismo tipo de células dentro de la población. Sustancialmente homogénea puede significar aproximadamente un 80 % de homogeneidad o aproximadamente un 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % de homogeneidad. En particular, la homogeneidad de las células se atribuye a la expansión de las células a partir de un único origen celular. Actualmente no hay antígeno específico de MSC disponible y, por lo tanto, no hay anticuerpo específico de MSC disponible. Teóricamente, el único modo de obtener una población homogénea al 100 % de MSC es expandir una única célula que se identifica como MSC posteriormente por caracterización de sus potenciales de diferenciación y proliferación. La "población homogénea de células madre" se refiere a células madre que derivan de una única célula identificada como una célula madre posteriormente por dichos estudios de caracterización.

50 Como se usa en este documento, "célula de densidad inferior" se refiere a células que tienen menor densidad que otras en la muestra, y son el objeto del aislamiento. La célula de densidad inferior incluye, sin limitación, células madre multilinaje, células progenitoras, otras células estromáticas de médula.

55 Como se usa en este documento, "mamífero" con propósitos de análisis de la fuente de las células y tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, ratas, ratones, conejos y así sucesivamente. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Como se usa en este documento "MLSC" se refiere a célula madre multilinaje.

60 Como se usa en este documento "MLSC/PC" se refiere a célula madre multilinaje o célula progenitora.

Como se usa en este documento "MSC" se refiere a células estromáticas de médula o células madre mesenquimatosas o células madre de médula, que son términos que se usan como sinónimos.

65 Como se usa en ese documento, "muestra de células" se refiere a cualquier muestra en que está contenida una mezcla de diferentes tipos de células, incluyendo muestra de médula ósea, sangre periferia, sangre de cordón

umbilical, muestra de tejido adiposo y sangre periférica con citoquinas activadas.

Técnica de cultivo de subfraccionamiento

5 Aunque sin limitarse a ningún método particular de aislamiento de MSC, MLSC o MLSC/PC, un método preferido de obtención de las células para su uso en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador es por un "método de cultivo de subfraccionamiento", que es un método usado para aislar una población altamente homogénea de células madre clonales de médula o células madre multilinaje (MLSC) de una muestra corporal o
10 fuente tal como médula ósea humana. El procedimiento se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US2006/0286669 (n.º de serie 11/471.684, presentada el 19 de junio de 2006), "Isolation of Multi-Lineage Stem Cells", cuyos contenidos se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Las MSC de médula ósea se han conocido por ser difíciles de aislar sin contaminación por células hematopoyéticas. Para su aplicación en entornos clínicos, es importante tener una población homogénea de MSC para evitar
15 problemas inmunogénicos y para evaluar los efectos clínicos correctamente. Convencionalmente, el aislamiento de poblaciones homogéneas de MSC se realizó por purificación en columna con anticuerpos específicos de MSC. Sin embargo, incluso este método no es adecuado y aún no está disponible dicho anticuerpo específico de MSC perfecto.

20 En la práctica del método de cultivo de subfraccionamiento, no es necesario emplear centrifugación de ningún tipo para eliminar previamente cualquier tipo de célula, tal como glóbulos rojos o blancos de la muestra, porque la mayoría de las células más pesadas o más densas puede eliminarse en las dos primeras etapas de incubación de 2 horas. Por tanto, una ventaja del sistema de la invención es que la centrifugación en gradiente de densidad y las etapas de fraccionamiento de células mononucleares usadas, que pueden introducir contaminación tal como Picoll, Ficoll o Ficoll-hypaque en el cultivo celular pueden evitarse. Por consiguiente, el método de cultivo de
25 subfraccionamiento de la invención es un protocolo simple, eficaz y económico para aislar MLSC altamente homogéneas de una muestra corporal, preferiblemente una muestra de médula ósea.

Como alternativa, las células mononucleares aisladas/fraccionadas por el método convencional de centrifugación en gradiente de densidad de aislamiento de MSC, también pueden someterse a la placa D1 para obtener colonias derivadas de células individuales y después para aislar poblaciones homogéneas de células madre o progenitoras (figura 1). Por lo tanto, el método de cultivo de subfraccionamiento puede usarse con las células mononucleares fraccionadas por el método convencional de centrifugación en gradiente de densidad.

35 La presente solicitud describe la diversidad de las características en la expresión de proteínas de superficie celular de las líneas de células madre derivadas de células individuales aisladas, que indica que hay varios tipos diferentes de células madre o progenitoras multilinaje que existen en muestras biológicas y, en particular, muestras de médula ósea, que se ejemplifican. Las MLSC aisladas generalmente eran negativas y débilmente positivas para CD34, HLA-DR, CD31, CD166, HLA de clase 1 y altamente positivas para CD44, CD29, CD105. Sin embargo, algunas líneas celulares de placas D4 y D5 mostraban niveles distintivos de proteínas superficiales, lo que indica que podría haber
40 varios tipos diferentes de células madre o progenitoras multilinaje en la médula ósea (figura 1). Estas MSC que tienen diferentes marcadores superficiales pueden representar diferentes potenciales de diferenciación de las células. Por lo tanto, el aislamiento de células madre homogéneas derivadas de células individuales por el método de cultivo de subfraccionamiento hace posible aislar células madre específicas de tejido o células progenitoras comprometidas, siempre que estos grupos de células existan en la médula ósea u otra muestra corporal específicamente aislada, y las condiciones de cultivo no cambien su potencial durante la expansión celular. La seguridad y eficacia del tratamiento de MSC y el proceso de injerto celular se mejora siendo capaces de caracterizar las subpoblaciones de células con propiedades específicas, como se muestra en la presente solicitud.

50 Eliminando las etapas de centrifugación en gradiente de densidad y de fraccionamiento de células mononucleares y sin requerir el uso de anticuerpos para separar las células madre o enzimas particulares, el método de cultivo de subfraccionamiento genera poblaciones más homogéneas de MSC o MLSC en un procedimiento simple, eficaz y económico y aplicaciones más seguras para entornos terapéuticos.

55 En la realización de la presente invención, preferiblemente y sin limitación, las células madre de médula pueden obtenerse usando el método de cultivo de subfraccionamiento como se describe anteriormente. Además, es preferible que las MSC obtenidas expresen alguno o todos los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD105. También es preferible que no se exprese alguno o todos los antígenos de superficie celular HLA-DR en las MSC. Más preferiblemente, se expresa alguno o todos los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD90, CD105, y
60 CD166 en las MSC, no se expresa alguno o todos los antígenos de superficie celular CD106, CD119, y HLA-DR en las MSC.

Preferiblemente, las MSC usadas en la invención expresan interleuquina-10 (IL-10). Preferiblemente, IL-10 se expresa a más de 5 ng/ml o más de 10 ng/ml después de cultivo en el momento del tratamiento.

65

En un aspecto, la invención se refiere al uso de células obtenidas por el método de cultivo de subfraccionamiento, que incluye: 1) la etapa de obtención de médula ósea de un individuo; 2) la etapa de cultivo de la médula ósea; 3) la etapa de movimiento de solamente el líquido superior de 2) a un nuevo recipiente y cultivo; y 4) la etapa de separación de solamente el líquido superior de 3) y cultivo repetido en un recipiente de cultivo que se ha tratado opcionalmente con recubrimiento.

Respecto al método de cultivo de subfraccionamiento mencionado anteriormente, aunque no está limitado a ninguna cantidad particular de tiempo, el cultivo repetido en la etapa anterior 4) puede realizarse durante aproximadamente 1 a 4 horas a 37 °C y después cultivarse repetidamente durante aproximadamente 2 a 3 veces durante aproximadamente 12 a 36 horas a 37 °C y después cultivarse durante aproximadamente 24 a 72 horas a 37 °C, y para que el líquido superior se mueva a un nuevo recipiente de cultivo cada vez.

En otro aspecto, se usaron placas de cultivo recubiertas con colágeno, gelatina, fibrinógeno o polilisina para obtener células madre más adherentes. El solicitante ha descubierto que cualquier superficie de cultivo cargada, positiva o negativa, ayuda a la adhesión de las células madre a la misma, en comparación con la superficie de una placa sin recubrir. Se adhirieron más células a una placa de cultivo recubierta con colágeno o polilisina que a una placa no recubierta, aproximadamente en casi dos a tres veces respectivamente (datos no mostrados).

Por tanto, en una realización, el fondo de una placa de cultivo puede recubrirse por aminoácidos cargados positivamente, tales como polilisina, poliarginina o aminoácidos cargados negativamente, tales como poliaspartato, poliglutamato o una combinación de los mismos para ayudar a que las células madre o progenitoras se adhieran mejor al fondo la placa.

Es preferible que el recipiente de cultivo se trate con un recubrimiento, y aunque puede usarse cualquier material que pueda mejorar la adhesión de las células al recipiente, es particularmente preferido que se use colágeno, polilisina, fibrinógeno o gelatina. Más preferiblemente, puede usarse colágeno o polilisina. Incluso más preferiblemente, puede usarse colágeno. Además, es deseable que las células se cultiven repetidamente durante aproximadamente 3 a 6 veces en un recipiente de cultivo que se ha tratado con colágeno e incluso es más deseable que las células se cultiven repetidamente aproximadamente 4 a 5 veces.

La preparación farmacéutica del agente terapéutico puede prepararse usando los conocimientos convencionales en la industria. Por ejemplo, puede usarse en una forma no oral de solución acuosa o líquida esterilizada farmacéuticamente permisible, así como una inyección suspendida. Por ejemplo, puede considerarse la preparación farmacéutica, combinándola con un vehículo o medio que sea farmacéuticamente permisible, específicamente agua estéril o una solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensiones, tensioactivo, estabilizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante y similares y mezclándola en un formato de capacidad unitaria que esté generalmente aceptado como necesario en una aplicación farmacéutica. Además, los compuestos esterilizados para inyección pueden prescribirse basándose en aplicaciones farmacéuticas conocidas usando líquidos de soporte tales como agua destilada inyectable.

Para soluciones acuosas para inyección que puedan usarse conjuntamente, un ejemplo puede ser solución salina fisiológica, glucosa o soluciones isotónicas incluyendo medicaciones de soporte tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, cloruro de sodio. En cuanto a los agentes de soporte de licuación adecuados un ejemplo puede ser alcohol, específicamente etanol o polialcohol tal como polietilenglicol o un tensioactivo no ionizado tal como polisorbato 80™ o HCO-50.

Como agente oleoso, puede considerarse el aceite de sésamo o el aceite de soja y pueden usarse conjuntamente con un benzoato e bencilo o alcohol bencílico. Además, puede combinarse con un agente tamponante tal como solución tamponante de fosfato, solución tamponante de acetato sódico o solución analgésica tal como novocaína o estabilizante tal como alcohol bencílico, fenol o antioxidante. El líquido de inyección preparado tiene que cargarse en una ampolla adecuada habitualmente aceptada.

Es deseable que la administración al cuerpo del paciente no sea oral y más específicamente, aunque es básico administrarla en vena 1 o 3 veces, se pueda permitir una mayor inyección. Adicionalmente, la longitud de la administración puede ser corta o larga. Más específicamente, puede considerarse el tipo de inyección o el tipo transdérmico. Como un ejemplo de tipo de inyección, aunque puede administrarse a través de inyección intravenosa, es deseable inyección arterial, inyección arterial seleccionable, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección hipodérmica, inyección intracerebral, inyección cerebral o inyección en la médula ósea e inyección intravenosa. En el caso de inyección intravenosa, como los métodos de trasplante que usan transfusión normal de sangre se han hecho posibles, el paciente no requiere cirugía y, además, como la anestesia tópica no es necesaria, la carga es ligera tanto para el paciente como para el médico. Cuando se considere el futuro desarrollo de medicina de urgencia, puede considerarse la administración durante el transporte de urgencia o en el sitio crítico.

Además, esta invención proporciona un método para tratar pacientes con enfermedad de injerto contra hospedador que incluye la etapa de administrar células madre mesenquimatosas o de médula en una dosis eficaz para el tratamiento, al paciente mencionado anteriormente que padece la enfermedad de injerto contra hospedador.

La dosis eficaz por inyección de las células clonales de médula para el tratamiento de GVHD o los síntomas de GVHD en un mamífero y, en particular, un ser humano, puede ser entre 1×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^8 células/kg de peso corporal; entre 1×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^8 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^8 células/kg de peso corporal; entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 1×10^8 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^7 células/kg de peso corporal; entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 1×10^7 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 3×10^6 células/kg de peso corporal; entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 3×10^6 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 2×10^6 células/kg de peso corporal; entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 2×10^6 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^6 células/kg de peso corporal; entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 1×10^6 células/kg de peso corporal; entre 2×10^4 células/kg de peso corporal y 1×10^5 células/kg de peso corporal; o entre $2,5 \times 10^4$ células/kg de peso corporal y 1×10^5 células/kg de peso corporal.

Sin limitarse a ningún método de administración particular, se prefiere un método de administración que no sea oral. Aunque es posible la administración al cuerpo completo o una parte del cuerpo, la administración al cuerpo completo es preferida y es mucho más preferida la inyección intravenosa.

Tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador

Los autores de la presente invención en este documento fueron capaces de mejorar el estado de los pacientes con enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica que eran insensibles al tratamiento administrando células madre mesenquimatosas o de médula separadas usando los métodos (figura 1) descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US2006/0286669, presentada el 19 de junio de 2006, "Isolation of Multi-Lineage Stem Cells", cuyos contenidos se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

Respecto a las manifestaciones o síntomas de GVHD, incluyen piel esclerótica, limitación de ingesta oral, sequedad ocular, síntomas del tracto gastrointestinal (GI) tales como disfagia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea, síntomas hepáticos manifestados por bilirrubina elevada, fosfatasa alcalina elevada y relación de alanina aminotransferasa (ALT)/aspartato aminotransferasa (AST) (AST/ALT) elevada, disnea y/o rigidez de los brazos o las piernas.

Un sujeto puede mostrar múltiples síntomas que dependen del tejido que está afectado por la enfermedad de injerto contra hospedador. Algunos pacientes tienen 4-5 síntomas, otros pueden tener 1-2 síntomas. Por lo tanto, la presente invención se refiere al tratamiento de todos y cada uno de los síntomas asociados con GVHD manifestados en cualquier tejido en el sujeto. Según se tratan las manifestaciones o síntomas, se cree que la propia enfermedad GVHD también se trata de ese modo.

La siguiente descripción proporciona detalles de la aplicación de la tecnología de cultivo de subfraccionamiento y el uso de las células madre clonales y homogéneas de médula obtenidas de ese modo para administrar a un individuo identificado como que padece los síntomas de GVHD. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que las células madre administradas secretan IL-10 en el sujeto. Que contrarresta o inactiva los efectos de la enfermedad de las células T donantes, tratando de ese modo la GVHD y los síntomas de GVHD.

Después de separar las células madre mesenquimatosas o de médula de la madre del paciente anterior que padece la enfermedad de injerto contra hospedador crónica, usando el método de cultivo de subfraccionamiento y estableciéndolas como la línea celular de origen monoclonal, se llamó cMSC-15. Se realizó un análisis de antígenos de superficie celular a través de análisis de células parenquimáticas para determinar si la línea celular anterior era una célula madre mesenquimatosas o de médula real (figura 2). Como resultado, como se demostró que se expresaban los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD90, CD105, y CD166 y no se expresaban los antígenos de superficie celular CD106, CD 119, y HLA-DR, se confirmó que era una célula madre mesenquimatosas o de médula y no una célula madre hematopoyética. La expresión CD133 y STRO-1 era débilmente positiva. Por consiguiente, para verificar más específicamente las características de la línea celular anterior, se verificó el grado de expresión de TGF- β e IL-10 usando el método ELISA (figura 3). En el caso de expresión de TGF- β , no hubo gran diferencia con la célula madre mesenquimatosas obtenida a través del método de centrifugación en gradiente de densidad convencional, que es el control. Sin embargo, IL-10 mostró un aumento en la expresión de al menos 5 veces en comparación con el control.

Por consiguiente, los autores de la presente invención, en este documento, después de cultivar la célula madre mesenquimatosas o de médula establecida anteriormente hasta una cantidad suficiente para el tratamiento, la aplicaron en el tratamiento de un paciente cuya vida estaba en una situación crítica debido a la aparición de enfermedad de injerto contra hospedador crónica. Específicamente, el paciente anterior era una mujer de 18 años de edad que se diagnosticó con leucemia mielógena aguda y después de alcanzar la remisión a través de terapia de inducción, recibió trasplante de médula ósea allogenica. Un mes después de la interrupción de una administración de 6 meses de supresores inmunológicos durante 6 meses, comenzó la enfermedad de injerto contra hospedador crónica y aunque se trató usando ciclosporina A (CsA), micofenolato mofetilo (MMF) y esteroides, el estado del paciente se deterioró debido a rectorragia continuada, bilirrubina aumentada y sequedad de la piel, la boca y los

ojos, y a causa de la activación de citomegalovirus (CMV) debido a los efectos secundarios del tratamiento y el virus BK que se encuentra incluso en la orina y la sangre debido a infección del virus BK, se comenzó un tratamiento usando cidofovir.

5 Los autores de la presente invención en este documento administraron las células madre mesenquimatosas o de médula cultivadas mencionadas anteriormente a través de inyección intravenosa una vez después de recibir un permiso clínico de urgencia de la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea. No se observaron reacciones adversas/negativas durante o después de la administración, y los síntomas del paciente mejoraron lentamente después de la primera administración y se dio una segunda administración después de 3 semanas. Después de ello, los síntomas del paciente mejoraron y el paciente recibió el alta 34 días después de la segunda administración en un estado de haber detenido la ingesta de esteroides y tomando solamente supresores inmunológicos.

15 Para verificar el efecto patológico del tratamiento, los autores de la presente invención en este documento midieron la cantidad de heces y la actividad de fosfatasa alcalina en la sangre, que son indicadores principales de la enfermedad de injerto contra hospedador (figura 4). La cantidad de heces, se había reducido considerablemente y la actividad de la fosfatasa alcalina en la sangre, que es un índice serológico también había caído hasta niveles normales (60-220 ng/ml). Además, se realizó un análisis de colonoscopia para verificar si los síntomas habían mejorado (figura 5). Como puede observarse en la figura 5, con el paso del tiempo después de la administración de las células madre mesenquimatosas o de médula en esta invención, las úlceras habían mejorado mucho a partir de los datos de colonoscopia.

20 Como se observó anteriormente, los autores de la presente invención en este documento verificaron a través de ensayo clínico que las células madre mesenquimatosas o de médula usando el método de cultivo de subfraccionamiento de esta invención son eficaces en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador crónica.

25 La presente invención no debe limitarse en su alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, llegaron a ser evidentes para los expertos en la materia diversas modificaciones de la invención además de las descritas en este documento a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que dichas modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención y no a modo de limitación.

Ejemplos

35 **Ejemplo 1 - Separación de células madre mesenquimatosas o de médula usando el método de cultivo de subfraccionamiento**

Después de aplicar anestesia local a una sección de la pelvis del proveedor de médula (madre del paciente con la enfermedad de injerto contra hospedador crónica diana del tratamiento), se extrajo la médula ósea insertando una 40 aguja de inyección en el hueso ilíaco. Se pusieron 15 ml de DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO-BRL, Life-technologies, MD, EE. UU.) que incluía FBS al 20 % y penicilina/estreptomina al 1 % y 2 ml de la médula extraída del proveedor de médula mencionado anteriormente en un recipiente de cultivo de 100 mm y se cultivaron durante 2 horas en un cultivador celular a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después del cultivo, el recipiente de cultivo se inclinó ligeramente de modo que las células adheridas al fondo no cayeran y se movió la cantidad máxima del líquido de cultivo de la capa superior en el recipiente de cultivo a un nuevo recipiente.

Después de repetir el mismo procedimiento una vez más, el líquido de cultivo que se recogió se movió a un recipiente de cultivo (Becton Dickinson) y se cultivó durante 2 horas a 37 °C. El líquido de cultivo se movió de nuevo a un nuevo recipiente y después de 24 horas se movió a otro nuevo recipiente y después de 24 horas se movió a un nuevo recipiente de nuevo. Finalmente, después de 48 horas, se verificó por simple vista que las células que quedaban después de moverse a un nuevo recipiente estaban adheridas y crecían en el fondo del recipiente de cultivo. Puede deducirse que las células que pueden llegar a esta etapa que ha ido a través de las varias separaciones estratificadas son células que son más pequeñas que las otras células. Una vez que han pasado aproximadamente 3 a 5 horas, las células forman una única colonia. Esta única colonia se trató con tripsina, se separó y se movió a un recipiente de cultivo de 6 pocillos con un número de células de 10² a 6 x 10² por pocillo. Después de cultivar durante 4 a 5 días en un cultivador celular a 37 °C, CO₂ al 5 % cuando había crecido hasta el 80 %, se trató con tripsina al 0,25 %/EDTA 1 mM (GIBCO-BRL) y después de reunirla se movió y se cultivó sucesivamente en un recipiente de cultivo de 75 cm². Las líneas celulares con orígenes monoclonales se adquieren como anteriormente y se llamaron cMSC-15.

60 Como resultado de observar la forma de las células anteriores a través del microscopio, se observó que las células en la fase inicial tenían una forma similar a células fibroblásticas y no se encontraron grandes cambios en la forma hasta el cultivo sucesivo en la fase 5. El tiempo que tardan las células en duplicarse se observó en 24-36 horas, no muy diferente de las células fibroblásticas.

65

Ejemplo 2 - Verificación de las células madre mesenquimatosas o de médula separadas

Ejemplo 2.1 - Análisis de las características de las células madre mesenquimatosas o de médula usando citometría de flujo

5 Para verificar si las células cMSC-15 que se separaron de la médula usando el método del ejemplo 1 anterior eran células madre mesenquimatosas o de médula, se usó citometría de flujo (BD Biosciences) para descubrir si existían antígenos de superficie celular con características de células madre.

10 Las células madre que se cultivaron sucesivamente durante 6 a 7 días en un recipiente de cultivo de 75 cm² se trataron con tripsina al 0,25 % y se reunieron las células. Las células se lavaron 2 veces con PBS 1x/BSA al 0,4 % para eliminar la tripsina, así como los líquidos de cultivo. Las células se recogieron usando separación centrífuga y después de medir la cantidad de células se reunieron 1 x 10⁶ células en un tubo de 1,5 ml y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente usando suero de cabra (Vector). Después de completarse el bloqueo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1x/BSA al 0,4 % y se trataron con anticuerpo adherido a ficoeritrina (PE) anti-CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD119, CD133, CD166, HLA-DR, HLA de clase 1 y STRO-1 (Serotec Ltd, Kidlington, OX, RU) cada una y se hicieron reaccionar durante 40 minutos a 4 °C. Después de que las células se lavaran 2 veces con PBS 1x/BSA al 0,4 %, se suspendieron en 0,5 ml de PBS 1x/BSA al 0,4 %, se cargaron en el citómetro de flujo y se analizaron.

20 CD29, que es un antígeno de integrina específico de células madre mesenquimatosas, así como CD44 y CD105, que son antígenos de receptores de matriz también específicos de células madre mesenquimatosas mostraron una reacción positiva. Los antígenos de superficie celular CD90, CD166, y HLA de clase 1 se expresaban, y no se expresaban los antígenos de superficie celular CD106, CD119, sí como HLA-DR. Aparte de esto, en el caso de CD31, CD133, y STRO-1 un nivel de expresión era débilmente positivo (figura 2). La expresión de dichos antígenos de superficie celular se mantuvo en las células que habían experimentado 6 cultivos sucesivos. Esto indica que en las células separadas, incluso si se cultivan sucesivamente, los antígenos específicos de células madre mesenquimatosas se expresarían de forma continuada.

30 Ejemplo 2.2 - Análisis del estado de secreción de citoquina relacionado con la supresión inmunológica de células madre mesenquimatosas

Los autores de la presente invención en este documento, para descubrir más acerca de las características de las células madre mesenquimatosas aisladas usando el método de cultivo de subfraccionamiento en esta invención, analizaron los niveles de expresión de citoquinas relacionadas con supresión inmunológica.

35 Específicamente, después de cultivar las células madre mesenquimatosas o de médula recogidas del mismo proveedor de médula y separadas usando el método existente de centrifugación en gradiente de densidad (grupo de control) y la cMSC-15 en esta invención separada usando el método mencionado anteriormente descrito en el ejemplo 1, se analizó la cantidad expresada de TGF-β e IL-10 secretadas en el líquido de cultivo usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para un análisis preciso, se cultivaron las dos líneas celulares anteriores usando un lote sin suero, y ambas del ELISA anterior usaron un kit de R&D Systems (EE. UU.) y se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 Como resultado del análisis, aunque TGF-β mostró poca diferencia del grupo de control, en el caso de IL-10, las células cMSC-15 obtenidas usando el método de cultivo de subfraccionamiento mostraron expresión aumentada más de 5 veces en comparación con el grupo de control (figura 3). Esto indica que hay una correlación entre la eficacia del tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador y el nivel de expresión de IL-10 de las células madre mesenquimatosas o de médula.

50 Ejemplo 3 - Aplicación clínica de células madre mesenquimatosas o de médula aisladas

Ejemplo 3.1 - Administración de células madre mesenquimatosas o de médula

55 El paciente era una mujer de 18 años de edad que se diagnosticó con leucemia mielógena aguda y después de alcanzar la remisión a través de terapia de inducción, recibió un trasplante de médula ósea alogénica. Un mes después de la interrupción de una administración de 6 meses de supresores inmunológicos, empezó la enfermedad de injerto contra hospedador crónica y aunque se trató usando ciclosporina A (CsA), micofenolato mofetilo (MMF) y esteroides, el estado del paciente se deterioró debido a rectorragia continuada, bilirrubina aumentada y sequedad de la piel, la boca y los ojos, y a causa de la activación de CMV debido a los efectos secundarios del tratamiento y al virus BK que se encuentra incluso en la orina y la sangre debido a infección del virus BK, se inició un tratamiento usando cidoforvir. Después de recibir un permiso clínico de urgencia de la Administración de Alimentos y Fármacos de Corea, se cultivaron las células madre mesenquimatosas o de médula de la madre del paciente que se aislaron como se describe en el ejemplo 1 en las instalaciones GMP y se administraron al paciente usando inyección intravenosa. No se observaron reacciones adversas/negativas durante o después de la administración y los síntomas del paciente mejoraron lentamente después de la primera administración y una segunda administración en

la misma cantidad que la primera se administró después de 3 semanas. Después de ello, los síntomas del paciente mejoraron considerablemente y el paciente recibió el alta 34 días después de la segunda administración en un estado que había detenido la ingesta de esteroides, quedando solamente la toma de MMF a 1,5 g/día como supresor inmunológico.

5

Ejemplo 3.2 - Cambio en los indicadores de enfermedad después del tratamiento

Para verificar si las células madre mesenquimatosas o de médula aisladas usando el método de cultivo de subfraccionamiento de esta invención es eficaz para el tratamiento, los autores de la presente invención en este documento midieron la cantidad de heces y la actividad de fosfatasa alcalina en la sangre que es un indicador principal (figura 4). La activación de la fosfatasa alcalina en la sangre se consiguió usando un kit comercial (Sigma Chemical Company, EE. UU.).

10

Como resultado, la cantidad de heces que es un indicador principal en la enfermedad de injerto contra hospedador crónica, se redujo considerablemente y la actividad de fosfatasa alcalina en la sangre que es un índice serológico también había caído hasta niveles normales (60-220 ng/ml). Además, se realizó un análisis de colonoscopia para verificar si los síntomas habían mejorado (figura 5). Como resultado, la opinión colonoscópica a los tres meses después de la administración de las células madre mesenquimatosas es que las úlceras han mejorado mucho. Como se ha descrito, los autores de la presente invención en este documento, a través de ensayo clínico, han verificado que las células madre mesenquimatosas o de médula separadas usando el método de cultivo de subfraccionamiento de esta invención son eficaces para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador crónica.

15

20

Esta invención, como se refiere a un agente terapéutico para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador aguda o crónica que incluye células madre mesenquimatosas o de médula como ingrediente activo, el agente terapéutico en esta invención puede tratar de forma eficaz la enfermedad de injerto contra hospedador que ha sido muy difícil de tratar, especialmente la enfermedad de injerto contra hospedador crónica o aguda mortal que se produce frecuentemente como un efecto secundario después de cirugía de trasplante de médula ósea.

25

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar, usando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención específicamente descrita en este documento.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células madre clonales y homogéneas de médula para su uso en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador, en las que las células madre clonales y homogéneas de médula se aíslan por el método que comprende:
- 10 i) permitir que una muestra de células de médula ósea sedimente en un recipiente;
 ii) transferir el sobrenadante de i) a un nuevo recipiente y cultivar;
 iii) transferir el sobrenadante de ii) a un nuevo recipiente y cultivar;
 iv) transferir el sobrenadante de iii) a un nuevo recipiente;
 v) permitir que las células formen colonias derivadas de células individuales; y
 vi) aislar una población homogénea de células madre clonales de médula.
- 15 2. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que una dosificación de las células por cada administración es entre 1×10^4 células/kg de peso corporal a 1×10^8 células/kg de peso del sujeto.
- 20 3. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que las células expresan los antígenos de superficie celular CD29, CD44 y CD105, pero no el antígeno de superficie celular HLA-DR.
- 25 4. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en las que las células expresan los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166, pero no los antígenos de superficie celular CD106, CD119 o HLA-DR.
- 30 5. Células madre clonales y homogéneas de médula para su uso en el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador, en las que las células madre clonales y homogéneas de médula se aíslan por el método que comprende:
- 35 i) permitir que una muestra de células de médula ósea sedimente en un recipiente;
 ii) transferir el sobrenadante de i) a un nuevo recipiente y cultivar;
 iii) transferir el sobrenadante de ii) a un nuevo recipiente y cultivar;
 iv) transferir el sobrenadante de iii) a un nuevo recipiente;
 v) permitir que las células formen colonias derivadas de células individuales; y
 vi) aislar una población homogénea de células madre clonales de médula.
- 40 6. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en las que los síntomas de la enfermedad de injerto contra hospedador son del tracto gastrointestinal, piel esclerótica, limitación de la ingesta oral, sequedad ocular, síntomas hepáticos, disnea o rigidez de los brazos o las piernas.
- 45 7. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en las que el síntoma gastrointestinal es volumen diario aumentado de heces.
- 50 8. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en las que el síntoma gastrointestinal es colon inflamado.
- 55 9. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en las que el síntoma hepático es nivel elevado de fosfatasa alcalina en suero sanguíneo.
- 60 10. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en las que una dosificación de las células por cada administración es entre 1×10^4 células/kg de peso corporal a 1×10^8 células/kg de peso del sujeto.
- 65 11. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en las que las células expresan los antígenos de superficie celular CD29, CD44 y CD105, pero no el antígeno de superficie celular HLA-DR.
12. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en las que las células expresan los antígenos de superficie celular CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166, pero no los antígenos de superficie celular CD106, CD119 o HLA-DR.
13. Las células madre clonales y homogéneas de médula para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en las que las células madre clonales y homogéneas de médula secretan interleuquina-10 a una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/ml cuando están en cultivo.

FIG. 1

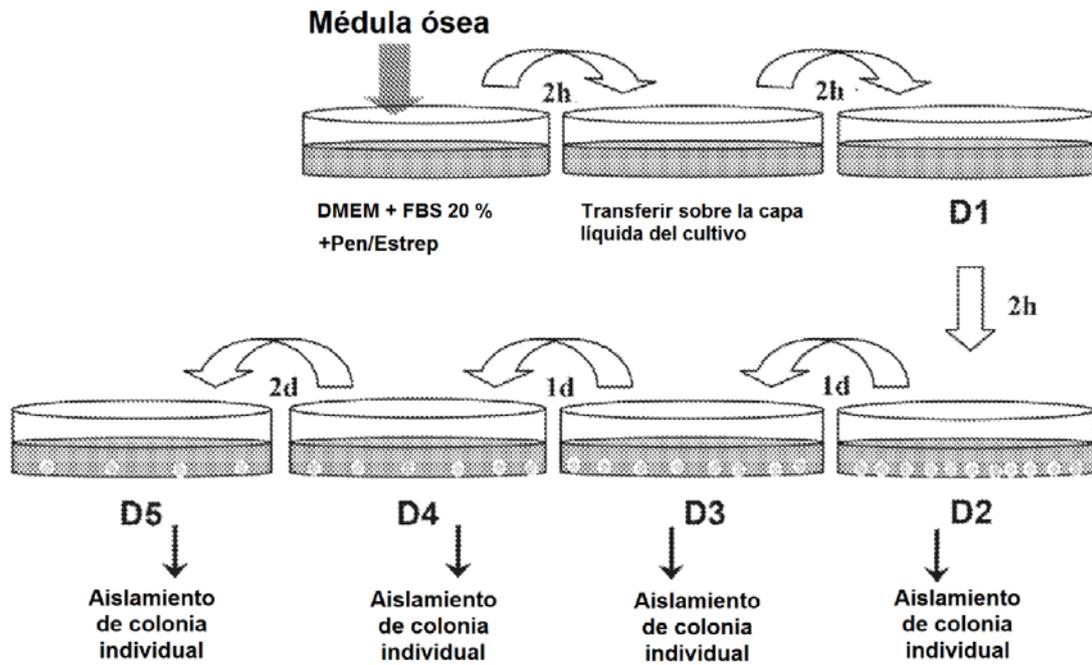


FIG. 2

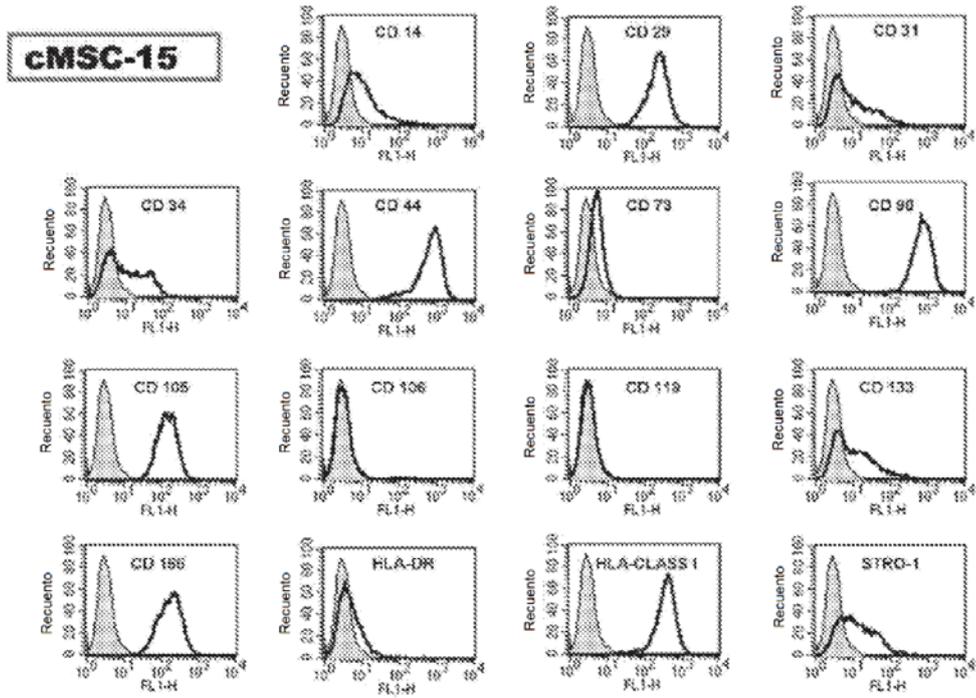


FIG. 3

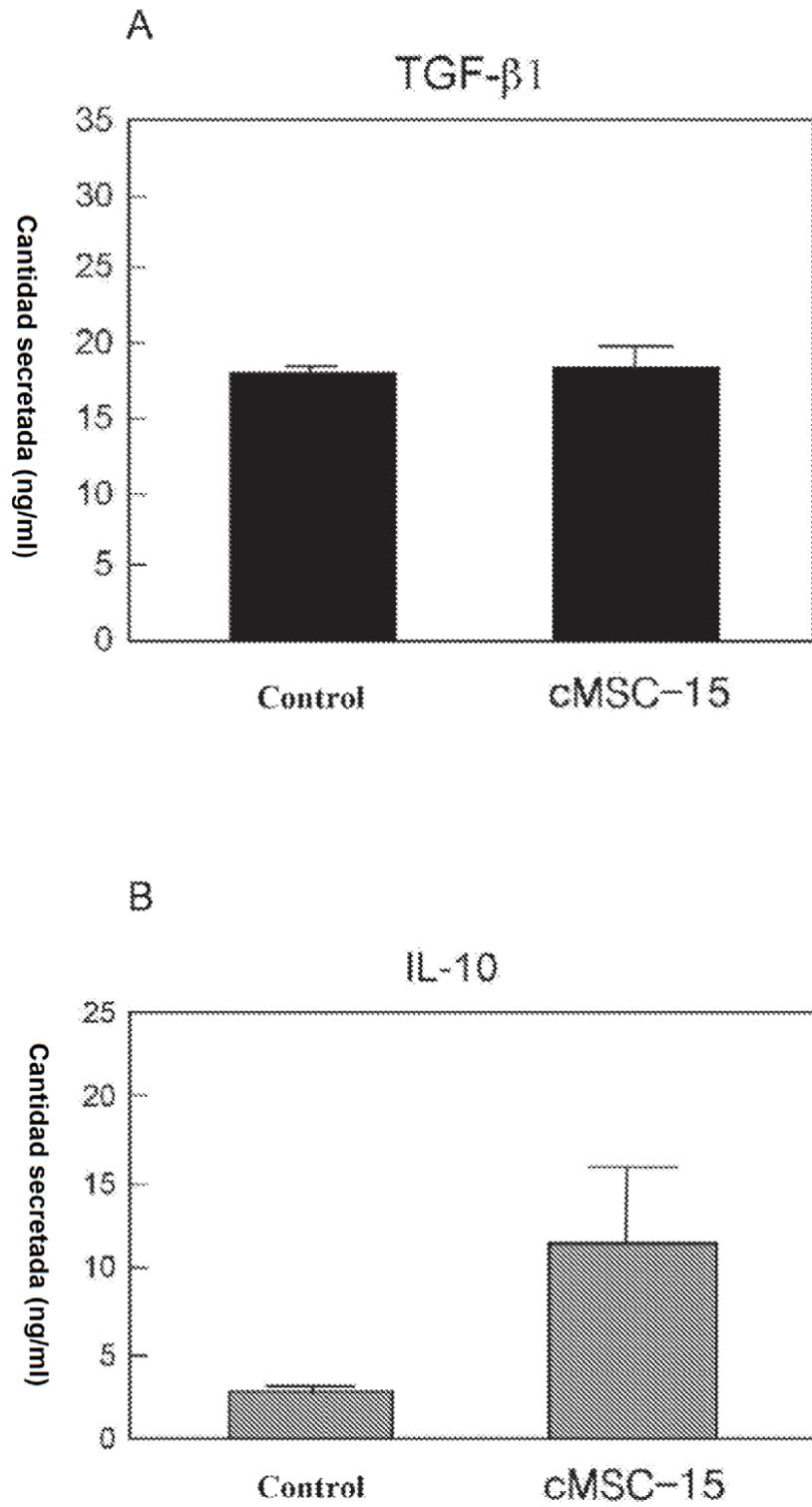


FIG. 4

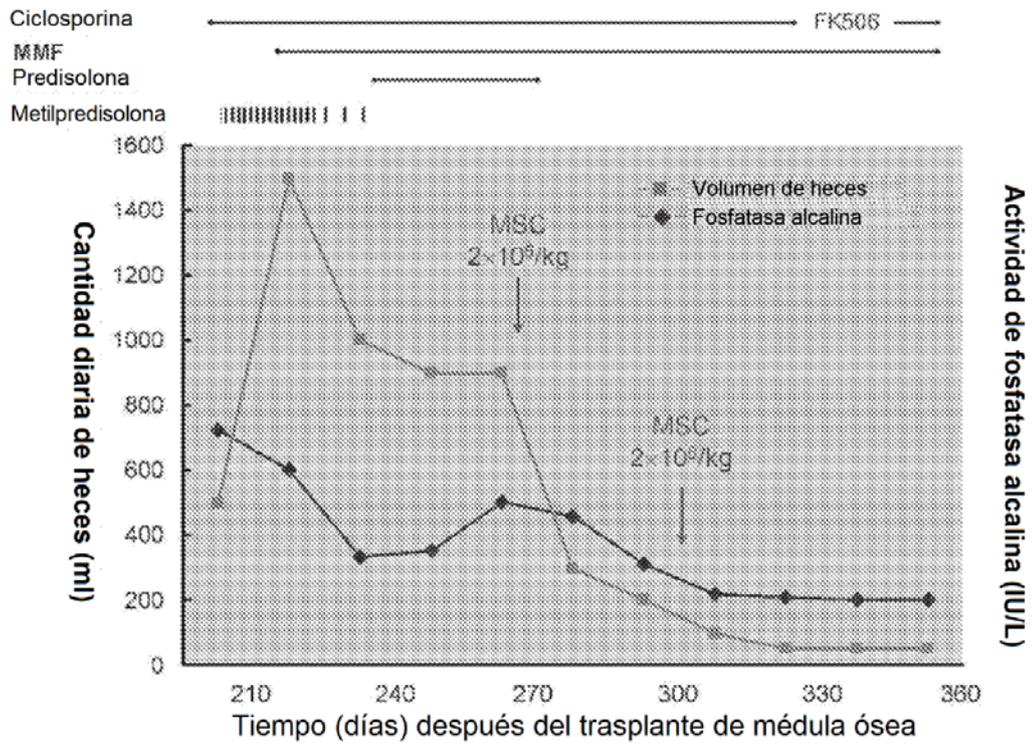


FIG. 5

