

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 994**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0789 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2011 PCT/US2011/047657**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012 WO12021845**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011 E 11817137 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2603227**

54 Título: **Terapia mejorada con células madre y precursoras hematopoyéticas**

30 Prioridad:

12.08.2010 US 373212 P

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

15.02.2018

73 Titular/es:

**FATE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
Suite 200, 3535 General Atomics Court
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**SHOEMAKER, DANIEL;
MULTANI, PRATIK;
DESPONTS, CAROLINE;
ROBBINS, DAVID, L.;
GRAYSON, PAUL y
MENDLEIN, JOHN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 654 994 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

Terapia mejorada con células madre y precursoras hematopoyéticas

5 **Antecedentes****Campo técnico**

10 La presente invención se refiere por lo general a terapia celular. En particular, la presente invención se refiere a terapias celulares mejoradas para el sistema hematopoyético. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos mejorados para reconstituir el sistema hematopoyético de un individuo.

Descripción de la técnica relacionada

15 La medicina regenerativa es un campo de investigación médica que desarrolla tratamientos para reparar o restaurar células, tejidos y órganos específicos en el cuerpo. Un aspecto de la terapia regenerativa que se persigue es el uso de trasplantes de células madre hematopoyéticas para tratar una lista en expansión de cánceres y trastornos degenerativos. De acuerdo con el National Marrow Donor Program® (NMDP), se tiene un cálculo anual entre 45.000 y 50.000 trasplantes de células hematopoyéticas (médula ósea, células madre de sangre periférica (PBSC), o
20 trasplantes de sangre del cordón umbilical), incluyendo aproximadamente 20.000 trasplantes alogénicos de células hematopoyéticas. En todo el mundo para tratar a los pacientes con enfermedades malignas potencialmente mortales y no malignas (Horowitz MM. Uses and Growth of Hematopoietic Cell Transplantation. En: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 3ª ed. Maiden, Mass: Blackwell; 2004: 9-15). Además, aproximadamente 4.800 pacientes son trasplantados anualmente usando donantes no relacionados o
25 unidades de sangre del cordón umbilical a través del NMDP.

Desde que comenzó a funcionar en 1987, el NMDP ha facilitado más de 38.000 trasplantes de médula y sangre del cordón umbilical para dar a los pacientes una segunda oportunidad en la vida. Tradicionalmente, los trasplantes de células madre hematopoyéticas de médula ósea se usaban para tratar pacientes que padecían diversos tipos de
30 leucemias, anemias, linfomas, mielomas, trastornos de inmunodeficiencia y tumores sólidos, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario. Sin embargo, el trasplante de médula ósea es doloroso para los donantes y, además, a menudo es difícil y lleva mucho tiempo encontrar el grado necesario de tejido compatible con el donante de HLA, especialmente en poblaciones étnicas particulares. Además, los trasplantes alogénicos de médula ósea a menudo están asociados con una incidencia significativa de enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD).
35

En muchos casos, los pacientes que reciben trasplantes de células madre hematopoyéticas tienen cáncer avanzado u otros trastornos metabólicos que amenazan la vida. Por lo tanto, cualquier retraso en la búsqueda de un donante que tenga un tipo de tejido HLA compatible adecuadamente puede comprometer el resultado del paciente, a menudo dando como resultado la muerte. Por consiguiente, el crecimiento reciente del número de trasplantes de donantes no
40 relacionados con NMDP ha sido especialmente radical, con más de 4.800 trasplantes solamente en 2009, en comparación con 4.300 en 2008. Además, la proporción de trasplantes alogénicos que usan donantes no relacionados o unidades de sangre de cordón umbilical ha aumentado constantemente. En 2006, más de un tercio de los trasplantes alogénicos realizados en todo el mundo usaron donantes no relacionados. En 2009, un 75 % de los donantes adultos - más de 2.800 - donaron PBSC a pacientes a través del NMDP. En 2009, el NMDP facilitó
45 1.056 trasplantes de sangre del cordón umbilical, que representa un 22 % del número total de trasplantes de NMDP en 2009. Esto representa un aumento de un 18 % desde 2008, cuando el NMDP facilitó 896 trasplantes de sangre del cordón umbilical.

Se han realizado trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas usando sangre del cordón umbilical porque la sangre se puede obtener más fácilmente, conlleva menos riesgo para el receptor de la enfermedad del
50 injerto contra hospedador, es indolora para el donante y requiere menos compatibilidad con el tipo de HLA entre donante y receptor.

Sin embargo, se percibe que existen varios inconvenientes al realizar trasplantes de sangre del cordón umbilical humano, incluyendo el riesgo de que las células madre y precursoras hematopoyéticas del trasplante de sangre del
55 cordón umbilical no se puedan injertar.

Otro inconveniente del uso de trasplantes de sangre del cordón umbilical es que los glóbulos del cordón umbilical tardan más en injertarse en el paciente, lo que pone al paciente en alto riesgo de infección. Además, los trasplantes de sangre del cordón umbilical son un enfoque de tratamiento más novedoso. Por lo tanto, se puede desalentar a los
60 médicos para que no los utilicen porque no tienen tanta información sobre los resultados a largo plazo de los pacientes después de haber realizado trasplantes de sangre del cordón umbilical como lo hacen para los trasplantes de médula. Además, los trasplantes de sangre del cordón umbilical también tienen los mismos riesgos que los trasplantes de médula ósea y de sangre periférica.

65 Además, una barrera significativa para usar la sangre del cordón umbilical como fuente de células para trasplantes

de sangre humana es que a menudo no hay suficientes células formadoras de sangre en una sola unidad de sangre del cordón umbilical para el tamaño del paciente o para tratar la indicación en particular. Dado que el tamaño de un solo cordón (es decir, el número de células formadoras de sangre en un solo cordón) a menudo es insuficiente para un trasplante de sangre, pueden ser necesarios dos cordones, lo que aumenta los riesgos de GVHD y la imposibilidad de injertar. Por lo tanto, se han intentado numerosos enfoques para ampliar el número de células madre y precursoras hematopoyéticas en la sangre del cordón umbilical dentro de injertos aislados en entornos *ex vivo*, lo que puede permitir el trasplante usando un solo cordón, pero estos esfuerzos han tenido un éxito limitado.

Por lo tanto, la promesa de terapias de células madre hematopoyéticas restauradoras o regenerativas no se ha realizado, en parte, debido a dificultades para traducir protocolos de modelos animales prometedores en la práctica clínica humana, baja eficacia de protocolos clínicos existentes, alta incidencia de complicaciones, por ejemplo, enfermedad de injerto contra hospedador, y relativamente pocos donantes lo suficientemente compatibles.

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de métodos que puedan aumentar la eficacia del injerto de células madre y precursoras hematopoyéticas a la médula ósea, para ampliar la capacidad de aplicación y aumentar el éxito del trasplante de células madre hematopoyéticas. La presente invención proporciona soluciones a estos problemas y también proporciona otros usos y ventajas que serán evidentes para las personas expertas en la materia.

20 Sumario de la invención

La invención proporciona métodos mejorados de trasplante de células madre y precursoras hematopoyéticas. Además, la invención proporciona una preparación superior de células madre o precursoras hematopoyéticas que presentan un aumento del injerto/potencial de injerto y/o aumento de expansión. En diversas realizaciones, las células se expanden o proliferan *in vivo*. En otras diversas realizaciones, las células se tratan *ex vivo*, se administran a un sujeto y se expanden o proliferan *in vivo*.

En un aspecto, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende una población de células que comprende al menos aproximadamente un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que a) las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con un agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células; b) la expresión genética de CXCR4 aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas en al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto; y c) en la que la composición terapéutica comprende una suspensión terapéuticamente aceptable, estéril de células madre o precursoras hematopoyéticas preparada para su administración a un paciente.

En una realización en particular, la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas de la composición terapéutica aumenta al menos aproximadamente 3 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En una realización, la población de células comprende una colección de células CD34⁺ en la que la expresión genética de CXCR4 en la colección de células CD34⁺ aumenta al menos aproximadamente 3 veces en comparación con una colección de células CD34⁺ no puesta en contacto.

En otra realización, la expresión genética de CXCR4 aumenta de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En otra realización de la composición terapéutica, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 4 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En otra realización de la composición terapéutica, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 6 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. Además en otra realización de la composición terapéutica, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 7 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En otra realización de la composición terapéutica, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 8 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otra realización de la composición terapéutica, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

Además en otra realización de la invención, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 12 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta

en contacto.

En una realización adicional de la invención, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 16 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En algunas realizaciones, la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas que comprenden la composición terapéutica aumenta de aproximadamente 8 a aproximadamente 18 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En diversas realizaciones de la invención, el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas se selecciona entre el grupo que consiste en un potenciador de AMPc, un activador de G α -s, y un compuesto que se une de forma selectiva al subtipo EP₄ de receptor de PGE₂.

En realizaciones en particular, el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas es PGE₂, o un análogo o derivado de PGE₂. En realizaciones más particulares, el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas es 16,16-dimetil PGE₂.

En una realización de la composición terapéutica de la invención, las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente una hora. En diversas realizaciones, las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas. En realizaciones en particular, las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de aproximadamente dos horas a aproximadamente seis horas. En realizaciones más particulares, las células madre o precursoras hematopoyéticas que comprenden la composición terapéutica se pusieron en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de aproximadamente dos horas.

En realizaciones en particular de la invención, las células madre o precursoras hematopoyéticas que comprenden la composición terapéutica comprenden un elemento distintivo de la expresión genética en el que la expresión de uno o más genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2).

En realizaciones más particulares, la expresión de al menos dos de los genes distintivos aumenta al menos 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En realizaciones más particulares, la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

En diversas realizaciones, la población de células que comprende la composición terapéutica comprende menos de aproximadamente un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺. En algunas realizaciones, la población de células comprende al menos aproximadamente un ,01 % y no más de aproximadamente un 50 % de células CD34⁺.

En algunas realizaciones, la población de células no se expande *ex vivo*.

En diversas realizaciones, la composición terapéutica se genera en un centro de atención y se administra en un paciente sin cultivar la población de células. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera a las 24 horas de administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera a las 12 horas de administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera a las 6 horas de administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera el día de infusión de la composición.

En algunas realizaciones, la composición terapéutica está sustancialmente libre del agente. En diversas realizaciones, la composición terapéutica comprende células madre o precursoras hematopoyéticas suspendidas en una solución de albúmina de suero humano al 5 % y dextrano.

En algunas realizaciones, la composición terapéutica comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células madre mesenquimales. En realizaciones en particular, la composición terapéutica comprende no más de aproximadamente un 10 % de células madre mesenquimales.

En algunas realizaciones, la composición terapéutica comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células madre mesenquimales.

15 %, 10 % o un 5 % de células precursoras endoteliales. En realizaciones en particular, la composición terapéutica comprende no más de aproximadamente un 10 % de células precursoras endoteliales.

5 En realizaciones en particular de la invención, la población de células comprende células positivas para el marcador de superficie celular CD34, y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células positivas para un marcador de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD73, CD140B, CD14 y VWF.

10 En realizaciones en particular, la población de células que comprende la composición terapéutica de la invención comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD14⁺/CD45. En otras realizaciones de la invención, la población de células comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células VWF⁺. En otras realizaciones de la invención, la población de células comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD140B⁺.

15 En realizaciones más particulares, la población de células comprende células madre o precursoras hematopoyéticas CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD14⁺/CD45, células VWF⁺, células CD73⁺, y células CD140B⁺. En algunas realizaciones, la población de células es positiva para el marcador de superficie celular CD34 y es negativa para al menos un marcador de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD14, VWF, CD73, y CD140B. En otras realizaciones, la población de células es positiva para el marcador de superficie celular CD34 y es negativa para al menos los marcadores de superficie celular CD14, VWF, CD73, y CD140B.

20 En diversas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente un 15 % de células dentro de la población de células expresa la proteína CXCR4.

En algunas realizaciones, la población de células se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada.

30 En realizaciones en particular, la población de células presenta haplotipo de HLA. En realizaciones más particulares, la población de células presenta haplotipo de HLA basándose en el grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DRB1. En algunas realizaciones, la población de células que presenta haplotipo de HLA es compatible con un sujeto humano específico. En algunas realizaciones, la población de células que presenta haplotipo de HLA tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico.

35 En otra realización, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende una población de células que comprende al menos aproximadamente un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que a) las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con 16,16-dmPGE₂ durante un periodo de tiempo de aproximadamente dos horas; b) las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden una colección de células CD34⁺ en la que la expresión genética de CXCR4 aumenta en la colección de células CD34⁺ en al menos aproximadamente 3 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en células CD34⁺ no puestas en contacto; y c) en la que la composición terapéutica comprende una suspensión terapéuticamente aceptable, estéril de células madre o precursoras hematopoyéticas preparada para su administración a un paciente.

45 En algunas realizaciones, la población de células comprende una colección de células CD34⁺ en la que la expresión genética de CXCR4 en la colección de células CD34⁺ aumenta al menos aproximadamente 3 veces en comparación con una colección de células CD34⁺ no puesta en contacto.

50 En diversas realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En realizaciones más particulares, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 4 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

55 En otras realizaciones en particular, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 6 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones en particular, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 7 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 8 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 12 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 16 veces en

comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión genética de CXCR4 aumenta de aproximadamente 8 a aproximadamente 18 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

5 En algunas realizaciones, las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden un elemento distintivo de la expresión genética en el que la expresión de uno o más genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en:
10 hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2).

15 En otras realizaciones, la expresión de al menos dos de los genes distintivos aumenta al menos 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

20 En una realización en particular, la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

25 En otras realizaciones, la población de células no comprende más de aproximadamente un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺. En realizaciones más particulares, la población de células comprende al menos aproximadamente un ,01 % y no más de aproximadamente un 50 % de células CD34⁺.

En diversas realizaciones, la población de células no se expande *ex vivo*.

30 En realizaciones en particular, la población de células se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada.

En algunas realizaciones, la población de células presenta haplotipo de HLA.

35 En otra realización, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende una población de células con haplotipo que comprende al menos aproximadamente un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que a) las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con un agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células; b) la expresión genética de CXCR4 aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas en al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto; y c) en la que la composición terapéutica comprende una suspensión
40 terapéuticamente aceptable, estéril de células madre o precursoras hematopoyéticas preparada para su administración a un paciente.

45 En una realización en particular, la población de células con haplotipo presenta haplotipo basándose en el grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DRB1. En realizaciones más particulares, la población de células con haplotipo presenta haplotipo basándose en el grupo que consiste en HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, y DPB1. En algunas realizaciones, la población de células con haplotipo es compatible con un sujeto humano específico. En diversas realizaciones, la población de células que presenta haplotipo de HLA tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico.

50 En algunas realizaciones, la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas aumenta al menos aproximadamente 3 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En realizaciones en particular, la expresión genética de CXCR4 aumenta de aproximadamente 3 veces a aproximadamente 8 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones en particular, la
55 expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 4 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

60 En realizaciones en particular, el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas se selecciona entre el grupo que consiste en un análogo o potenciador de AMPc, un activador de Gα-s, y un compuesto que se une de forma selectiva al subtipo EP₄ de receptor de PGE₂. En realizaciones más particulares, el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas es 16,16-dimetil PGE₂.

65 En diversas realizaciones, las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto con el agente durante un periodo de tiempo de aproximadamente una hora a aproximadamente seis horas.

- En algunas realizaciones, las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden un elemento distintivo de la expresión genética en el que la expresión de uno o más genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en:
- 5 hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2).
- En realizaciones en particular, la expresión de al menos dos de los genes distintivos aumenta al menos 5, 10, 15, o
- 10 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.
- En otras realizaciones, la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 2 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos
- 15 aproximadamente 4 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto. En otras realizaciones, la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos aproximadamente 6 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.
- 20 Además en otras realizaciones, la población de células comprende menos de aproximadamente un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺.
- En realizaciones más particulares, la población de células comprende al menos aproximadamente un ,01 % y no
- 25 más de aproximadamente un 50 % de células CD34⁺.
- En algunas realizaciones, la población de células no se expande *ex vivo*.
- En otras realizaciones, la composición terapéutica se genera en un centro de atención y se administra en un
- 30 paciente sin cultivar la población de células. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera menos de aproximadamente un 24 horas antes de la administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera menos de aproximadamente un 12 horas antes de la administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera menos
- 35 de aproximadamente un 6 horas antes de la administración de la composición al paciente. En algunas realizaciones, la composición terapéutica se genera el día de la infusión de la composición.
- En otras realizaciones, la población de células que comprende la composición terapéutica se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada.
- 40 En otra realización, la invención contempla, en parte, un método para preparar una composición terapéutica para su uso en un trasplante de células madre o precursoras hematopoyéticas que comprende: poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas, *ex vivo* o *in vitro*, a una temperatura de aproximadamente 37 °C, en condiciones suficientes para modificar la expresión genética de las células madre o precursoras hematopoyéticas para dar como resultado células madre o precursoras
- 45 hematopoyéticas que comprenden un elemento distintivo de la expresión genética que comprende el aumento de la expresión, en comparación con células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto, de uno o más de los siguientes genes: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), o receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4).
- 50 En otra realización, la invención contempla, en parte, un método para aumentar el injerto de células madre o precursoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende: poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en PGE₂ y un agente que tiene actividad de dmPGE₂; lavar la población de células para eliminar sustancialmente el agente; y administrar la población de células puesta en contacto a un sujeto; en el que la población de células se pone en contacto con el agente en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el
- 55 sujeto en comparación con las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto.
- 60 En una realización, la invención contempla, en parte, un método para tratar un sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético que comprende: seleccionar un sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético; poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en PGE₂ y un agente que tiene actividad de dmPGE₂; lavar la población
- 65 de células para eliminar sustancialmente el agente; y administrar la población de células puesta en contacto al

sujeto; en el que la población de células se pone en contacto con el agente en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto en comparación con las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto tratando de ese modo al sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético.

5 En una realización adicional, la invención contempla, en parte, un método para tratar un sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético que comprende: seleccionar el sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético; poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas a una temperatura de aproximadamente 37 °C con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂; lavar la población de células para eliminar sustancialmente el agente; y administrar la población de células puesta en contacto al sujeto; en el que la población de células se pone en contacto con el agente en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto en comparación con las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto tratando de ese modo al sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético.

10 En una realización más, la invención contempla, en parte, un método para preparar una población de células para aumentar la expansión de células madre o precursoras hematopoyéticas *in vivo* que comprende: poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas, *ex vivo* o *in vitro*, a una temperatura de aproximadamente 37 °C, con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂; en el que la población de células se pone en contacto con el agente en las condiciones suficientes para aumentar la expansión de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto *in vivo* en comparación con células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

25 En realizaciones en particular de los métodos de la invención, la población de células se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada.

30 En otras realizaciones en particular de la invención, el agente que tiene actividad de dmPGE₂ es dmPGE₂, un análogo o potenciador de AMPc, o un activador de Gα-s.

En ciertas realizaciones, el agente es PGE₂ o un análogo del mismo.

35 En ciertas realizaciones en particular, el análogo de PGE₂ es 16,16-dimetil PGE₂.

En otras realizaciones en particular, el agente es un potenciador de AMPc.

40 En ciertas realizaciones de la invención, las condiciones suficientes para modificar la expresión genética de, aumentar el injerto de o potencial de injerto de, o aumentar la expansión de, la población de células madre o precursoras hematopoyéticas puesta en contacto comprende poner en contacto la población de células con el uno o más agentes durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas, en las que al menos uno de los agentes comprende un agente que aumenta la señalización de PGE₂R₂ o PGE₂R₄ en las células madre o precursoras hematopoyéticas. En ciertas realizaciones, las células madre o precursoras hematopoyéticas se ponen en contacto a una temperatura de aproximadamente 37 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas con una concentración de aproximadamente 10 μM del agente que aumenta la señalización de PGE₂R₂ o PGE₂R₄ en las células madre o precursoras hematopoyéticas.

45 En otras realizaciones, la población de células madre o precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con una concentración de aproximadamente 10 μM o más de 16,16-dimetil PGE₂ y durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 6 horas.

En realizaciones adicionales, la población de células se pone en contacto con una concentración de aproximadamente 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM y durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 horas.

55 En realizaciones en particular, el aumento del potencial de injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en la población celular comprende un aumento de la expresión genética de uno o más de hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), o receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4) en comparación con células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto, un aumento de la capacidad de autorrenovación en comparación con las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto, y ninguna disminución sustancial de la viabilidad celular en comparación con células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

65 En algunas realizaciones de la invención, la población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas se prepara en un recipiente sin endotoxinas que comprende un dispositivo indicador de la

temperatura que comprende al menos un indicador de temperatura que produce una señal que indica la temperatura del recipiente y un dispositivo que indica el tiempo transcurrido que comprende al menos un indicador del tiempo transcurrido; y en el que el recipiente es adecuado para almacenamiento celular, el tratamiento de células, o de células, e infusión celular.

5 En ciertas realizaciones de la invención, incluyendo los métodos de la invención para preparar una población de células para un trasplante de células madre o precursoras hematopoyéticas, y para preparar una población de células para aumentar la expansión de células madre o precursoras hematopoyéticas, la población de células puesta en contacto se administra a un sujeto con necesidad de la misma, tal como un sujeto con necesidad de terapia celular, y el método de la invención comprende adicionalmente administrar la población de células puesta en contacto a un sujeto con necesidad de la misma.

15 En ciertas realizaciones en particular, el sujeto tiene leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), aplasia pura de glóbulos rojos, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, anemia drepanocítica, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mieloide agnogénica, linfohistiocitosis hemofagocítica familiar, tumores sólidos, enfermedad granulomatosa crónica, mucopolisacaridosis, o anemia de Diamond Blackfan.

25 En otras ciertas organizaciones en particular, el sujeto tiene cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, o sarcoma.

En otras ciertas realizaciones, el sujeto recibe quimioterapia o terapia de radiación ablativa o no mieloablativa de médula ósea.

30 En otras realizaciones, el sujeto es un donante de médula ósea.

En realizaciones en particular, la población de células comprende una o más unidades de sangre de cordón umbilical. En ciertas realizaciones, al sujeto se le administran una o más unidades de sangre de cordón umbilical. En otras realizaciones, al sujeto se le administra una unidad de sangre de cordón umbilical parcial. En otras realizaciones en particular, al sujeto se le administra una unidad de sangre del cordón umbilical.

En otras realizaciones, la población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas es autogénica para el sujeto.

40 En ciertas realizaciones, la población de células está inmovilizada desde la sangre periférica o médula ósea del sujeto.

En otras realizaciones, la población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas es alogénica para el sujeto.

45 **Breve descripción de las vistas varias de las figuras**

50 La Figura 1 muestra una representación en diagrama de la ruta de señalización celular del receptor 2 de prostaglandina E_2 /receptor acoplado a la proteína G del receptor 4 presente en células madre y precursoras hematopoyéticas.

55 La Figura 2 muestra un diagrama de flujo experimental para los análisis de poblaciones purificadas de células $CD34^+$ o sangre de cordón umbilical humano tratados con 16,16-dimetil PGE_2 en diferentes conjuntos de condiciones experimentales.

La Figura 3 muestra los resultados para ensayos de AMPc en células $CD34^+$ tratadas con 16,16-dimetil PGE_2 en diferentes conjuntos de condiciones experimentales.

60 La Figura 4 muestra un diagrama de dispersión de datos de expresión genética de células $CD34^+$ tratadas con vehículo en el eje x con respecto a datos de expresión genética de células $CD34^+$ tratadas con 16,16-dimetil PGE_2 10 μM en el eje y. Se observa el aumento del 8 veces en la expresión de CREM y el aumento de 18 veces en la expresión de CXCR4 en células $CD34^+$ tratadas con 16,16-dimetil PGE_2 10 μM en comparación con células tratadas con vehículo.

65 La Figura 5 muestra un diagrama de flujo experimental para el análisis de tiempo de tratamiento en la expresión genética de células $CD34^+$ tratadas con 16,16-dimetil PGE_2 10 μM .

- 5 La Figura 6 muestra los perfiles de expresión genética de células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM (eje y) con respecto a células tratadas con vehículo (eje x) para tiempos de tratamiento de 5, 15, 30, 60, y 120 minutos. Los perfiles de expresión genética se obtuvieron después del periodo de incubación de 120 minutos.
- 10 La Figura 7 muestra los perfiles de expresión genética de células CD34⁺ tratadas a 37 °C durante 120 minutos con cualquiera de 100 nM, 1 μM, 10 μM, o 100 μM de 16,16-dimetil PGE₂ (eje y) con respecto a células tratadas con vehículo (eje x).
- 15 La Figura 8 muestra los perfiles de expresión genética de células CD34⁺ purificadas a partir de sangre de cordón umbilical que se trataron a 37 °C durante 120 minutos con cualquiera de 100 nM, 1 μM, 10 μM, 25 μM, o 50 μM de 16,16-dimetil PGE₂ (eje y) con respecto a células tratadas con vehículo (eje x).
- La Figura 9 muestra los perfiles de expresión genética de células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 60 minutos (paneles de la parte superior) o 120 minutos (paneles de la parte inferior) y tratadas a 37 °C (paneles de la parte izquierda) o 4 °C (panel de la parte derecha superior) o 25 °C (panel de la parte derecha inferior) (eje y) con respecto a células tratadas con vehículo (eje x).
- 20 La Figura 10 muestra que las células CD34⁺ incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 37 °C no disminuye la viabilidad celular en comparación con las células tratadas con vehículo o las células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 4 °C.
- 25 La Figura 11 muestra que las células CD34⁺ incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 37 °C no disminuye la capacidad de las células para formar unidades formadoras de colonias en comparación con las células tratadas con vehículo o las células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 4 °C. Unidad formadora de colonias de granulocitos - monocitos (CFU-GM); Unidad formadora de colonias eritroide (CFU-E); Unidad formadora de estallido eritroide (BFU-E); mezcla de unidades formadoras de colonias de múltiples linajes (CFU-GM/M/Eosi).
- 30 La Figura 12 muestra un esquema para los ensayos clínicos usando sangre del cordón umbilical humano tratada con 16,16-dimetil PGE₂.
- 35 La Figura 13 muestra análisis de expresión de todo el genoma del protocolo de tratamiento con 16,16-dimetil PGE₂. La Figura 13A muestra la expresión genética en células tratadas a 4 °C durante 1 hora. Las células se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM (eje y; N = 3) en comparación con los controles de DMSO (N = 3). La Figura 13B muestra la expresión genética en células tratadas a 37 °C durante 2 horas. Las células se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM (eje y; N = 3) en comparación con los controles de DMSO (N = 3).
- 40 La Figura 14 muestra estudios de validación de análisis de expresión genética para células incubadas tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM incubado a 37 °C usando la plataforma de expresión genética Fluidigm. La Figura 14A muestra la expresión genética de un grupo de genes seleccionados en células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 y 240 minutos en comparación con los controles tratados con vehículo. La Figura 14B muestra la expresión genética media de los genes distintivos enumerados en la Tabla 3 en células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 y 240 minutos en comparación con los controles tratados con vehículo. Los siguientes genes tuvieron un mal rendimiento y se excluyeron en la determinación de la expresión genética media que se muestra en la Figura 14B: ARPC2, CXCL5, CXCL6, FGF9, GNAL, GULP1, LRIG2, PDE4D, PLAT(1), PLAT(2), SSTR1, SYT4 y TMCC3. Los siguientes genes constitutivos se usaron para normalizar la determinación de la expresión genética media que se muestra en el Panel B: ACTB, GAPDH, HPTR1, y QARS. La Figura 14C muestra la expresión genética media de CXCR4 en células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180 y 240 minutos en comparación con los controles tratados con vehículo. Todos los perfiles de expresión genética para la Figura 14 se obtuvieron después del tratamiento de las células durante el periodo de tiempo especificado y sin incubación adicional de las células después del tratamiento.
- 45
- 50
- 55 La Figura 15 muestra un tratamiento de pulso de células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM suficiente para dirigir el efecto biológico completo o las células tratadas con DMSO. Las células CD34⁺ se incubaron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante diferentes periodos de tiempo tal como se muestra (0, 20, 40, 80 y 120 minutos) seguido de un periodo de recuperación sin 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C de modo que el tiempo de incubación total fue de 120 minutos. Los datos se analizaron usando la plataforma de expresión genética Fluidigm. Las Figuras 15A y 15B muestran la expresión genética media de los genes distintivos enumerados en la Tabla 3 en células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o DMSO a 37 °C durante 5, 15, 30, 60, y 120 minutos en comparación con los controles tratados con vehículo. Los siguientes genes tuvieron un mal rendimiento y se excluyeron en la determinación de la expresión genética media que se muestra en la Figura 15B: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2, e YPEL4. Los siguientes genes constitutivos se usaron para normalizar la determinación de la expresión genética media que se muestra en la Figura 15B: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPTR1, LRIG2, y QARS. Los perfiles de expresión genéticas se obtuvieron después del
- 60
- 65

periodo de incubación de 120 minutos.

La Figura 16 muestra el efecto de la concentración de 16,16-dimetil PGE₂ o tratamiento con DMSO en la expresión genética usando la plataforma de expresión genética Fluidigm. Las Figuras 16A y 16B muestran la expresión genética media de los genes distintivos enumerados en la Tabla 3 en células CD34⁺ tratadas con 0, 0,1, 1, 10, 50 y 100 μM de 16,16-dimetil PGE₂ o DMSO durante 120 minutos a 37 °C en comparación con los controles tratados con vehículo. Los siguientes genes tuvieron un mal rendimiento y se excluyeron en la determinación de la expresión genética media que se muestra en la Figura 16B: ACDY7, CCND1, CREB5, GULP1, FGFR1, FLJ27352, MPPE1, PDE4D, PTGER2, PDG3B, e YPEL4. Los siguientes genes constitutivos se usaron para normalizar la determinación de la expresión genética media que se muestra en la Figura 16B: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2, y QARS.

La Figura 17 muestra el análisis de expresión genética de células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 2 horas en comparación con células tratadas con DMSO. La Figura 17A muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células de sangre de todo el cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 2 horas en comparación con células de sangre del cordón umbilical tratadas con DMSO. La Figura 17B muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células Lin⁺ CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 2 horas en comparación con células Lin(+) CD34⁺ tratadas con DMSO. La Figura 17C muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células Lin(-) CD34⁺ CD38⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 2 horas en comparación con células Lin(-) CD34⁺ CD38⁺ tratadas con DMSO. La Figura 17D muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células Lin(-) CD34⁺ CD38⁺ CD90⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C durante 2 horas en comparación con células Lin(-) CD34⁺ CD38⁺ CD90⁺ tratadas con DMSO.

La Figura 18 muestra la expresión de CXCR4 en células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM tratadas a diferentes temperaturas durante diferentes de tiempo. La Figura 18A muestra las condiciones experimentales comparadas en esta serie de experimentos. La Figura 18B muestra la expresión de la superficie celular de CXCR4 a 1, 6, y 24 horas después del tratamiento en células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o DMSO a 4 °C durante 1 hora y células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o DMSO a 37 °C durante 2 horas. La Figura 18C muestra el porcentaje de células que expresan CXCR4 en la superficie celular a 1, 6, y 24 horas después del tratamiento en células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o DMSO a 4 °C durante 1 hora y células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o DMSO a 37 °C durante 2 horas.

La Figura 19 muestra análisis de viabilidad y proliferación de células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM en los periodos de tiempo y temperaturas indicados. Las células tratadas se analizaron a continuación usando un ensayo de CFU-S *in vivo*. La Figura 19A muestra que la incubación a 37 °C aumenta el número de células precursoras hematopoyéticas.

La Figura 19B muestra datos de viabilidad celular para células de sangre de todo el cordón umbilical humano incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a diversas concentraciones durante 120 minutos a 4 °C, 25 °C, y 37 °C. La Figura 19C muestra datos de viabilidad celular para células CD34⁺ humanas incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a diversas concentraciones durante 120 minutos a 4 °C y 37 °C. La Figura 19D muestra un aumento en la formación de colonias de CFU-C en células CD34⁺ tratadas con dmPGE₂ a 37 °C en comparación con células CD34⁺ tratadas con DMSO o con dmPGE₂ a 4 °C.

La Figura 20 muestra un diagrama de flujo experimental para un ensayo funcional de quimiotaxis *in vitro*. Las células CD34⁺ se tratan con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o control de DMSO durante 4 horas, y a continuación se transfieren para un ensayo de pocillo de migración durante 4 horas en presencia de 0 - 50 ng/ml de SDF1α.

La Figura 21 muestra datos representativos para un ensayo funcional de quimiotaxis *in vitro*. Las células CD34⁺ se tratan con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM o control de DMSO durante 4 horas, y a continuación se transfieren para un ensayo de pocillo de migración durante 4 horas en presencia de 0 - 50 ng/ml de SDF1α.

La Figura 22A muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 4 °C, 25 °C, o 37 °C (eje y) con respecto a células tratadas con vehículo (eje x). La Figura 22B proporciona el promedio de número de veces de cambio para un subconjunto de genes distintivos en las células a partir del análisis de expresión que se ilustra en la Figura 22A.

La Figura 23A muestra el análisis de expresión de todo el genoma de células CD34⁺ tratadas a 37 °C con dmPGE₂ 10 μM o forskolina (eje y) durante 120 minutos con respecto a células tratadas con vehículo (eje x). La Figura 23B (panel superior) muestra el promedio de número de veces de cambio para un subconjunto de genes distintivos que se ilustra en la Figura 23A en las células tratadas con dmPGE₂ o forskolina. La Figura 23B (panel inferior) muestra el promedio de número de veces de cambio con qPCR de Fluidigm para un subconjunto de genes distintivos en células CD34⁺ tratadas a 37 °C con dbAMPc 1 mM durante 120 minutos o tratadas con dmPGE₂ durante 120 minutos.

La Figura 24 muestra una estrategia experimental para realizar trasplantes de células hematopoyéticas en ratones usando las composiciones terapéuticas de la invención.

Descripción detallada

5

A. Introducción

La invención proporciona composiciones terapéuticas y métodos para mejorar la eficacia del trasplante de células madre o precursoras hematopoyéticas y se dirige a los desafíos de múltiples facetas enfrentados por la profesión médica en este campo de la terapia celular regenerativa. Los inventores analizaron varios parámetros biológicos de poblaciones de células madre o precursoras hematopoyéticas tratadas con agentes que modifican la expresión genética de las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de la prostaglandina y que regulan de forma positiva la expresión genética y de la superficie celular de CXCR4, para desarrollar métodos para aumentar la eficacia de las células madre o precursoras hematopoyéticas usadas en trasplantes de células madre. La eficacia en la reconstitución de una población de células del sistema hematopoyético de un sujeto después del trasplante depende de propiedades tales como la capacidad de las poblaciones celulares para migrar de forma dirigida e injertarse en la médula ósea, autorrenovarse, y proliferar *in vivo*. La invención proporciona un método para modular una población celular para mejorar las propiedades celulares de este tipo y proporcionar mejoras terapéuticas resultantes en la reconstitución hematopoyética.

De forma específica, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende un aumento de la población de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas, y métodos para preparar y usar la composición terapéutica mejorada en trasplantes de células madre. La composición terapéutica de la invención comprende una población de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas que se han modificado *ex vivo* para aumentar las propiedades terapéuticas de la población celular antes de su uso en la población celular en terapias de trasplante. Las células modificadas de la composición terapéutica demuestran un aumento de la capacidad para migrar de forma dirigida e injertarse en la médula ósea, y además poseen una mejora de la viabilidad celular y capacidades de autorrenovación.

Las propiedades terapéuticas de las células madre y precursoras hematopoyéticas de la composición terapéutica, incluyendo la capacidad de injerto y migración dirigida de las células, aumentan con un método para tratar la población celular *ex vivo* con un agente que modifica la expresión de genes en la célula que se cree que está asociada con la migración dirigida e injerto celular, incluyendo a CXCR4. Por lo tanto el método de la invención ceba a las células que comprenden la composición terapéutica para conseguir el efecto terapéutico más beneficioso después del trasplante de las células. En el método de la invención, las células madre o precursoras hematopoyéticas de la composición terapéutica se tratan con el agente *ex vivo* a temperaturas fisiológicamente relevantes, dando como resultado un aumento de la expresión de genes asociado con las propiedades biológicas beneficiosas de las células, tales como migración dirigida, injerto y expansión *in vivo* de la población celular. En los ejemplos que siguen a continuación se demuestra que la composición terapéutica que comprende las células madre o precursoras hematopoyéticas mejoradas tiene ventajas en migración dirigida, injerto, y proliferación.

Por lo tanto la composición terapéutica proporciona un método para mejorar el potencial injerto de células sanguíneas, incluyendo células sanguíneas cosechadas y, con fines de claridad, sangre del cordón umbilical, y un método para aumentar la migración dirigida, viabilidad, y autorrenovación en células hematopoyéticas trasplantadas. Además, la presente invención proporciona métodos de expansión de células madre y precursoras hematopoyéticas *in vivo*. Las composiciones terapéuticas y métodos que se describen en la presente invención pueden permitir el uso de una unidad de cordón umbilical parcial o individual en trasplantes de sangre de cordón umbilical.

El tratamiento de referencia actual para la manipulación de células madre hematopoyéticas antes del trasplante requiere un control estricto de la temperatura a 4 °C para maximizar la viabilidad celular y un injerto satisfactorio después del trasplante. La invención demuestra que la estimulación de la ruta de señalización celular de la prostaglandina en células madre y precursoras hematopoyéticas en condiciones que se cree que están asociadas con una disminución de la viabilidad celular semivida del agente (tal como manipulación de células a 37 °C durante un periodo de dos horas) da como resultado de forma inesperada a un aumento de la capacidad de las células para migrar de forma dirigida a la médula ósea, aumentar la autorrenovación, y aumentar el potencial de injerto de las células madre/precursoras, sin influir de forma negativa en la viabilidad celular. De forma más particular, los inventores descubrieron que la exposición prolongada (de al menos una hora) de las células madre o precursoras hematopoyéticas con un agente de tratamiento que ejerce una actividad de PGE₂ a temperaturas fisiológicamente relevantes, tales como la temperatura corporal, es necesaria para conseguir un efecto biológico total. En particular, el tratamiento de células madre o precursoras hematopoyéticas durante periodos de tiempo breves a temperaturas fisiológicamente relevantes da como resultado un aumento de la producción de AMPc, pero de forma inesperada nota como resultado un aumento de la expresión de los genes de los que se cree que están asociados con la migración dirigida e injerto celular. Se necesitan periodos de tiempo de tratamiento celular más largos a temperaturas fisiológicamente relevantes para conseguir un aumento de la expresión genética, y con la presente invención se demuestra que son necesarios para conseguir los efectos biológicos necesarios para aumentar la migración dirigida e injerto celular. Sin desear quedar ubicado por ninguna teoría en particular, los métodos que se

describen en el presente documento dan como resultado un aumento del potencial de proliferación e injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas después de su administración a un sujeto.

5 La prostaglandina E_2 (PGE_2) ejerce su función actuando en un número de diferentes receptores de prostaglandina en diversos tipos celulares, activando diversas rutas de señalización que incluyen, pero no se limitará, la ruta de PI3-quinasa (PI3-K o PI3K). Estos receptores de prostaglandina representan una subfamilia de los siete receptores transmembrana de la superficie celular denominados receptores acoplados a la proteína G (GPCR). Existen cuatro subtipos de receptores de prostaglandina E_2 , PGE_2R_1 , PGE_2R_2 , PGE_2R_3 y PGE_2R_4 . Cuando se activa por un ligando adecuado, o agonista, tal como una prostaglandina o análogo de la misma, por ejemplo, un agonista de PGE_2R_2 o PGE_2R_4 , estos receptores de prostaglandina inician una diversidad de funciones biológicas corriente abajo. Por ejemplo, la estimulación/activación de la señalización celular de PGE_2R_2 y/o PGE_2R_4 en células madre y precursoras hematopoyéticas se acopla, en parte, a la activación de alfa-s de la proteína G ($G\alpha_s$ o $Gq-s$) y estimulación de la adenilato ciclasa.

15 La activación de la adenilil ciclasa cataliza la conversión de ATP en AMPc. Los aumentos en la concentración del segundo mensajero AMPc pueden conducir a la activación de canales y únicos abiertos por nucleótidos cíclicos, intercambio de proteínas activadas por AMPc tales como RAPGEF3. La especificidad de la señalización entre un GPCR y su última diana molecular a través de una ruta dependiente de AMPc se puede conseguir a través de la formación de un complejo de múltiples proteínas, incluyendo GPCR, adenilil ciclasa, y la proteína efectora.

20 Como se ha indicado anteriormente, el AMP cíclico activa la proteína quinasa A (PKA, también denominada proteína quinasa dependiente de AMPc). La PKA normalmente está inactiva como una holoenzima tetramérica, que consiste en 2 unidades catalíticas y 2 unidades reguladoras (C_2R_2), con las unidades reguladoras bloqueando los centros catalíticos de las unidades catalíticas. El AMP cíclico se une a posiciones específicas en las unidades reguladoras de PKA, disocia las subunidades reguladoras y catalíticas, y de ese modo activa las unidades catalíticas, permitiendo la fosforilación de proteínas sustrato. No todas las proteínas quinasa responden a AMPc, ya que varios tipos de proteínas quinasa no son dependientes de AMPc, incluyendo, por ejemplo, la proteína quinasa C.

30 Las subunidades activas de PKA pueden catalizar la transferencia de fosfato de ATP a restos de serina o treonina de sustratos proteicos. Las proteínas quinasa fosforiladas pueden actuar directamente sobre los canales iónicos en la célula, o pueden activar o inhibir otras enzimas. La PKA también fosforila proteínas específicas que se unen a regiones promotoras de ADN, causando un aumento de la expresión de genes específicos. Los efectos corriente abajo adicionales dependen de los diversos papeles de la PKA, que se pueden diferenciar basándose en el tipo de célula. Por ejemplo, la PKA activada puede fosforilar un número de otras proteínas, incluyendo, por ejemplo, proteínas que convierten glucógeno en glucosa, proteínas que estimulan la contracción muscular en el corazón conduciendo a un aumento del ritmo cardiaco, y factores de transcripción que regulan la expresión genética.

40 Por lo tanto, la estimulación de las rutas de señalización celular de PGE_2R_2 y PGE_2R_4 puede conducir a un aumento de la activación de factores de transcripción tales como proteína de unión de elementos de respuesta a AMPc (CREB) y genes diana de CREB, por ejemplo, modulador de elementos de respuesta a AMPc (CREM) (véase la Figura 1). La administración de células madre o precursoras hematopoyéticas que presentan un aumento de AMPc puede mantener la viabilidad de las células madre/precursoras hematopoyéticas, puede aumentar la migración dirigida, puede aumentar la autorrenovación, y puede proporcionar un aumento del injerto y un aumento de la expansión de la población celular trasplantada *in vivo*.

45 La estimulación/activación de la señalización celular de PGE_2R_2 y PGE_2R_4 también está asociada con un aumento de la fosforilación de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) y un aumento de la señalización de la B-catenina (Hull *et al.*, 2004; Regan, 2003), ambas de las cuales indican la activación de la ruta de Wnt. La estimulación de PGE_2 de la ruta de Wnt puede aumentar de forma activa la proliferación de células madre/precursoras hematopoyéticas, y la autorrenovación a través de señalización desde el nicho de células madre así como desde dentro de las propias células (North *et al.*, 447 (7147) Nature 1007-11 (2007)). La activación de la ruta de Wnt en células madre y precursoras hematopoyéticas también prevé conducir a un aumento de la expansión de la población de células *in vivo*.

55 También se ha mostrado que la estimulación de PGE_2R_4 activa la ruta de PI3K, y también puede ser importante para conseguir los efectos biológicos deseados de aumento de la migración dirigida, proliferación, supervivencia, e injerto de células madre. La estimulación/activación de las rutas de señalización celular de PGE_2R_2 y PGE_2R_4 , tales como la ruta de PI3K, también puede aumentar la expresión de genes importantes para la migración dirigida e injerto de células madre, por ejemplo, receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4), selectinas, integrinas.

60 Antes del descubrimiento actual, las células madre y precursoras hematopoyéticas se trataron con compuestos con la creencia de que los receptores EP se podrían saturar totalmente con el compuesto sometido a ensayo en condiciones que maximizaran la viabilidad de las células y también la estabilidad del compuesto de tratamiento.

65 Se creyó que el tratamiento a 4 °C, de acuerdo con el tratamiento de referencia actual para trasplantes de células madre hematopoyéticas proporcionaba un aumento de la viabilidad celular de las células tratadas, así como una

esperanza de aumento de la semivida de los compuestos sometidos a ensayo a esta temperatura en comparación con temperaturas más elevadas, por ejemplo, 25 °C o 37 °C y periodos de incubación más largos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más horas.

5 Sin desear quedar ligado por ninguna teoría en particular, la invención contempla, en parte, que el injerto de células madre o precursoras hematopoyéticas, la capacidad de las células para migrar de forma dirigida a la médula ósea, y la autorrenovación de las células puede aumentar, y la viabilidad celular se puede mantener, tratando las células con aumentos de temperatura durante periodos de incubación prolongados con agentes que aumentan la expresión de genes asociados con la migración dirigida y el injerto.

10 Los agentes relevantes incluyen, por ejemplo, mejores composiciones de prostaglandina E₂ y agentes que tienen actividad de dmPGE₂, incluyendo análogos y potenciadores de AMPc, y/o activadores de Gα-s. Además, la presente invención demuestra que la administración de células tratadas con agentes de este tipo, incluyendo prostaglandina E₂ y agentes que tienen actividad de dmPGE₂, a temperaturas fisiológicamente relevantes (tales como la temperatura corporal, o 37 °C) durante periodos de incubación prolongados (es decir, al menos una hora) conduce no solamente a un aumento del injerto celular sino que también va como resultado una expansión *in vivo* de la población de células madre y precursoras hematopoyéticas.

15 En consecuencia, en diversas realizaciones, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas humanas que se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de aproximadamente 37 °C con un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células. La invención también proporciona métodos para preparar células madre y precursoras hematopoyéticas para su uso como una composición terapéutica para reconstitución hematopoyética que comprende poner en contacto una población de células madre y/o precursoras hematopoyéticas con un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células, tal como un agente que estimula la ruta de la prostaglandina, en condiciones que optimizan el injerto y la expansión de la población de células madre o precursoras hematopoyéticas.

20 En el presente documento los artículos "un", "uno", y "el" se usan para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o más de un elemento.

25 Se debería entender que el uso de la alternativa (por ejemplo, "o") hace referencia a una cualquiera, ambas, o cualquier combinación de las mismas de las alternativas. Como se usa en el presente documento, los términos "incluir" y "comprender" se usan como sinónimos.

30 Como se usa en el presente documento, el término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como en un 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o un 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una realización, el término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud $\pm 15 \%$, $\pm 10 \%$, $\pm 9 \%$, $\pm 8 \%$, $\pm 7 \%$, $\pm 6 \%$, $\pm 5 \%$, $\pm 4 \%$, $\pm 3 \%$, $\pm 2 \%$, o $\pm 1 \%$ aproximadamente una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

35 A través de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que los términos "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste en" se hace referencia a que incluye, y se limita a, lo que sea que siga a la expresión "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se hace referencia a la inclusión de cualquier elemento enumerado después de la expresión, y que se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad facción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y puede estar presente o no dependiendo de si influyen o no en la actividad o acción de los elementos enumerados.

40 A través de la presente memoria descriptiva la referencia a "una realización (en concreto)" o "una realización" se refiere a que un elemento distintivo, estructura o característica en particular descrita con referencia a la realización está incluida en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, no todas las apariciones de las expresiones "en una realización (en concreto)" o "en una realización" en diversos lugares a través de la presente memoria descriptiva se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los elementos distintivos, estructuras, o características en particular se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

B. Composiciones Terapéuticas de la Invención

La invención proporciona una composición terapéutica que comprende una población de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas suspendidas en una solución terapéuticamente aceptable, estéril adecuada para su administración a un paciente. La composición terapéutica de la invención comprende una población de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* con uno o más agentes capaces de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células, y en la que las células se caracterizan por un elemento distintivo de la expresión genética que comprende el aumento de la expresión, con respecto a las células madre o precursoras no puestas en contacto, de CXCR4. Las células madre o precursoras hematopoyéticas se pueden caracterizar basándose en el aumento de los niveles de la expresión genética y de superficie celular de CXCR4.

En la composición terapéutica de la invención, la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en células no puestas en contacto.

La composición terapéutica de la invención se puede caracterizar adicionalmente por un elemento distintivo de la expresión genética de uno o más genes distintivos seleccionados entre el grupo que consiste en hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) que aumenta, con respecto a las células no puestas en contacto.

Como se usa en el presente documento, una célula "no puesta en contacto" es una célula que no se ha tratado, por ejemplo, cultivado, puesta en contacto, o incubado con un agente distinto a un agente de control. Las células puestas en contacto con DMSO (un agente de control), o puestas en contacto con otro vehículo no son células puestas en contacto.

Un "gen distintivo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier gen en el conjunto de genes distintivos proporcionados en la Tabla 3. Por ejemplo, los genes distintivos incluyen hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), y receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4). Con fines de claridad, los genes distintivos no incluyen a los genes constitutivos.

La expresión de un gen distintivo puede aumentar 2 o más veces en comparación con las células no puestas en contacto, y en realizaciones en particular al menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, o 20 veces. En algunas realizaciones, la expresión de uno o más genes distintivos aumenta en las células que comprenden la composición terapéutica de la invención. En realizaciones en particular, la expresión de al menos 2, 3, 4, o más de los genes distintivos aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 6, 10, 15, o 20 veces en comparación con las células no puestas en contacto. En diversas realizaciones, la expresión de un gen distintivo puede aumentar con las células no puestas en contacto al menos 6 veces en comparación con las células no puestas en contacto.

En realizaciones en particular de la invención, la expresión genética de CXCR4 aumenta al menos aproximadamente 4 veces y la expresión genética de CREM aumenta al menos aproximadamente 10 veces.

Las células madre o precursoras hematopoyéticas humanas que comprenden la composición terapéutica también se deben caracterizar por un perfil de expresión genética en el que el promedio de veces de cambio de todos los genes distintivos es al menos aproximadamente 2, 4, o 6 veces. En algunas realizaciones, el promedio de veces de cambio de todos los genes distintivos es al menos aproximadamente 4. En algunas realizaciones, el promedio de veces de cambio de todos los genes distintivos es al menos aproximadamente 6. En algunas realizaciones, el promedio de veces de cambio de al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o un 90 % de los genes distintivos es al menos 6 veces. En algunas realizaciones, el promedio de veces de cambio de al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o un 90 % de los genes distintivos es al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. En realizaciones en particular, la composición terapéutica se puede caracterizar por un perfil de expresión genética que tiene el promedio de veces de cambio para todos los genes distintivos como se representa en la Figura 14(B), la Figura 15(B), o la Figura 16(B).

El elemento distintivo de la expresión genética de las células madre o precursoras hematopoyéticas humanas que comprende la composición terapéutica se puede analizar, es decir, obtener, después de tratar las células con un agente, o las células se pueden incubar durante un cierto periodo de tiempo después del tratamiento antes de analizar el elemento distintivo de la expresión genética de las células. Por ejemplo, las células se pueden tratar *ex vivo* con un agente, se pueden lavar para retirar el agente, y la expresión genética se puede analizar sin incubación adicional de las células. Como alternativa, en algunas realizaciones, las células se tratan con un agente, se lavan para retirar el agente de la población celular, y a continuación las células incuban *ex vivo* durante un cierto periodo de tiempo antes de analizar el elemento distintivo de la expresión genética de las células.

En algunas realizaciones, las células se lavan para retirar el agente y a continuación se incuban de una a seis horas antes de analizar el elemento distintivo de la expresión genética de las células. En algunas realizaciones, las células se lavan y a continuación se incuban durante al menos aproximadamente una hora antes de analizar el elemento distintivo de la expresión genética de las células. En algunas realizaciones, las células se lavan y a continuación se incuban durante aproximadamente dos horas antes de analizar el elemento distintivo de la expresión genética de las células.

"Expresión genética", como se usa en el presente documento, se refiere a los niveles relativos de expresión y/o patrón de expresión de un gen en una muestra biológica, tal como las células madre y precursoras hematopoyéticas, o población de células madre o precursoras hematopoyéticas, en una composición terapéutica de la invención. La expresión de un gen se puede medir a nivel del ADNc, ARN, ARNm, o combinaciones de los mismos. "perfil de expresión genética" o "elemento distintivo de la expresión genética" se refiere a los niveles de expresión de múltiples genes diferentes medidos para la misma muestra, es decir, una población de células.

En el presente documento está incluido cualquier método disponible en la técnica para detectar la expresión de los genes que caracterizan las células que comprenden la composición terapéutica de la invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "detectar la expresión" se refiere a determinar la cantidad por presencia de una transcripción de ARN o subproducto de expresión de un gen. Los métodos para detectar la expresión de genes, es decir, formación de perfiles de expresión genética, incluyen métodos basados en análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en secuenciación de polinucleótidos, métodos de inmunohistoquímica, y métodos basados en proteómica. Los métodos detectan generalmente de productos de expresión (por ejemplo, ARNm) de los genes de interés. En algunas realizaciones, se usan métodos basados en PCR, tales como PCR de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis *et al.*, TIG 8: 263-64, 1992), y métodos basados en matriz tales como micromatriz (Schna *et al.*, Science 270: 467-70, 1995). Por "micromatriz" se hace referencia a una colocación ordenada elementos de matriz hibridables, tales como, por ejemplo, sondas de polinucleótido, en un sustrato. El término "sonda" se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse de forma selectiva a una biomolécula diana pretendida de forma específica, por ejemplo, una transcripción de nucleótido o una proteína codificada por o que corresponde a un gen intrínseco. Alguien con experiencia en la materia puede sintetizar sondas, o se pueden obtener a partir de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas se pueden diseñar de forma específica para su etiquetado. Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, aptámeros, proteínas, anticuerpos, y moléculas orgánicas.

En la técnica se conocen bien algunos métodos generales para extracción de ARN y se desvelan en libros de texto convencionales de biología molecular, incluyendo Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987-1999. Algunos métodos para extracción de ARN a partir de tejidos embebidos en parafina se desvelan, por ejemplo, en Rupp y Locker (*Lab Invest.* 56: A67, 1987) y en De Andres *et al.* (*Biotechniques* 18: 42-44, 1995). En particular, el aislamiento del ARN se puede realizar usando un kit de purificación, un conjunto de tampón y proteasa a partir de fabricantes comerciales, tales como Qiagen (Valencia, Calif.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de las células en cultivo se puede aislar usando mini-columnas RNeasy de Qiagen. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el mercado incluyen MASTERPURE. Kit de Purificación Completa de ADN y ARN (Epicentre, Madison, Wis.) y Kit de Aislamiento de ARN en Bloque de Parafina (Ambion, Austin, Tex.). El ARN total de las muestras de tejido se puede aislar, por ejemplo, usando RNA Stat-60 (Tel-Test, Friendswood, Tex.). Además, grandes números de muestras de tejido se pueden procesar fácilmente usando técnicas bien conocidas para alguien con experiencia en la materia, tal como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN en una sola etapa de Chomczynski (documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.843.155).

El ARN aislado se puede usar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de PCR y matrices de sonda. Un método para la detección de los niveles de ARN implica la puesta en contacto del ARN aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se puede hibridar al ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido con una longitud de al menos 7, 15, 30, 60, 100, 250, o 500 nucleótidos y suficiente para hibridarse de forma específica en condiciones rigurosas a un gen intrínseco de la presente invención, o cualquier derivado de ADN o ARN. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el gen intrínseco en cuestión se está expresando.

En una realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo desarrollando el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde el gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, las sondas se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con las ondas, por ejemplo, en una matriz de chip de gen de Agilent. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de expresión de los genes intrínsecos de la presente invención.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión genética en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante RT-PCR (documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.683.202), reacción en cadena de ligasa (Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-93, 1991), replicación de

secuencias autosostenida (Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-78, 1990), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-77, 1989), Q-Beta Replicasa (Lizardi *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1197, 1988), replicación de círculo rodante (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.854.033), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por las personas con experiencia en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleicos y las moléculas de este tipo están presentes en recuentos muy bajos.

En particular aspectos de la invención en particular, la expresión genética se evalúa mediante RT-PCR cuantitativa. En la técnica se conocen numerosos protocolos diferentes de PCR o QPCR y en el presente documento se usan a modo de ejemplo a continuación y se pueden aplicar o adaptar directamente para su uso usando las composiciones descritas en la actualidad para la detección y/o cuantificación de los genes enumerados en la Tabla 3. Generalmente, en PCR, una secuencia de polinucleótidos diana se amplifica por reacción con al menos un cebador de oligonucleótido o par de cebadores de oligonucleótidos. El cebador o cebadores se hibridan a una región complementaria del ácido nucleico diana y una ADN polimerasa amplía el cebador o cebadores para amplificar la secuencia diana. En condiciones suficientes para proporcionar productos de amplificación de ácido nucleico basados en polimerasa, un fragmento de ácido nucleico de un tamaño domina los productos de reacción (la secuencia de polinucleótidos diana que es el producto de amplificación). El ciclo de amplificación se repite para aumentar la concentración de la secuencia de polinucleótidos diana individual. La reacción se puede realizar en cualquier termociclador usado normalmente para PCR. Sin embargo, los precedentes son los aparatos de ciclado con capacidades de medición de fluorescencia en tiempo real, por ejemplo, SMARTCYCLER (Cepheid, Sunnyvale, Calif.), ABI PRISM 7700. (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), ROTOR-GENE (Corbett Research, Sydney, Australia), LIGHTCYCLER (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, Ind.), ICYCLER (Biorad Laboratories, Hercules, Calif.) y MX4000 (Stratagene La Jolla, Calif.).

La PCR cuantitativa (QPCR) (también denominada PCR en tiempo real) es preferente en algunas circunstancias porque proporciona no solamente una medición cuantitativa, sino también una reducción del tiempo y la contaminación. En algunos casos, la capacidad de las técnicas de formación de perfiles de expresión genética completos es limitada debido a requisitos de tejido recién congelado y equipo de laboratorio especializado, haciendo que el uso de rutina de las tecnologías de este tipo sea difícil en una instalación clínica. Como se usa en el presente documento, "PCR cuantitativa (o "QPCR en tiempo real)" se refiere al control directo del progreso de la amplificación de PCR ya que se está produciendo sin la necesidad de toma de muestras repetidas de los productos de reacción. En la PCR cuantitativa, los productos de reacción se pueden controlar a través de un mecanismo de señalización (por ejemplo, fluorescencia) ya que se generan y se rastrean después de que la señal se eleve por encima de un nivel de fondo pero antes de que la reacción alcance una meseta. El número de ciclos necesarios para conseguir un nivel detectable o "umbral" de fluorescencia varía directamente con la concentración de las dianas amplificables al inicio del proceso de PCR, lo que permite una medida de la intensidad de la señal para proporcionar una medida de la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra en tiempo real.

En otra realización de la invención, para la formación de perfiles de expresión se usan micromatrices. Las micromatrices son particularmente muy adecuadas para este fin debido a la reproducibilidad entre diferentes experimentos. Las micromatrices de ADN proporcionan un método para la medición simultánea de los niveles de expresión de grandes números de genes. Cada matriz consta de un patrón reproducible de sondas de captura a un soporte sólido. El ARN o ADN etiquetados, se hibrida a sondas complementarias en la matriz y a continuación se detecta mediante barrido con láser.

Las intensidades de hibridación para cada sonda en la matriz se determinan y se convierten a un valor cuantitativo que representa niveles relativos de expresión genética. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.040.138, 5.800.992 y 6.020.135, 6.033.860, y 6.344.316. Las matrices de oligonucleótidos de alta densidad son particularmente útiles para determinar el perfil de expresión genética para un gran número de ARN en una muestra.

El análisis de micromatrices se puede realizar con equipo disponible en el mercado, siguiendo protocolos del fabricante, tales como usando la tecnología GenChip de Affymetrix, la tecnología Bead Array de Illumina, o la tecnología de micromatriz de inyección de tinta de Agilent.

Para eliminar la variación de muestra la muestra se puede usar la "normalización". Para datos de micromatrices, el proceso de normalización tiene como objeto eliminar los errores sistemáticos equilibrando las intensidades de presencia de los dos colorantes de etiquetado. El sesgo del colorante puede provenir de diversas fuentes que incluyen diferencias en las suspicacias del etiquetado con el colorante, sensibilidades al calor y la luz, así como ajustes del escáner para el barrido de dos canales. Algunos métodos usados normalmente para calcular el factor de normalización incluyen: (i) normalización global que usa todos los genes en la matriz, tal como mediante análisis de múltiples matrices consistente a escala logarítmica (RMA); (ii) normalización de genes constitutivos que usa genes constitutivos/invariables expresados constantemente; y (iii) normalización de controles internos que usa una cantidad conocida de genes de control exógeno añadidos durante la hibridación (Quackenbush (2002) *Nat. Genet.* 32 (Supl.), 496-501). En una realización, la expresión de los genes desvelados en el presente documento se puede normalizar

a genes constitutivos de control o mediante análisis de múltiples matrices consistente a escala logarítmica (RMA).

En diversas realizaciones ilustrativas, la presente invención proporciona, en parte, una composición terapéutica que comprende una población de células para su uso en un trasplante, por ejemplo, un trasplante de médula ósea. Como se usa en el presente documento, la expresión "población de células" se refiere a una población heterogénea u
 5 homogénea de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas. La población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas puede ser de células de médula ósea, células de sangre del cordón umbilical, o células de sangre periférica movilizada, o una población de células obtenidas a partir de cualquier fuente adecuada, incluyendo médula ósea, sangre periférica movilizada, y sangre del cordón umbilical entre otros. La expresión "colección de células" también se refiere a una población de células, y en algunas
 10 realizaciones es sinónimo de "población de células". Sin embargo, no es necesario que una colección de células referencia a ninguna población de células en particular.

Las células madre y/o precursoras hematopoyéticas, tanto si se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica u otra fuente, se pueden cultivar, tratar o expandir en cualquier medio definido
 15 disponible en el mercado o adaptado, adecuado, con o sin suero, si se desea (véase, por ejemplo, Hartshorn *et al.*, *Cell Technology for Cell Products*, páginas 221-224, R. Smith, Editor; Springer Netherlands, ²⁰⁰⁷). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el medio sin suero puede utilizar albúmina y/o transferrina, que se ha mostrado que son útiles para el crecimiento y la expansión de células CD34⁺ en medio sin suero. Además, se pueden incluir citoquinas, tales como ligando Flt-3, factor de células madre (SCF), y trombopoyetina (TPO), entre otros. Las HSC también se
 20 pueden cultivar en recipientes tales como biorreactores (véase, por ejemplo, Liu *et al.*, *Journal of Biotechnology* 124: 592-601, ²⁰⁰⁶). Un medio adecuado para expansión de las HSC *ex vivo* también puede comprender células de soporte de HSC, tales como células del estroma (por ejemplo, células del estroma linforreticular), que se pueden obtener, por ejemplo, a partir de la desagregación de tejido linfoide, y que se ha mostrado que soportan el mantenimiento, crecimiento, y diferenciación de las HSC, así como su progenie, *in vitro*, *ex vivo*, e *in vivo*.

En realizaciones en particular, la población de células no se expande *ex vivo* o *in vitro* antes de su administración a un sujeto. En realizaciones en particular, se obtiene una población de células sin expandir, la población de células se trata *ex vivo* de acuerdo con el protocolo proporcionado en el presente documento, se puede lavar para eliminar el agente de tratamiento, y se puede administrar a un paciente sin expansión de la población celular *ex vivo*. En
 30 algunas realizaciones, las células se obtienen a partir de un donante, incluyendo sangre del cordón umbilical, y no se expanden antes o después del tratamiento de las células, o en cualquier momento antes de la administración de la composición terapéutica a un paciente. En una realización, una población de células sin expandirse tratáis se administra a un paciente antes de cualquier división celular sustancial *ex vivo* de las células en la población, o antes del tiempo necesario para cualquier división celular sustancial *ex vivo*. En otras realizaciones, una población de
 35 células sin expandir se trata y se administra a un paciente antes de cualquier mitosis *ex vivo* sustancial de las células en la población, poco antes del tiempo necesario para cualquier mitosis sustancial *ex vivo*. En algunas realizaciones, una población de células sin expandir se trata y se administra a un paciente antes del tiempo de duplicación de las células en la población. En algunas realizaciones, a una población de células sin expandir se trata y se administra a un paciente dentro de las 6, 12, o 24 horas de tratamiento de las células. En otras realizaciones, una población de
 40 células sin expandir se trata y se administra a un paciente dentro de las 2 horas de tratamiento de las células.

En diversas realizaciones, la población de células no se cultiva antes del tratamiento con un agente *ex vivo* o en cualquier momento antes de su administración a un paciente. En algunas realizaciones, la población de células se cultiva durante menos de aproximadamente 24 horas. En otras realizaciones, la población de células cultiva durante
 45 menos de aproximadamente 12 horas, 10 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, o dos horas.

En diversas realizaciones, la población de células que se trata con un agente como se describe en cualquier parte en el presente documento y que posteriormente se administra a un sujeto es una población de células heterogénea que incluye, médula ósea completa, sangre del cordón umbilical, sangre periférica movilizada, células madre hematopoyéticas, células precursoras hematopoyéticas, y la progenie de células madre o precursoras hematopoyéticas, incluyendo granulocitos (por ejemplo, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos), eritrocitos (por ejemplo, reticulocitos, eritrocitos), trombocitos (por ejemplo, megacarioblastos, megacarioblastos productores de plaquetas, plaquetas), y monocitos (por ejemplo, monocitos, macrófagos).
 50

En una realización, la composición terapéutica comprende una población celular que consta de aproximadamente un 100 % de células madre y precursoras hematopoyéticas. En algunas realizaciones, la población de células en la composición terapéutica tiene menos de aproximadamente un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, o un 30 % de células madre y precursoras hematopoyéticas. En algunas realizaciones la población de células tiene
 60 menos de aproximadamente un 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, o un 30 % de células CD34⁺. En otras realizaciones, la población de células tiene de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 %, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 15 %-20 %, aproximadamente un 20 %-25 %, aproximadamente un 25 %-30 %, aproximadamente un 30 %-35 %, aproximadamente un 35 %-40 %, aproximadamente un 40 %-45 %, aproximadamente un 45 %-50 %, aproximadamente un 60 %-70 %, aproximadamente un 70 %-80 %, aproximadamente un 80 %-90 %, aproximadamente un 90 %-95 %, o de
 65

- aproximadamente un 95 % a aproximadamente un 100 % de células madre y precursoras hematopoyéticas. En realizaciones en particular, la población de células tiene de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 %, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %- aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 15 %-20 %, aproximadamente un 20 %-25 %, aproximadamente un 25 %-30 %, aproximadamente un 30 %-35 %, aproximadamente un 35 %-40 %, aproximadamente un 40 %-45 %, aproximadamente un 45 %-50 %, aproximadamente un 60 %-70 %, aproximadamente un 70 %-80 %, aproximadamente un 80 %-90 %, aproximadamente un 90 %-95 %, o aproximadamente un 95 % a aproximadamente un 100 % de células CD34⁺.
- 5 Las células en la composición terapéutica de la invención pueden ser autólogas/autogénicas ("auto") o no autólogas ("no auto", por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). "Autólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que se diferencian genéticamente con respecto a la célula en comparación. "Singénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas con respecto a la célula en comparación. "Xenogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente con respecto a la célula en comparación. En realizaciones en particular, las células de la invención son alogénicas.
- 10 Una "célula madre" se refiere a una célula que es una célula diferenciada capaz de (1) autorrenovación a largo plazo, o la capacidad de generar al menos una copia idéntica de la célula original, (2) diferenciación al nivel celular individual en múltiples, y en algunos casos solamente uno, tipo de célula especializada y (3) de regeneración de tejidos funcional *in vivo*. Las células madre se subclasifican, de acuerdo con su potencial de desarrollo, como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y oligo/unipotentes. Una "célula precursora" también tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en más células maduras, pero está destinada a un linaje (por ejemplo, los precursores hematopoyéticos están comprometidos con el linaje sanguíneo; los precursores mieloides están comprometidos con el linaje mieloides; los precursores linfoides están comprometidos con el linaje linfoides), mientras que las células madre no están necesariamente limitadas de este modo. "Autorrenovación" se requiere una célula con una capacidad única para producir células hijas no alteradas y por lo tanto suministrar y mantener sus índices de población, y para generar tipos de células especializadas (potencia). La autorrenovación se puede conseguir de dos formas. La división celular asimétrica produce una célula hija que es idéntica a la célula precursora y una célula hija que es diferente a la célula precursora y es una célula precursora o diferenciada más comprometida. La división celular simétrica produce dos células hijas idénticas. "Proliferación" o "expansión" de células se refiere a células que se dividen de forma simétrica.
- 20 Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células precursoras hematopoyéticas comprometidas (HPC) que son capaces de generar todo el repertorio de células sanguíneas maduras durante el periodo de vida de un organismo. La expresión "célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a células madre multipotentes que da lugar a todos los tipos de células sanguíneas de un organismo, incluyendo los linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linajes linfoides (por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK), y otros conocidos en la técnica (Véase Fei, R., *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.635.387; McGlave, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.460.964; Simmons, P., *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.677.136; Tsukamoto, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.750.397; Schwartz, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.759.793; DiGuisto, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.681.599; Tsukamoto, *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.716.827). Cuando se trasplantan en animales o seres humanos irradiados de forma letal, las células madre hematopoyéticas pueden repoblar la combinación de células hematopoyéticas eritroides, neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y linfoides.
- 25 Las HSC se pueden identificar de acuerdo con ciertos marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, las HSC se pueden identificar por su tamaño pequeño, falta de marcadores de linaje (lin), baja tinción (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 (rodamina^{DULL}, también denominada rho^{lo}) u Hoechst 33342, y presencia de diversos marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen al grupo de series de diferenciación (por ejemplo, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, y c-kit, el receptor para el factor de células madre). Las HSC son principalmente negativas para los marcadores que se usan habitualmente para detectar el compromiso del linaje y, por lo tanto, a menudo se denominan células Lin(-). La mayoría de las HSC humanas se pueden caracterizar como CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, C-kit/CD117⁺, y Lin(-). Sin embargo, no todas las células madre están cubiertas por estas combinaciones, ya que ciertas HSC son CD34⁺/CD38⁻. También algunos estudios sugieren que las primeras células madre pueden carecer de c-kit en la superficie celular. Para las HSC humanas, CD133 puede representar un marcador temprano, ya que se ha demostrado que las HSC tanto CD34⁺ como CD34⁻ son CD133⁺. En la técnica se sabe que las células CD34⁺ y Lin(-) también incluyen células precursoras hematopoyéticas.
- 30 Las fuentes adecuadas de células madre o precursoras hematopoyéticas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células aisladas u obtenidas de un órgano del cuerpo que contiene células de origen hematopoyético. Por "aislado" se hace referencia al material que se retira de su entorno original. Por ejemplo, una célula se aísla si se separa de algunos o todos los componentes que normalmente la acompañan en su
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

estado nativo. Por ejemplo, una "población de células aislada", una "fuente de células aislada" o "células madre y precursoras hematopoyéticas aisladas" y similares, se refieren a la separación *in vitro* o *ex vivo* de una o más células de su entorno celular natural, y de asociación con otros componentes del tejido u órgano, es decir, no se asocian de forma significativa con sustancias *in vivo*.

5 Las células madre y precursoras hematopoyéticas para su uso en los métodos de la presente invención pueden presentar agotamiento de células hematopoyéticas maduras tales como linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos, células eritroides y sus precursores comprometidos a partir de aspiración de médula ósea, sangre de cordón umbilical, o sangre periférica movilizada (producto de leucoféresis
10 movilizada). Las células maduras comprometidas con el linaje se empobrecen mediante inmunoempobrecimiento, por ejemplo, mediante el etiquetado de sustratos sólidos con anticuerpos que se unen a un panel de los denominados antígenos de "linaje": CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, y CD235a. Se puede realizar una etapa posterior para purificar aún más la población de células, en la que un sustrato etiquetado con anticuerpos que se unen al antígeno CD34⁺ se usa para aislar células madre y precursoras hematopoyéticas
15 primitivas. Los kits están disponibles en el mercado para purificar células madre y precursoras hematopoyéticas de diversas fuentes celulares y en realizaciones en particular, estos kits son adecuados para su uso con los métodos de la presente invención. Los kits disponibles en el mercado a modo de ejemplo para purificar células madre y precursoras hematopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, Kit de Agotamiento de Linaje (Lin) (Miltenyi Biotec); kit de enriquecimiento de CD34⁺ (Miltenyi Biotec); RosettaSep (Stem Cell Technologies).

20 La población de las que comprende la composición terapéutica de la invención, en algunas realizaciones, comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células madre mesenquimales. En realizaciones en particular, la población de células comprende no más de aproximadamente un 10 % de células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales (MSC) son células madre multipotentes
25 que se pueden diferenciar fácilmente en linajes que incluyen osteoblastos, miocitos, condrocitos, y adipocitos (Pittenger, *et al.*, *Science*, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth, *et al.*, *Bone*, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, *Science*, Vol. 276, pg. 71 (1997)).

30 En otras realizaciones, la población de células que comprende la composición terapéutica de la invención comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células precursoras endoteliales. En otras realizaciones, la población de células comprende menos de aproximadamente un 10 % de células precursoras endoteliales. Como se usa en el presente documento, "célula precursora endotelial" se refiere a una célula multipotente o unipotente con el potencial de diferenciarse en células endoteliales vasculares.

35 En realizaciones más particulares, la población de células comprende nomás de aproximadamente un 10 % de células madre mesenquimales o células precursoras endoteliales.

40 La población de células tal como se obtiene a partir de un donante, o tal como se proporciona de otro modo, puede estar sustancialmente libre de células madre mesenquimales y/o células precursoras endoteliales, y en realizaciones en particular comprende menos de aproximadamente un 10 % de células madre mesenquimales y que menos de aproximadamente un 10 % de células precursoras endoteliales. Como alternativa, la población de células puede presentar agotamiento de células madre mesenquimales y/o células precursoras endoteliales usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando técnicas de selección inmunomagnética, clasificación celular activada por fluorescencia, o una combinación en las mismas. Los métodos de agotamiento pueden comprender
45 adicionalmente el uso de al menos un anticuerpo específico para al menos uno de los marcadores de superficie celular que se describen en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, la población de células presenta agotamiento de células precursoras endoteliales, incluyendo células positivas para el marcador de superficie celular CD14 y negativas para CD45 (CD14⁺/CD45⁻) y/o células positivas para VWF (Factor de Von Willebrand) (VWF⁺). En otras realizaciones, la población celular presenta agotamiento de células positivas para CD73 y/o marcadores de superficie celular CD140B. En realizaciones en particular de la invención, la población de células comprende células positivas para el marcador de superficie celular CD34, y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células positivas para un marcador de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD73, CD140B, CD14 y VWF.

55 En realizaciones en particular, la población de células que comprende la composición terapéutica de la invención comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD14⁺/CD45⁻. En otras realizaciones de la invención, la población de células comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células VWF⁺. En otras
60 realizaciones de la invención, la población de células comprende células CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD140B⁺.

65 En realizaciones más particulares, la población de células comprende células madre o precursoras hematopoyéticas CD34⁺ y comprende menos de aproximadamente un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células CD14⁺/CD45⁻, células VWF⁺, células CD73⁺, y células CD140B⁺. En algunas realizaciones, la población de células es positiva para el marcador de superficie celular CD34 y es negativa para al menos un marcador de superficie

celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD14, VWF, CD73, y CD140B. En otras realizaciones, la población de células es positiva para el marcador de superficie celular CD34 y es negativa para al menos los marcadores de superficie celular CD14, VWF, CD73, y CD140B.

5 Las células madre y precursoras hematopoyéticas se pueden obtener o aislar a partir de médula ósea de adultos sin fraccionar o fraccionada, que incluye fémures, cadera, costillas, esternón, y otros huesos. Las células madre y precursoras hematopoyéticas se pueden obtener o a aislar directamente mediante extracción de la cadera usando una aguja y jeringa, o de la sangre, a menudo después de tratamiento previo con citoquinas, tales como G-CSF (factores estimulantes de colonias de granulocitos), que inducen la liberación o movilización de las células del
10 compartimento de la médula ósea. Otras fuentes de células madre o precursoras hematopoyéticas incluyen sangre del cordón umbilical, sangre de placenta, y sangre periférica movilizada. Para fines experimentales, algunas fuentes útiles de células madre o precursoras hematopoyéticas también son hígado fetal, bazo fetal, médula de riñón, y AGM (región de Aorta-gónadas-mesonefros) de animales.

15 En realizaciones en particular, las células madre o precursoras hematopoyéticas se cosechan a partir de una fuente hematopoyética, por ejemplo, células de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o células de sangre periférica movilizada. La "cosecha" de células madre y precursoras hematopoyéticas se define como la extracción o separación de células de la matriz. Esto se puede realizar usando una serie de métodos, tales como métodos enzimáticos, no enzimáticos, con centrifugadora, eléctricos, o basados en el tamaño, o preferentemente, mediante
20 dilatación de las células usando medios (por ejemplo, medios en los que se incuban las células). En realizaciones en particular, la cosecha de una cantidad suficiente de células para trasplante puede requerir la movilización de las células madre y precursoras en el donante.

"Movilización de células madre hematopoyéticas" se refiere a la liberación de células madre de la médula ósea en la circulación de la sangre periférica para leucoféresis, antes del trasplante de células madre. Para estimular la
25 movilización a menudo se usan factores de crecimiento hematopoyéticos, por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o agentes quimioterapéuticos. Existen fármacos comerciales para movilización de células madre y se pueden usar en combinación con G-CSF para movilizar cantidades suficientes de células madre o precursoras hematopoyéticas para su trasplante en un sujeto. Por ejemplo, G-CSF y Mozobil™ (Genzyme Corporation) se pueden administrar a un donante para cosechar un número suficiente de células hematopoyéticas para trasplante.
30

Mediante el aumento del número de células madre cosechadas a partir del donante, el número de células madre disponibles para trasplante de nuevo en un sujeto se puede aumentar de forma significativa el resultado del sujeto, reduciendo desembocó potencialmente el tiempo de injerto, y en consecuencia conduciendo a una disminución del tiempo durante el que el sujeto presenta una cantidad insuficiente de neutrófilos y plaquetas, evitando de este modo infecciones, sangrado otras complicaciones. Otros métodos para la movilización de células madre y precursoras hematopoyéticas podrían ser evidentes para alguien con experiencia en la materia.
35

40 En realizaciones en particular, las células madre o precursoras hematopoyéticas se obtienen a partir de sangre del cordón umbilical. La sangre del cordón umbilical se puede cosechar de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 7.147.626 y 7.131.958, incorporados en el presente documento por referencia para metodologías de este tipo).

45 En una realización, células madre y precursoras hematopoyéticas para su uso en la composición terapéutica y métodos de la invención se pueden obtener a partir de fuentes de células madre pluripotentes, por ejemplo, células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y células madre embrionarias (ESC). Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre pluripotente inducida" o "iPSC" se refiere a una célula no pluripotente que se ha reprogramado para un estado pluripotente. Una vez que las células de un sujeto se han preprogramado para un estado pluripotente, las células se pueden programar a continuación para un tipo celular deseado, tal como una
50 célula madre o precursora hematopoyética. Como se usa en el presente documento, el término "reprogramación" se refiere a un método para aumentar la potencia de una célula para un estado menos diferenciado. Como se usa en el presente documento, el término "programación" se refiere a un método para disminuir la potencia de una célula o para diferenciar la célula para un estado más diferenciado.
55

En diversas realizaciones, la invención contempla la administración de la composición terapéutica a un paciente humano, o un sujeto con necesidad de terapia. La cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas contenidas en la composición terapéutica y administradas a un paciente variará con la fuente de las células, patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de las células madre y precursoras hematopoyéticas para
60 provocar una respuesta deseada en el individuo.

En una realización, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas (por ejemplo, CD34⁺, células Lin(-)) en la composición terapéutica administrada a un sujeto es la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en una muestra de sangre de cordón umbilical parcial o individual, o al menos 0,1 x 10⁵ células, al menos 0,5 x 10⁵ células, al menos 1 x 10⁵ células, al menos 5 x 10⁵ células, al menos 10 x 10⁵ células, al menos 0,5 x 10⁶ células, al menos 0,75 x 10⁶ células, al menos 1 x 10⁶ células, al menos 1,25 x 10⁶ células, al menos
65

1,5 x 10⁶ células, al menos 1,75 x 10⁶ células, al menos 2 x 10⁶ células, al menos 2,5 x 10⁶ células, al menos 3 x 10⁶ células, al menos 4 x 10⁶ células, al menos 5 x 10⁶ células, al menos 10 x 10⁶ células, al menos 15 x 10⁶ células, al menos 20 x 10⁶ células, al menos 25 x 10⁶ células, o al menos 30 x 10⁶ células.

5 En una realización en particular, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas (por ejemplo, CD34⁺, células Lin(-)) en la composición terapéutica es la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en una muestra de sangre de cordón umbilical parcial o individual, o de aproximadamente 0,1 x 10⁵ células a aproximadamente 10 x 10⁵ células; de aproximadamente 0,5 x 10⁶ células a aproximadamente 5 x 10⁶ células; de aproximadamente 1 x 10⁶ células a aproximadamente 3 x 10⁶ células; de aproximadamente 1,5 x 10⁶ células a aproximadamente 2,5 x 10⁶ células; o de aproximadamente 2 x 10⁶ células a aproximadamente 2,5 x 10⁶ células.

15 En una realización en particular, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en la composición terapéutica es la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en una muestra de sangre de cordón umbilical parcial o individual, o de aproximadamente 1 x 10⁵ células a aproximadamente 3 x 10⁵ células; de aproximadamente 1,0 x 10⁶ células a aproximadamente 5 x 10⁶ células; de aproximadamente 1,0 x 10⁶ células a aproximadamente 10 x 10⁶ células, de aproximadamente 10 x 10⁶ células a aproximadamente 20 x 10⁶ células, de aproximadamente 10 x 10⁶ células a aproximadamente 30 x 10⁶ células, o de aproximadamente 20 x 10⁶ células a aproximadamente 30 x 10⁶ células.

20 En otra realización, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en la composición terapéutica es la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en una muestra de sangre de cordón umbilical parcial o individual, o de aproximadamente 1 x 10⁶ células a aproximadamente 30 x 10⁶ células; de aproximadamente 1,0 x 10⁶ células a aproximadamente 20 x 10⁶ células; de aproximadamente 1,0 x 10⁶ células a aproximadamente 10 x 10⁶ células, de aproximadamente 2,0 x 10⁶ células a aproximadamente 30 x 10⁶ células, de aproximadamente 2,0 x 10⁶ células a aproximadamente 20 x 10⁶ células, o de aproximadamente 2,0 x 10⁶ células a aproximadamente 10 x 10⁶ células.

30 En una realización en particular, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en la composición terapéutica es aproximadamente 1 x 10⁶ células madre o precursoras hematopoyéticas, aproximadamente 2 x 10⁶ células, aproximadamente 5 x 10⁶ células, aproximadamente 7 x 10⁶ células, aproximadamente 10 x 10⁶ células, aproximadamente 15 x 10⁶ células, aproximadamente 17 x 10⁶ células, aproximadamente 20 x 10⁶ células aproximadamente 25 x 10⁶ células, o aproximadamente 30 x 10⁶ células.

35 En una realización, la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas) en la composición terapéutica administrada a un sujeto es la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en una muestra de sangre de cordón umbilical parcial o individual, o al menos 0,1 x 10⁵ células/kg de peso corporal, al menos 0,5 x 10⁵ células/kg de peso corporal, al menos 1 x 10⁵ células/kg de peso corporal, al menos 5 x 10⁵ células/kg de peso corporal, al menos 10 x 10⁵ células/kg de peso corporal, al menos 0,5 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 0,75 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 1 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 1,25 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 1,5 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 1,75 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 2 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 2,5 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 3 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 4 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 5 x 10⁶ células /kg de peso corporal, al menos 10 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 15 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 20 x 10⁶ células/kg de peso corporal, al menos 25 x 10⁶ células/kg de peso corporal, o al menos 30 x 10⁶ células/kg de peso corporal.

50 Sin desear quedar ligado por ninguna teoría en particular, la presente invención contempla, en parte, que una de las ventajas de los presentes métodos es que en un trasplante se puede usar una pequeña cantidad de células madre y precursoras hematopoyéticas porque el aumento de células madre y precursoras hematopoyéticas en la composición terapéutica de la invención presenta un aumento del potencial de injerto, una mejora de la migración dirigida, y aumento de la capacidad para expansión *in vivo* en comparación con células tratadas de control y células tratadas con un agente a 4 °C, por ejemplo.

C. Métodos de la Invención

55 Los presentes inventores analizaron varios parámetros biológicos de poblaciones de células madre o precursoras hematopoyéticas tratadas con agentes que modifican la expresión genética de las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de la prostaglandina y que regulan de forma positiva la expresión genética y de superficie celular de CXCR4 para aumentar la eficacia de las células madre o precursoras hematopoyéticas usadas en trasplantes de células madre. La eficacia de la población celular en la reconstitución del sistema hematopoyético de un sujeto después del trasplante depende de propiedades tales como la capacidad de la población celular para migrar de forma dirigida y para injertarse en la médula ósea, autorrenovación, y para proliferar *in vivo*. La invención proporciona un método para modular una población de células para mejorar las propiedades celulares de este tipo y para proporcionar mejoras terapéuticas resultantes en la reconstitución hematopoyética.

65 El "potencial de injerto" se refiere a la capacidad de una célula para injertarse. En realizaciones en particular, el

potencial injerto de una célula madre o precursora hematopoyética, tal como una célula CD34⁺, Lin(-), se puede determinar mediante la medición, por ejemplo, de la actividad de las rutas de señalización celular de PGE₂R₂/R₄, la expresión en la célula de genes asociados con la migración dirigida o injerto, la viabilidad celular, y la capacidad de la célula para autorrenovarse. Por supuesto, el experto en la materia podría observar otros ensayos adecuados que también podrían indicar un aumento del potencial de injerto en una célula madre o precursora hematopoyética. Como se usa en el presente documento, el término "injerto" se refiere a la capacidad de una célula para integrarse en una ubicación, tal como un tejido, y persistir en la ubicación en particular en el tiempo, por ejemplo, la capacidad de una célula madre o precursora hematopoyética para integrarse y persistir en la médula ósea. "Migración dirigida" se refiere a la capacidad de las células madre o precursoras hematopoyéticas para localizar, es decir, desplazarse, a un área o tejido en particular, tal como localización de células madre trasplantadas a la médula ósea.

En diversas realizaciones, la invención proporciona una composición terapéutica que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas humanas puestas en contacto con uno o más agentes capaces de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de la prostaglandina, por ejemplo, la ruta de señalización celular de PGE₂R₂/R₄. La composición terapéutica de las células tratadas ofrece numerosas ventajas con respecto a las células usadas previamente en trasplantes de células madre, tales como, por ejemplo, aumento de la migración dirigida, injerto y expansión de la población celular *in vivo*. Como se usa en el presente documento, "agente" se refiere a un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células. Los agentes de este tipo incluyen, por ejemplo y sin limitación, PGE₂ o agentes que tienen actividad de dmPGE₂, que incluyen, pero no se limitan a, un análogo de PGE₂, un análogo o activador de AMPc, y/o un activador de Gα-s como se describe en cualquier parte del presente documento. En realizaciones en particular, una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas se puede poner en contacto con 1, 2, 3, 4, 5 o más agentes en cualquier combinación, de forma simultánea o de forma secuencial.

Las células madre o precursoras hematopoyéticas humanas puestas en contacto con un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células, tal como PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o potencial y/o expansión de injerto, se pueden caracterizar de múltiples y diversas formas, tales como mediante el aumento de los niveles de señalización de AMPc intracelular, por ejemplo, fosforilación de CREB, o tal como se determina mediante un ensayo bioquímico; elementos distintivos de la expresión genética que indican regulación positiva de genes implicados en la ruta de señalización de PGE₂R₂/R₄, por ejemplo, CREM, y genes que aumentan la migración dirigida y el injerto de células madre y precursoras hematopoyéticas, por ejemplo, CXCR4, tal como se determina mediante ensayos de expresión genética, por ejemplo, micromatrices; disminución no mensurable de la viabilidad de células madre y precursoras hematopoyéticas tal como se determina mediante ensayos de viabilidad celular, por ejemplo, tinción con 7-aminoactinomicina D (7-AAD); y/o un aumento de la capacidad de las células madre hematopoyéticas para autorrenovarse tal como se determina mediante ensayos de unidades formadoras de colonias (CFU-C) *in vitro*, por ejemplo.

En una realización, las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4 en las células, tal como PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o potencial y/o expansión de injerto se pueden identificar examinando el elemento distintivo de la expresión genética de las células puestas en contacto (tratadas) en comparación con las células tratadas con vehículo o las células tratadas con un agente a 4 °C.

En realizaciones en particular, las células madre o precursoras hematopoyéticas tratadas que presentan un aumento del injerto y/o potencial de injerto y/o aumento de la expansión *in vivo* presentan un aumento de la expresión de 1, 2, 3, 4, 5, o todos los genes siguientes en comparación con las células tratadas con vehículo o las células tratadas con un agente a 4 °C: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), y receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4). En realizaciones específicas de la invención, CXCR4 está regulado de forma positiva en al menos cuatro veces en las células madre o precursoras hematopoyéticas en la composición terapéutica en comparación con el nivel de expresión de CXCR4 en las células no tratadas.

A diferencia de las observaciones obtenidas a partir de estudios preclínicos, los presentes inventores descubrieron que las células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con un agente que estimula la ruta de la prostaglandina aumenta la expansión y potencial de injerto de las células en condiciones en particular que se describen en el presente documento. Estas condiciones optimizan la respuesta biológica deseada del tratamiento con un agente que estimula la ruta de la prostaglandina, incluyendo la migración dirigida, supervivencia, proliferación, e injerto de células madre.

Por lo tanto, los inventores descubrieron que las condiciones de las que se creía que disminuyan la viabilidad de las células madre y precursoras hematopoyéticas y que disminuyan las semivida de dmPGE₂ de forma inesperada dan como resultado células madre o precursoras hematopoyéticas que presentan un aumento del potencial de injerto y/o expansión *in vivo* porque conservan la viabilidad celular, aumentan la migración dirigida y el injerto a la médula ósea (por ejemplo, aumento de la expresión de CXCR4), y aumentan la capacidad de autorrenovación celular.

Por consiguiente, la invención contempla nuevos métodos para dirigir trasplantes de médula ósea, sangre periférica, y sangre del cordón umbilical, en parte, tratando poblaciones de células madre o precursoras hematopoyéticas con agentes que se describen en el presente documento que regulan de forma positiva la expresión de CXCR4 en las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de señalización celular de PGE₂R₂/R₄, tales como dmPGE₂, en condiciones que no se esperaba que fueran favorables para aumentar el injerto de células madre y precursoras hematopoyéticas o expansión *in vivo* de células madre o precursoras hematopoyéticas.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "condiciones suficientes", o "en condiciones suficientes", se refieren a las condiciones de incubación para tratar la fuente de material de trasplante, por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica, o células de sangre del cordón umbilical, y/u otras poblaciones de células que comprenden células madre y/o células precursoras hematopoyéticas, y/o poblaciones enriquecidas o seleccionadas de células madre o precursoras hematopoyéticas, con un agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células. En una realización, las condiciones son suficientes para aumentar el injerto de células madre o precursoras hematopoyéticas administradas a un sujeto. En una realización, las condiciones son suficientes para aumentar la expansión de células madre o precursoras hematopoyéticas administradas a un sujeto.

En otra realización, las condiciones suficientes para aumentar el injerto y la expansión de la población de células madre o precursoras hematopoyéticas administradas a un sujeto. Las condiciones de incubación incluyen, pero no se limitan a, fuente de las células, concentración de agente, duración de incubación de las células y el agente, y la temperatura de la incubación. En realizaciones en particular, el agente es PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂. En una realización, el agente es 16,16-dimetil PGE₂.

En diversas realizaciones, las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión de células madre o precursoras hematopoyéticas incluyen, incubación a una temperatura fisiológicamente relevante, tal como un intervalo de temperaturas de aproximadamente 39 °C (de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente la temperatura corporal), incluyen, pero no se limitan a, temperaturas de aproximadamente 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, y 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 120 µM de 16,16-dimetil PGE₂, que incluyen, pero no se limitan a, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 1 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 20 µM, aproximadamente 30 µM, aproximadamente 40 µM, aproximadamente 50 µM, aproximadamente 60 µM, aproximadamente 70 µM, aproximadamente 80 µM, aproximadamente 90 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 110 µM, o aproximadamente 120 µM, o cualquier otra concentración que aparezca de 16,16-dimetil PGE₂ (por ejemplo, .1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM); e incubación de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 4 horas, incluye, pero no se limita a, incubación durante un periodo de tiempo de aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 100 minutos, aproximadamente 110 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 2,5 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 3,5 horas o aproximadamente 4 horas o cualquier otra duración de incubación que aparezca (por ejemplo, 111 minutos, 112 minutos, 113 minutos, 114 minutos, 115 minutos, 116 minutos, 117 minutos, 118 minutos, 119 minutos).

Como se usa en el presente documento, el término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere a una concentración, temperatura, duración, cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varíe en tanto como un 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o un 1 % con respecto a una concentración, temperatura, duración, cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. Por ejemplo, en una realización preferente, el término aproximadamente se refiere a un intervalo de cantidad descentrado aproximadamente en la cantidad específica más o menos un 10 %, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 37 °C se refiere a un intervalo de temperaturas de 33 °C a 41 °C. En otra realización preferente, el término aproximadamente se refiere a un intervalo de cantidades centrado en aproximadamente la cantidad específica más o menos un 5 %. En otra realización preferente, el término aproximadamente se refiere a un intervalo de cantidades centrado en aproximadamente la cantidad específica más o menos un 1 %.

En realizaciones en particular, las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de células madre o precursoras hematopoyéticas incluyen, incubación en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 39 °C; a una concentración final de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 25 µM de 16,16-dimetil PGE₂; e incubación de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, o de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas.

En otra realización, las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de células madre o precursoras hematopoyéticas incluyen, incubación a una temperatura de aproximadamente 37 °C (aproximadamente la temperatura corporal); a una concentración final de aproximadamente 10 µM o más de 16,16-dimetil PGE₂; e incubación durante aproximadamente dos horas.

En otra realización, la puesta en contacto de células de sangre del cordón umbilical, células de médula ósea, o células de sangre periférica movilizada que comprenden células madre o precursoras hematopoyéticas o una

población purificada de Lin(-)CD34⁺, células madre o precursoras hematopoyéticas con una concentración final de 10 µM de 16,16-dmPGE₂ (dmPGE₂) durante 120 minutos o más a una temperatura de 37 °C aumenta el potencial de injerto de las células madre o precursoras hematopoyéticas en la médula ósea de un sujeto. Las células puestas en contacto no muestran una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular, y muestran aumentos estadísticamente significativos en la expresión genética asociados con migración dirigida e injerto de células madre o precursoras hematopoyéticas, y la capacidad de autorrenovación.

En otra realización, la puesta en contacto de sangre del cordón umbilical, células de médula ósea, o células de sangre periférica movilizada que comprenden células madre o precursoras hematopoyéticas o una población purificada de Lin(-)CD34⁺, células madre o precursoras hematopoyéticas con una concentración final de 10 µM de 16,16-dmPGE₂ (dmPGE₂) durante 120 minutos o más a una temperatura de 37 °C aumenta la expansión *in vivo* de la población de células madre o precursoras hematopoyéticas administradas a un sujeto.

En diversas realizaciones, la invención proporciona, en parte, métodos para obtener y preparar una población de células para un trasplante de células madre y precursoras hematopoyéticas, que comprende poner en contacto la población de células con uno o más agentes que aumentan la expresión genética de CXCR4 en las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de señalización celular de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄, en las condiciones suficientes para aumentar el potencial de injerto y/o injerto de las células.

En realizaciones en particular, la invención proporciona, en parte, métodos para obtener y preparar una población de células para aumentar la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en un sujeto, que comprende poner en contacto la población de células con uno o más agentes que aumentan la expresión genética de CXCR4 en las células, incluyendo agentes que estimulan la ruta de señalización celular de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄, en las condiciones suficientes para aumentar la expansión de la población celular *in vivo*.

En otras diversas realizaciones, la invención proporciona, en parte, un método para aumentar el injerto de células madre y precursoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende poner en contacto una población de células que comprende células hematopoyéticas que expresan CD34 pero que carecen de expresión de Lin (por ejemplo, células, Lin(-)CD34⁺) con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂, y administrar la población de células a un sujeto. Las células se ponen en contacto con el agente en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto como se describe en cualquier parte en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona, en parte, un método para expandir una población de células madre y precursoras hematopoyéticas en un sujeto, *in vivo*, que comprende poner en contacto una población de células que comprende células hematopoyéticas expresan CD34 pero que carecen de expresión de lin (por ejemplo, células, Lin(-)CD34⁺) con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂, y administrar la población de células a un sujeto. Las células se ponen en contacto con el agente en condiciones suficientes para expandir la población de células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto como se describe en cualquier parte en el presente documento.

La invención contempla, en parte, métodos para aumentar el injerto de células madre en un sujeto con necesidad del mismo (por ejemplo, un ser humano) que comprende poner en contacto una población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica, y/o células de sangre del cordón umbilical) con PGE₂ o un análogo del mismo, por ejemplo, 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ y administrar las células al sujeto. En una realización, la fuente de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con un análogo de PGE₂ tal como dmPGE₂. En diversas realizaciones, la fuente de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con una gente que tiene actividad de dmPGE₂ tal como dmPGE₂, un análogo o potenciador de AMPc, o un activador de Gα-s.

En cierta realización, la población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con un análogo de PGE₂ tal como dmPGE₂ y un agente que tiene actividad de dmPGE₂, por ejemplo, un análogo o potenciador de AMPc, o un activador de Gα-s. En otra realización, la fuente de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con uno o más análogos de PGE₂, uno o más análogos o potenciadores de AMPc, y/o uno o varios activadores de Gα-s.

En otras diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para tratar un sujeto con necesidad del mismo que comprenden identificar a un sujeto con necesidad, y administran al sujeto una población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂), un agente que tiene actividad de dmPGE₂, por ejemplo, un análogo o potenciador de AMPc, y un activador de Gα-s en las condiciones suficientes para aumentar el injerto o expansión *in vivo* de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto, tratando de ese modo al sujeto con necesidad.

Con "potenciar" o "estimular", o "aumentar" o "activar" generalmente se hace referencia a la capacidad de PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ para producir o causar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquiera del vehículo o una molécula/composición de control, por ejemplo, aumento del injerto/potencial de injerto de células madre y/o precursoras y aumento de la expansión de células madre *in vivo*. Una respuesta fisiológica mensurable puede incluir un aumento del injerto, viabilidad, migración dirigida, autorrenovación, y/o expansión, de células madre y/o precursoras hematopoyéticas entre otras evidentes a partir de la comprensión en la técnica y de la descripción en el presente documento. En una realización, el aumento puede ser un aumento en la expresión genética como resultado del aumento de la señalización a través de las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄, que incluye, pero no se limita a, un aumento en la fosforilación de CREB, un aumento en la expresión de CREM, y un aumento en CXCR4. Los aumentos en injerto, viabilidad, migración dirigida, autorrenovación y/o expansión *in vivo* de células madre y/o precursoras hematopoyéticas, también se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica, tales como expresión genética, ensayos de CFU-C, ensayos de CFU-S, ensayos de CAFC, y expresión de proteína de superficie celular, entre otros. Un "aumento" o "potenciación" de la cantidad por lo general es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control. Por ejemplo, en realizaciones en particular, los métodos de la invención comprenden poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas con dmPGE₂ a aproximadamente 37 °C. Estas células presentan un aumento del potencial de injerto y expansión en comparación con las células puestas en contacto a aproximadamente 4 °C.

Por "disminuir" o "degradar", o "decrecer", o "reducir", o "bajar" generalmente se hace referencia a la capacidad de un PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ para producir o causar una respuesta fisiológica menor (es decir, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquiera del vehículo o una molécula/composición de control, por ejemplo, disminución de la apoptosis. En una realización, la disminución puede ser una disminución de la expresión genética o una disminución de la señalización celular que normalmente está asociada con una reducción de la viabilidad celular. Una cantidad "disminuida" o "reducida" por lo general es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la respuesta producida por el vehículo (la ausencia de un agente) o una composición de control. Por ejemplo, en realizaciones en particular, los métodos de la invención comprenden poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas con dmPGE₂ a aproximadamente 37 °C. Las células puestas en contacto no presentan una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular en comparación con las células puestas en contacto con dmPGE₂ a aproximadamente 4 °C.

Por "mantener", o "conservar", o "mantenimiento", o "sin cambio", o "sin cambio sustancial", o "sin disminución sustancial" generalmente se hace referencia a la capacidad de un PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ para producir o causar una respuesta fisiológica comparable (es decir, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por cualquiera del vehículo o una molécula/composición de control (respuesta de referencia). Una respuesta comparable es una que no es diferente de forma significativa o mensurablemente diferente de la respuesta de referencia (véase la Figura 13A). En una realización, una población de células que comprende células madre y precursoras hematopoyéticas se pone en contacto con un agente que estimula las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ y PGE₂R₄, tal como un agente que tiene actividad de dmPGE₂, por ejemplo, dmPGE₂, un análogo o potenciador de AMPc, y que un activador de Gα-s a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente dos horas. Las células tratadas no muestran una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular en comparación con las células puestas en contacto a aproximadamente 4 °C. En otras palabras, los métodos que se describen en el presente documento mantienen, no disminuyen sustancialmente, no dan como resultado una disminución estadísticamente significativa en, no causan una pérdida de, y/o no cambian de forma sustancial la viabilidad de las células madre y precursoras hematopoyéticas en comparación con células puestas en contacto a aproximadamente 4 °C.

En realizaciones en particular, las células se tratan con un agente, por ejemplo, dmPGE₂ durante un periodo de tiempo. En realizaciones relacionadas, las células se lavan después del tratamiento en un medio de cultivo celular de modo que se encuentran sustancialmente libres del agente. Por ejemplo, en una realización, una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas humanas, por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica movilizada, o células de sangre del cordón umbilical se pone en contacto con 16,16-dimetil PGE₂ durante un periodo de 120 minutos a aproximadamente 37 °C. Después de la incubación, pero antes de la infusión o tratamiento o almacenamiento posterior, las células se lavan con un medio de cultivo celular, tal como dextrano de bajo peso molecular con un 5 % de medio de albúmina de suero humano (LMD/HSA al 5 %) o medio Stem Span (Stem Cells Technology Inc.).

En diversas realizaciones ilustrativas, la invención proporciona, en parte, métodos de tratamiento *in vitro* o *ex vivo* que comprenden poner en contacto una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas con PGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ que mantiene la viabilidad de las células

madre/precursoras, y aumenta el injerto, migración dirigida, autorrenovación, y expansión *in vivo*.

La expresión "*ex vivo*" se refiere generalmente a actividades que se producen fuera de un organismo, tales como experimentación o mediciones realizadas en un sobre tejido vivo en un entorno artificial fuera del organismo, preferentemente con una alteración mínima de las condiciones naturales. En realizaciones en particular, los procedimientos "*ex vivo*" implicará células o tejidos vivos tomados de un organismo y cultivados en un aparato de laboratorio, normalmente en condiciones estériles comen por lo general durante unas pocas horas o hasta aproximadamente 24 horas, pero que incluyen hasta 48 o 72 horas, dependiendo de las circunstancias. En ciertas realizaciones, los tejidos o células de este tipo se pueden recoger y congelar, y posteriormente descongelar para tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo tisular que tienen periodos de duración más largos que unos pocos días usando células o tejidos vivos por lo general se consideran "*in vitro*", aunque en ciertas realizaciones, esta expresión se puede usar indistintamente con *ex vivo*.

Las expresiones "administración *ex vivo*", "tratamiento *ex vivo*", o "uso terapéutico *ex vivo*", se refieren generalmente a procedimientos médicos en los que uno o más órganos, células o tejidos se obtienen a partir de un sujeto vivo o recientemente fallecido, opcionalmente purificados/enriquecidos, expuestos a un tratamiento o procedimiento (por ejemplo, una etapa de administración *ex vivo* implica la incubación de las células con una composición o agente de la presente invención para aumentar la expansión de las células deseables, tales como células madre o precursoras hematopoyéticas). Las células tratadas *ex vivo* se pueden administrar al mismo o diferente sujeto vivo.

Las aplicaciones terapéuticas *ex vivo* de este tipo también pueden incluir un tratamiento o etapa del procedimiento *in vivo* opcional, tal como mediante la administración de las células puestas en contacto de la invención una o más veces con el sujeto vivo. Para estas realizaciones se contempla la administración tanto local como sistémica, de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica y como se describe en cualquier parte en el presente documento. La cantidad de células administradas a un sujeto dependerá de las características de ese sujeto, tales como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos, así como el grado, gravedad, y tipo de reacción al fármaco y/o trasplante celular.

La expresión "*in vivo*" generalmente se refiere a actividades que se producen dentro de un organismo, tales como injerto celular, migración celular dirigida, autorrenovación de células, y expansión de células. En una realización, la expresión "expansión *in vivo*" se refiere a la capacidad de una población celular para aumentar su número *in vivo*. En realizaciones en particular, la expansión *in vivo* incluye autorrenovación y/o proliferación de células madre.

En una realización, la invención proporciona, en parte, un método para preparar una población de células, por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica movilizada, células de sangre del cordón umbilical, para un trasplante, por ejemplo, trasplante de médula ósea que comprende poner en contacto las células *ex vivo*, con dmPGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de las células puestas en contacto cuando se administran a un sujeto.

En una realización en particular, la invención proporciona un método para tratar un sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética o reconstitución del sistema hematopoyético que comprende identificar a un sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética, y administrar al sujeto una cantidad de células madre y/o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con un agente capaz de aumentar la expresión genética de CXCR4, tal como dmPGE₂, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto, tratando de ese modo al sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética.

En otra realización en particular, la invención proporciona un método para tratar un sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético, un número creciente de células madre o precursoras hematopoyéticas, y/o expansión *in vivo* de células madre o precursoras hematopoyéticas que comprenden identificar a un sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética, y administrar al sujeto una cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con un agente que aumenta la expresión genética de CXCR4, tal como dmPGE₂ en las condiciones suficientes para aumentar la expansión *in vivo* de las células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto, tratando de ese modo al sujeto con necesidad de reconstitución hematopoyética.

Un "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que presente un síntoma que se pueda tratar con un agente o composición o dispositivo de la invención, o que se pueda tratar con las HSC o sangre del cordón umbilical que se han tratado *ex vivo* con un agente o composición de la invención. "Sujetos con necesidad" de reconstitución hematopoyética, reconstitución del sistema hematopoyético, un aumento del número de células madre o precursoras hematopoyéticas, y/o expansión *in vivo* de células madre o precursoras hematopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, sujetos que tienen o que se han diagnosticado con diversos tipos de leucemias, anemias, linfomas, mielomas, trastornos de deficiencia inmunitaria, y tumores sólidos como se discute en cualquier parte en el presente documento. Un "sujeto" también incluye un ser humano que es un candidato para trasplante de células madre o trasplante de médula ósea, como durante el transcurso del tratamiento para una neoplasia o un

componente de terapia genética. Los sujetos también pueden incluir individuos o animales que donan células madre o médula ósea para trasplante alogénico. En ciertas realizaciones, un sujeto puede haber experimentado terapia de radiación o quimioterapia, tal como durante diversos tratamientos para el cáncer. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo, o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (por ejemplo, un gato o perro). Están incluidos los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos. Los sujetos habituales incluyen animales que presentan cantidades anómalas (cantidades menores o mayores que las de un sujeto "normal" o "sano") de una o más actividades fisiológicas que se pueden modular con un agente o un trasplante de células madre o de médula ósea.

Los métodos adecuados para administrar poblaciones de células usadas en los métodos que se describen en el presente documento incluyen administración parenteral, que incluyen, pero no se limitan a, métodos de administración intravascular, tal como administración intravenosa e intraarterial. Los métodos ilustrativos adicionales para la administración de células de la invención incluyen inyección e infusión intramuscular, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

La administración de una "cantidad" de células madre o precursoras hematopoyéticas a un sujeto se refiere a la administración de "una cantidad eficaz", para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado, incluyendo sin limitación el tratamiento de sujeto. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de células madre o precursoras hematopoyéticas para fines en el presente documento se determina por lo tanto mediante consideraciones tales como las que se conocen en la técnica, y puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de las células madre y precursoras hematopoyéticas para provocar una respuesta deseada en el individuo. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye una cantidad que es eficaz para "tratar" un sujeto (por ejemplo, un paciente). Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de las células madre o precursoras hematopoyéticas se sopesa con los efectos terapéuticamente beneficios.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas eficaz para conseguir el resultado profiláctico deseado. Por lo general, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

En otra realización en particular, la invención contempla, un método para tratar un sujeto con necesidad de un trasplante de células madre/precursoras hematopoyéticas que comprende: seleccionar el sujeto con necesidad de un trasplante de células madre/precursoras hematopoyéticas y administrar a un sujeto, una población de células puestas en contacto *ex vivo* con dmPGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de las células puestas en contacto en un sujeto en comparación con las células no puestas en contacto. En realizaciones en particular, el sujeto tiene necesidad de reconstitución hematopoyética.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que incluyen, pero no se limitan a, conseguir una mejora o eliminación de los síntomas de una enfermedad. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente una enfermedad síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de conseguir una mejora o eliminación de los síntomas, o proporcionar una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un ser humano, e incluye: (a) evita que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no ha sido diagnosticado con la misma; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, producir la reversión de la enfermedad, por ejemplo, para eliminar total o parcialmente los síntomas de la enfermedad; y (d) restablecer un estado previo a la enfermedad en el individuo, por ejemplo, reconstituir el sistema hematopoyético.

"Tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o patología de una enfermedad o afección patológica, y puede incluir cualquier reducción mínima en uno o más marcadores mensurables de la enfermedad o afección que se está tratando. "Tratamiento" no indica necesariamente una erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o síntomas asociados a los mismos. En métodos en particular de la invención, tratamiento o tratar proporciona una mejora del injerto de una población celular en un sujeto, mejora de la reconstitución hematopoyética en un sujeto, o mejora de la supervivencia en un sujeto.

Los sujetos con necesidad de este tipo de tratamiento incluyen sujetos que padecen (por ejemplo, que están afectados con) trastornos sanguíneos no malignos, en particular inmunodeficiencias (por ejemplo, SCID, anemia de Fanconi, anemia aplásica grave, o hemoglobinopatías congénitas, o enfermedades de almacenamiento metabólico, tales como enfermedad de Hurler, enfermedad de Hunter, mannosidosis, entre otras) o cáncer, en particular neoplasias hematológicas, tales como leucemia aguda, leucemia crónica (mieloide o linfoide), linfoma (Hodgkin o no Hodgkin), mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, o cánceres no hematológicos tales como carcinoma de mama, carcinoma de colon, neuroblastoma, o carcinoma de células renales.

Los métodos de la invención se pueden usar para tratar cualquier enfermedad o trastorno en el que es deseable a aumentar la cantidad de células madre o precursoras hematopoyéticas en la médula ósea o movilizar células madre o precursoras hematopoyéticas a la médula ósea. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden usar para tratar pacientes que requieren un trasplante de médula ósea o un trasplante de células madre o precursoras hematopoyéticas, tales como pacientes con cáncer que se someten a quimioterapia y/o terapia de radiación. Los métodos de la presente invención son particularmente útiles en el tratamiento de pacientes que se someten a quimioterapia o terapia de radiación para el cáncer, incluyendo pacientes que padecen mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia, y tumores sólidos (cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, o cáncer pancreático). Los métodos de la presente invención también se pueden usar en el tratamiento de pacientes que padecen anemia aplásica, un trastorno inmunológico (síndrome de deficiencia inmunitaria combinada grave o lupus), mielodisplasia, talasemia, anemia drepanocítica o síndrome de Wiskott-Aldrich. Los trastornos tratados con los métodos de la invención pueden ser el resultado de un efecto secundario o complicación no deseados de otro tratamiento primario, como terapia de radiación, quimioterapia, o tratamiento con un fármaco supresor de la médula ósea, tal como zidovadina, cloranfenicol o gangciclovir. Los trastornos de este tipo incluyen neutropenias, anemias, trombocitopenia, y disfunción inmune. Además, los métodos de la invención se pueden usar para tratar daños a la médula ósea causados por exposición no intencionada a agentes tóxicos o radiación.

El trastorno a tratar también puede ser el resultado de una infección (por ejemplo, infección vírica, infección bacteriana o infección fúngica) que produce daño a las células madre o precursoras de la médula ósea.

Además de lo mencionado anteriormente, las afecciones adicionales que se pueden beneficiar de tratamiento usando los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, linfocitopenia, linforrea, linfostasis, eritrocitopenia, trastornos eritrodegenerativos, eritroblastopenia, leucocitoblastosis; eritroclasia, talasemia, mielofibrosis, trombocitopenia, coagulación intravascular diseminada (DIC), púrpura trombocitopénica inmune (autoinmune) (ITP), ITP inducida por VIH, mielodisplasia; enfermedad trombocitótica, trombocitosis, neutropenias congénitas (tales como síndrome de Kostmann y síndrome de Schwachman-Diamond), neutropenias asociadas a neoplasias, neutropenia cíclica infantil y adulta; neutropenia post-infecciosa; síndrome mielodisplásico; neutropenia asociada a quimioterapia y radioterapia; enfermedad granulomatosa crónica; mucopolisacaridosis; anemia de Diamond Blackfan; anemia drepanocítica; o Beta talasemia mayor.

En una realización en particular, el paciente con necesidad de un trasplante es un donante de médula ósea que ha donado médula ósea, es un donante de médula ósea que va a donar médula ósea, es un receptor del trasplante de un donante de médula ósea, tiene células precursoras hematopoyéticas bajo estrés ambiental, tiene anemia, tiene un nivel reducido de función celular inmunológica en comparación con un sujeto normal, o tiene una deficiencia del sistema inmunitario.

En una cierta realización, el paciente con necesidad de un trasplante tienen mieloma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloide crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia no linfoblástica aguda, o pre-leucemia.

D. Agentes Usados en los Métodos de la Invención

En diversas realizaciones, la invención contempla una composición terapéutica de una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas puestas en contacto con uno o más agentes que aumentan la expresión genética de CXCR4 en las células, tales como agentes que estimulan las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄.

Usando prácticas de cGMP, los agentes útiles para preparar la composición terapéutica de la invención se pueden formular en un disolvente orgánico, tal como acetato de metilo, para su uso en la puesta en contacto de las células de la invención, y se pueden proporcionar en un recipiente sin endotoxinas. Los agentes contemplados por la invención son adecuados para administración *ex vivo* a células de mamífero, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el disolvente por lo general es un disolvente orgánico adecuado, como se describe en el presente documento (por ejemplo, DMSO, DMF, DME, etc., incluyendo combinaciones o mezclas de los mismos). Uno o más disolventes se pueden combinar en ciertas proporciones. Por ejemplo, una mezcla de dos disolventes se puede combinar en una proporción de 9,5:0,5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, etc., incluyendo todos los números enteros y puntos decimales.

La expresión "disolvente orgánico" o "disolvente orgánico adecuado" se refiere generalmente a líquidos o gases que contienen carbono que disuelven un soluto sólido, líquido o gaseoso, dando como resultado una solución. Un disolvente orgánico "adecuado" es uno que sea apropiado para administración *ex vivo* a, o incubación con, células de mamífero, y también puede ser apropiado para administración *in vivo* a un sujeto, tal como con una toxicidad mínima u otros efectos inhibitorios en condiciones *ex vivo* (por ejemplo, cultivo celular) o *in vivo* a una concentración seleccionada para el periodo de incubación o administración. Un disolvente orgánico adecuado también debería ser apropiado para un almacenamiento con estabilidad y manipulación de los agentes que se describen en el presente documento. Los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido

(DMSO), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetoxietano (DME), y dimetilacetamida, incluyendo mezclas o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición o disolvente orgánico está "sustancialmente libre" de acetato de metilo, lo que significa que no debería haber más que cantidades traza de acetato de metilo en la composición o disolvente, y preferentemente cantidades indetectables (por ejemplo, tal como se mide mediante cromatografía líquida a alta presión (HPLC), cromatografía de gases (GC), etc.).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sin endotoxina" se refiere a recipientes y/o composiciones que contienen como máximo cantidades traza (es decir, cantidades que no tienen efectos fisiológicos adversos para un sujeto) de endotoxina, y preferentemente cantidades indetectables de endotoxina. Por "sustancialmente libre de endotoxina" se hace referencia a que hay menos endotoxina por dosis de células de la permitida por la FDA para un agente biológico, que es una endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal al día, que para un promedio de 70 kg de persona es 350 EL) por dosis total de células. En una realización, la expresión "sin endotoxina" se refiere a un recipiente y/o composiciones que está en al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o un 100 % libre de endotoxina. Las endotoxinas son toxinas asociadas con ciertas bacterias, por lo general bacterias gram-negativas, aunque algunas endotoxinas se pueden encontrar en bacterias gram-positivas, tales como *Listeria monocytogenes*. Las endotoxinas más prevalentes son lipopolisacáridos (LPS) o lipooligosacáridos (LOS) encontrados en la membrana externa de diversas bacterias Gram-negativas, y que representan una característica patogenicidad fundamental en la capacidad de estas bacterias para producir enfermedades. Las cantidades pequeñas de endotoxina en seres humanos pueden producir fiebre, una disminución de la presión sanguínea, y activación de inflamación y coagulación, entre otros efectos fisiológicos adversos. Por lo tanto, a menudo es deseable eliminar la mayoría o todas las trazas de endotoxina de los recipientes para producto farmacológico, porque incluso pequeñas cantidades pueden producir efectos adversos en seres humanos. Las endotoxinas se pueden eliminar recipientes usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los recipientes se pueden limpiar en un equipo de lavado con filtro HEPA con agua sin endotoxina, someter a despirogenado a 250 °C, y envasar en estado limpio en estaciones de trabajo con filtros HEPA situados dentro de una sala limpia de clase 100/10 (por ejemplo, una sala limpia de clase 100, contiene no más de 100 partículas con un tamaño superior a medio micrómetro en 28 l de aire).

Como se usa en el presente documento, la expresión "buenas prácticas de fabricación (GMP)" se refiere al control y gestión de la fabricación, y ensayo de control de calidad, de alimentos, productos farmacéuticos y dispositivos médicos. Las GMP no necesariamente dependen de la toma de muestras, sino que en su lugar dependen de la documentación de cada aspecto del proceso, actividades y operaciones implicadas en la fabricación del fármaco y del dispositivo médico. Si la documentación que muestra cómo se preparó y sometió a ensayo el producto (lo que permite la trazabilidad y, en el caso de futuros problemas, retirada del mercado) no es correcta y está en orden, entonces el producto no satisfacer las especificaciones requeridas y se considera que está contaminado (es decir, adulterado en Estados Unidos). Además, las GMP por lo general requieren que todo el equipo de fabricación y ensayo estire bien cualificado para que sea adecuado para su uso, y que todos los metodologías y procedimientos operativos (por ejemplo, fabricación, limpieza y ensayo analítico) utilizados en el proceso de fabricación del fármaco se hayan validado de acuerdo con especificaciones predeterminadas para demostrar que pueden desarrollar su función o funciones pretendidas. En Estados Unidos, la expresión "buenas prácticas de fabricación actuales" aparece en 501 (B) del 1938 Food, Drug, and Cosmetic Act (21 U.S.C. § 351).

Los agentes que se pueden usar para preparar una composición terapéutica de la invención son agentes capaces de aumentar la migración dirigida y potencial de injerto de una población de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas. Los agentes de este tipo incluyen agentes que aumentan la expresión genética de CXCR4 en las células, incluyendo agentes que estimulan las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ y/o PGE₂R₄. Los agentes útiles incluyen, pero no se limitan a, PGE₂ y agentes que tienen actividad de dmPGE₂, por ejemplo, análogos de PGE₂, análogos o potenciadores de AMPc y activadores de Gα-s. En ciertas realizaciones, los análogos específicos de PGE₂R₄ tienen interés en particular, y en algunas realizaciones, el agente se une a, y activa preferentemente, un receptor E₄ de PGE₂.

Como se usa en el presente documento, los términos "prostaglandina E₂" o "PGE₂" incluyen, pero no se limitan a, cualquier molécula de PGE₂ de origen natural o sintetizada por vía química, así como "análogos" de la misma. Como se usa en el presente documento, el término "análogo" o se refiere a una molécula química que es similar a otra sustancia química, por ejemplo, PGE₂, en estructura y función, que a menudo se diferencian estructuralmente un solo elemento o grupo, pero que pueden diferenciarse por la modificación de más de un grupo (por ejemplo, 2, 3 o 4 grupos) si mantiene la misma función que el agente químico precursor. Las modificaciones de este tipo son de rutina para las personas con experiencia en la materia, e incluyen, por ejemplo, restos químicos adicionales o sustituidos, tales como ésteres o amidas de un ácido, grupos protectores tales como un grupo bencilo para un alcohol o tiol, y grupos terc-butoxilcarbonilo para una amina. También están incluidas las modificaciones en las cadenas laterales de alquilo, tales como sustituciones de alquilo (por ejemplo, metilo, dimetilo, etilo, etc.), modificaciones a nivel de saturación o insaturación de cadenas laterales, y la adición de grupos modificados tales como fenilo sustituido y fenoxi. Los análogos también pueden incluir conjugados, tales como restos de biotina o avidina, enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y similares, y que incluyen restos radioetiquetados, bioluminescentes, quimioluminescentes, o fluorescentes. Además, los restos se pueden añadir a los agentes que se describen en el presente documento para alterar sus propiedades farmacocinéticas, tal como para aumentar la semivida *in vivo* o *ex vivo*.

vivo, o para aumentar sus propiedades de penetración celular, entre otras propiedades deseables. También están incluidos los profármacos, de los que se sabe que potencian numerosas cualidades deseables de los agentes farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) (Véase, por ejemplo, el documento WO/2006/047476 para las agonistas de EP a modo de ejemplo).

5 Los ejemplos ilustrativos de "análogos" de PGE₂ y agentes que tienen actividad de dmPGE₂ incluyen, pero no se limitan a, 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂), éster de fenilo de 16,16-dimetil PGE₂ p-(p-acetamidobenzamido), 11-desoxi-16,16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metilen PGE₂, 9-ceto Fluprostenol, 5-trans PGE₂, 17-fenil-omega-trinor PGE₂, amida de PGE₂ serinol, éster de metilo de PGE₂, 16-fenil tetranor PGE₂,
10 15(S)-15-metil PGE₂, 15(R)-15-metil PGE₂, 8-iso-15-ceto PGE₂, éster de isopropilo de 8-iso PGE₂, 20-hidroxi PGE₂, 11-desoxi PGE₁, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto PGE₂, y 19 (R) hidroxi PGE₂. también están incluidos los análogos o derivados de PG que tienen una estructura similar a la de PGE₂ que están sustituidos con halógeno en la posición 9 (véase, por ejemplo, el documento WO 2001/12569) así como derivados de 2-descarboxi-2-fosfínico prostaglandina, tales como los que se describen en la Publicación de Estados Unidos N.º 2006/024721⁴)

15 Los análogos de PGE₁, que incluyen, pero no se limitan a alprostadiol, también se pueden usar para activar las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ (EP₂) y PGE₂R₄ (EP₄), and y se contemplan como agentes útiles en los métodos de la invención.

20 Se contempla que la estimulación/activación de las rutas de señalización celular de PGE₂R₂ (EP₂) y PGE₂R₄ (EP₄) es la base de las respuestas fisiológicas en células madre y precursoras hematopoyéticas que aumentan el injerto, mantienen la viabilidad celular, y aumentan migración dirigida y proliferación de las células. Por consiguiente, en una realización, un "ligando no basado en PGE₂" que se une a y que estimula los receptores PGE₂R₂ y PGE₂R₄ (es decir, un agonista de PGE₂R₂/PGE₂R₄) se contempla para su uso en los métodos de la presente invención.

25 Los ejemplos ilustrativos de agonistas del receptor EP₂ no basados en PGE₂ incluyen CAY10399, ONO_8815Ly, ONO-AE1-259, CP-533,536 y carbazoles y fluorenos desvelados en el documento WO 2007/071456.

30 Los ejemplos ilustrativos de agonistas de EP₄ no basados en PGE₂ incluyen ONO-4819, APS-999 Na, AH23848, ONO-AE1-329, y otros agonistas de EP₄ no basados en PGE₂ desvelados en el documento WO/2000/038663; documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.747.037; y documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.610.719).

35 Los agentes selectivos para el receptor EP₄ de PGE₂ se unen preferentemente a receptores EP₄ de PGE₂. Los agentes de este tipo tienen una afinidad más elevada hacia el receptor EP₄ que para cualquier otro de los tres receptores EP en particular EP₁, EP₂ y EP₃. Dos agentes que se unen de forma selectiva al receptor EP₄ de PGE₂ incluyen, pero no se limitan a, agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: 5-[(1E,3R)-4,4-difluoro-3-hidroxi-4-fenil-1-buten-1-il]-1-[6-(2H-tetrazol-5R-il)hexil]-2-pirrolidinona; ácido 2-[3-[(1R,2S,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-5-[2-(metoximetil)fenil]pent-1-enil]-5-oxociclopentil]sulfanilpropilsulfanil] acético; 4-[2-[(1R,2R,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-4-[3-(metoximetil)fenil]but-1-enil]-5-oxociclopentil]etilsulfanil]butanoato de metilo; 16-(3-Metoximetil)fenil-ro-tetranor-5-tiaPGE₂; 5-{3-[(2S)-2-[(3R)-3-hidroxi-4-[3-(trifluorometil)fenil]butil]-5-oxopirrolidin-1il]propil]tiofeno-2-carboxilato; (3-metil-tiofeno-2-carbonil)-amida] del ácido [4'-[3-butil-5-oxo-l-(2-trifluorometil-fenil)-1,5-dihidro-[1,2,4]triazol-4-ilmetil]-bifenil-2-sulfónico; y (ácido (Z)-7-[(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enico), y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos agentes.

45 Un "potenciador de AMP cíclico (AMPC)", se refiere a una molécula que produce o causa una cantidad mayor de AMPC en una célula, o una cantidad mayor de actividad de AMPC en una célula, o cualquier otro componente relevante de una ruta de transducción de señales relacionada con AMPC, o una respuesta o efecto fisiológicos corriente abajo mensurable de una ruta de señalización de AMPC, en comparación con ningún agente o una molécula/composición de control. En una realización en particular, el agente que tiene actividad de dmPGE₂ es un análogo o potenciador de AMPC.

50 Los potenciadores de AMPC de la presente invención por lo general aumentan o mantienen los niveles intracelulares y/o actividad de AMPC. Más generalmente, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC, AMP cíclico o monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclico) actúa como un mensajero secundario importante en muchos procesos biológicos. Los sistemas de mensajeros secundarios se refieren a métodos de señalización celular, con lo que una molécula de señalización que se puede difundir se produce/secretada rápidamente después de una cierta señal de activación, que a continuación puede activar las proteínas efectoras dentro de la célula para ejercer una respuesta celular. Por ejemplo, entre otras respuestas, la señalización de AMPC transfieren los efectos de las prostaglandinas, que de otro modo no pueden pasar a través de la membrana celular. El AMPC también regula el paso de Ca²⁺ a través de canales iónicos.

65 Los efectos corriente abajo mensurables pueden incluir mayor viabilidad, proliferación o expansión, y autorrenovación e injerto de las células madre, entre otros, evidentes a partir de la comprensión de a la técnica y la descripción en el presente documento. Los potenciadores de AMPC pueden incluir "agonistas", que por lo general se

unen a un receptor u otra molécula de una célula y pueden desencadenar una respuesta de la célula, y "antagonistas", que por lo general actúan contra y bloquean/inhiben una acción, tal como bloqueando la degradación del AMPc (por ejemplo, bloqueando una fosfodiesterasa). También se contemplan los análogos de AMPc.

- 5 La actividad de AMPc también se puede regular de forma negativa mediante una diversidad de mecanismos. Por ejemplo, la subunidad $G\alpha_s$ cataliza lentamente la hidrólisis de GTP a GDP, que a su vez desactiva la proteína G_s , interrumpiendo de ese modo la ruta de AMPc. La ruta de AMPc también se puede desactivar corriente abajo inhibiendo directamente la adenilil ciclasa o mediante desfosforilación de las proteínas fosforiladas por PKA. La adenilil ciclasa, y por lo tanto la producción de AMPc, se pueden inhibir por agonistas de los receptores acoplados a la proteína G (G_i) inhibidora de la adenilil ciclasa. La descomposición del AMPc en AMP está catalizada por la enzima fosfodiesterasa, que también puede actuar como un regulador negativo de la señalización de AMPc.

- 10 Los ejemplos ilustrativos de moléculas que inhiben la ruta de AMPc incluyen, por ejemplo AMPc fosfodiesterasa, que desfosforila AMPc en AMP, reduciendo los niveles de AMPc; proteína G_i , que inhibe la adenilil ciclasa, reduciendo de este modo los niveles de AMPc; y toxina tosferínica (*Pertussis*), que disminuye los niveles de AMPc.

- 15 Los potenciadores de AMPc de la invención por lo general son capaces de activar la ruta de AMPc en cualquiera de las etapas que hay en esa ruta, o pueden evitar la regulación negativa (por ejemplo, degradación) de AMPc, e incluyen agentes químicos, polipéptidos, anticuerpos, y otras moléculas que tienen efectos funcionales de este tipo. Las moléculas poco agentes que activan la ruta de AMPc a modo de ejemplo pueden incluir, por ejemplo, toxina del cólera, que aumenta los niveles de AMPc; forskolina, un producto natural de diterpeno natural que activa la adenilil ciclasa; y cafeína y teofilina, que inhiben la AMPc fosfodiesterasa, lo que conduce a una activación de las proteínas G que a continuación activa en la ruta de AMPc.

- 20 Los ejemplos ilustrativos de potenciadores de AMPc incluyen, pero no se limitan a, éster de forbol, forskolina, esclarelina, 8-bromo-AMPc, toxina del cólera (CTx), aminofilina, 2,4 dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol, isobutimetilxantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, iloprost, prostaglandina E_1 , prostaglandina E_2 , polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), y polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), entre otros conocidos en la técnica. Como se ha mencionado a modo de ejemplo anteriormente, los ejemplos de potenciadores de AMPc también incluyen AMPc y análogos de AMPc, tales como sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS) y dibutiril AMPc (dbAMPc), entre otros.

- 25 El AMPc está implicado en el crecimiento y/o supervivencia de las células madre hematopoyéticas en (véase, por ejemplo, Negrotto *et al.*, *Experimental Hematology* 34: 1420-1428, 2006, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). Por ejemplo, se observó que dos análogos de AMPc diferentes, tales como dibutiril-AMPc y BIMPS, estimulan la supervivencia de las células CD34⁺ obtenidas a partir del cordón umbilical humano suprimiendo la apoptosis inducida por cualquiera de óxido nítrico (NO) o privación de suero. La implicación de la ruta de PKA y PI3K se demostró por la capacidad de sus inhibidores específicos Rp-AMPc y Wortmanina o LY294002, respectivamente, para invertir el efecto antiapoptótico de BIMPS. Aunque la trombopoyetina (TPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o actor de células madre (SCF) no aumentan los niveles de AMPc, la actividad antiapoptótica ejercida por estos factores de crecimiento estaba bloqueada por la inhibición de la adenilato ciclasa y presenta sinergia con BIMPS. Por lo tanto, los análogos de AMP cíclicos suprimen la disminución de la formación de colonias en células expuestas a NO o privación de suero, mostrando que AMPc no es solamente una ruta fundamental que controla la supervivencia de CD34⁺, sino también un mediador de la citoprotección mediada por TPO, G-CSF, y SCF.

- 30 De forma análoga, la activación de AMPc, tal como por inyección de isoproterenol (que estimula la adenilil ciclasa) o 3',5'-monofosfato de adenosina y dibutirilo cíclico o después del injerto de células de médula ósea, desencadenar casi inmediatamente la entrada de las células madre trasplantadas en la fase S mediante inducción de la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, Necas *et al.*, *Cell Proliferation*, 9: 223-230, 2008, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad).

- 35 Un "activador o agente de activación de $G\alpha_s$ " o "activador o agente de activación de la alfa-s proteína G" incluye cualquier molécula capaz de activar la subunidad alfa de la proteína G estimulante (" $G\alpha_s$ ") o variantes de $G\alpha_s$. Los ejemplos ilustrativos de activadores de $G\alpha_s$ incluyen PGE₂ y agonistas y derivados del mismo, y toxina del cólera. En una realización en particular, el agente que tiene actividad de dmPGE₂ es un activador de $G\alpha_s$.

- 40 Por lo tanto, las composiciones de la invención que comprenden PGE₂ y agentes que tienen actividad de dmPGE₂, por ejemplo, análogos de dmPGE, análogos o potenciadores de AMPc, y/o activadores de $G\alpha_s$ se pueden utilizar para conservar mantener la viabilidad celular, y aumentar el injerto, migración dirigida, autorrenovación y/o expansión de células madre hematopoyéticas *in vivo*.

- 45 Por consiguiente, en realizaciones en particular, el injerto/potencial de injerto y/o expansión *in vivo* de células madre/precursoras hematopoyéticas aumenta poniendo en contacto las células *ex vivo* o *in vitro* con PGE₂ y análogos del mismo (por ejemplo, dmPGE₂), y agentes que tienen actividad de dmPGE₂ en cualquier combinación en particular, sin limitación.

En realizaciones en particular, una población de células se trata (por ejemplo, se pone en contacto) con uno o más agentes, cada uno a una concentración final de aproximadamente $1 \mu\text{M}$ a aproximadamente $100 \mu\text{M}$. En ciertas realizaciones, una población de células se trata con uno o más agentes farmacéuticos, cada uno a una concentración final de aproximadamente $1 \times 10^{-14} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-13} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, de aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, o cualquier intervalo de concentraciones finales que intervenga.

En otra realización en particular, una población de células se trata con uno o más agentes, cada uno a una concentración final de aproximadamente $1 \times 10^{-14} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-13} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-12} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-10} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, o cualquier concentración final que intervenga. En los tratamientos que comprenden uno o más agentes, los agonistas se pueden encontrar en diferentes concentraciones entre sí o en la misma concentración.

En realizaciones en particular, una población de células se trata (por ejemplo, se pone en contacto con uno o más agentes) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces.

Una población de células se puede poner en contacto de forma intermitente, de forma puntual, o de forma secuencial con uno o más agentes dentro del mismo recipiente (por ejemplo, poniendo en contacto la población de células con un fármaco durante un periodo de tiempo, intercambiando en medio de cultivo y/o lavando la población de células, a continuación repitiendo el ciclo con la misma combinación o con una combinación diferente de agentes farmacéuticos durante el mismo periodo de tiempo determinado previamente o un periodo de tiempo diferente determinado previamente).

En realizaciones preferentes, una población de células se trata con un agonista de PGE_2R_2 o PGE_2R_4 , por ejemplo, 16,16-dimetil PGE_2 , a una concentración final de aproximadamente $10 \mu\text{M}$ durante 2 horas a aproximadamente 37°C .

Las duraciones de tratamiento a modo de ejemplo por lo general incluyen un tiempo de tratamiento de aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2, horas, o aproximadamente 3 horas.

En realizaciones en particular, los agentes útiles en la invención se pueden transferir desde un primer recipiente a un segundo recipiente, en el que el segundo recipiente es un vial de 2 ml con una tapa de teflón que no está libre de endotoxina y que es adecuado para almacenamiento o administración *ex vivo* del agente, en el que el agente es 16,16-dimetil PGE_2 a una concentración de reserva de aproximadamente 10 mM, proporcionado en dimetilsulfóxido (DMSO) que está sustancialmente libre de acetato de metilo, y en el que existe una cubierta de aire en el vial. Preferentemente, toda la composición, incluyendo el recipiente y el disolvente, es estéril y está libre de endotoxinas.

En ciertas realizaciones, el segundo otro recipiente puede comprender células incluyendo células madre o precursoras hematopoyéticas, tales como células de médula ósea, células de sangre periférica, o células del cordón umbilical. Por consiguiente, estas y otras realizaciones pueden implicar la transferencia de la composición desde el primer recipiente o recipiente inicial a un segundo recipiente que es adecuado para condiciones de tratamiento *ex vivo* y que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas en un medio adecuado. Como alternativa, la población de células humanas se puede transferir al primer o al segundo recipiente que ya contiene la composición, tal como una bolsa o tubo de PE, y que ya es adecuado para tratamiento *ex vivo* o condiciones de incubación.

E. Composiciones de la Invención Preparadas para su Administración

La composición terapéuticas de la invención son estériles, y son adecuadas y están preparadas para su administración (es decir, se pueden administrar sin ningún procesamiento adicional) a pacientes humanos. En algunas realizaciones, la composición terapéutica está preparada para infusión en un paciente. Como se usa en el presente documento, las expresiones "preparada para su administración", "preparada para la administración" o "preparada para infusión" se refieren a una composición a base de células de la invención que no requiere ningún tratamiento o manipulaciones adicionales antes de su trasplante o administración a un sujeto.

Las composiciones estériles, terapéuticamente aceptables, adecuadas para administración a un paciente pueden comprender uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, medio de cultivo celular) u otros componentes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición en particular que se está administrando, así como por el método en particular usado para administrar la composición terapéutica. Por consiguiente, existe una gran diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones terapéuticas de la presente invención (véase, por

ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed. 1985)).

En realizaciones en particular, las composiciones celulares terapéuticas que comprenden células madre y/o precursoras hematopoyéticas comprenden un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable. Una composición terapéutica que comprende una composición basada en células de la presente invención se puede administrar por separado mediante métodos de administración enteral o parenteral o en combinación con otros compuestos adecuados conseguirlos objetivos de tratamiento deseados.

El vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable debe ser de una pureza suficientemente alta y de una toxicidad suficientemente baja para hacerlos adecuados para la administración al sujeto humano que se está tratando. Además, debería mantener o aumentar adicionalmente la estabilidad de la composición terapéutica. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma planificada de administración en mente, para proporcionar el volumen deseado, consistencia, etc., cuando se combina con otros componentes de la composición terapéutica de la invención. Por ejemplo, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, pero no se limita a, un agente aglutinante (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.), una carga (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato cálcico, etil celulosa, poliácridatos, hidrogenofosfato cálcico, etc.), un lubricante (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.), un agente desintegrante (por ejemplo, almidón, almidón glicolato sódico, etc.), o un agente humectante (por ejemplo, lauril sulfato sódico, etc.). Otros vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatinas, amilosas, estearatos de magnesio, talcos, ácidos silícicos, parafinas viscosas, hidroximetilcelulosas, polivinilpirrolidonas y similares.

Las soluciones de vehículo de este tipo también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a una solución o líquido cuya composición química neutraliza ácidos o bases sin un cambio significativo en el pH. Los ejemplos de tampones previstos por la invención incluyen, pero no se limitan a, solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), solución de Ringer, dextrosa en agua al 5 % (D5W), solución salina normal/fisiológica (NaCl al 0,9 %).

Estos vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables pueden estar presentes en cantidades suficientes para mantener un pH de la composición terapéutica entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10. Como tal, el agente tamponador puede ser tanto como aproximadamente un 5 % en una base de peso a peso de la composición total. Los electrolitos tales como, pero no limitados a, cloruro sódico y cloruro potásico también se pueden incluir en la composición terapéutica.

En un aspecto, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. Como alternativa, el pH de la composición terapéutica está en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8. En otra realización, la composición terapéutica comprende un tampón que tiene un pH en uno de dichos intervalos de pH. En otra realización, la composición terapéutica tiene un pH de aproximadamente 7. Como alternativa, la composición terapéutica tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4. Además en otra realización, la composición terapéutica tiene un pH de aproximadamente 7,4.

La composición estéril de la invención puede ser una solución o suspensión estéril en un medio farmacéuticamente aceptable, no tóxico. El término "suspensión" como se usa en el presente documento puede hacer referencia a condiciones no adherentes en las que las células no están unidas a un soporte sólido. Por ejemplo, las células mantenidas en suspensión se pueden agitar y no se adhieren a un soporte, tal como una placa de cultivo.

Una suspensión es una dispersión (mezcla) en la que una especie finamente dividida se combina con otra especie, estando la primera tan finamente dividida y mezclada que no sedimenta rápidamente. Una suspensión se puede preparar usando un vehículo tal como un medio líquido, que incluye una solución. En realizaciones en particular, la composición terapéutica de la invención es una suspensión, en la que las células madre y/o precursoras hematopoyéticas se dispersan dentro de un medio líquido o solución aceptables, por ejemplo, medio salino o sin suero, y no se unen a un soporte sólido. En la vida cotidiana, las suspensiones más comunes son las de sólidos en agua líquida. Entre los diluyentes aceptables, por ejemplo, los vehículos y disolventes, que se pueden emplear son agua, solución de Ringer, solución de cloruro sódico (solución salina) isotónica y medio de cultivo celular sin suero. En algunas realizaciones, en la preparación de suspensiones se emplean soluciones hipertónicas. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un medio disolvente o de suspensión. Para aplicación parenteral, los vehículos particularmente adecuados consisten en soluciones, soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. En algunas realizaciones, la solución de infusión es isotónica para los tejidos del sujeto. En algunas realizaciones, la solución de infusión es hipertónica para los tejidos del sujeto.

El vehículo, diluyentes y otros componentes farmacéuticamente aceptables que comprenden la composición terapéutica de la invención preparada para su administración se a partir de reactivos de calidad farmacéutico de Estados Unidos que permitirán el uso de la composición terapéutica en regímenes clínicos. Por lo general, estos reactivos terminados, que incluyen cualquier medio, solución u otros vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, se esterilizan de manera convencional en la técnica, tales como filtros esterilizados, y se someten a ensayo para detectar diversos agentes contaminantes no deseados, como micoplasma, endotoxina, o contaminación con virus, antes de su uso. En una realización el vehículo farmacéuticamente aceptable está sustancialmente libre de proteínas naturales de origen humano o animal, y es adecuado para almacenar la población de células de la carga terapéutica, que incluye células madre y precursoras hematopoyéticas. La composición terapéutica está destinada a su administración en un paciente humano y, por lo tanto, está sustancialmente libre de componentes de cultivo celular tales como albúmina de suero bovino, suero de caballo y suero bovino fetal.

La invención también contempla, en parte, el uso de un medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable composiciones y/o cultivos de la presente invención en particular. Las composiciones de este tipo son adecuadas para su administración a sujetos humanos. Hablando en términos generales, cualquier medio que soporte el mantenimiento, crecimiento, y/o estado de las células reprogramadas y/o programadas deseadas de la invención es adecuado para su uso como un medio de cultivo celular farmacéutico. En realizaciones en particular, el medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable es un medio sin suero.

La composición terapéutica puede comprender un medio sin suero adecuado para almacenar la población de células que comprende la composición. El medio sin suero tiene varias ventajas con respecto al medio que contiene suero, que incluye una composición simplificada y mejor definida, una reducción del grado de contaminantes, eliminación de una fuente potencial de agentes infecciosos y menor coste. En diversas realizaciones, el medio sin suero no proviene de animales, y opcionalmente puede estar libre de proteínas. Opcionalmente, el medio puede contener proteínas recombinantes biofarmacéuticamente aceptables. Medio "que no proviene de animales" se refiere a un medio en el que los componentes se obtienen a partir de fuentes no animales. Las proteínas recombinantes reemplazan a las proteínas animales nativas en un medio que no proviene de animales y los nutrientes se obtienen a partir de fuentes sintéticas, vegetales o microbianas. Por el contrario, el medio sin proteínas se define como sustancialmente libre de proteínas.

El medio sin suero empleado en la presente invención es una formulación adecuada para uso en protocolos y productos terapéuticos humanos. Un medio sin suero es QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.945.337. QBSF-60 isoptimizado con componentes de calidad farmacéutica de Estados Unidos y está formado por el medio basal IMDM más L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, albúmina de suero de calidad inyectable en ser humano (4 mg/ml) (Alpha Therapeutic Corporation), transferrina humana saturada parcialmente con hierro (300 µg/ml) (Sigma Chemical Corporation o Bayer Corporation) e insulina sódica humana recombinante (0,48 U/ml) (Sigma). Otros medios sin suero conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a: medio de cultivo sin suero StemPro-34 del Catálogo de Life Technologies; Capmany, *et al.*, Short-term, serum-free, static culture of cord blood-derived CD34⁺ cells: effects of FLT3-L and MIP-1α on *in vitro* expansion of hematopoietic progenitor cells, *Haematologica* 84: 675-682 (1999); Daley, J P, *et al.*, *Ex vivo* expansion of human hematopoietic progenitor cells in serum-free StemProTM-34 Medium, *Focus* 18 (3): 62-67; información del Catálogo de Life Technologies sobre medio de cultivo sin suero AIM V; información del Catálogo de BioWhittaker sobre medio de cultivo sin suero X-VIVO 10; documento N.º 5.397.706 con el título Serum-free basal and culture medium for hematopoietic and leukemia cells; no cell proliferation; Kurtzberg *et al.*, 18: 153-4 (2000); Kurtzberg *et al.*, *Exp Hematol* 26 (4): 288-98 (abril de 1998).

Alguien con una experiencia habitual en la materia podría observar que el ejemplo de medio mencionado anteriormente es ilustrativo y de ninguna manera limita la formulación de medios adecuados para su uso en la presente invención y que existen muchos de estos medios conocidos y disponibles para uso en la técnica.

En diversas realizaciones, la composición terapéutica de la invención comprende una solución estéril de albúmina de suero humano (HSA), tal como HSA al 5 %, y dextrano de bajo peso molecular (LMW).

La composición terapéutica está sustancialmente libre de contaminación con micoplasma, endotoxina, y microbiana. En realizaciones en particular, la composición terapéutica contiene menos de aproximadamente 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1, 0,05 µg/ml de albúmina de suero bovino.

Por "sustancialmente libre" con respecto a endotoxina se hace referencia a que hay menos endotoxina por dosis de células de la permitida por la FDA para un agente biológico, que es una endotoxina total de 5 EU/kg de peso corporal al día, que una persona con un peso medio de 70 kg es de 350 EU por dosis total de células.

Con respecto a contaminación con micoplasma y microbiana, "sustancialmente libre", como se usa en el presente documento, se refiere a una lectura negativa para los ensayos aceptados generalmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, la contaminación con micoplasma se determina mediante el subcultivo de una muestra de la composición terapéutica en medio de caldo de cultivo y distribución sobre placas de agar los días 1, 3, 7, y 14 a 37 °C con controles positivos y negativos apropiados. El aspecto de la muestra se compara por vía microscópica, a

100x, con respecto al control positivo y negativo. Además, la inoculación de un cultivo celular indicador se incuba durante 3 y 5 días y se examina a 600x para la presencia de micoplasmas mediante microscopía de epifluorescencia usando un fluorocromo de unión a ADN. La muestra se considera satisfactoria si el procedimiento de medio de agar y/o de caldo de cultivo y el procedimiento de cultivo celular indicador no muestran signos de contaminación con micoplasma.

Las composiciones terapéuticas de la invención tienen tipo de HLA y pueden ser compatibles o ser compatibles parcialmente con un paciente específico para trasplante. El tipo HLA se refiere al conjunto único de proteínas denominadas antígenos leucocitarios humanos. Estas proteínas están presentes en cada célula del individuo y permiten que el sistema inmune reconozca 'propio de 'extraño'. La administración de células o tejidos que se reconocen como extraños puede conducir a problemas de compatibilidad tales como rechazo inmunológico o enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD). Por consiguiente, el tipo y compatibilidad de HLA es particularmente importante en trasplante de órganos y tejidos.

Existen seis HLA principales (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP, y HLA-DQ). Cada antígeno de HLA tiene múltiples isoformas en la población humana, y cada individuo puede tener dos isoformas diferentes para cada HLA debido a la naturaleza diploide de nuestro genoma. Por lo tanto, una compatibilidad completa podría hacer compatibles doce de doce isoformas. Una célula o tejido clonado por el mismo individuo como, o un gemelo idéntico de, el receptor pretendido podría tener un tipo perfecto de HLA y se denomina singéneo o autólogo. También se entiende que ciertos factores que incluyen, pero no se limitan a, los antecedentes étnicos y la raza se correlacionan con ciertos tipos de HLA.

Existen muchas isoformas de HLA principales y secundarias y se entiende que una compatibilidad adecuada puede incluir una compatibilidad entre un subconjunto de los HLA principales, todos los HLA principales, algunos o todos los HLA principales y secundarios o cualquier combinación conocida en la técnica que alivie el rechazo inmunológico o GVHD. También se entiende que las directrices específicas para lo que constituye una buena compatibilidad de tipo HLA depende de muchos factores. Por lo tanto, el experto en la materia debe tener criterio para evaluar la idoneidad de una muestra dada de célula o tejido para trasplante en un individuo dado.

El tipo HLA se puede determinar usando los denominados métodos de baja resolución, por ejemplo mediante formación de serotipos, o usando métodos basados en anticuerpo. La formación de serotipos se basa en el reconocimiento de anticuerpo de tipo se HLA. La formación de serotipos puede distinguir entre 28 genes diferentes de HLA-A, 59 genes de HLA-B y genes de 21 HLA-C. Una compatibilidad perfecta mediante métodos de formación de serotipos podría ser una denominada compatibilidad de seis de seis que hace referencia a los dos alelos para cada HLA (A, B, y C) presente en cada individuo. En ciertos casos, una compatibilidad de cinco de seis o menos se puede considerar como una buena compatibilidad tal como lo determina alguien con experiencia en la materia.

Otros métodos de resolución baja o media para determinar el tipo de HLA examinan las isoformas de HLA del individuo, pero no dependen de la determinación de la secuencia real de los alelos de HLA de un individuo. A menudo, el donante está relacionado con el individuo que recibe la muestra, en este caso la formación de serotipos solo o en combinación con otros métodos de resolución baja o media puede ser suficiente para determinar si la muestra es adecuada para trasplante. En otros casos una compatibilidad de cinco de seis o menor se encuentra fácilmente, pero una compatibilidad perfecta no se encuentra fácilmente. En tales casos, puede ser ventajoso usar células o tejidos con una compatibilidad menor en lugar de perder tiempo y esfuerzos en encontrar una compatibilidad mejor del tipo de HLA.

Los métodos de alta resolución implican el examen de la secuencia específica de los genes o productos de expresión genética de HLA (proteína o ARN). Los métodos de alta resolución pueden distinguir entre miles de diferentes isoformas.

Como mínimo, la formación de tipos de HLA de la composición terapéutica se realiza para seis locus de HLA, HLA-A, -B, y -DR, por ejemplo, a nivel de baja resolución/separación de antígeno.

A la formación de tipos de HLA-DR se pueden utilizar métodos de ensayo basados en ADN. El ensayo basado en ADN se puede usar para HLA-A y -B. Las directrices del centro de trasplante para la formación de tipos de un paciente, familia y para confirmar los tipos de HLA de los donantes potenciales no relacionados incluyen, formación de tipos de locus de HLA-A, B, y -DR usando métodos de ensayo basados principalmente en ADN para resolución al nivel de alelo para DRB1 y nivel de baja resolución/separación de antígeno para HLA-A y -B. La formación de tipos de un paciente y el donante seleccionado se puede realizar usando el mismo conjunto de reactivos, metodología, y criterios de interpretación con muestras de tejido recién preparadas para asegurar la identidad del HLA. Se cumplen las garantías de calidad y control de calidad para los ensayos de HLA.

En diversas realizaciones, la población de células comprende células madre o precursoras hematopoyéticas haplotipadas. En algunas realizaciones, la población de células que comprende la composición terapéutica presenta tipo de HLA basándose en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DRB1. En realizaciones en particular, la población de células presenta tipo de HLA basándose en el grupo que consiste en HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, y DPB1. En

algunas realizaciones, la población de células que comprende la composición terapéutica es compatible con un paciente humano específico. En algunas realizaciones, la población de células que presenta haplotipo de HLA tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico. La compatibilidad de HLA se puede usar basándose en alelos o antígenos, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la población de células que presenta haplotipo de HLA es una falta de compatibilidad parcial con un sujeto humano específico, tal como el sujeto al que se le administra la composición terapéutica.

La composición terapéutica de la invención es capaz de obtener autorización del producto de la FDA (es decir, aprobación por la FDA) y otras autoridades sanitarias en otros países y territorios reguladores, así como etiquetado del producto con caracterización de la información con respecto a indicación del producto, eficacia del producto, seguridad y pobreza. Es probable que la aprobación por la FDA se base en la dosis de las células y faltas de coincidencias de HLA. La composición terapéutica de la invención, en algunas realizaciones, se procesa y se crioconserva de acuerdo con patrones acreditados, estériles, y se etiqueta para, por ejemplo, formación de tipos de RH y ABO, formación de tipos de HLA y los locus A, B, y DR-beta-1, y recuentos de procesamiento posteriores, recuentos de CD34⁺, recuentos de CFU-GM, identificación sistemática de enfermedad infecciosa, historia familiar y evidencias de consentimiento materno para donación. La composición terapéutica a usar para trasplante podría incluir células que presente en una compatibilidad de un mínimo de 4/6 antígenos o 3/6 alelos, y una dosis celular como se describe en el presente documento.

F. Bio-Envases Inteligentes

En diversas realizaciones, la invención contempla, en parte, métodos de terapia celular, por ejemplo, trasplantes de células madre/precursoras hematopoyéticas, que comprenden poner en contacto una población de células con uno o más agentes farmacéuticos en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de las células puestas en contacto en un sujeto y administrar las células puestas en contacto con el sujeto.

La invención contempla además, en parte, métodos para aumentar el injerto de células madre en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que comprenden poner en contacto una población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica, y/o células de sangre del cordón umbilical) con agentes que aumentan la expresión de CXCR4 en las células madre y/o precursoras hematopoyéticas, tales como PGE₂, dmPGE₂, o agentes que tienen actividad de dmPGE₂, en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células puestas en contacto en un sujeto y administrar las células puestas en contacto con el sujeto.

La invención contempla además, en parte, métodos para aumentar el número de células madre o precursoras hematopoyéticas en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que comprenden poner en contacto una población de células que comprende células madre y/o precursoras hematopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica, y/o células de sangre del cordón umbilical) con agentes que aumentan la expresión de CXCR4 en las células madre y/o precursoras hematopoyéticas, tales como PGE₂ o un análogo del mismo, por ejemplo, 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar la expansión *in vivo* de las células puestas en contacto en un sujeto y administrar las células puestas en contacto con el sujeto.

En diversas realizaciones ilustrativas, la invención proporciona, en parte, un método para poner contacto las células madre o precursoras hematopoyéticas con PGE₂ o un análogo del mismo, por ejemplo, 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂) o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en condiciones suficientes para mantener la viabilidad de las células madre/precursoras y aumentar el injerto, migración dirigida, y expansión *in vivo*.

En una realización, la invención proporciona, en parte, un método para preparar una población de células, por ejemplo, células de médula ósea, células de sangre periférica movilizada, células de sangre del cordón umbilical, para un trasplante, por ejemplo, trasplante de médula ósea, que comprende poner en contacto las células con dmPGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de las células puestas en contacto en un sujeto en comparación con las células no puestas en contacto.

En una realización en particular, la invención contempla, un método para aumentar el injerto de células madre o precursoras hematopoyéticas en un sujeto que comprende administrar al sujeto, una fuente o población de células puestas en contacto con dmPGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células puestas en contacto en un sujeto en comparación con las células no puestas en contacto.

En otra realización en particular, la invención contempla, un método para tratar un sujeto con necesidad de un trasplante de células madre/precursoras hematopoyéticas que comprende: seleccionar el sujeto con necesidad de

un trasplante de células madre/precursoras hematopoyéticas y administrar a un sujeto, una población de células puestas en contacto con dmPGE₂ o un agente que tiene actividad de dmPGE₂ en un recipiente sin endotoxinas como se describe en el presente documento, en las condiciones suficientes para aumentar el injerto y/o expansión *in vivo* de las células puestas en contacto en un sujeto en comparación con las células no puestas en contacto.

5 Como se usa en el presente documento, el término "recipiente" generalmente se refiere a cualquier artículo que se pueda usar para fines de cultivo, tratamiento, manipulación, almacenamiento, análisis, incubación, administración y que de otro modo establecimiento, soporte, cosecha, y poblaciones de células que comprenden células madre o
10 precursoras hematopoyéticas y productos secundarios de las mismas *ex vivo* o *in vitro* o de otro modo para una diversidad de fines como se establece y se contempla en el presente documento.

Las realizaciones ilustrativas de recipientes incluyen, pero no se limitan a: bolsas (por ejemplo, bolsas intravenosas (IV); bolsas de cultivo celular, por ejemplo, VueLife™, KryoSure™, KryoVue™, Lifecell®, PermaLife™, X-Fold™, Si-Culture™, VectraCell™), biorreactores, dispositivos de cultivo celular o tisular, fundas, cápsulas, viales para cultivo,
15 aparatos, fábricas celulares, recipientes, tubos de cultivo (por ejemplo, tubos de microcentrifugadora, EPPENDORF TUBES®, tubos cónicos FALCON®, etc.), placas de cultivo (por ejemplo, placas de Petri), Matracas de cultivo, matraces de centrifugación, frascos rotatorios, placas de múltiples pocillos (por ejemplo, placas de 2 pocillos, 4 pocillos, 6 pocillos, 12 pocillos, 24 pocillos, 48 pocillos, 96 pocillos, y 384 pocillos), microincubadoras,
20 microvehículos, microplacas, microportaobjetos y portaobjetos de cámara, y dispositivos para implante (por ejemplo, esponjas de colágena). El recipiente se puede usar múltiples veces o puede ser un recipiente de un solo uso.

Preferentemente, los recipientes de la presente invención están libres de endotoxinas, y se fabrican de acuerdo con las prácticas GMP como se discute en cualquier parte en el presente documento.

25 En realizaciones en particular, los recipientes se pueden fabricar a partir de materiales que comprenden una o más de las siguientes características: permeabilidad a gases (materiales que tienen tasas de transferencia de gases adecuadas para oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno); tasas de pérdida de agua insignificantes (los materiales son prácticamente impermeables al agua); química y biológicamente inertes (materiales que no reaccionan con los contenidos del recipiente), y mantenimiento de la flexibilidad y resistencia en diversas condiciones (los materiales
30 permiten que el recipiente se pueda tratar con microondas, tratar con radiación UV, centrifugar o usar dentro de un amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo, de -100 °C a +100 °C).

Los expertos en la técnica pertinente pueden seleccionar materiales poliméricos apropiados con las propiedades
35 deseadas de permeabilidad, biorreactivas y biocompatibles, resistencia a la temperatura, flexibilidad, conductividad térmica, y resistencia.

Los materiales ilustrativos que son adecuados para la fabricación de recipientes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: vidrio, cerámica, metales, monómeros y polímeros de termosellado y elastómeros, y termoplásticos monoméricos y poliméricos. Los materiales termoplástico usa modo de ejemplo adecuados para la
40 fabricación de recipientes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: resinas de acetal, delrina, fluorocarbonos, poliésteres, elastómeros de poliéster, metalocenos, poliamidas, nailon, cloruro de polivinilo, polibutadienos, resinas de silicona, ABS (un acrónimo de "acrilonitrilo, butadieno, estireno"), policarbonato (también denominado "PC" en la industria de plásticos) polipropileno, polietileno, poliestireno, polímeros de cristal líquido, aleaciones y combinaciones y mezclas de compuestos de los mismos, y aleaciones reforzadas y combinaciones y
45 mezclas y compuestos de las mismas.

En realizaciones en particular, los recipientes se pueden fabricar a partir de uno o más materiales seleccionados entre el grupo que consiste en: ftalato de dietilhexilo, cloruro de polivinilo, polietileno, polipropileno, y etileno propileno fluorado.
50

En diversas realizaciones ilustrativas, un recipiente se puede fabricar para que tenga un grosor de la pared transversal en el que se basa y que es una función implícita de los materiales seccionados ay de las aplicaciones pretendidas. Los grosores de pared transversal a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, grosores entre aproximadamente 0,25 mm y aproximadamente 2,0 mm, entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente
55 1,5 mm, y entre aproximadamente 0,75 mm y aproximadamente 1,25 mm En realizaciones en particular, el grosor de la pared transversal de un recipiente es al menos 0,2 mm, 0,3 mm, 0,4 mm, 0,5 mm, 0,6 mm, 0,7 mm, 0,8 mm, 0,9 mm, 1,0 mm, 1,1 mm, 1,2 mm, 1,3 mm, 1,4 mm, 1,5 mm, 1,6 mm, 1,7 mm, 1,8 mm, 1,9 mm, o 2,0 mm o cualquier grosor que intervenga.

60 En realizaciones ilustrativas en particular, los recipientes de la presente invención se diseñan para que tengan cabida para volúmenes específicos. Los volúmenes a modo de ejemplo de los recipientes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, volúmenes de aproximadamente 10 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 50 ml, aproximadamente 75 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 150 ml, aproximadamente 250 ml, aproximadamente 500 ml, aproximadamente 750 ml, aproximadamente 1000 ml, aproximadamente 1250 ml,
65 aproximadamente 1500 ml, aproximadamente 1750 ml, aproximadamente 2000 ml, o más, incluyendo cualquier volumen que intervenga. Por ejemplo, los volúmenes que intervengan entre 10 ml y 25 ml, incluyen 11 ml, 12 ml,

13 ml, 14 ml, 15 ml, 16 ml, 17 ml, 18 ml, 19 ml, 20 ml, 21 ml, 22 ml, 23 ml, y 24 ml.

5 En ciertas realizaciones, un recipiente contemplado en el presente documento comprende 1, 2, 3, 4 o 5 compartimentos. Los compartimentos pueden ser del mismo tamaño o de tamaños diferentes y pueden tener las mismas o diferentes porosidades. En una realización, la porosidad de los compartimentos adyacentes es tal que las moléculas pequeñas, nutrientes, polipéptidos, y/o factores de crecimiento se pueden intercambiar libremente entre compartimentos, pero en el que las células de cada compartimento están limitadas a sus respectivos compartimentos.

10 Alguien con experiencia en la materia en la técnica pertinente puede fabricar un recipiente que tenga el grosor, volumen, y número de compartimentos deseados basándose en el conocimiento de los materiales de fabricación y los usos pretendidos del recipiente.

15 En realizaciones en particular, los recipientes de fabricar con materiales que se adapten revestimientos, películas u otros agentes en particular, por ejemplo, un PGE₂ o un agente que tenga actividad de dmPGE₂, o combinación adecuada de los mismos.

20 La superficie interior del recipiente se puede diseñar para que se adapte el revestimiento con diversas moléculas hidrófobas, hidrófilas, o anfipáticas usando métodos conocidos por los expertos en la técnica pertinente. Por ejemplo, los materiales hidrófobos usados normalmente tales como por ejemplo, materiales de termosellado, elastómeros, cauchos, y agentes termoplásticos tales como poliestirenos, policarbonatos, los ABS, y otros materiales poliméricos desvelados en el presente documento se adaptan a la unión de moléculas hidrófobas (por ejemplo, proteínas que tienen una o más regiones hidrófobas). Además, las aplicaciones experimentales, industriales o clínicas específicas pueden requerir, excluir, o ser indiferentes a la unión de diversos tipos de moléculas tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, o similares. También puede ser deseable prevenir, minimizar y/o maximizar la unión de las moléculas al sustrato dependiendo de los objetivos de una aplicación en particular.

30 En realizaciones ilustrativas en particular, los recipientes contemplados en el presente documento comprenden uno o más puertos de entrada y/o salida para introducir, intercambiar o eliminar compuestos, células, medio de cultivo celular, y similares. Los puertos pueden proporcionar acceso sin aguja o pueden incluir puntos de acceso para agujas, si fuera apropiado. Cada puerto puede contener uno o más adaptadores (por ejemplo, adaptadores luer), válvulas y/o filtros.

35 La presente invención contempla, en parte, recipientes que comprenden uno o más dispositivos en cualquier combinación y configuración adecuadas que indican, por ejemplo, la temperatura de los contenidos del recipiente, el tiempo que el recipiente ha estado a cualquier temperatura dada, y diversas condiciones ambientales (por ejemplo, pH, concentración de oxígeno, concentración de dióxido de carbono, concentración de glucosa).

40 La invención contempla dispositivos en forma de tarjetas, tiras, discos, etiquetas adhesivas, etiquetas, sondas, sensores, y dispositivos electrónicos pequeños, y similares. Los dispositivos contemplados se pueden integrar en el material del recipiente o como alternativa, se pueden fabricar por separado del recipiente y posteriormente, se pueden fijar o adherir de forma permanente o no permanente a la superficie externa del recipiente.

45 En una realización, un recipiente comprende un dispositivo indicador de la temperatura. En una realización preferente, un recipiente comprende tanto un dispositivo indicador de temperatura como un dispositivo indicador del tiempo transcurrido, ya sea por separado como dispositivos individuales o combinados como un solo dispositivo. En otras realizaciones, el recipiente comprende un dispositivo indicador de la temperatura, un dispositivo indicador del tiempo transcurrido y uno o más dispositivos que indican una condición ambiental. La pluralidad de dispositivos se puede fabricar por separado como dispositivos individuales o se puede fabricar como un solo dispositivo.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "dispositivo indicador de la temperatura" se refiere a un dispositivo que detecta, mide, y/o indica una temperatura del recipiente y/o contenidos del recipiente que comprende uno o una pluralidad de "indicadores de temperatura". Como se usa en el presente documento, la expresión "indicador de temperatura" se refiere a un indicador que produce una señal que indica una temperatura. El indicador de temperatura puede producir una señal que corresponde a la temperatura o exposición en tiempo real para cualquier período de tiempo determinado previamente. En realizaciones en particular, el indicador de temperatura es reversible. En otras realizaciones, el uno o más indicadores de temperatura indican de forma irreversible que el recipiente y/o contenidos del recipiente han alcanzado una temperatura determinada previamente o han experimentado una temperatura determinada previamente durante un periodo de tiempo en particular. En otras realizaciones, un dispositivo indicador de la temperatura comprende uno o más indicadores de la temperatura reversibles e irreversibles en cualquier número o combinación.

65 El dispositivo indicador de la temperatura puede ser activado por el usuario, o puede ser activado por exposición a una temperatura determinada previamente. Como se usa en el presente documento, la expresión "temperatura determinada previamente" se refiere a una temperatura o intervalo de temperaturas seleccionado para controlar por

el usuario. En diversas realizaciones, la temperatura determinada previamente es una "temperatura diana" que indica la temperatura o intervalo de temperaturas para los que el recipiente se contempla para su uso. En diversas realizaciones, un dispositivo indicador de la temperatura proporciona indicadores de temperatura que indican una o más temperaturas determinadas previamente, es decir, temperaturas del recipiente y/o contenidos del recipiente a, por encima de, o por debajo de una temperatura diana, o por encima, por debajo o dentro de un intervalo de temperaturas diana. La presente invención contempla una diversidad de temperaturas e intervalos de temperatura diana, sin limitación.

Para uso en indicadores de temperatura de la presente invención se contemplan diversos tipos de señales. Por ejemplo, los indicadores de temperatura pueden indicar temperatura produciendo una señal visual (por ejemplo, una pantalla digital, un cambio de color, un gráfico), una señal audible, una señal de infrarrojos, una señal de radio, una señal analógica, una señal digital, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, el dispositivo indicador de la temperatura puede incluir uno o más de: una pantalla de cristal líquido (LCD) para indicar la temperatura; una voz o sintetizador de voz para indicar la temperatura o para especificar un artículo está por debajo o supera una temperatura diana determinada previamente; una señal analógica, de infrarrojos, o de radio que indica la temperatura a través de ondas de sonido, ultrasónicas u otro tipo de ondas; y/o una señal digital que indica la temperatura por vía electrónica.

Los indicadores de temperatura que producen indicaciones visuales de temperatura pueden producir una señal que comprende un color que corresponde a una temperatura del recipiente y/o contenidos del recipiente que están a, por encima, o por debajo de una temperatura diana, o por encima, por debajo o dentro de un intervalo de temperaturas diana. La presente invención contempla que se puede usar cualquier combinación de color con cualquier número y combinación de indicadores de temperatura, sin limitación. Alguien que tenga experiencia en la materia podría emplear cualquier número de agentes químicos que reflejen ciertos colores a ciertas temperaturas y podría seleccionar sustancias químicas de este tipo para reflejar un color deseado para que haga correspondencia con una temperatura en particular.

En realizaciones ilustrativas adicionales, los dispositivos indicadores de la temperatura pueden comprender una o una pluralidad de escalas de temperatura cada una comprendiendo uno o más o indicadores de temperatura que indiquen una temperatura o intervalos de temperatura determinados previamente. Cada indicador de temperatura dentro de una escala de temperatura puede producir una señal (por ejemplo, señal visual, señal digital).

Las escalas de temperatura incluyen de forma ilustrativa indicadores de temperatura en incrementos de 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, sobre intervalos de 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C, 110 °C, 125 °C, 130 °C, 140 °C, 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C, 190 °C, o 200 °C o superiores.

Los intervalos de temperatura ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, intervalos de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 65 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 50 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 42 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 37 °C o cualquier intervalo de temperaturas que intervenga.

La presente invención contempla, pero no se limita a, que un dispositivo indicador de la temperatura puede comprender una o más escalas de temperatura, con cada escala comprendiendo cualquier número y combinación de indicadores de temperatura, en cualquier incremento con respecto a cualquier intervalo de temperaturas para indicar una temperatura o intervalo de temperaturas determinados previamente.

En una realización, el dispositivo indicador de la temperatura comprende una pluralidad de indicadores de temperatura reversibles cada uno asociado con un intervalo de temperaturas específico y uno o más indicadores de temperatura irreversibles que indican cuando una o una pluralidad de temperaturas determinadas previamente se ha alcanzado o se ha experimentado durante cualquier período de tiempo determinado previamente. Los indicadores reversibles proporcionan de forma individual indicaciones visuales de la temperatura en tiempo real. Las indicaciones visuales de temperatura corresponden a la temperatura del recipiente y/o contenidos de los recipientes que están a, por encima, o por debajo de una temperatura diana, o por encima, por debajo o dentro de un intervalo de temperaturas diana. Un indicador irreversible mantiene una indicación visual una vez que se ha alcanzado la temperatura determinada.

La presente invención contempla adicionalmente recipientes que comprenden uno o más dispositivos indicadores de la temperatura y uno o más dispositivos indicadores del tiempo transcurrido, o dispositivos que indican diversas condiciones ambientales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dispositivo indicador del tiempo transcurrido" se refiere a un dispositivo que comprende uno o una pluralidad de "indicadores del tiempo transcurrido". Como se usa en el presente documento, la expresión "indicador del tiempo transcurrido" se refiere a un indicador que mide, controla, e indica cuando ha transcurrido un período de tiempo determinado previamente. Cada indicador del tiempo transcurrido puede estar independientemente activado por el usuario o puede estar activado por exposición a una

temperatura o intervalo de temperaturas determinados previamente en particular.

Una vez que se ha activado, un indicador del tiempo transcurrido indica el tiempo desde la activación. En una realización, indicador del tiempo transcurrido un dado mide un periodo de tiempo determinado previamente y a continuación produce una señal que indica cuando transcurrido el periodo de tiempo determinado previamente. En diversas realizaciones ilustrativas, un dispositivo indicador del tiempo transcurrido comprende 1, 2, 3, 4, 5, o más indicadores del tiempo transcurrido, cada uno siendo capaz de manera individual de una activación independiente un usuario por exposición a la misma temperatura o intervalo de temperaturas determinados previamente o a uno diferente.

En diversas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, un recipiente que comprende un indicador del tiempo transcurrido que indica el tiempo que el recipiente y/o sus contenidos se han expuesto, experimentado, o mantenido a una o una pluralidad de temperaturas o intervalos de temperatura determinados previamente. En una realización relacionada, el indicador del tiempo transcurrido indica un período de tiempo determinado previamente al que los recipientes y/o sus contenidos se han expuesto a, experimentado, o mantenido a una o una pluralidad de temperaturas o intervalos de temperatura determinados previamente. El indicador del tiempo transcurrido puede producir una señal continua o una o una pluralidad de señales en puntos en los que ha transcurrido un porcentaje predeterminado del tiempo total determinado previamente, por ejemplo, produce una señal a intervalos regulares del período de tiempo transcurrido total a medir.

En una realización, un indicador del tiempo transcurrido produce una señal a intervalos regulares de tiempo transcurrido o total medir. Por ejemplo, si el indicador del tiempo transcurrido se diseña para medir e indicar un tiempo transcurrido total de una hora, el indicador puede producir una señal para indicar el punto en el que han transcurrido 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, y una hora. Los intervalos regulares a modo de ejemplo incluyen intervalos de 1 minuto, intervalos de 2 minutos, intervalos de 5 minutos, intervalos de 10 minutos, intervalos de 15 minutos, intervalos de 20 minutos, intervalos de 30 minutos, intervalos de 45 minutos, intervalos de 60 minutos, intervalos de 90 minutos, intervalos de 120 minutos o superiores. Los números a modo de ejemplo de intervalos regulares dentro de cualquier periodo de tiempo transcurrido total incluyen intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

En otra realización, un indicador del tiempo transcurrido produce una señal continua que indica el periodo de tiempo que ha transcurrido o que aún tiene que transcurrir (es decir, el tiempo restante). Por ejemplo, un indicador del tiempo transcurrido que se diseña para medir e indicar el tiempo transcurrido total de una hora puede presentarse en forma de una barra de progreso, gráfico de sectores, o reloj, en el que se produce una señal después de la activación y aumenta linealmente en comparación con la fracción del tiempo transcurrido total que ha transcurrido. En una realización, una vez que ha transcurrido el tiempo total, el indicador del tiempo transcurrido puede dejar de producir la señal o producir una señal diferente para indicar que ha transcurrido el tiempo total.

En una realización ilustrativa en particular, el dispositivo indicador del tiempo transcurrido comprende una o una pluralidad de cualquier combinación de indicadores del tiempo transcurrido. Cada indicador del tiempo transcurrido se puede activar de forma independiente por un usuario o se puede activar mediante exposición a una temperatura determinada previamente diferente. Además, cada indicador del tiempo transcurrido puede medir y producir una señal durante periodos de tiempo determinados previamente diferentes.

Simplemente para fines de ilustración, un dispositivo indicador del tiempo transcurrido individual puede comprender: un indicador del tiempo transcurrido que es activado por el usuario y que mide e indica un tiempo transcurrido de 1 hora; un indicador del tiempo transcurrido que es activado por el usuario y que mide e indica un tiempo transcurrido de 2 horas; un indicador del tiempo transcurrido que es activado por el usuario y que mide e indica un tiempo transcurrido de 10 minutos; un indicador del tiempo transcurrido que se activa por exposición a una temperatura determinada previamente de 4 °C y que mide e indica un tiempo transcurrido de 1 hora, 2 horas, o más desde la activación; y/o un indicador del tiempo transcurrido que se activa por exposición a una temperatura determinada previamente en el intervalo de 30 °C-40 °C, preferentemente 37 °C y que mide e indica un tiempo transcurrido de 1 horas, 2 horas, o más desde la activación.

Los tipos de señales a modo de ejemplo producidas indicadores del tiempo transcurrido incluyen, pero no se limitan a, señales visuales, señales audibles, señales de infrarrojos, señales de radio, señales digitales, señales analógicas, y combinaciones de las mismas.

La presente invención contempla adicionalmente, en parte, recipientes que comprenden un dispositivo indicador que comprende uno o más indicadores ambientales que miden, controlan e indican, por ejemplo, el pH, concentración de dióxido de carbono, concentración de oxígeno, osmolaridad, o concentración de glucosa de los contenidos del recipiente. En una realización, un indicador ambiental controla y produce de forma continua una señal que indica la condición ambiental. En otra realización, un indicador ambiental controla y produce una señal en uno o más periodos de tiempo determinados previamente y/o a intervalos regulares. La señal es preferentemente una señal visual, más preferentemente una señal alfanumérica producida en un LED, OLED, o LCD.

En diversas realizaciones, los indicadores ambientales comprenden sensores digitales que miden, controlan e indican las condiciones ambientales en el recipiente. Además, se contempla que los sensores se pueden calibrar para medir cualquier intervalo de condiciones ambientales, sin limitación. Por lo tanto, un intervalo normal para cada condición ambiental se puede programar previamente en cada dispositivo de indicación ambiental. El intervalo puede

- 5 incluir uno o más de un umbral mínimo, condición óptima, o umbral máximo. En una realización en particular, cuando la condición ambiental que se va a medir o controlar está fuera de los valores de umbral mínimo o máximo, el indicador ambiental producirá una señal audible para indicar que la condición ambiental está dentro de un intervalo de un intervalo aceptable.
- 10 Otros indicadores ambientales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, concentración de Ca^{++} , potasio, sodio, magnesio, manganeso, sulfato, fosfato, y cloruro.

La presente invención, contempla, en parte, recipientes que comprenden una combinación de dispositivos indicadores que indican, por ejemplo, la temperatura de los contenidos del recipiente, el tiempo que el recipiente ha estado a cualquier temperatura dada, y opcionalmente, una o más condiciones ambientales diversas (por ejemplo, pH, concentración de oxígeno, concentración de glucosa). En realizaciones preferentes, los dispositivos de combinación pueden incluir y de las características de los dispositivos e indicadores individuales desvelados en el presente documento. Alguien que tenga experiencia en la materia podría observar que los dispositivos de indicación ambiental están preferentemente en contacto con los contenidos del recipiente. Los dispositivos contemplados se

- 15 pueden integrar en el material del recipiente en un punto en el que la permeabilidad del recipiente es tal que el dispositivo sensor ambiental en particular está en contacto con el lumen o contenidos del recipiente. En otra realización, los dispositivos de indicación ambiental se pueden fabricar por separado del recipiente y posteriormente, se pueden fijar o adherir de forma permanente o no permanente a la superficie exterior del recipiente. En una realización relacionada, el dispositivo fijado o adherido perfora el recipiente de modo que el dispositivo sensor ambiental está en contacto con el lumen del recipiente o con los contenidos del recipiente. En otra realización relacionada, el dispositivo fijado o adherido se aplica a una parte del dispositivo que es permeable, de modo que el dispositivo sensor ambiental en particular está en contacto con el lumen del recipiente o contenidos del recipiente.

En una realización preferente, el recipiente comprende una combinación de un dispositivo indicador de la temperatura y un dispositivo indicador del tiempo transcurrido, ya sea por separado como dispositivos individuales o como un solo dispositivo. En otras realizaciones, el recipiente comprende una combinación de un dispositivo indicador de la temperatura, un dispositivo indicador del tiempo transcurrido y uno o más dispositivos indicadores de la condición ambiental ya sea por separado como dispositivos individuales o como un solo dispositivo.

- 30 El dispositivo indicador de la combinación se fabrica reforma integral con el recipiente, puede estar unido de forma permanente o no permanente a la superficie exterior del recipiente, se puede laminar a la superficie exterior del recipiente o se puede revestir con el recipiente dentro de un revestidor para recipiente. El dispositivo puede ser un dispositivo electrónico pequeño, una sonda, un sensor, o una combinación de los mismos.

El dispositivo indicador de la combinación puede ser de cualquier forma o tamaño. Las formas a modo de ejemplo del dispositivo indicador de la combinación, incluyen, pero no se limitan a: tarjetas, tiras, discos, etiquetas adhesivas, etiquetas, sondas, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo un dispositivo indicador de la temperatura en forma de una tarjeta o tira puede comprender una o una pluralidad de discos indicadores de la temperatura o viceversa.

- 40 Como será evidente para alguien con experiencia en la materia, se pueden usar diversos tipos de diseño gráfico para visualizar el tiempo transcurrido y la temperatura del recipiente que incluyen, pero no se limitan a, diversas líneas, curvas, elipses, rectángulos o puntos. De forma análoga, también se pueden usar indicios que muestran la evolución del frente de migración del líquido, que incluyen, pero no se limitan a, diversas flechas, curvas, líneas y puntos de diferentes tamaños. Por ejemplo, la señal se puede visualizar en una ventana continua como progreso en una barra de progreso o en una pluralidad de ventanas visibles a intervalos de tiempo transcurrido en particular para temperaturas o un intervalo de temperaturas en particular. Además, cada realización se puede adaptar para incluir numerosos indicios adicionales para mostrar el estado del indicador de tiempo o temperatura del recipiente. Los indicios de este tipo incluyen símbolos gráficos que muestran el avance gradual para el tiempo transcurrido total con respecto a la temperatura.

En una realización más preferente, el recipiente comprende una combinación de un dispositivo indicador de la temperatura y un dispositivo indicador del tiempo transcurrido.

- 55 Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

A través de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que los términos "comprender", "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "que consiste en" se hace referencia a que incluye, y se limita a, todo lo que siga a la expresión "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u

- 65

obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se hace referencia a la inclusión de cualquier elemento enumerado después de la expresión, y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen con la actividad coacción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y pueden estar presentes o no dependiendo de si influyen o no en la actividad o acción de los elementos enumerados.

A través de la presente memoria descriptiva la referencia a "una realización" o "una realización" se refiere a que un elemento distintivo, estructura o característica en particular descritos en relación con la realización está incluido en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, no todas las apariciones de las expresiones "en una realización" o "en una realización" en diversos lugares a través de la presente memoria descriptiva hacen referencia necesariamente a la misma realización. Además, los elementos distintivos, que estructuran sus características en particular se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

15 Ejemplos

Se realizó el análisis de varios parámetros biológicos de poblaciones de células madre o precursoras hematopoyéticas tratadas con agentes que estimulan la ruta de la prostaglandina para desarrollar métodos clínicos para aumentar el potencial de injerto y la expansión de las células (Véase la Figura 2). Los resultados de estos experimentos y los resultados de los ensayos clínicos en Fase 1b se describen a continuación.

Ejemplo 1

25 ENSAYOS DE AMPc COMPETITIVO

El ensayo de AMPc se realizó en células CD34⁺ usando el kit de detección de AMPc LANCE® (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, 3.000 células CD34⁺ (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) se tomaron en alícuotas en cada pocillo de una placa de color blanco opaca de 384 pocillos en el tampón de estimulación recomendado. Los ensayos se realizaron por triplicado para todas las condiciones.

Las células CD34⁺ se colocaron en hielo antes de su estimulación con DMSO o 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C. Para los ensayos realizados a otras temperaturas, por ejemplo, 25 °C o 37 °C, se añadió DMSO o 16,16-dimetil PGE₂ a las células CD34⁺ a temperatura ambiente y a continuación las placas se incubaron con DMSO o 16,16-dmPGE₂ a la temperatura experimental (25 °C o 37 °C).

Las células CD34⁺ se incubaron durante periodos de 5, 15, 30, 60 o 120 minutos. Después del periodo de incubación, el tampón de detección se añadió a las células estimuladas y las células se incubaron durante un periodo adicional de 1 hora a temperatura ambiente en el tampón de detección, independientemente de la temperatura de estimulación. Las placas de ensayo se analizaron usando un Lector de Múltiples Etiquetas EnVision® 2104 (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se realizó un ensayo de AMPc competitivo usando células CD34⁺ para determinar los efectos del tiempo (incubación durante 15, 30, 60, o 120 minutos), temperatura (incubación a 4 °C, 25 °C, o 37 °C), y concentración final de 16,16-dimetil PGE₂ (1 μM, 10 μM, 50 μM, o 100 μM) en la producción de AMPc en las células.

Los resultados mostraron que la respuesta máxima de AMPc se producía aproximadamente a los 30-60 minutos de incubación; que las temperaturas de incubación daban lugar a una actividad de AMPc más consistente; y que la respuesta de AMPc era relativamente insensible a la dosis por encima de una concentración umbral de 10 μM (Véase la Figura 3). Un aumento estadísticamente significativo en la actividad de AMPc se observó cuando las células CD34⁺ se incubaron con 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C y 25 °C en comparación con el control de DMSO, para duraciones tan breves como 5 min y hasta 2 horas, a todas las concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂ sometidas a ensayo (1, 10, 50 y 100 μM) (p < 0,001). No se observó un aumento estadísticamente significativo en la producción de AMPc en las células CD34⁺ incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C en comparación con los controles de DMSO, en condiciones similares de tiempo y a través de todas las concentraciones sometidas a ensayo (1, 10, 50 y 100 μM) (p > 0,05 para todas las muestras).

La incubación a temperaturas más elevadas durante un periodo de tiempo más largo, condiciones que anteriormente se creía que estaban asociadas con una disminución de la viabilidad celular de CD34⁺ y una semivida de 16,16-dimetil PGE₂, mostraban una estimulación superior de AMPc sin influir de forma negativa en la viabilidad celular. Además, como se describe en el presente documento, el tratamiento de las células con 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C durante periodos de tiempo más cortos dio como resultado un aumento de la producción de AMPc pero no dio como resultado un aumento de la expresión de los genes que se crían importantes en la regulación de la migración dirigida, supervivencia, proliferación, e injerto de las células madre. La regulación positiva de los genes de este tipo, y por lo tanto la consecución de la respuesta biológica más consistente, necesitó el tratamiento de las células con 16,16-dimetil PGE₂ a temperaturas fisiológicamente relevantes, tales como 37 °C, para periodos de tiempo

aumentados de al menos una hora.

Ejemplo 2

5 EXPRESIÓN GENÉTICA

Matrices de Expresión del Genoma Completo

10 La sangre del cordón umbilical humano y las células CD34⁺ aisladas previamente de la sangre del cordón umbilical humano se adquirieron en Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, BC, Canadá). Las células incubaron en cualquiera de medio de dextrano de bajo peso molecular con un 5 % de albúmina en suero humano (LMD/HSA al 5 %) o medio Stem Span (Stem Cells Technology Inc.) para tratamiento *ex vivo* con 16,16-dimetil PGE₂. El ARN total se aisló de las células incubadas usando un Kit de Aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

15 El ARN amplificado biotinilado (ARNa) se preparó usando el protocolo estándar para el Kit de Amplificación de ARN MessageAmp II (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) y la Amplificación de Segunda Ronda opcional; el ARN de copia (ARNc) se transcribió en ARN etiquetado con biotina usando el Kit de Potenciación de Biotina MessageAmp II (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN etiquetado con biotina se purificó y se fragmentó de acuerdo con los protocolos de Applied Biosystems. 20 µg de ARN fragmentados se hibridaron a Human Genome U133 Más 2.0 GeneChips (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) durante 16 horas a 45 °C.

25 Los GeneChips se lavaron y se tiñeron en la Affymetrix Fluidics Station 450 y se escanearon usando el Escáner 3000 7G de Affymetrix GeneChip. Los datos de las imágenes se analizaron usando el software Affymetrix Expression Console y ajustes de análisis por defecto. Los datos de expresión de GeneChip se normalizaron mediante análisis de múltiples matices consistente a escala logarítmica (RMA) y se visualizaron en Spotfire para Genomics 3.1 (Tibco Spotfire, Palo Alto, CA). El análisis de rutas se realizó en MetaCore. (GeneGo, St. Joseph, MI).

30 La tecnología GeneChip se usó para determinar los efectos del tiempo (incubación durante 5, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 180, o 240 minutos), temperatura (incubación a 4 °C, 25 °C, o 37 °C), y concentración final de 16,16-dimetil PGE₂ (0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, o 100 µM) en la expresión genética celular.

qPCR Microfluida usando la plataforma Fluidigm

35 La cuantificación de la transcripción de PCR en tiempo real de células CD34⁺ tratadas *ex vivo* con 16,16-dimetil PGE₂ se realizó usando el sistema de microfluidos BioMark Dynamic Array (Fluidigm Corporation, South San Francisco, CA, USA). El ARN total se aisló de las células tratadas usando el Kit de Aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). El ADN complementario (ADNc) se transcribió de forma inversa a partir de 50 ng de ARN total aislado usando el Kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA).

45 El ADNc se amplificó previamente para genes diana específicos (96) usando una mezcla 200 nM de 96 padres de cebadores específicos de genes (véase la Tabla 1), incluyendo 6 genes de control de referencia usando el protocolo del Kit de Mezcla Maestra TaqMan PreAmp (Life Technologies). La amplificación de diana específica (STA) del ADNc se realizó usando 14 ciclos de amplificación con las condiciones de ciclado convencionales usando el protocolo del fabricante. El colorante EvaGreen (Biotium, Inc. Hayward, CA, USA) se añadió de acuerdo con el protocolo de EvaGreen de Fluidigm para detectar productos amplificados. Para las muestras, la mezcla de reacción contenía 3,0 µl de Mezcla Maestra de Expresión Genética (Life Tech.), 0,3 µl de Tampón de Carga de Muestra (Fluidigm), 0,3 µl de colorante EvaGreen 20X (Biotium, Inc.), 1,5 µl de cADN STA (1:5 estéril nH₂O) diluido, y 0,9 µl de diH₂O estéril para cargar en las entradas de muestra de la Matriz Dinámica 96.96 (Fluidigm).

55 Las muestras se desarrollaron por duplicado, de 5 a 9 pocillos. Para pares de cebadores, la mezcla de reacción contenía 2,5 µl de pares de Cebador Específico de Genes (20 µM) y 2,5 µl de Tampón de Carga de Ensayo (Fluidigm) para cargar en las entradas del ensayo en la Matriz Dinámica 96.96 (Fluidigm). Las matrices Dinámicas 96.96 se cargaron usando un Controlador HX de IFC NanoFlex (Fluidigm) y las reacciones en tiempo real se realizaron usando Sistema de PCR en Tiempo Real BioMark (Fluidigm).

60 Los resultados se analizaron usando el software de Análisis de PCR en Tiempo Real BioMark. Los Ct promedio se calcularon a partir de los replicados de la muestra y los Ct delta-delta ($\Delta\Delta Ct$) se calcularon usando la media de 6 genes de referencia (ACTB, GAPDH, HPRT1, QARS, ARPC2 y LRIG2) frente a un vehículo solo muestra. Los 28 Ct mencionados anteriormente o productos amplificados con propiedades de curva de fusión inapropiadas se excluyeron de los cálculos. Los resultados se presentan en Spotfire para Genomics 3.1 (Tibco Spotfire, Palo Alto, CA, USA) en formato de mapa de calor o como representaciones gráficas en Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

65

Tabla 1: Pares de Cebadores

Posición del Pocillo	Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
A1	AREG-F	CGGCTCAGGCCATTA TGC	AREG-R	GGTCCCAGAAAATGGTT CA
A2	AREGB-F	TCTCCACTCGCTCTTC CAACAC	AREGB-R	ATCAAGAGCGACAGCAC CACTG
A3	ATP6V0 A4-F	TGGACGACCATGGAG AAGAGTTC	ATP6V0A4 -R	ACTCGATGGTGTGGATG GCTTG
A4	AKAP12- F	CAGAAACAAGAGAGA GAATCTGCAA	AKAP12-R	TGTCTTCACATTCTGGTCT TCCA
A5	ADCY7-F	GCACTGGAGAACTTG GGAAAAT	ADCY7-R	GCATTCACAAGAGTACCC GAGG
A6	CCND1-F	CTTCCTGTCCTACTAC CGCCTC	CCND1-R	CTTGACTCCAGCAGGGCT TC
A7	C6orf17 6-F	TCGGACACACACACA CACACAC	C6orf176- R	AGCAACTTCGGACTCAGA CCTC
A8	CA2-F	GATGACTCTCAGGAC AAAGCAGTG	CA2-R	AACCTTGTCCATCAAGTG AACCC
A9	CA4-F	AAGGTCGTCTGGACT GTGTTCC	CA4-R	CTGAGAGAATGCCAGGA TCTGTTCC
A10	CREB5-F	AAGACTGCCCAATAA CAGCCAT	CREB5-R	GACAGGACTAGCAGGAG GGCTA
A11	COL1A1- F	TGCGATGACGTGATC TGTGACG	COL1A1-R	TTTCTTGGTCGGTGGGTG ACTCTG
A12	CREM-F	AAGAAGCAACACGCA AACGA	CREM-R	TTCTTTCTTCTCCTGCGA CACT
B1	CXCL1-F	CGGAAAGCTTGCCCTC AATCCTG	CXCL1-R	CAGTTGGATTTGTCCTG TTCAGC
B2	CXCL2-F	AAACCGAAGTCATAG CCCACTC	CXCL2-R	AGCCACCAATAAGCTTCC TCCTTC
B3	CXCL5-F	AGACCACGCAAGGAG TTCATCC	CXCL5-R	TCTTCAGGGAGGCTACCA CTTC
B4	CXCL6-F	AGCTTGAGTTTCTTGC CAGTCG	CXCL6-R	TTTCCTCGTGCTTCTGCA CTC
B5	CXCR4-F	TCCTGGCTTTCTTGC CTGTTG	CXCR4-R	TGAAGGAGTCGATGCTG ATCCC
B6	DUSP2-F	AACCAGATGGTGGAG ATCAGTGC	DUSP2-R	CCGCTGTTCTTCACCCAG TCAATG
B7	DUSP4-F	TGCATCCCAGTGGAA GATAACCAC	DUSP4-R	GCATCGATGTA CTATG GCTTCC
B8	ECEL1-F	GACTTCCTGCTGAAAC CCGATG	ECEL1-R	GGTCTTCTCATGGACCTC AAACTC

Posición del Pocillo	Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
B9	EDN1-F	ATTTGGGTCAACACTC CCGAGCAC	EDN1-R	TCACGGTCTGTTGCCTTT GTGG
B10	ETV3-F	ATGAAAGCCGGCTGT AGCATCG	ETV3-R	CAGGAAACTGATACCCTC CACCTC
B11	GULP1-F	GCAGCAGATTTCCCTC CAGATA	GULP1-R	TGTCTAACGGGTCGAGA CAAAA
B12	FGF9-F	TCGGTGTGGGCATTG TCTCTTG	FGF9-R	ACTGGATGCAAACCCATG AGCTG
C1	FGFR1-F	ATACCAGCTGGATGT CGTGGAG	FGFR1-R	ACATGAACTCCACGTTGC TACCC
C2	FLJ2735 2-F	TCACCGGCTTTCTTGC CATCTG	FLJ27352- R	TTCTTATCCCGGTTGCGG TCTG
C3	FOS-F	TACTCAAGCGGA GACAGAC	FOS-R	GTTGGCAATCTCGGTCTG CAAAG
C4	FOSL2-F	GCAGTTGGGTTTCTG GCTTGAG	FOSL2-R	TCCTGCTACTCCTGGCTC ATTC
C5	FOXA1-F	TCCTCAGGAATTGCCC TCAAGAAC	FOXA1-R	ATGACATGACCATGGCAC TCTGC
C6	GEM-F	GCCGAGAAGTGTCTG TATCAGAAG	GEM-R	CTGTCGCACAATGCCCTC AAAC
C7	GNAL-F	AGAATCGACAGCGTC AGCTTGG	GNAL-R	TGGCCACCAACATCAAAC ATGTGG
C8	HAS1-F	GCCTGGTACAACCAG AAGTTCC	HAS1-R	ACCTGGAGGTGTACTIONG GTAGC
C9	HOMER 1-F	AGAAGCTGCTCGACT AGCAAAGG	HOMER1- R	GCGGATTCCTGTGAAGG TGTACTIONG
C10	HR-F	AGGACCAAGAGCATC AAAGAGGAG	HR-R	TGTATTCGCTCATGGCCC AAGC
C11	IL11-F	AGCGGACAGGGAAG GGTTAAAG	IL11-R	GGCGCAAACACAGTTC ATGTC
C12	INHBA-F	TCACGTTTGCCGAGTC AGGAAC	INHBA-R	TGACAGGTCCTGCCTTC CTTG
D1	JAG1-F	TGGGCCCGACTGCAG AATAAAC	JAG1-R	ATCCACACAGGTCGCTCC AAAG
D2	JOSD1-F	TCCAGGACAGCAATG CCTTCAC	JOSD1-R	CATGGTGTGGGAGACA ACCTCTG
D3	KCTD20- F	TCTAGGTCCCAGGAA TGAAGACC	KCTD20-R	GGAAGTGAAGATTTGCT GGCTGAG
D4	KIAA119 9-F	TTGGCCTCCTGTCAA GTCTGG	KIAA119- R	ATCCAGAAGGTGGACAC AGCATTG
D5	LGALS12 -F	CGGGAATGAGGAAGT GAAGGTGAG	LGALS12- R	AGCGTGTCCACATGAGA CAGTG

Posición del Pocillo	Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
D6	LIF-F	TGCTTCATCCGGCTTA GCTTGG	LIF-R	AGTTTGTCTTTCTCGAAG CCCATC
D7	LONRF2-F	AGGGTCACAGCCACA TGAATGC	LONRF2-R	AATTCTCCGAGCTCCCTG CATC
D8	LXN-F	ACAAGTTAAGGTGAA CTGCACAGC	LXN-R	TGCAGTTTCTTGTCCTG TGAAGG
D9	MALT1-F	TGGTCACAGCTGGAT GTTTGGC	MALT1-R	TCAGAGACGCCATCAACA CTTCTC
D10	MPPE1-F	TGGCTGACACCCATTT GCTTGG	MPPE1-R	TCTCCATCTGCCATTCCCT TCG
D11	MYOM2-F	TGACCATCATGGAAG GGAAGACC	MYOM2-R	CTGGATGTCCTGGTCGTT CTTG
D12	NPTX1-F	ATCAGCGAGCTCGAG AAAGGTC	NPTX1-R	TAGTTGGTCCGCAGTGG GAATG
E1	NR4A2-F	GCTGTTGGGATGGTC AAAGAAGTG	NR4A2-R	TCTTCGGTTTCGAGGGCA AACG
E2	NR4A3-F	TGCGTCCAAGCCCAA TATAGCC	NR4A3-R	TGTATGTCTGCGCCGCAT AACTG
E3	PLAT(2)-F	GTGTGCTGGAGACAC TCGGA	PLAT(2)-R	CATCGTTCAGACACACCA GGG
E4	NTRK1-F	AGCACCGACTATTACC GTGTGG	NTRK1-R	TCGGTGGTGAACCTACG GTACAGG
E5	OSM-F	TGCCTGTCGGTTGCTT GGATTC	OSM-R	TGCACCACCTGTCCTGAT TTACAG
E6	PCDH8-F	TCATCAACCACATGCA GAGTGGAC	PCDH8-R	AAGGTTGACATCTGGGCT GGTG
E7	PDE4A-F	TCCACAACATTCCTGG ACAAACAG	PDE4A-R	TTCCTTCATCGTGGGTGA TGGG
E8	PDE4B-F	ACAAGTTCAGGCGTT CTTCTCC	PDE4B-R	CCATGTTGCGAAGGACCT GAATG
E9	PDE4D-F	TTGTGACTCCATTTGC TCAGGTC	PDE4D-R	GATGGATGGTTGGTTGC ACATGG
E10	PDLIM3-F	ACAAATGTGGGAGTG GCATAGTCG	PDLIM3-R	ACTCAGGGTGCCGGTACT TATC
E11	PLAT-F	TCTCAGATTTCTGTGTG CCAGTGC	PLAT-R	GCACGTGGCCCTGGTATC TATTTTC
E12	PLAUR-F	ATCGTGCGCTTGTGG GAAGAAG	PLAUR-R	ACCCACACACAACCTCGG TAAG
F1	PLK2-F	TGGAGGAGAACCTCA TGGATGG	PLK2-R	TTAGCCACTGAAGGAGG TAGAGC
F2	PPARD-F	TCCTTCCAGCAGCTAC ACAGAC	PPARD-R	ATCTGCAGTTGGTCCAGC AGTG

Posición del Pocillo	Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
F3	RASD1-F	AGGCTTCAAGAAACC GTCATGC	RASD1-R	ACAGCAACCCGGAATCA CAGAC
F4	PTGER2-F	TCCTGGCTATCATGAC CATCAC	PTGER2-R	TTCGGGAAGAGGTTTCAT TCAT
F5	REN-F	TGTACCTTTGGTCTCC CGACAG	REN-R	GGGCATTCTCTTGAGGAA GATCCG
F6	RGS1-F	TGCTGCTGAAGTAAT GCAATGGTC	RGS1-R	TGACCAGTTTGGTTGGCA AGAAG
F7	RGS2-F	CAAACAGCAAGCTTT CATCAAGCC	RGS2-R	AAGCCCTGAATGCAGCA AGACC
F8	S1PR1-F	ACGTAGGCTGTGGGA AGATGAAG	S1PR1-R	TGGAACTTTGGCCTCAG CGAAG
F9	SC5DL-F	AAGCGCCTACATAAA CCTCACC	SC5DL-R	AGCATGACTTGCAAATG GAGTAGG
F10	SGIP1-F	AAGGAGCAGACCCAA GCAAATG	SGIP1-R	GCCAGCAGGAAATGACA ACACC
F11	SGK1-F	AGGAGCCTGAGCTTA TGAATGCC	SGK1-R	TGATTTGCTGAGAAGGA CTTGGTG
F12	SHISA2-F	ACTATCACCCGCTGCT TCTCTG	SHISA2-R	CGCCAAACCATAACCACA AGGC
G1	SIK1-F	ACTCACCGCCATGT ATAGTC	SIK1-R	ACAAGTGTGAGAGCTGGT TCCC
G2	SSTR1-F	ATGGTGACAGGTGTG AGTCTGG	SSTR1-R	TTGAGTGCTGCTTGCCT CCTG
G3	SV2C-F	TGTCTGCTCTGCTGAT GGACAG	SV2C-R	AAGCACCATAGAGCCAC CTAGC
G4	SYT4-F	CACCAGCCGGGAAGA ATTTGATG	SYT4-R	GTGAAGACCAGGCCAAA TGCAC
G5	SYTL3-F	GAATGAACGACCGCT TGCTTGG	SYTL3-R	CCAACAGCTGTGTCTCCC TTTG
G6	TAC1-F	TACGACAGCGACCAG ATCAAGGAG	TAC1-R	TCCAAAGAACTGCTGAG GCTTGG
G7	THBS1-F	GGCAGACACAGACAA CAATGGG	THBS1-R	TGTCCCCTTCATTGAGGA TACCG
G8	PTGER4-F	TCTTACTCATTGCCAC CTCCCT	PTGER4-R	TGGCTGATATAACTGGTT GACGA
G9	TMCC3-F	TTCAGCCGGTGAGGC TGTTATC	TMCC3-R	GGCAAGGCAATAAACAC AGAGTGG
G10	TNFRSF1B-F	TGTCCACACGATCCCA ACACAC	TNFRSF1B-R	TGTCACACCCACAATCAG TCCAAC
G11	ULBP2-F	GCTCTCCTTCATCAA GTCTCTCC	ULBP2-R	GCACAGAAGGATCTTGG TAGCG

Posición del Pocillo	Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
G12	VPS37B-F	ATGGTGCAGAAGATG GAGGAGAC	VPS37B-R	GGTCAAGCGTGCTTTCAA CGTG
H1	WT1-F	TGCCCCACTTACAGAT GCACAGC	WT1-R	ACACTGGAATGGTTTCAC ACCTG
H2	YPEL4-F	TCACCGCACTTACAGC TGTGTC	YPEL4-R	ATGGCTCCCTTGAAGG ACTTG
H3	PDE3B-F	TGATGAAGACGGTGA AGAATTAGA	PDE3B-R	AGGTGGTGCATTAGCTG ACAAA
H4	ZNF331-F	AACAATGGCCCAGGG TTTGGTG	ZNF331-R	TACAGGTCCTCTGAGCA GAGTTC
H5	TGFB2-F	AGCATGCCCGTATTTA TGGAGT	TGFB2-R	GCAGATGCTTCTGGATTT ATGG
H6	TCF4-F	ATCGAATCACATGGG ACAGATG	TCF4-R	GCTGTTAAGGAAGTGGT CTCTTG
H7	ACTB-F	TGGCCGAGGACTTTG ATTGCAC	ACTB-R	GGACTTCCTGTAACAACG CATCTC
H8	ARPC2-F	AGGTGAACAACCGCA TCATCGAG	ARPC2-R	TACTGCTTCCGTTTTGTTT CCG
H9	GAPDH-F	AGCTCATTTCTGGTA TGACAACG	GAPDH-R	CTCTTCTCTTGCTCTT GCTG
H10	HPRT1-F	TGCAGACTTTGCTTTC CTTGGTC	HPRT1-R	CAAGCTTGCACCTTGAC CATC
H11	LRIG2-F	TGGCAACAGCTGACA GAAATGGG	LRIG2-R	ACAAGCAGATGCACACC AGAGC
H12	QARS-F	AGGTTCCCTTTGCACC CATTGTC	QARS-R	TTAAATCCTGGCTCTGGC TCCTC

Elemento Distintivo de la Expresión Genética de 16,16-dimetil PGE₂

- 5 Se obtuvo una medida inicial del elemento distintivo de la expresión genética de células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 37 °C en comparación con células CD34⁺ tratadas con vehículo (véase la Figura 4). Un total de 608 genes se modularon a un nivel estadísticamente significativo (365 regulados de forma positiva o 243 regulados de forma negativa) en células CD34⁺ tratadas en estas condiciones. CXCR4, un mediador conocido de la migración dirigida de HSC al nicho de la médula ósea a través de su interacción con SDF-1α se
- 10 regulo de forma positiva 18 veces con respecto al control tratado con DMSO. CREM, uno de muchos genes sensibles a AMPc, también estaba regulado de forma positiva. También se observaron la modulación de la expresión genética asociada con las rutas de señalización de PGE₂, adhesión celular, y señalización de quimioquinas. Sin embargo, no se observó aumento de la expresión genética asociada con apoptosis o muerte celular.
- 15 El perfil de expresión genética para las células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM durante 120 minutos a 37 °C en comparación con el control de DMSO control, distingue las células de la invención de otras células conocidas. Los métodos de la invención producen células que presentan una potenciación o aumento del potencial injerto/injerto y un aumento de la expansión *in vivo* en comparación con las células de control, no tratadas, o células tratadas a 4 °C. A continuación aparece una tabla de genes en el elemento distintivo de la expresión genética de las
- 20 células de la invención que muestran una regulación de amplitud elevada.

Tabla 2: Genes altamente regulados en un Elemento Distintivo de la Expresión Genética de dmPGE₂

Símbolo del Gen	Descripción	Veces de cambio (aumentos)
HAS1	Hialuronano sintasa 1	55,83
GEM	Proteína GEM de unión a GTP	28,18
DUSP4	Proteína fosfatasa 4 de doble especificidad	25,75
AREG	Anfirregulina	23,32
NR4A2	Proteína 1 relacionada con receptor Nuclear	22,30
REN	Renina	19,50
CREM	Modulador de elemento sensible a AMPc	12,90
COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	10,50
FOSL2	Antígeno 2 relacionado con Fos	8,11
CXCR4	Receptor 4 quimioquina CXC	7,33

Por consiguiente, a diferencia de los protocolos preclínicos, la incubación a 37 °C, que previamente se pensaba que estaba asociada con una disminución de la viabilidad de las células CD34⁺ y la semivida de 16,16-dimetil PGE₂, de forma inesperada presentaba un aumento de la expresión genética asociada con las rutas de señalización celular de PGE₂R₂/R₄, migración celular dirigida, y proliferación. Además, no se observaron cambios en la expresión genética que pudieran indicar una disminución de la viabilidad celular.

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si las células CD34⁺ respondían al 16,16-dimetil PGE₂ cuando las células se trataban en el contexto de un protocolo de tratamiento clínico con sangre completa del cordón umbilical. Las células de sangre del cordón umbilical humanas se incubaron durante 120 minutos a 37 °C con vehículo o en 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM (Véase la Figura 17). Después de la incubación, las células Lin(-)CD34⁺ se aislaron usando clasificación magnética de Miltenyi. El ARN etiquetado con biotina se preparó a partir de las células, y los perfiles de expresión genética se analizaron. De forma coherente con los resultados para las células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical incubadas con diferentes concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂, las células Lin(-)CD34⁺ aisladas de la sangre del cordón umbilical humano reprodujeron el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂. También se preparó ARN de la sangre completa del cordón umbilical tratada, de células Lin(+)-CD34⁺, células Lin(-) CD34⁺ CD38⁺, y de células Lin(-) CD34⁺ CD38⁻ CD90⁺. La Figura 17 muestra que la sangre completa del cordón umbilical (más de un 99 % de células del Linaje +) no respondían a 16,16-dimetil PGE₂ de una manera similar a como lo hacían las células Lin(-)CD34⁺ aisladas a partir de sangre completa del cordón umbilical o de células Lin(+)-CD34⁺.

Parámetros de Tiempo

Los perfiles de expresión genética se analizaron para células CD34⁺ incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM a 37 °C durante 5, 15, 30, 60, o 120 minutos. Para periodos de incubación (por ejemplo, tratamiento) inferiores a 120 minutos, las células se lavaron en medio para retirar el 16,16-dimetil PGE₂ y a continuación las células se incubaron durante el período de tiempo restante en medio para permitir un tiempo para que se produjera la expresión genética (Véase la Figura 5).

Los resultados mostraban que exposiciones más largas a 16,16-dimetil PGE₂ proporcionaban magnitudes mayores de expresión genética en el elemento distintivo de expresión de 16,16-dimetil PGE₂ (Véase la Figura 6). Por el contrario, los tiempos de incubación muy cortos (5-15 minutos) daban como resultado cambios mínimos de la expresión genética con el elemento distintivo de expresión de 16,16-dimetil PGE₂. Los cambios en la expresión genética eran evidentes después de 30 minutos de incubación con 16,16-dimetil PGE₂ pero continuaban aumentando hasta los 120 minutos de incubación, a pesar del hecho de que todos los experimentos se evaluaron después de un total de 120 minutos de tiempo transcurrido.

Esto se produce como contraste a las observaciones previas que sugerían que los tiempos de incubación cortos podrían ser suficiente para cargar los receptores EP₂/4 con fármaco antes del trasplante, en el que se creía que se

podría producir biología corriente abajo. Los resultados actuales demuestran que se requieren tiempos de incubación más largos (superiores a 30 minutos) a temperaturas fisiológicamente antes, tales como 37 °C, para conseguir un beneficio biológico.

- 5 También se usó una plataforma de qPCR microfluida para medir los cambios de expresión de un elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ de los genes enumerados en la Tabla 3 en células CD34⁺ humanas en diferentes tiempos de incubación. El análisis de la expresión genética incluye un formato de 96 pocillos para detectar los genes enumerados en la Tabla 3.

10

Tabla 3: Genes de Elemento Distintivo para ensayo Fluidigm

ADCY7	CXCL 1	FGFR1	INHBA	MYO M2	PLAT (1)	SC5D L	THBS1
AKAP1 2	COL1 A1	FLJ273 52	JAG1	NPTX 1	PLAT (2)	SGIP1	TMCC3
AREG	CXCL 2	FOS	JOSD1	NR4A 2	PLAUR	SGK1	TNFRSF 1B
AREGB	CXCL 5	FOSL2	KCTD2 0	NR4A 3	PLK2	SHIS A2	ULBP2
ARPC2	CXCL 6	FOXA1	KIAA11 99	NTRK 1	PPAR D	SIK1	VPS37B
ATB6V 0A4	CXCR 4	GEM	LGALS 12	OSM	PTGE R2	SSTR 1	WT1
C6orf17 6	DUSP 2	GNAL	LIF	PCDH 8	PTGE R4	SV2C	YPEL4
CA2	DUSP 4	GULP1	LONRF 2	PDE3 B	RASD1	SYT4	ZNF331
CA4	ECEL1	HAS1	LRIG2	PDE4 A	REN	SYTL 3	ACTB
CCND1	EDN1	HOME R1	LXN	PDE4 B	RGS1	TAC1	GAPDH
CREB5	ETV3	HR	MALT1	PDE4 D	RGS2	TCF4	HPRT1
CREM	FGF9	IL11	MPPE1	PDLIM 3	S1PR1	TGFB 2	QARS

15

La Figura 14A muestra que los elementos distintivos de la expresión genética adecuados eran detectables después de al menos aproximadamente 60 minutos de exposición constante al 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C hasta al menos aproximadamente 4 horas de exposición constante al 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C. Sin embargo, la respuesta de la expresión genética máxima se observó después de al menos aproximadamente dos horas de exposición constante al 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C. La Figura 14B muestra la expresión genética media para los genes distintivos enumerados en la Tabla 3 y que cambios en la expresión genética máxima se observaron después de al menos aproximadamente dos horas a 37 °C. La Figura 14C muestra los datos de expresión para CXCR4, que es responsable de la migración dirigida al nicho de la médula ósea. Es interesante observar que la cinética de la respuesta de la expresión genética es mucho más lenta en comparación con la respuesta a AMPc que alcanzó niveles máximos solo en 15 minutos a 37 °C. Para los datos que se muestran en la Figura 14, las reacciones de detección de expresión genética para el siguiente grupo de genes fracasó y se excluyeron de este análisis: ARPC2, SSTR1, CXCL5, SYT4, CXCL6, TMCC3, FGF9, GNAL, GULP1, LRIG2, PDE4D, PLAT (1), y PLAT (2). Para los datos que se muestran en la Figura 14, se usaron los siguientes genes constitutivos de control: ACTB, GAPDH, HPRT1, y QARS.

20

25

Además, los elementos distintivos de la expresión genética se midieron en células que recibieron tratamientos de curso corto con 16,16-dimetil PGE₂ seguido de un periodo de recuperación en ausencia del fármaco. Las células CD34⁺ humanas se incubaron durante diferentes periodos de tiempo en presencia de 16,16-dimetil PGE₂ seguido de un lavado y un periodo de recuperación en medio diseñado para reflejar su establecimiento *in vivo*. El diseño

30

experimental hacía coincidir el paradigma de tratamiento *ex vivo* en el que las células se tratan, se lavan para retirar el fármaco y a continuación se administran al paciente. Las células CD34⁺ se incubaron con 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C durante 5, 15, 30, 60, o 120 minutos y los elementos distintivos de la expresión genética se analizaron. Para periodos de incubación inferiores a 120 minutos, las células se lavaron en media para retirar el 16,16-dimetil PGE₂ y a continuación las células se incubaron durante el periodo de tiempo restante en medio para permitir tiempo para que se produjera la expresión genética.

La Figura 15 muestra que los tratamientos de curso corto con 16,16-dimetil PGE₂ (5-15 minutos) no son suficientes para generar una respuesta de expresión genética "completa". Los cambios de la expresión genética y de los elementos distintivos de la expresión genética reconocibles solamente se observaron después de aproximadamente 30 minutos de incubación con 16,16-dimetil PGE₂, y eran máximos después de aproximadamente 2 horas, que se produce a diferencia de la respuesta rápida a AMPc (véase la Fig. 3). Por lo tanto, en realizaciones clínicas en particular, la sangre del cordón umbilical tratada con 16,16-dimetil PGE₂ en condiciones fisiológicas (por ejemplo, 37 °C) durante 120 minutos consiguen un elemento distintivo de la expresión genética "consistente" indicativo de una mejora de la eficacia clínica de las células tratadas.

Para los datos que se muestran en la Figura 15, las reacciones de detección de la expresión genética para el siguiente grupo de genes fracasó y se excluyeron de este análisis: ADCY7, CCND1, CREB5, GULP1, MPPE1, PDE3B, PTGER2, RGS2, e YPEL4. Para los datos que se muestran en la Figura 15, se usaron los siguientes genes constitutivos de control: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2, y QARS.

Concentración de 16,16-dimetil PGE₂

Se analizaron perfiles de expresión genética para células CD34⁺ incubadas durante 120 minutos a 37 °C con diferentes concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂ (vehículo, 100 nM, 1 μM, 10 μM, o 100 μM; véase la Figura 7). Los resultados mostraban que el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ completo se reproducían a 10 μM pero que no se producían cambios sustanciales adicionales en el elemento distintivo de la expresión genética por encima de 10 μM de 16,16-dimetil PGE₂, lo que sugiere que 10 μM es la dosis de tratamiento óptima.

Estos experimentos se repitieron usando células de sangre completa del cordón umbilical humano para determinar si los resultados de la expresión de CD34⁺ se podían traducir a las instalaciones clínicas. El tratamiento de los cordones completos tiene en cuenta (1) aumento de la complejidad celular presente en la sangre completa del cordón umbilical, (2) reducción de los niveles de fármacos debido a la unión de la proteína del fármaco, y (3) posibles efectos paracrinos. Las células de sangre del cordón umbilical del humano se incubaron durante 120 minutos a 37 °C con vehículo, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 25 μM, o 50 μM de 16,16-dimetil PGE₂ (Véase la Figura 8). Después de la incubación, las células Lin(-)CD34⁺ se aislaron, se preparó ARNa etiquetado a partir de las células, y se analizaron los perfiles de expresión genética. De forma coherente con los resultados para las células CD34⁺ incubadas con diferentes concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂, las células Lin(-)CD34⁺ aisladas de sangre del cordón umbilical humano reproducían el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ a 10 μM, con 10 μM dando el elemento distintivo máximo y no se observaba una mejora sustancial con el aumento de la concentración.

Una plataforma de qPCR microfluida también se usó para medir los cambios de expresión de un elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ (véase la Tabla 3 para genes) en células CD34⁺ humanas tratadas con diferentes concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂ (vehículo, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 50 μM, o 100 μM), a 37 °C durante 2 horas. La Figura 16 muestra que el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ era máximo a 10 μM pero que no se producían cambios sustanciales adicionales en el elemento distintivo de la expresión genética por encima de 10 μM de 16,16-dimetil PGE₂.

A los datos que se muestran en la Figura 16, las reacciones de detección de la expresión genética para el siguiente grupo de genes fracasó y se excluyeron de este análisis: ADCY7, CCND1, CREB5, GULP1, FGFR1, FLJ27352, MPPE1, PDE4D, PTGER2, PDE3B, e YPEL4. Para los datos que se muestran en la Figura 16, se usaron los siguientes genes constitutivos de control: ACTB, ARPC2, GAPDH, HPRT1, LRIG2, y QARS.

Temperatura de Incubación

Se analizaron perfiles de expresión genética para células CD34⁺ incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C, 25 °C, o 37 °C (Véanse las Figuras 9 y 22). Estos resultados mostraban que los cambios en la expresión genética asociados con el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ se producían en incubación a 37 °C durante 60-120 minutos, con los cambios de la expresión genética más consistentes a los 120 minutos. Además, la concentración en la temperatura se covariaron, y se determinó que las temperaturas más bajas y las concentraciones más elevadas de 16,16-dimetil PGE₂ no se podrían usar para replicar los efectos de una temperatura más elevada (los datos no se muestran). Por lo tanto, el tratamiento a 100 μM de 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C y a 25 °C proporcionaba cambios de la expresión genética más pequeños que 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C.

Por consiguiente, los resultados mostraban que la expresión genética en células CD34⁺ o células Lin(-)CD34⁺ aisladas en sangre del cordón umbilical humano daba como resultado la regulación positiva de los genes implicados en la migración dirigida e injerto de HSC, por ejemplo, CXCR4; genes sensibles a AMPc, por ejemplo, CREM; y modulación de la expresión genética asociada con las botas de señalización de PGE₂, adhesión celular, y señalización de quimioquinas. De forma significativa más genes presentaban al menos un aumento o disminución de 2 veces de la expresión genética (ensayo t, p < 0,05 para cada gen/sonda) después de incubación con 16,16-dimetil PGE₂ 10 μM a 37 °C en comparación con incubación a 25 °C o 4 °C. En particular, se producían cambios estadísticamente significativos en la expresión genética en genes asociados con la migración dirigida de células madre y precursoras hematopoyéticas, por ejemplo, CXCR4 (p = 0,00014), y genes asociados con el aumento de las rutas de señalización celular de PGE₂R₂/R₄, por ejemplo, CREM (p = 0,0012), a 37 °C en comparación con incubación a 25 °C o 4 °C.

Además, a diferencia de las expectativas preclínicas, no se observó aumento en la expresión genética de genes asociados con apoptosis o muerte celular en células incubadas a 37 °C, que previamente se había pensado que estaban asociadas con la disminución de la viabilidad celular de CD34⁺ y la semivida de 16,16-dimetil PGE₂.

Ejemplo 3

ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Las células de sangre completa o células CD34⁺ del cordón umbilical obtenidas en Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá) se tomaron alícuotas también en tubos Eppendorf y se trataron *ex vivo* a un intervalo de concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂ (de 10 μM a 100 μM) o control de DMSO; temperaturas (4 °C, 22 °C, o 37 °C) durante 60 o 120 minutos en medio LMD/HSA al 5 %. Después del tratamiento, una alícuota de las células incubadas se sometió a ensayo usando tinción con 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) como un indicador de la muerte celular. Un millón de células de sangre completa del cordón umbilical se tiñeron con 5 μl de solución de tinción con 7AAD (BD Bioscience, San Jose, CA), o 200.000 células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical se tiñeron con 1 μl de solución de 7-AAD. Las células se analizaron en un Sistema Guava EasyCyte 8HT (Millipore) y con el paquete de software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR). Una alícuota separada de las mismas células también se tomó para evaluación del potencial de proliferación usando ensayos de CFU-C (que se discuten a continuación en el Ejemplo 4).

Los resultados mostraban que las células de sangre completa o células CD34⁺ del cordón umbilical incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a temperaturas elevadas durante periodos de incubación relativamente largos no disminuían la viabilidad celular en comparación con células incubadas en otras condiciones, a diferencia de lo que se esperaba a partir de los experimentos preclínicos previos. Por lo tanto, no había una disminución estadísticamente significativa en las células vivas evaluadas con 7-AAD de 4 °C a 37 °C (Véanse las Figuras 10 y 19B-C).

Ejemplo 4

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se realizaron ensayos de Células de Unidades Formadoras de Colonias (CFU-C) usando un kit de ensayo de metil celulosa, MethoCult® GF H4034 (Stem Cell Technologies, Vancouver, CA). Las células de sangre completa o células CD34⁺ del cordón umbilical obtenidas en Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá) se tomaron alícuotas también en tubos Eppendorf y se trataron *ex vivo* a un intervalo de concentraciones de 16,16-dimetil PGE₂ (de 10 μM a 100 μM) o control de DMSO; temperaturas (4 °C, 22 °C, o 37 °C) durante 120 minutos en medio LMD/HSA al 5 %. Después del tratamiento, las células se lavaron en medio LMD/HSA al 5 % y se volvieron a suspender en Medio de Iscove que contenía un 2 % de Suero Bovino Fetal (FBS) (Stem Cell Technologies). A continuación las células se cargaron en un tubo de ensayo MethoCult®, se mezclaron, y se sembraron en placas de cultivo de 35 mm de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A menos que se mencione de otro modo, el equivalente de 10.000 células WCB y de 250 células CD34⁺ se cargó en cada placa.

Los resultados mostraban que las células de sangre completa o células CD34⁺ del cordón umbilical incubadas con 16,16-dimetil PGE₂ a temperaturas elevadas durante periodos de incubación relativamente largos presentaban un potencial proliferativo más elevado (por ejemplo, capacidad de autorrenovación) que las células incubadas en otras condiciones, a diferencia de las expectativas basadas en experimentos preclínicos previos. Por lo tanto, se producía un aumento estadísticamente significativo en el potencial proliferativo celular de 4 °C a 37 °C (Véase la Figura 11).

Ejemplo 5

EXPRESIÓN EN LA SUPERFICIE CELULAR DE CXCR4 EN CÉLULAS TRATADAS CON 16,16-DIMETIL PGE2

Citometría de Flujo

Las células de sangre del cordón umbilical CD34⁺ (Stem Cell Technologies o All Cells) se trataron durante 2 horas a

37 °C en 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM o DMSO como control en LMD/HSA al 5 %. Después del tratamiento, las células se lavaron con LMD/HSA al 5 % y se centrifugaron a 650 x g durante 10 minutos. A continuación las células se clasificaron para aislar las células precursoras a largo plazo, corto plazo y multipotentes de acuerdo con un protocolo publicado en cualquier parte (Park *et al.*, 2008). A continuación las células se volvieron a suspender en medio de tinción (mencionado anteriormente), y se añadió anticuerpo de tinción. Todos los anticuerpos eran de BD Biosciences a menos que se indique de otro modo. Los paneles de anticuerpos de agotamiento de linaje incluían CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235 y todos estaban conjugados directamente a FITC. Otros anticuerpos usados fueron CD34(8G12)-APC, CD38-PerCPCy5.5, CD45RA-V450, y CD90-PE. Las células se tiñeron con la cantidad recomendada de anticuerpos durante 20 minutos en hielo y a continuación se lavaron dos veces con medio de tinción. A continuación las células se volvieron a suspender a 2 millones de células/ml y se clasificaron en FACS Aria II usando el software DiVa (BD Biosciences). Las células se recogieron en medio StemSpan y se mantuvieron a 4 °C hasta realizar la extracción de ARN.

Análisis de Expresión Superficial de CXCR4

Las células de sangre del cordón umbilical CD34⁺ se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM o DMSO en medio StemSpan durante 2 horas a 37 °C o durante 1 hora a 4 °C. Después del tratamiento, las células se lavaron en medio StemSpan, se centrifugaron durante 10 minutos a 300 x g y se volvieron a suspender en medio StemSpan que contenía citoquinas (por ejemplo, CC100) para estimular la supervivencia de las células CD34⁺ y se incubaron a 37 °C durante 1, 6 y 24 horas. Después de la incubación de 1, 6 o 24 horas, las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en medio de tinción que contenía el cóctel de Linaje, 1-FITC, CD34⁻ APC, CXCR4(CD184)-PE, y se incubaron en hielo durante 15 minutos. A continuación se añadió medio de tinción recién preparado a las células, y las células se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos, dos veces. Las células teñidas se adquirieron en un Guava EasyCyte 8HT y el análisis se realizó usando el Paquete de Software FloJo (Treestar).

Un aumento en la expresión de la ARN de CXCR4 se observó en las células de sangre completa (WCB) o células CD34⁺ del cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM durante 2 horas a 37 °C cuando se comparó con las células tratadas con DMSO o células tratadas con 10 µM durante 1 hora a 4 °C. La expresión en la superficie celular de CXCR4 es importante para la migración dirigida de células madre al nicho hematopoyético de la médula ósea. La Figura 18 muestra que la expresión superficial de la proteína CXCR4 aumentaba en presencia de 16,16-dimetil PGE₂ en ciertas condiciones. Las células se trataron durante 2 horas a 37 °C o durante 1 hora a 4 °C con cualquiera de 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM o control de DMSO en medio StemSpan. La expresión de la proteína de superficie celular CXCR4 se evaluó 1, 6 y 24 horas después del final del tratamiento mediante citometría de flujo.

1 hora después del tratamiento, la expresión de CXCR4 era detectable en un 48 % de las células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM en comparación con un 3,5 % de células tratadas con DMSO. A las 6 horas después del tratamiento, un 34,7 % de células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM expresaban niveles detectables de CXCR4 en comparación con un 1,7 % de células tratadas con DMSO. A las 24 horas después del tratamiento, el nivel de CXCR4 presente en células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM era sustancialmente el mismo en comparación con las células tratadas con DMSO.

Por el contrario, las células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM a 4 °C, no daban como resultado un aumento de la expresión de CXCR4. Por lo tanto, la expresión del ARNm de CXCR4 en las células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM representa exactamente la expresión de la proteína de la superficie celular CXCR4 en las células. Por consiguiente, en realizaciones clínicas en particular, para obtener la activación máxima de HSC para realizar la migración dirigida unción de HSC, el tratamiento de las células con 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C es preferente en comparación con el tratamiento a 4 °C.

Ejemplo 6

ENSAYOS EN BAZO PARA UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Los ensayos de Bazo para Unidades Formadoras de Colonias en el día 12 (CFU-S12) se realizaron como se describe en North *et al.*, *Nature*. 2007 Jun 21; 447 (7147): 1007-11. La médula ósea completa de ratones donantes C57Bl/6 de 8 semanas de edad se aisló y se trató con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM o DMSO a 4 °C durante 1 hora o a 37 °C durante 2 horas o en PBS. Después del tratamiento, las células se lavaron mediante centrifugación y volviendo a suspender en PBS a la inyección en la vena de la cola en receptores C57Bl/6 (2 x 5/tratamiento) que se habían irradiado de forma que tan previamente a 10,5 Gy. Se inyectaron 50.000 células por receptor.

El aumento en el elemento distintivo de la expresión genética de 16,16-dimetil PGE₂ observado después del tratamiento con 16,16-dimetil PGE₂ a 37 °C durante 2 horas en comparación con el tratamiento con 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C durante 1 hora se corroboró adicionalmente en un ensayo de CFU-S.

La médula ósea de murino se expuso a tratamiento con 10 µM de 16,16-dimetil PGE₂ o DMSO para cualquiera de 1 hora a 4 °C o 2 horas a 37 °C y se administró a los ratones irradiados. Catorce días más tarde, los barcos se

extirparon y se hizo el recuento de las colonias. Los resultados mostraban que el tratamiento a 4 °C no provocaba una respuesta a AMPc ni un aumento en la señal de expresión genética, pero daba como resultado un aumento más pequeño en el recuento de CFU-S en comparación con las células tratadas con DMSO. Sin embargo, este aumento es menor de forma estadísticamente significativa que cuando las células se incubaron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM a 37 °C.

Las células de médula ósea completa (WBM) de murino se expusieron a 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM o DMSO durante 1 o 2 horas a 4 °C o 37 °C. Se observó un aumento estadísticamente significativo en el índice de CFU-S12 cuando las células se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM independientemente de la temperatura cuando se compara con las células tratadas con DMSO (Figura 19A). La exposición a 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM a 37 °C durante 2 horas dio como resultado la formación de 11,5 ± 1,4 colonias que era significativamente mayor que WBM expuestas a tratamiento con 10 µM con 16,16-dimetil PGE₂ a 4 °C durante 1 hora, 8,5 ± 1,3 colonias ($p < 0,005$) o a DMSO a 37 °C durante 2 horas, 4,0 ± 0,8 colonias ($p < 0,001$). Además, las WBM tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ 10 µM a 37 °C durante 1 hora (11,2 ± 1,5) o 2 horas (11,5 ± 1,4) daban resultados similares. Lo mismo se observó con el tratamiento con 16,16-dimetil PGE₂ de WBM a 4 °C, en el que la exposición de 1 o 2 horas daba resultados similares, 8,5 ± 1,3 y 8,4 ± 1,0 colonias, respectivamente.

Ejemplo 7

AUMENTO DE LA QUIMIOTAXIS DE CÉLULAS TRATADAS CON 16,16-DIMETIL PGE₂

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron usando cámaras de quimiotaxis de 96 pocillos, membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 5 µM (Corning Inc., Corning, NY) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células CD34⁺ de sangre del cordón umbilical (hCD34⁺ CB) humano se obtuvieron en All Cells y se les congelaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación las células se trataron durante 4 horas a 37 °C con 16,16-dimetil PGE₂ o control de DMSO a una concentración de 10 µM en medio StemSpan (Stem Cell Technology, Vancouver, Canadá). A continuación las células se lavaron mediante centrifugación (300 g durante 10 minutos) y se volvieron a suspender en tampón de ensayo transpocillo (Rojo Fenol Sin medio RPMI (Mediatech), BSA al 0,5 % sin lípido (Sigma-Aldrich) a una concentración de 40.000-60.000 células/75 ul. Se añadieron setenta y cinco µl de suspensión celular a la cámara superior de la placa, mientras que se añadían 235 µl de medio de ensayos transpocillo que contenía 0 o 50 ng/ml de SDF1α (sistema R&D, Minneapolis, MN) al pocillo inferior. El número total de células en el pocillo inferior se obtuvo mediante citometría de flujo, usando 7AAD (BD Biosciences) para excluir las células muertas, después de 4 horas de incubación a 37 °C, CO₂ al 5 %. La Figura 20 muestra un diagrama de flujo del ensayo funcional *in vitro* de quimiotaxis usado en estos experimentos. El porcentaje de migración se calculó dividiendo el número de células en el pocillo inferior entre la entrada total de células multiplicado por 100. Las muestras se analizaron por triplicado, a continuación se hizo un promedio de los datos para análisis estadístico.

La Figura 21 muestra que el número de células CD34⁺ que migran incubadas con 16,16-dimetil PGE aumenta de forma significativa cuando se exponen a 50 ng/ml de SDF1α en comparación con el número de células CD34⁺ que migran incubadas con DMSO o controles negativos (0 ng/ml de SDF1 α). Por lo tanto, las células CD34⁺ tratadas con 16,16-dimetil PGE presentan un aumento de las propiedades de migración dirigida de células madre cuando se compara con DMSO o células de control no tratadas.

Ejemplo 8

ESTUDIO CLÍNICO EN FASE 1B

Sumario

Los datos preclínicos generados por los presentes inventores apoyaban el uso de 16,16-dimetil PGE₂ como promotor de la migración dirigida, proliferación, supervivencia, y diferenciación de HSC. Basándose en los datos preclínicos, se inició un ensayo clínico en Fase Ib en adultos con neoplasias hematológicas sometidos a doble trasplante de CB (sangre del cordón umbilical) después de un régimen de acondicionamiento con intensidad reducida. Un objetivo principal del estudio era determinar la seguridad de la UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ basándose en el injerto del Día 42 con > 5 % de quimera de la unidad de UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂. Los objetivos secundarios incluían el tiempo injerto, las tasas de toxicidad no hematológica, rechazo del injerto, GVHD aguda y crónica, recaída, mortalidad relacionada con el tratamiento (TRM), quimera fraccionaria, y supervivencia sin recaída y general. La dinámica del injerto competitivo del doble trasplante de UCB permite la determinación de si las HSC modificadas con dmPGE₂ son capaces de competir con las HSC no moduladas.

Métodos

Los criterios para selección de sangre del cordón umbilical consistían en una compatibilidad mínima de HLA de 4/6 para cada unidad de sangre de cordón umbilical con respecto al sujeto así como para la otra unidad de sangre del cordón umbilical. Los pacientes sin un donante hermano o sin compatibilidad con un familiar se acondicionaron con

fludarabina (30 mg/m²/día IV Día -8 a -3), melfalán (100 mg/m²/día IV Día -2), y ATG de conejo (1 mg/kg/día Días -7, -5, -3 y -1). El régimen de inmunosupresión incluía sirolimus (diana 3-12 ng/ml) y tacrolimus (diana 5-10 ng/ml). En el día 0, los pacientes recibieron dos unidades de sangre del cordón umbilical (UCB): la primera unidad de UCB (UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂), se les congeló en un baño de agua caliente y se lavó usando una solución de albúmina de suero humano al 5 % (HSA) y dextrano de bajo peso molecular (LMW). Las células se incubaron con 16,16-dimetil PGE₂ durante 2 horas a 37 °C. Después de un lavado final para retirar el 16,16-dimetil PGE₂ residual, la UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ se administró al paciente mediante infusión sin manipulación adicional de las células. La segunda unidad de UCB sin tratarse descongeló, se lavó y se infundió 2-6 horas después sin modulación o manipulación de las células.

Resultados

Un total de 12 sujetos se inscribieron y recibieron unidades de UCB tratadas con 16,16-dimetil PGE₂, de los cuales 11 sujetos se pudieron evaluar. La edad media era de 57,5 años (intervalo de 19-66) y un 67 % era de sexo masculino. Los diagnósticos incluían: AML(5), MDS(4) y NHL/CLL(3). Todas las UCB tratadas con 16,16-dimetil PGE₂ se trataron y se infundieron el Día 0. Los tamaños medios de UCB con crioconservación previa eran para UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂: 2,7 x 10⁷ TNC/kg (intervalo de 2,0-5,1) y 1,3 x 10⁵ CD34/kg (intervalo de 0,3-6,3); UCB sin tratar: 2,0 x 10⁷ TNC/kg (intervalo de 1,8-5) y 1,1 x 10⁵ CD34/kg (intervalo de 0,5-3,4) con una dosis celular media combinada de 4,7 x 10⁷ TNC/kg (intervalo de 3,9-10,1) y 2,1 x 10⁵ CD34/kg (intervalo de 1,4-9,7).

El tratamiento de UCB con 16,16-dimetil PGE₂ no dio como resultado una pérdida celular significativa, con una recuperación media de células CD34⁺ viables de un 90 %. Los sucesos adversos atribuidos a UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ incluía cinco sucesos relacionados con la infusión de Grado 1 en cuatro sujetos, que consistía en escalofríos, enrojecimiento, dolor abdominal, o tos. Un sujeto adicional con enfermedad arterial coronaria conocida experimentó aumento de ST de Grado 4 transitorio con infusión y evidencia de isquemia del miocardio mediante el ensayo de troponina cardiaca.

El tiempo medio para la recuperación de neutrófilos (> 500 células/μl) fue de 17 días (intervalo de 15-27 días), que se compara de manera favorable con una media de 21 días para un grupo de control histórico de pacientes tratados del mismo modo en la misma institución (n = 53; p = 0,025). Estos datos también se comparan de manera favorable con una población base previa de 9 pacientes, que también recibieron una unidad de UCB sin tratar en combinación con una UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ que se preparó usando un régimen de incubación alternativo: tratamiento con 16,16-dimetil PGE₂ durante 60 minutos en hielo (una temperatura de 4 °C). Estos pacientes presentaban un tiempo medio para la recuperación de neutrófilos de 22 días.

El tiempo medio para un recuento de plaquetas no apoyado de 20.000/μl fue de 42 días (n = 9 evaluable). No había casos de rechazo al injerto primario o secundario. La UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ era la fuente dominante de hematopoyesis en 9 de los 11 sujetos evaluables, y la quimera media total de UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ en el día 14 era de un 90 %, con dominancia a largo plazo de nuevo con la unidad de UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂. En comparación, en el experimento previo de 9 pacientes que recibieron una UCB sin tratar y una UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ preparada usando el régimen de incubación de 4 °C/60 minutos, la UCB tratada con 16,16-dimetil PGE₂ era la fuente dominante de hematopoyesis en solo 2 de 9 casos.

Hasta la fecha, solamente se han observado dos casos de GvHD aguda de Grado 2 y no se han observado casos de GvHD crónica. Además, no se observaron casos de enfermedad linfoproliferativa de EBV. TRM era de un 9 % (1 sujeto), y un paciente recae; 9 sujetos permanecen vivos sin recaída con un seguimiento medio de 5,0 meses (intervalo de 1,6-9,4).

Conclusiones

Estos datos apoyan el beneficio de un nuevo enfoque de modulación *ex vivo* para mejorar el injerto en pacientes que se someten a trasplante de UCB. Además, los resultados de estos experimentos demuestran claramente que el aumento de la temperatura de incubación de 4 °C a 37 °C y un aumento del tiempo de incubación de 60 minutos a 120 minutos daba como resultado un aumento profundo de la actividad biológica de las células tratadas con 16,16-dimetil PGE₂. Este portfolio proporciona un ejemplo importante de cómo la formación de perfiles moleculares puede tener un impacto directo en la medicina clínica y demuestra que un tratamiento *ex vivo* corto con moléculas pequeñas puede mejorar la terapia celular.

Ejemplo 9

ANÁLISIS DE TRATAMIENTO ACTIVO DE LA ACTIVIDAD DE REPOBLACIÓN DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN TRATADAS *EX VIVO* CON dmPGE₂ A 4 °C CON RESPECTO A 37 °C

La invención demuestran los efectos de dmPGE₂ en la recuperación de WBC, incluyendo mejora de las recuperaciones de recuentos de eritroides, plaquetas y neutrófilos en comparación con controles cuando las células pulsan a 37 °C. El presente estudio es una comparación de tratamiento activo del injerto de las células tratadas *ex vivo*

vivo con dmPGE₂ a 4 °C con respecto a 37 °C. Las células de médula ósea de ratones CD45.1 y CD45.2 congénicos se tratan *ex vivo* durante 2 horas con 10 uM de 16,16-dmPGE₂ y se cotrasplantaron en ratones receptores híbridos CD45.1/CD45.2 irradiados de forma letal. Los grupos de 10 ratones híbridos reciben 100.000 células de médula ósea de CD45.1 tratadas con 16,16-dmPGE₂ a 4 °C y 100.000 células de médula ósea de CD45.2 tratadas con 16,16-dmPGE₂ a 37 °C. Una segunda población base de 10 ratones recibe 100.000 células de médula ósea de CD45.2 tratadas con 16,16-dmPGE₂ a 4 °C y 100.000 células de médula ósea de CD45.1 tratadas con 16,16-dmPGE₂ a 37 °C para compensar el sesgo de la cepa. A los ratones les extrae sangre a 1, 2, 3 y 4 meses después del trasplante y se determinan las células de sangre periférica positivas para CD45.1 y CD45.2. A los 4 meses, la reconstitución del linaje del trinomio se evalúa para determinar cualquier sesgo o diferencia en la reconstitución del linaje. Los ratones se sacrifican y se realiza una quimera de médula a los 4 meses después del trasplante. La desviación de la quimera de un 50 %/50 % refleja alteración en la capacidad de injerto que resulta de los protocolos de tratamiento. En la Figura 24 se muestra un esquema gráfico del estudio.

Ejemplo 10

MÉTODOS

Aislamiento de células Lin(-)CD34⁺ a partir de sangre del cordón umbilical tratada

Las células mononucleares de sangre completa del cordón umbilical humano se obtuvieron en Stem Cell Technologies (Vancouver, Canadá). Después de descongelar, las células se trataron con 16,16-dimetil PGE₂ o controles apropiados, por ejemplo, DMSO, en medio LMD/HSA al 5 %.

Después del tratamiento, las células se lavaron con medio LMD/HSA al 5 %, se centrifugaron durante 10 minutos a 650 x g a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en un tampón de selección frío (solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca⁺ o Mg⁺; EDTA 2 mM; y HSA al 0,5 %). La selección magnética se realizó usando el Kit de Agotamiento de Linaje (Lin) (Miltenyi Biotec, abrun, CA) seguido de un kit de enriquecimiento de CD34⁺ (Miltenyi Biotec). El agotamiento del linaje y el enriquecimiento de las células CD34⁺ se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando un separador QuadroMACS™. Durante este proceso, las células se mantuvieron a 4 °C. Una vez que las células Lin-CD34⁺ se aislaron de la sangre completa del cordón umbilical tratada, una alícuota se analizó mediante citometría de flujo para evaluar la pureza. La pureza de las células era superior a un 90 %. La mayor parte de las células se usaron para extracción de ARN usando el Kit de Aislamiento de ARN Pico Pure (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para análisis Affymetrix.

En general, en las reivindicaciones que siguen a continuación, no se debería interpretar que los términos usados limitan las reivindicaciones a las realizaciones específicas desveladas en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, pero se debería interpretar que incluyen todas las posibles realizaciones junto con el alcance completo de los equivalentes a los que dan derecho tales reivindicaciones. En consecuencia, las reivindicaciones no están limitadas por la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica que comprende una población de células que comprende al menos un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que:

a) las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de 33 °C a 41 °C con un agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células, en la que el agente es un potenciador de AMPc, un activador de Gα-s, un agente que se une de forma selectiva al receptor PGE₂EP₄, o que comprende PGE₂ o un agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄

b) la expresión genética de CXCR4 aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas al menos 5 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto; y

c) en la que la composición terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz, estéril, de células madre o precursoras hematopoyéticas preparada para su administración a un paciente,

en la que las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto opcionalmente con el agente durante un periodo de tiempo de:

[[a]]1) al menos una hora;

[[b]]2) de una hora a seis horas;

[[c]]3) de dos horas a seis horas; o

[[d]]4) dos horas.

2. La composición terapéutica de la reivindicación 1 en la que

a) la expresión de uno o más genes distintivos aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas al menos 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2);

b) la expresión de al menos dos genes distintivos seleccionados entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas al menos 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto; o

c) la expresión de cada gen distintivo seleccionado entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), aumenta al menos 2 veces en las células madre o precursoras hematopoyéticas en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

3. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en la que:

a) la población de células comprende menos de un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺;

b) la población de células comprende al menos un 0,01 % y no más de un 50 % de células CD34⁺;

c) la población de células no se expande;

d) la población de células comprende menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células madre mesenquimales;

e) la población de células comprende menos de un 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o un 5 % de células precursoras endoteliales;

- f) la población de células se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada;
- 5 g) la población de células presenta haplotipo de HLA;
- h) la población de células presenta haplotipo de HLA basándose en el grupo que consiste en _HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-DRB1;
- 10 i) la población de células presenta haplotipo de HLA y presenta compatibilidad con un sujeto humano específico; o
- j) la población de células presenta haplotipo de HLA y tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico.
- 15 4. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en la que la composición terapéutica está sustancialmente libre del agente.
5. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en la que al menos un 15 % de células dentro de la población de células expresa la proteína CXCR4.
- 20 6. Una composición terapéutica que comprende una población de células que comprende al menos un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas en la que:
- 25 a) las células madre o precursoras hematopoyéticas se pusieron en contacto *ex vivo* a una temperatura de 33 °C a 41 °C con 16,16-dmPGE₂ durante un periodo de tiempo de dos horas;
- b) las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden una colección de células CD34⁺ en la que la expresión genética de CXCR4 aumenta en la colección de células CD34⁺ al menos 5 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en células CD34⁺ no puestas en contacto; y
- 30 c) en la que la composición terapéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz, estéril de células madre o precursoras hematopoyéticas preparada para su administración a un paciente,
- en la que las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden opcionalmente:
- 35 [[a]]1) un elemento distintivo de la expresión genética en el que la expresión de uno o más genes distintivos aumenta al menos 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2);
- 40 [[b]]2) la expresión de al menos dos de los genes distintivos aumenta al menos 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto;
- 45 [[c]]3) la expresión de cada uno de los genes distintivos aumenta al menos 2 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto,
- 50 o en la que:
- [[a]]i) la población de células opcionalmente comprende menos de un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺;
- 55 [[b]]ii) la población de células opcionalmente comprende al menos un 0,01 % y no más de un 50 % de células CD34⁺;
- [[c]]iii) la población de células opcionalmente no se expande;
- 60 [[d]]iv) la población de células opcionalmente se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada;
- [[e]]v) la población de células opcionalmente presenta haplotipo de HLA;
- 65 [[f]]vi) la población de células opcionalmente presenta haplotipo de HLA basándose en el grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DRB1;

[[g]]vii) la población de células opcionalmente presenta haplotipo de HLA y presenta compatibilidad con un sujeto humano específico; o

5 [[j]]viii) la población de células opcionalmente presenta haplotipo de HLA y tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico.

7. La composición terapéutica de la reivindicación 1, en la que la población de células es una población de células con haplotipo que comprende al menos un millón de células madre o precursoras hematopoyéticas humanas, en la que preferentemente:

10 a) la población de células con haplotipo presenta haplotipo basándose en el grupo que consiste en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y HLA-DRB1;

15 b) la población de células con haplotipo presenta haplotipo basándose en el grupo que consiste en HLA-DRB3/4/5, HLA-DQB1, y DPB1;

c) la población de células con haplotipo es compatible con un sujeto humano específico;

20 d) la población de células que presenta haplotipo de HLA tiene 4 de 6 compatibilidades de HLA con un sujeto humano específico, o

en la que las células madre o precursoras hematopoyéticas comprenden preferentemente:

25 [[a]]1) un elemento distintivo de la expresión genética en el que la expresión de uno o más genes distintivos aumenta al menos 2 veces en comparación con la expresión del uno o más genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto, en la que el gen distintivo se selecciona entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2);

35 [[b]]2) la expresión de al menos dos de genes distintivos seleccionados entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) aumenta al menos 5, 10, 15, o 20 veces en comparación con la expresión de los dos genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto; o

40 [[c]]3) la expresión de cada gen distintivo seleccionado entre el grupo que consiste en: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), y antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2) aumenta al menos 2 veces en comparación con la expresión de los genes distintivos en una célula madre o precursora hematopoyética no puesta en contacto.

8. La composición terapéutica de las reivindicaciones 1 o 7, en la que el agente que aumenta la expresión genética de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas es:

50 a) un potenciador de AMPc seleccionado entre: AMPc, sp-5,6-DCI-BIMPS (BIMPS) y dibutilil AMPc (dbAMPc), éster de forbol, forskolina, esclarelina, 8-bromo-AMPc, toxina del cólera (CTX), aminofilina, 2,4 dinitrofenol (DNP), norepinefrina, epinefrina, isoproterenol, isobutilmetilxantina (IBMX), cafeína, teofilina (dimetilxantina), dopamina, rolipram, iloprost, prostaglandina E1, prostaglandina E2, polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), y polipéptido intestinal vasoactivo (VIP),

55 b) un agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄ seleccionado entre 16,16-dimetil PGE₂ (dmPGE₂), éster de fenilo de 16,16-dimetil PGE₂ p-(p-acetamidobenzamido), 11-desoxi-16,16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metilen-16,16-dimetil PGE₂, 9-desoxi-9-metilen PGE₂, 9-ceto Fluprostenol, 5-trans PGE₂, 17-fenil-omega-trinor PGE₂, amida de PGE₂ serinol, éster de metilo de PGE₂, 16-fenil tetranor PGE₂, 15(S)-15-metil PGE₂, 15(R)-15-metil PGE₂, 8-iso-15-ceto PGE₂, éster de isopropilo de 8-iso PGE₂, 20-hidroxi PGE₂, 11 -desoxi PGE₁, nocloprost, sulprostona, butaprost, 15-ceto PGE₂, o 19 (R) hidroxi PGE₂;

60 c) un agente que se une de forma selectiva al receptor EP₄ de PGE₂ seleccionado entre ONO-4819, APS-999 Na, AH23848, ONO-AE1-329, 5-[(1E,3R)-4,4-difluoro-3-hidroxi-4-fenil-1-buten-1-il]-1-[6-(2H-tetrazol-5R-il)hexil]-2-pirrolidinona; ácido 2-[3-[(1R,2S,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-5-[2-(metoximetil)fenil]pent-1-enil]-5-oxociclopentil]sulfanilpropilsulfanil]acético; 4-[2-[(1R,2R,3R)-3-hidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-4-[3-

(metoximetil)fenil]but-1-enil]-5-oxociclopentil]etilsulfanil]butanoato de metilo; 16-(3-Metoximetil)fenil-ro-tetranor-5-tiaPGE; 5-{3-[(2S)-2-[(3R)-3-hidroxi-4-[3-(trifluorometil)fenil]butil]-5-oxopirrolidin-1 il]propil]tiofeno-2-carboxilato; (3-metil-tiofeno-2-carbonil)-amida] del ácido [4'-[3-butil-5-oxo-1-(2-trifluorometilfenil)-1,5-dihidro-[1,2,4]triazol-4-ilmetil]-bifenil-2-sulfónico; y (ácido (Z)-7-[(1R,4S,5R)-5-[(E)-5-(3-cloro-benzo[b]tiofen-2-il)-3-hidroxi-pent-1-enil]-4-hidroxi-3,3-dimetil-2-oxo-ciclopentil]-hept-5-enoico), o sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de estos agentes; o

d) un activador o agente activador de G α -s seleccionado entre toxina del cólera.

9. La composición terapéutica de la reivindicación 7, en la que:

a) la población de células comprende menos de un 0,10, 0,50, 1,0, 3, 5, 10, 15, 20, o un 30 % de células CD34⁺;

b) la población de células comprende al menos un 0,01 % y no más de un 50 % de células CD34⁺;

c) la población de células no se expande; o

d) la población de células se obtiene a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada.

10. Un método para preparar una composición terapéutica que comprende: poner en contacto *ex vivo* una población de células que comprende células madre o precursoras hematopoyéticas, con uno o más agentes a una temperatura de 33 °C a 41 °C en condiciones suficientes para modificar la expresión genética de las células madre o precursoras hematopoyéticas para dar como resultado células madre o precursoras hematopoyéticas que comprenden un elemento distintivo de la expresión genética que comprende un aumento de la expresión, en comparación con células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto, de uno o más de los siguientes genes: hialuronano sintasa 1 (HAS1), proteína GEM de unión a GTP (GEM), proteína fosfatasa 4 de doble especificidad (DUSP4), anfirregulina (AREG), proteína 1 relacionada con el receptor nuclear (NR4A2), renina (REN), modulador de elemento sensible a AMPc (CREM), colágeno, tipo I, alfa 1 (COL1A1), antígeno 2 relacionado con Fos (FOSL2), o receptor 4 de quimioquina CXC (CXCR4),

en el que la población de células se obtiene preferentemente a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada, o

en el que al menos uno del uno o más agentes se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en un potenciador de AMPc, un activador de G α -s, un agente que se une de forma selectiva al receptor PGE₂EP₄, o comprende PGE₂ o uno o un agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄.

11. Una población de células que comprende células madre y precursoras hematopoyéticas para su uso en un método para aumentar el injerto de células madre y precursoras hematopoyéticas en un sujeto, en el que la población de células se puso en contacto *ex vivo*, a una temperatura de 33 °C a 41 °C, con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) y un agente que tiene actividad de dmPGE₂;

en el que la población de células se puso en contacto con el agente en condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto en comparación con células madre y precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto, en el que la población de células es preferentemente de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada

en el que el agente es opcionalmente PGE₂ o un agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄, en la que el agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄ es 16,16-dimetil PGE₂,

en el que la expresión genética de CXCR4 aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas al menos 5 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

12. Una población de células que comprende células madre y precursoras hematopoyéticas para su uso en un método para tratar un sujeto con necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético, en el que

a) la población de células se puso en contacto *ex vivo* a una temperatura de 33 °C a 41 °C, con uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en: una prostaglandina E₂ (PGE₂) y un agente que tiene actividad de dmPGE₂;

en el que la población de células se puso en contacto con el agente en condiciones suficientes para aumentar el injerto de las células madre y precursoras hematopoyéticas puestas en contacto en el sujeto en comparación con células madre y precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto tratando de ese modo al sujeto con

necesidad de reconstitución del sistema hematopoyético,

en el que la población de células es preferentemente de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica movilizada,

5 en el que el agente es preferentemente PGE₂ o un agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄, en el que el agonista de PGE₂R₂ o PGE₂R₄ es opcionalmente 16,16-dimetil PGE₂,

10 en el que la expresión genética de CXCR4 aumenta en las células madre o precursoras hematopoyéticas al menos 5 veces en comparación con la expresión de CXCR4 en las células madre o precursoras hematopoyéticas no puestas en contacto.

13. La población de células para el uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el sujeto tiene leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), aplasia pura de glóbulos rojos, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, anemia drepanocítica, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mielode agnogénica, linfocitosis hemofagocítica familiar, o tumores sólidos,

en la que el sujeto tiene opcionalmente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, o sarcoma o en el que el sujeto recibió opcionalmente quimioterapia o terapia de radiación ablativa o no mieloablativa de médula ósea o

25 en la que el sujeto es opcionalmente un donante de médula ósea.

14. La composición terapéutica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en un método para aumentar la expansión de células madre y precursoras hematopoyéticas en un sujeto,

30 en el que el sujeto tiene preferentemente leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielomonocítica juvenil, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, anemia aplásica grave, anemia de Fanconi, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), aplasia pura de glóbulos rojos, amegacariocitosis/trombocitopenia congénita, síndrome de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), síndrome de Wiskott-Aldrich, beta-talasemia mayor, anemia drepanocítica, síndrome de Hurler, adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, mielodisplasia, anemia refractaria, leucemia mielomonocítica crónica, metaplasia mielode agnogénica, linfocitosis hemofagocítica familiar, o tumores sólidos, o

40 en el que el sujeto tiene preferentemente cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer pancreático, o sarcoma, o

en el que el sujeto recibió preferentemente quimioterapia o terapia de radiación ablativa o no mieloablativa de médula ósea, o

45 en el que el sujeto es preferentemente un donante de médula ósea.

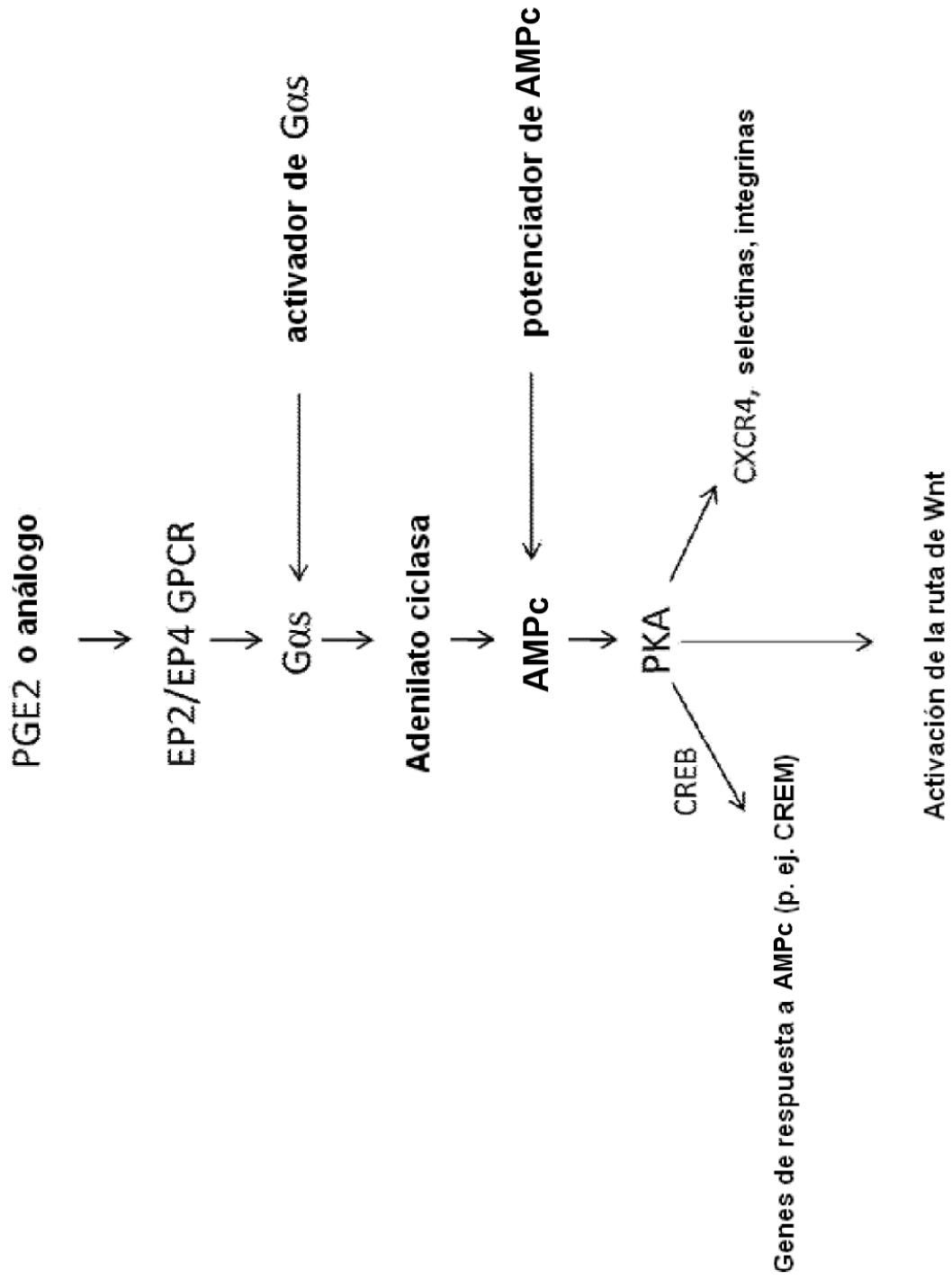


FIG. 1

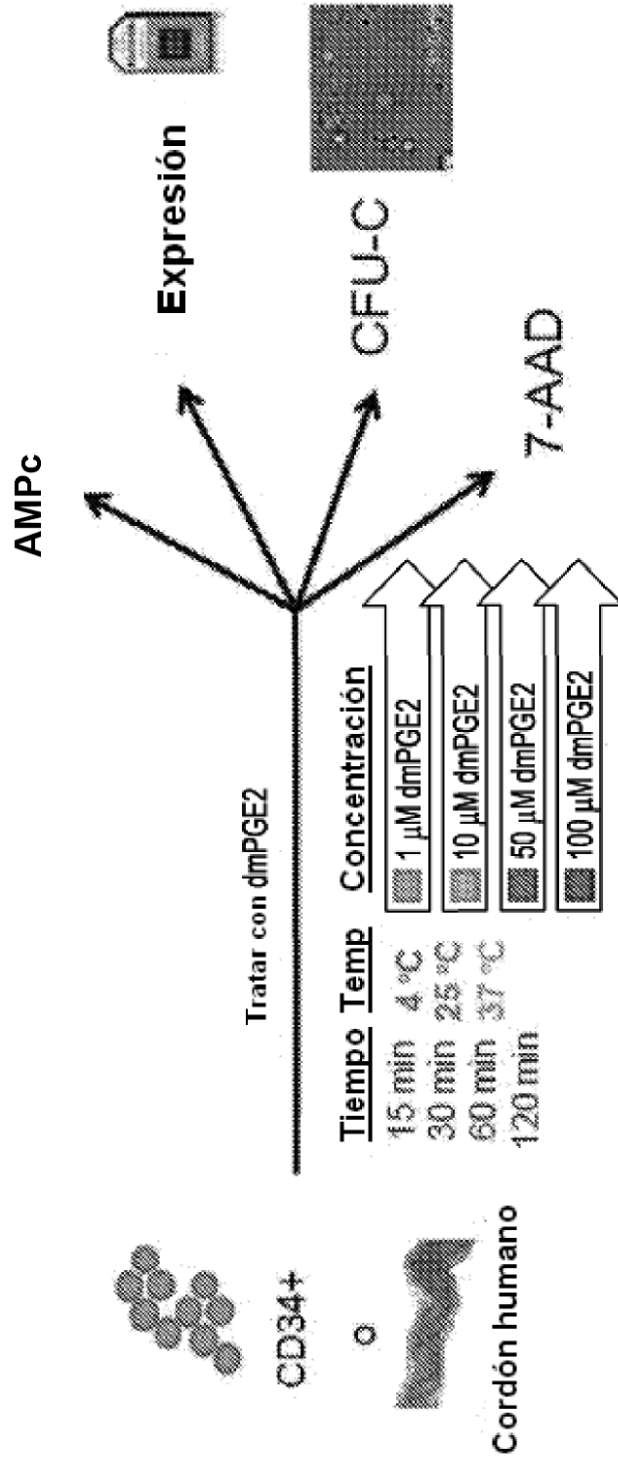


FIG. 2

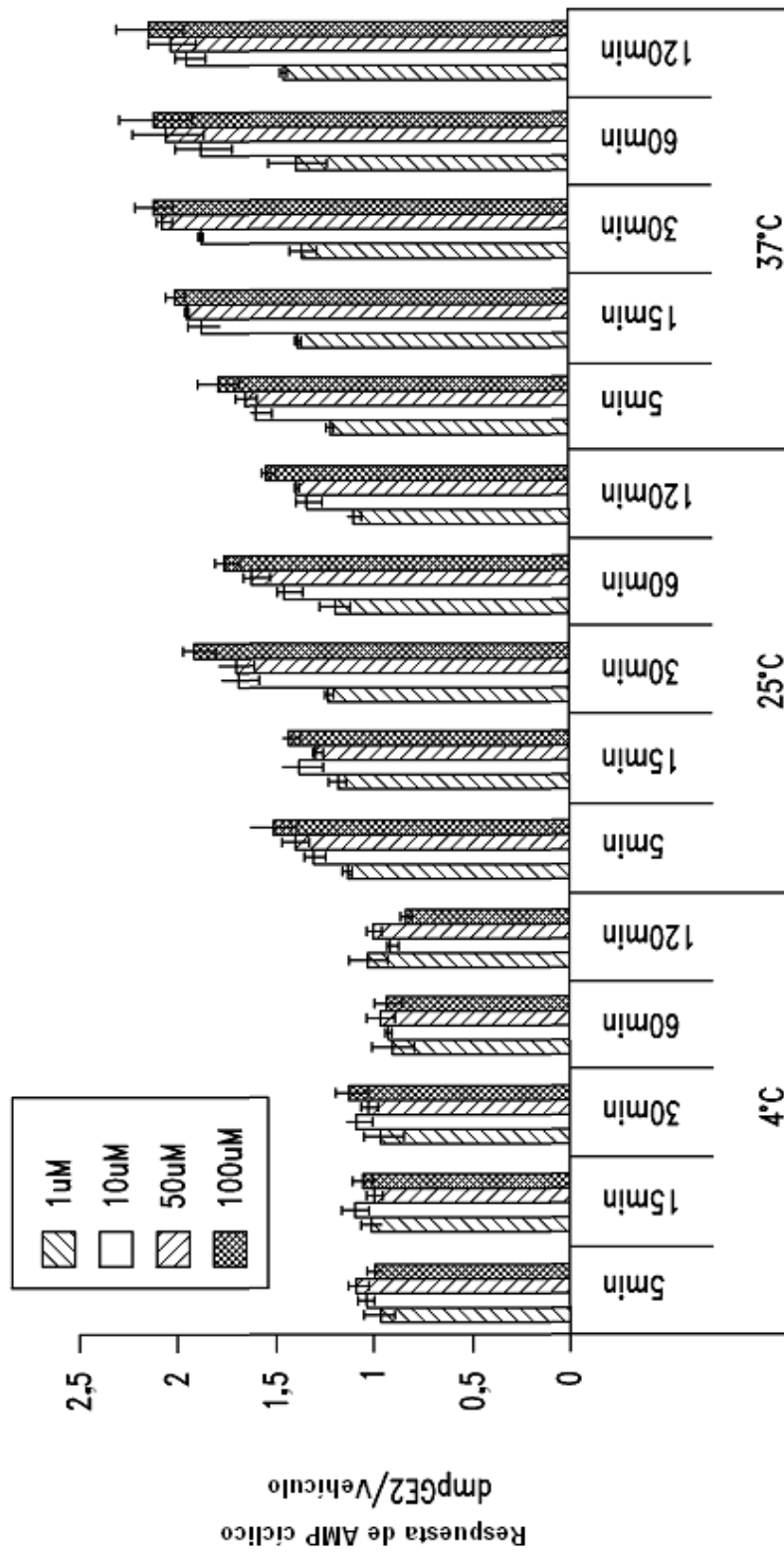


FIG. 3

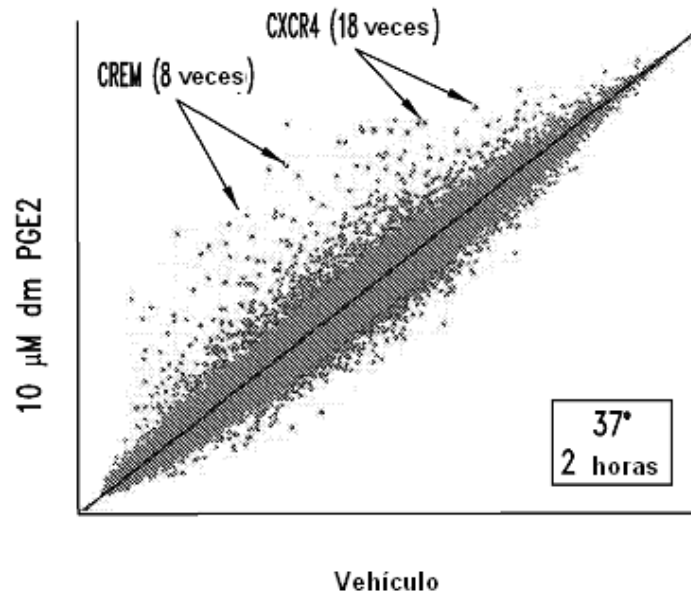


FIG. 4

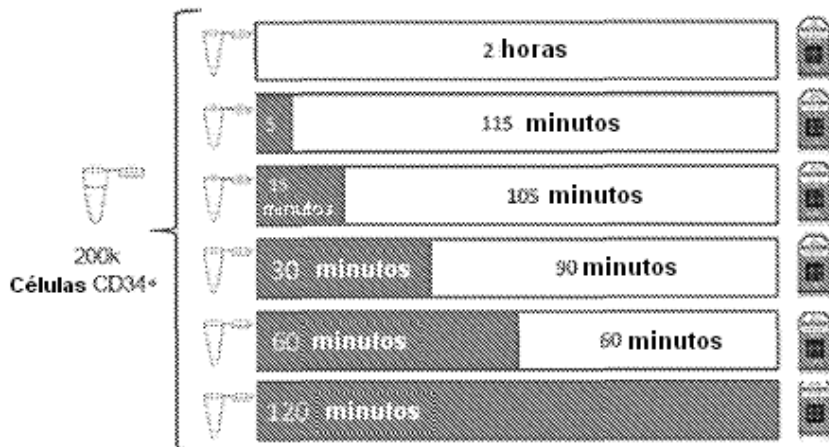


FIG. 5

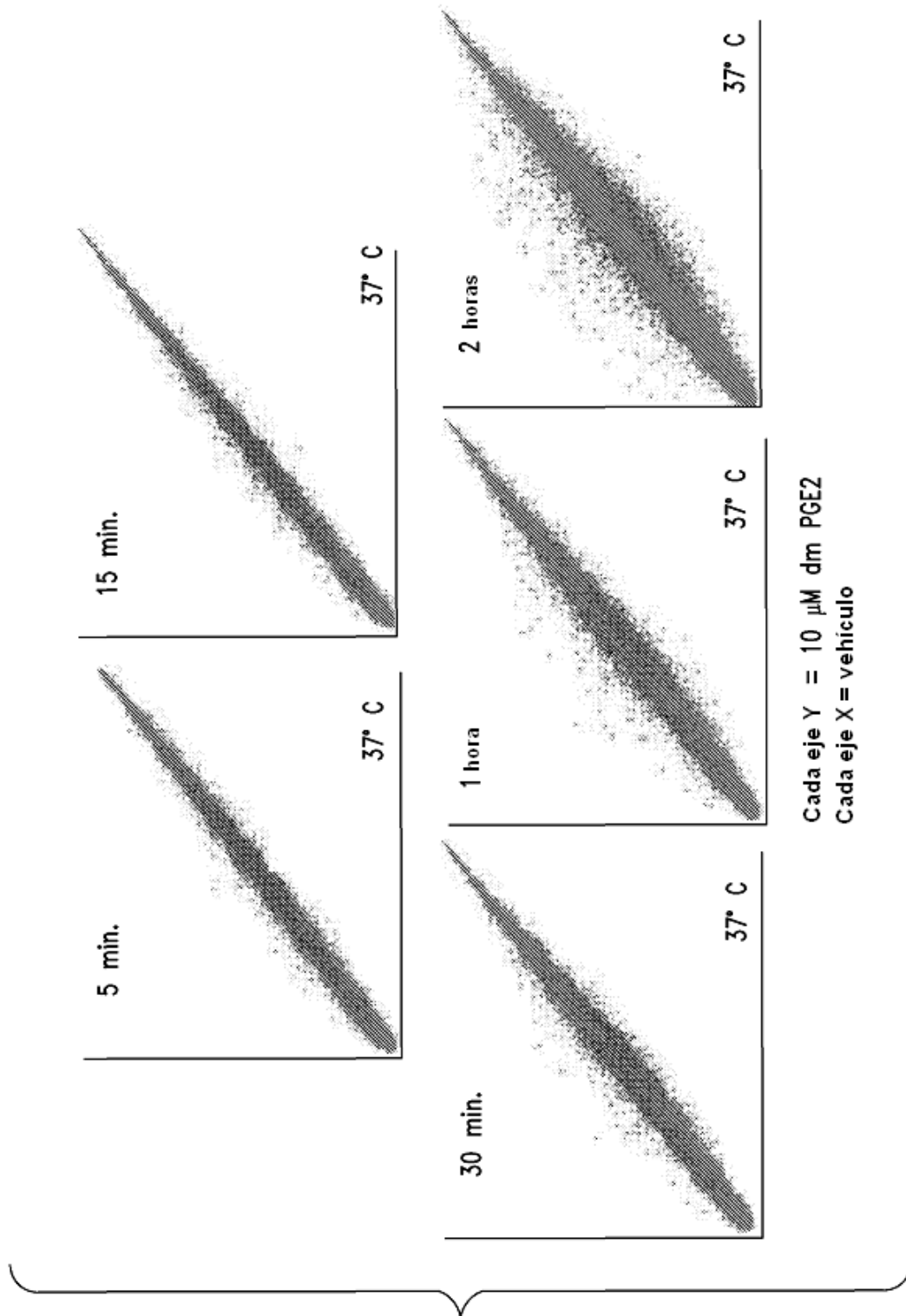


FIG. 6

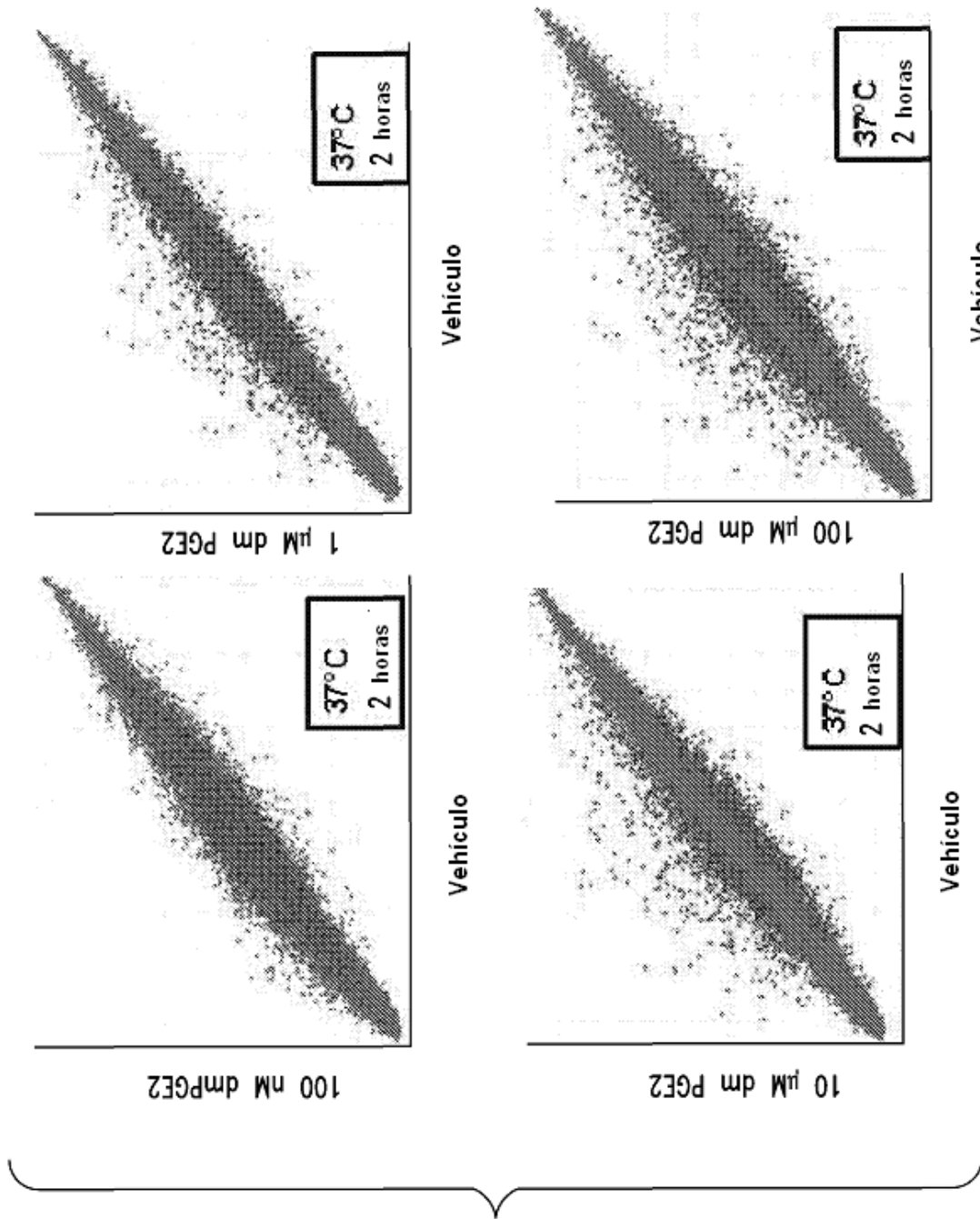


FIG. 7

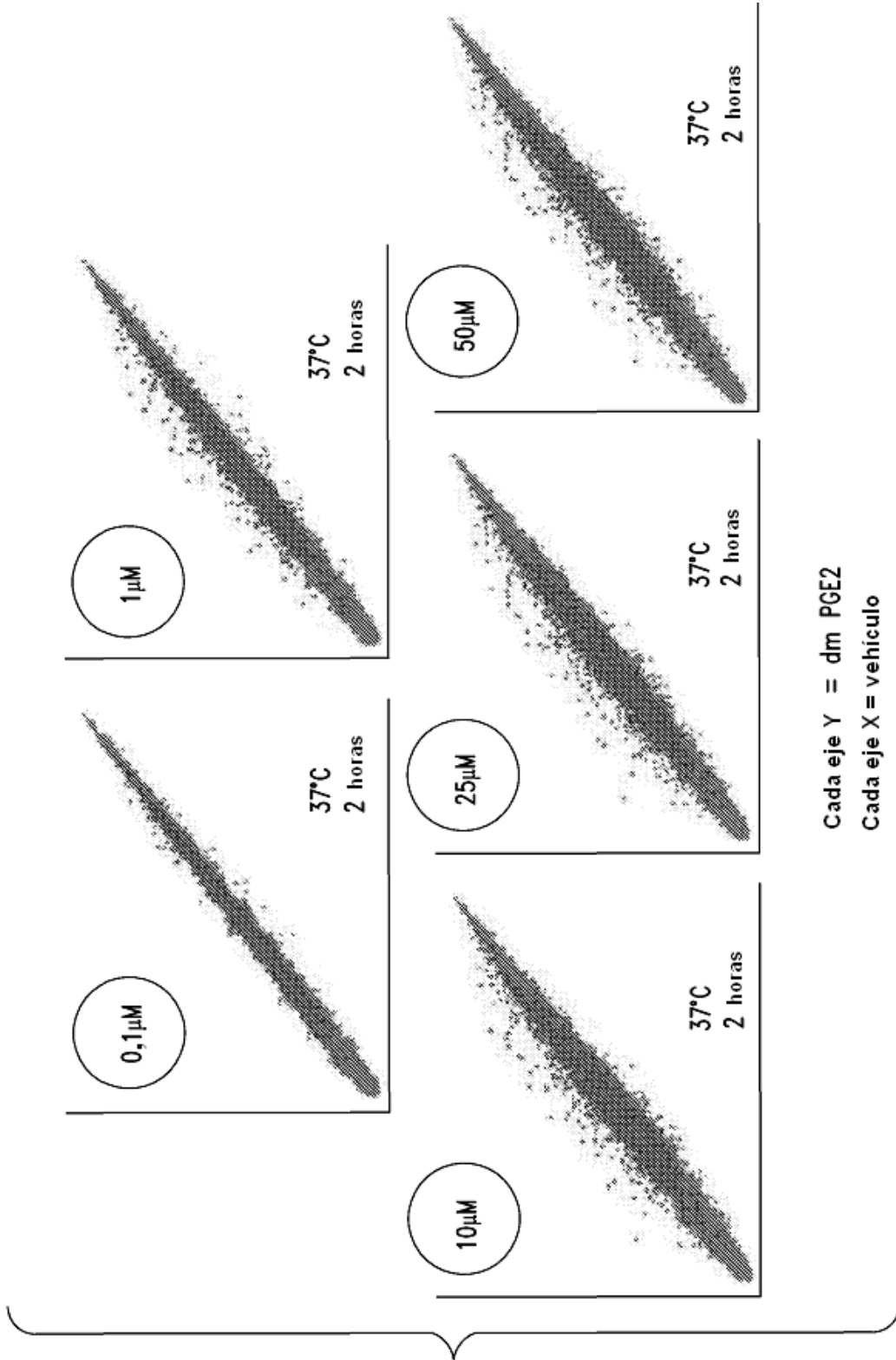


FIG. 8

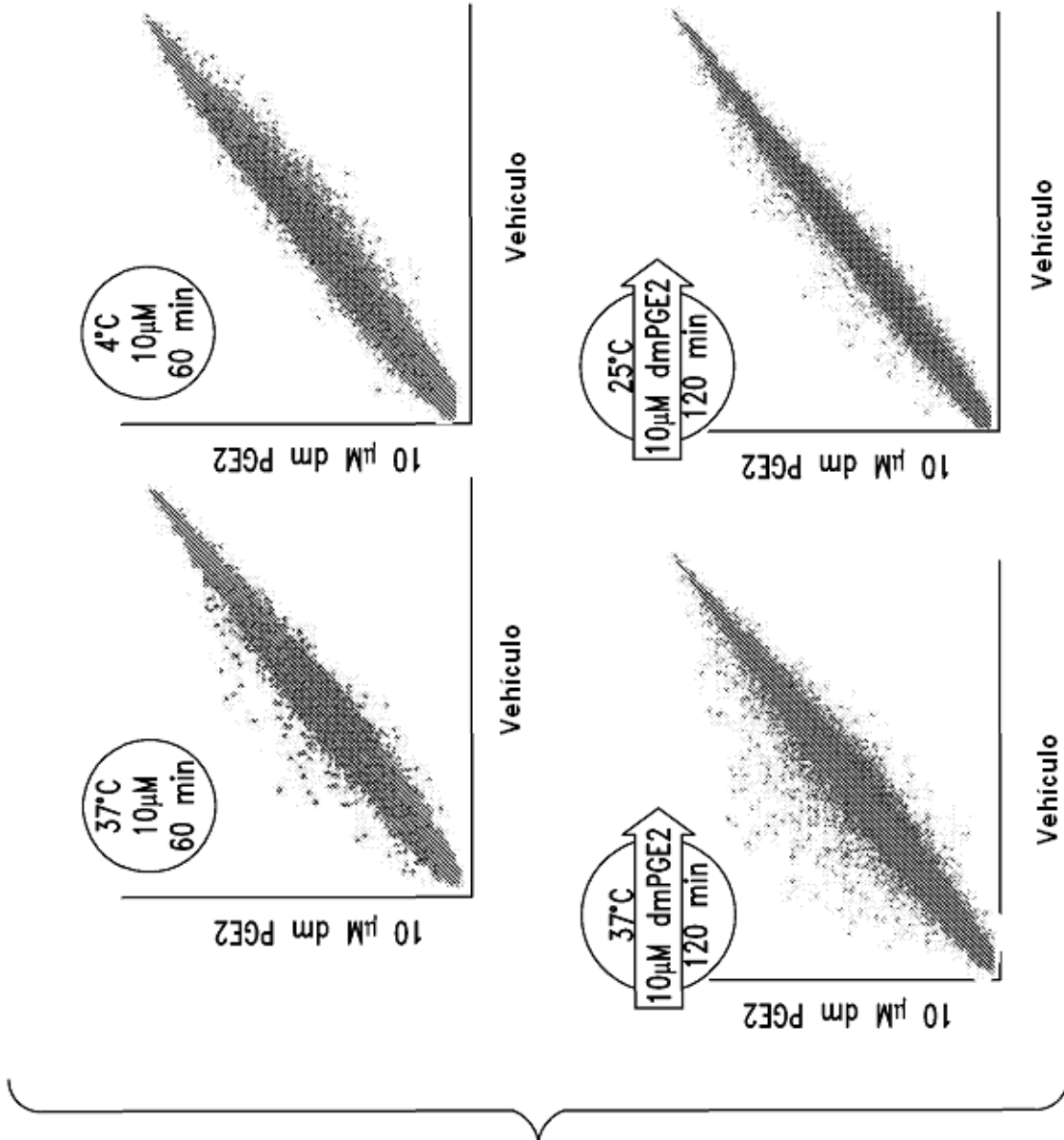


FIG. 9

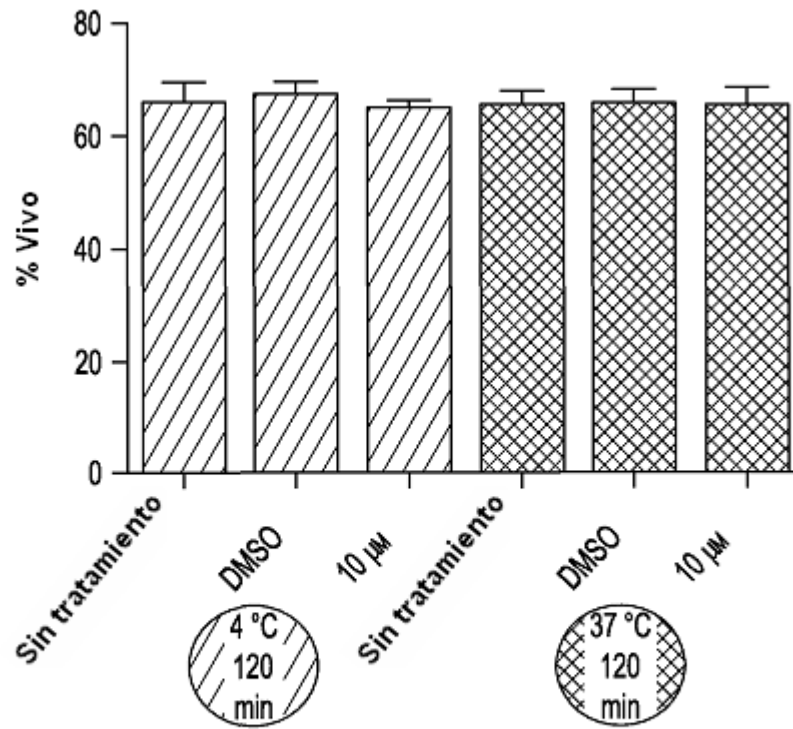


FIG. 10

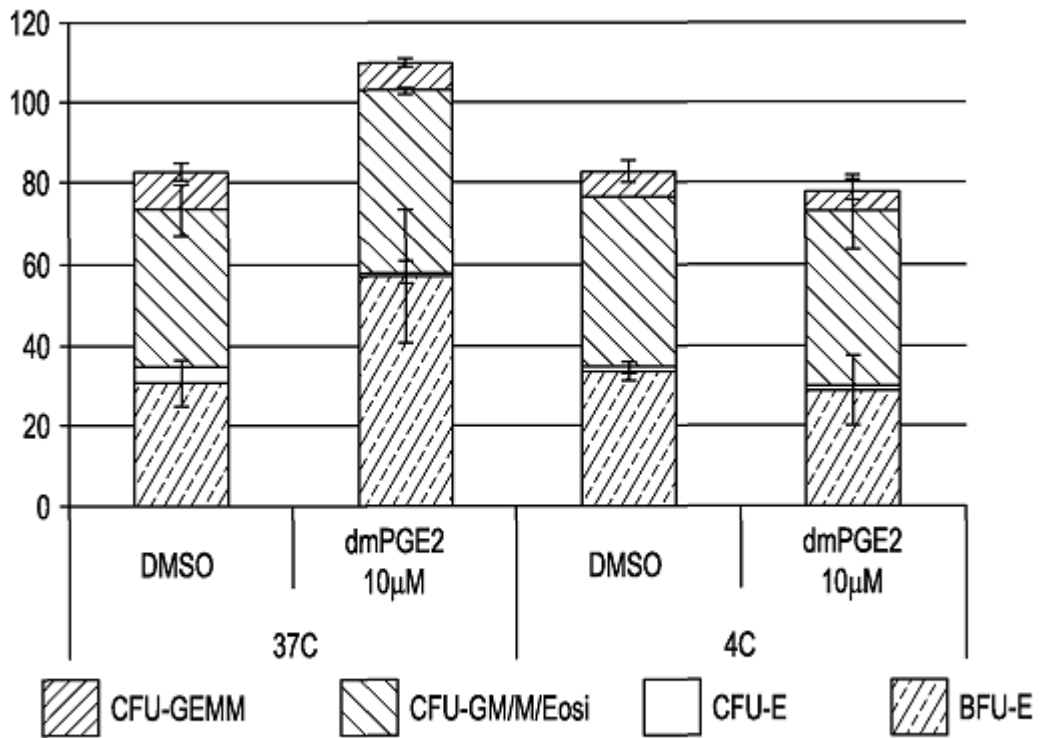


FIG. 11

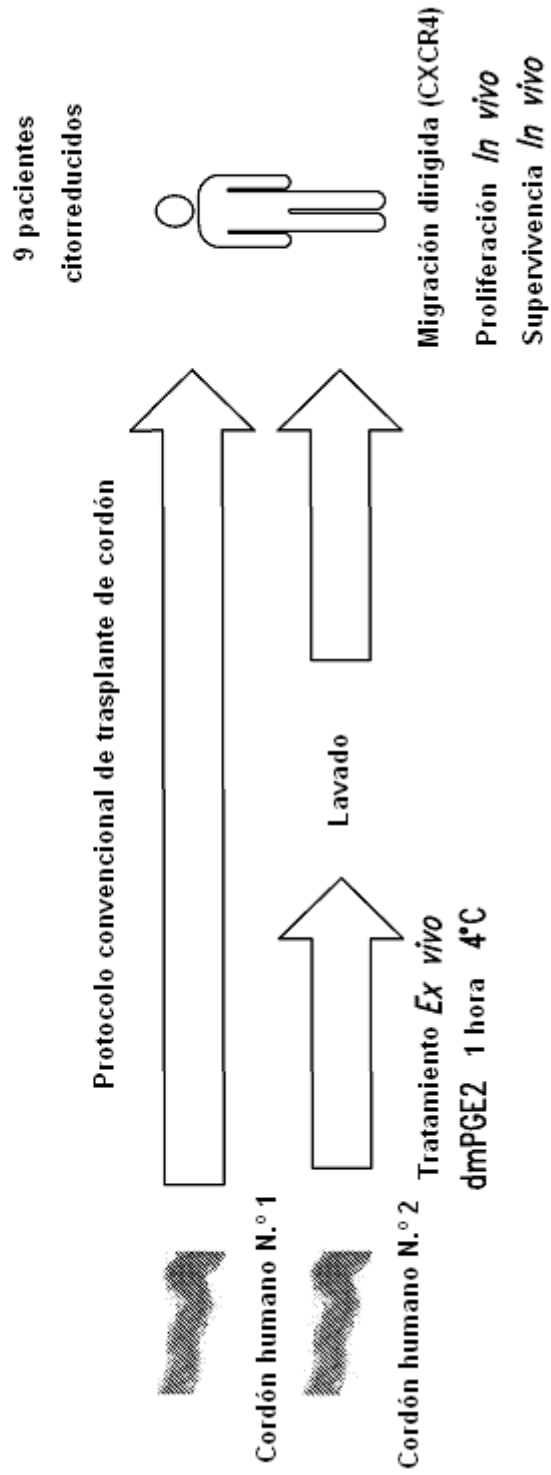


FIG. 12

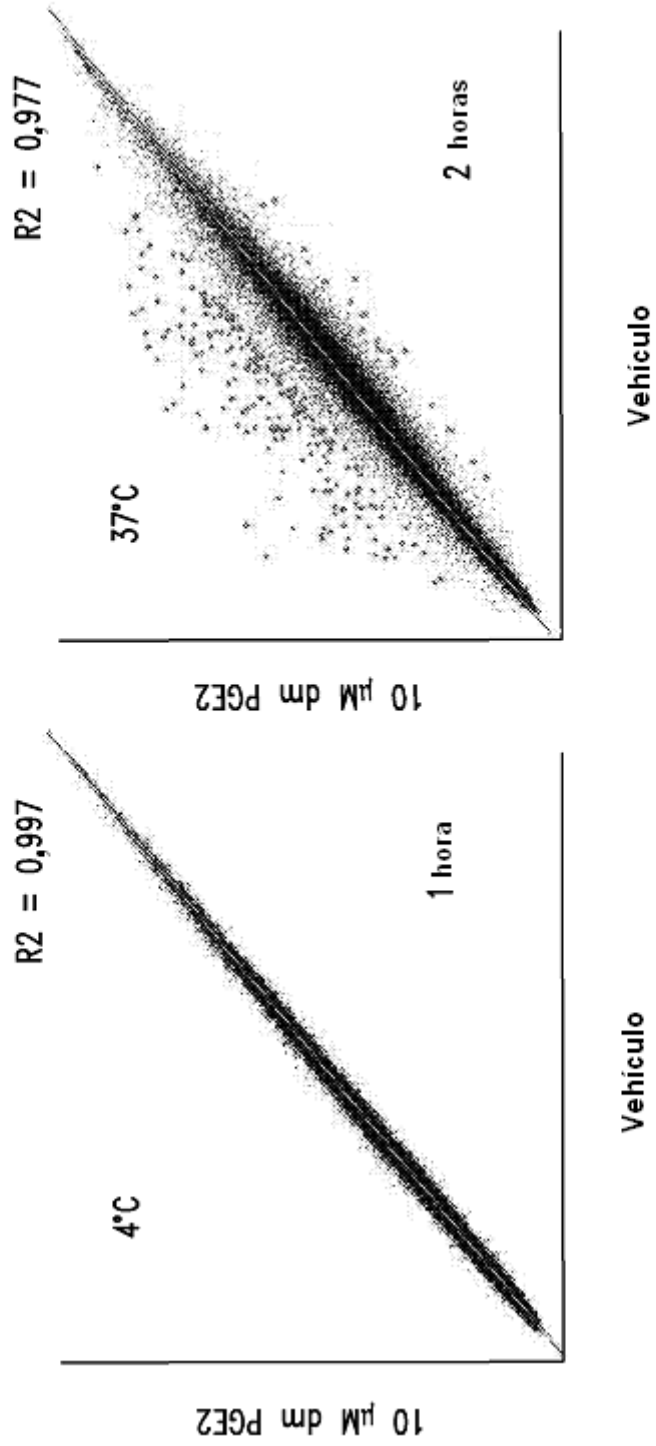


FIG. 13B

FIG. 13A

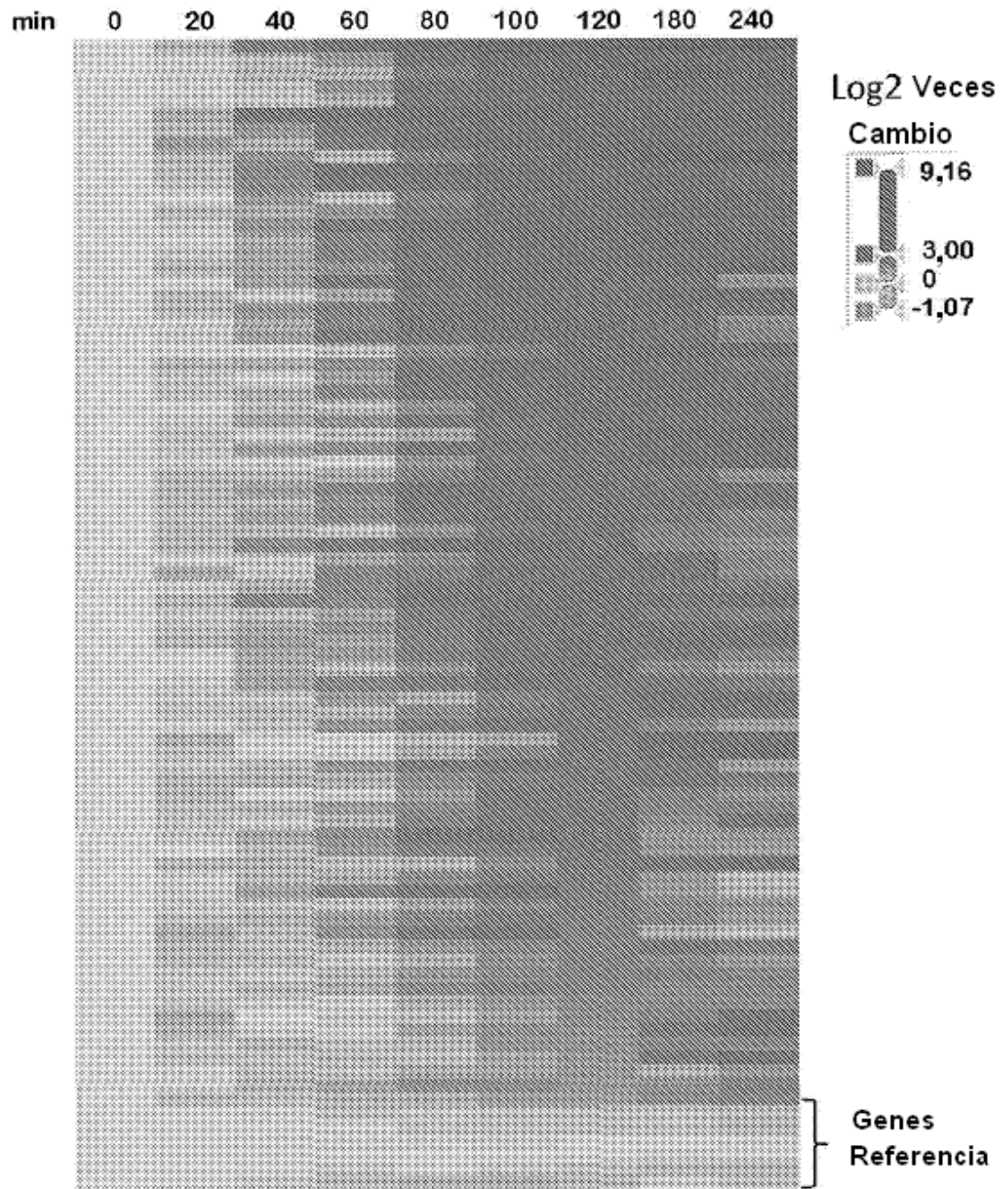


FIG. 14A

Expresión Genética (Todos los Genes de Identificación)

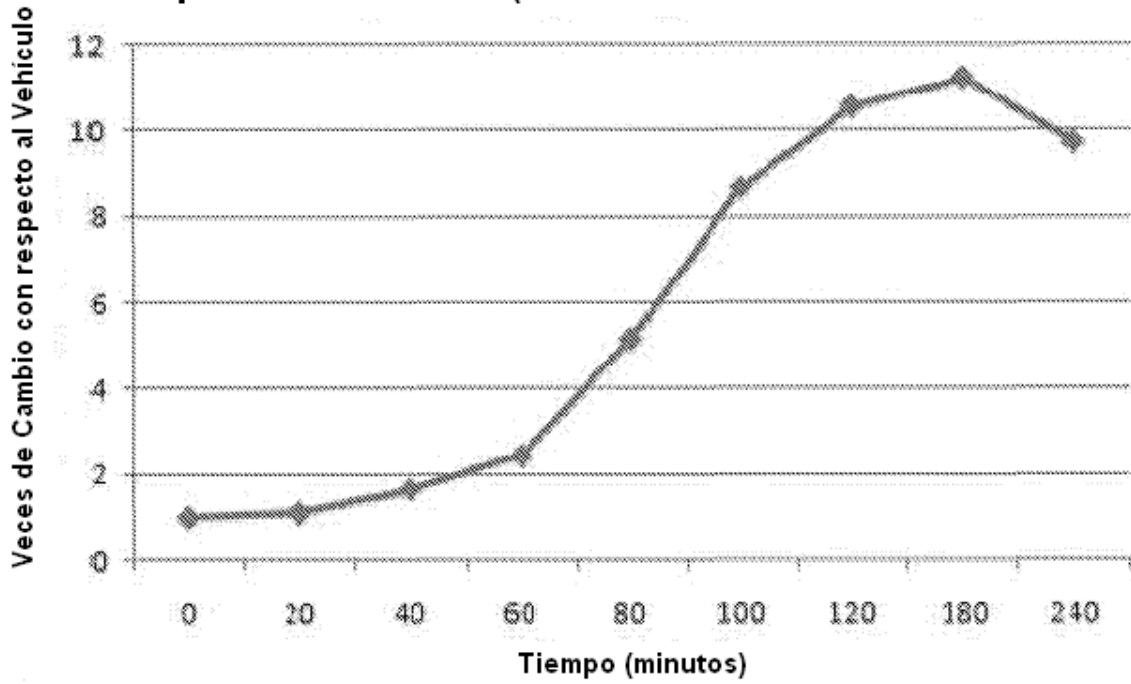


FIG. 14B

Expresión Genética (CXCR4)

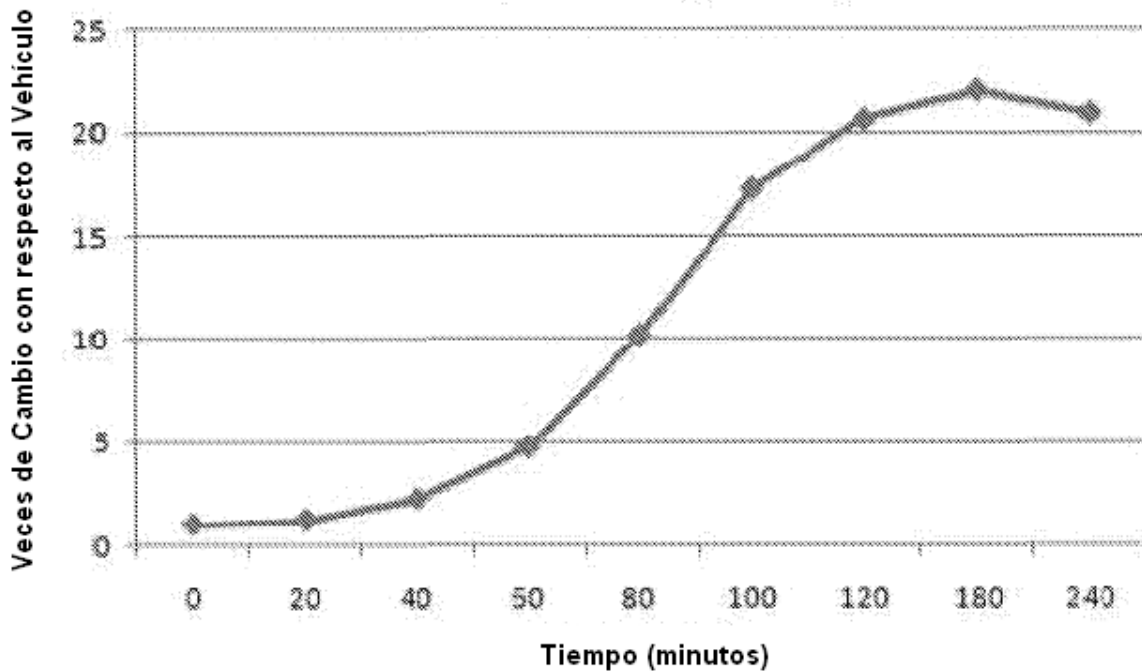


FIG. 14C

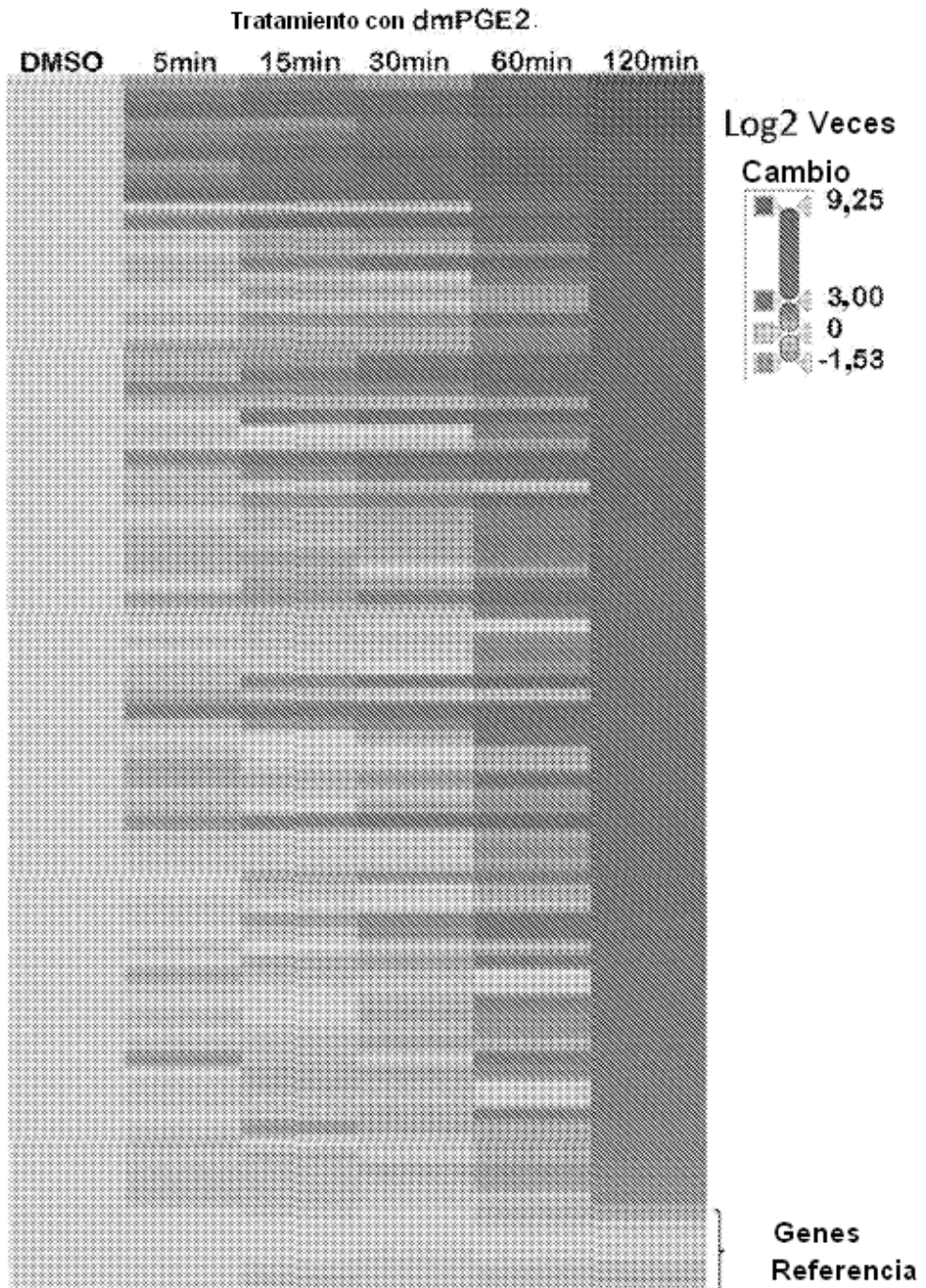


FIG. 15A

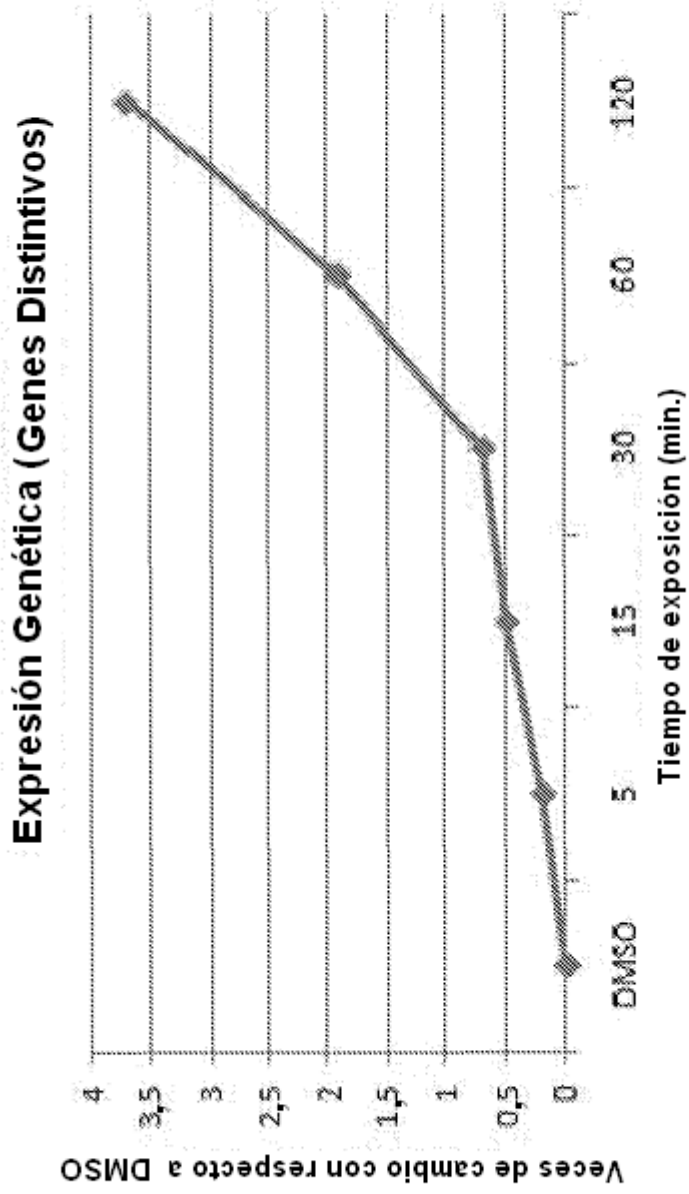


FIG. 15B

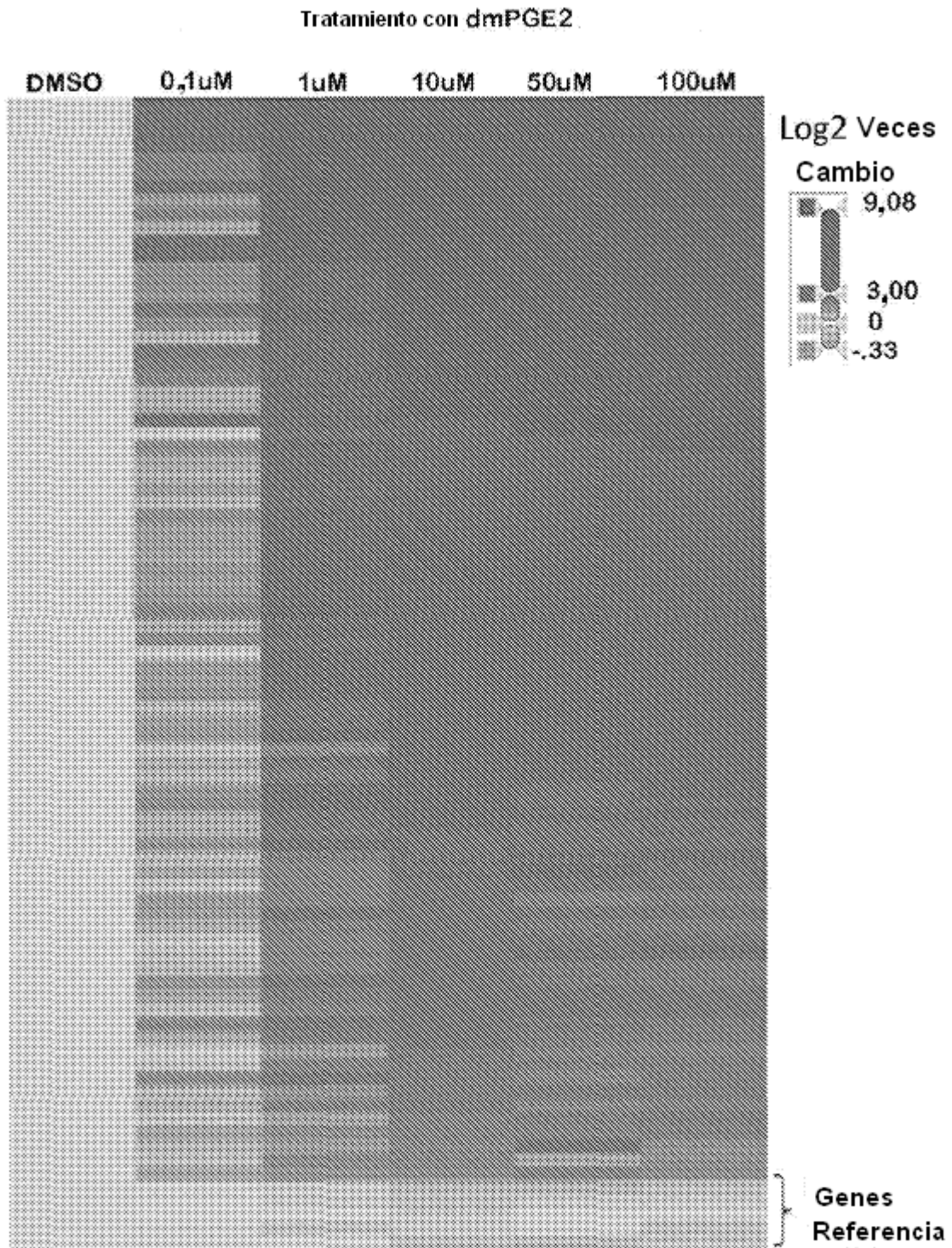


FIG. 16A

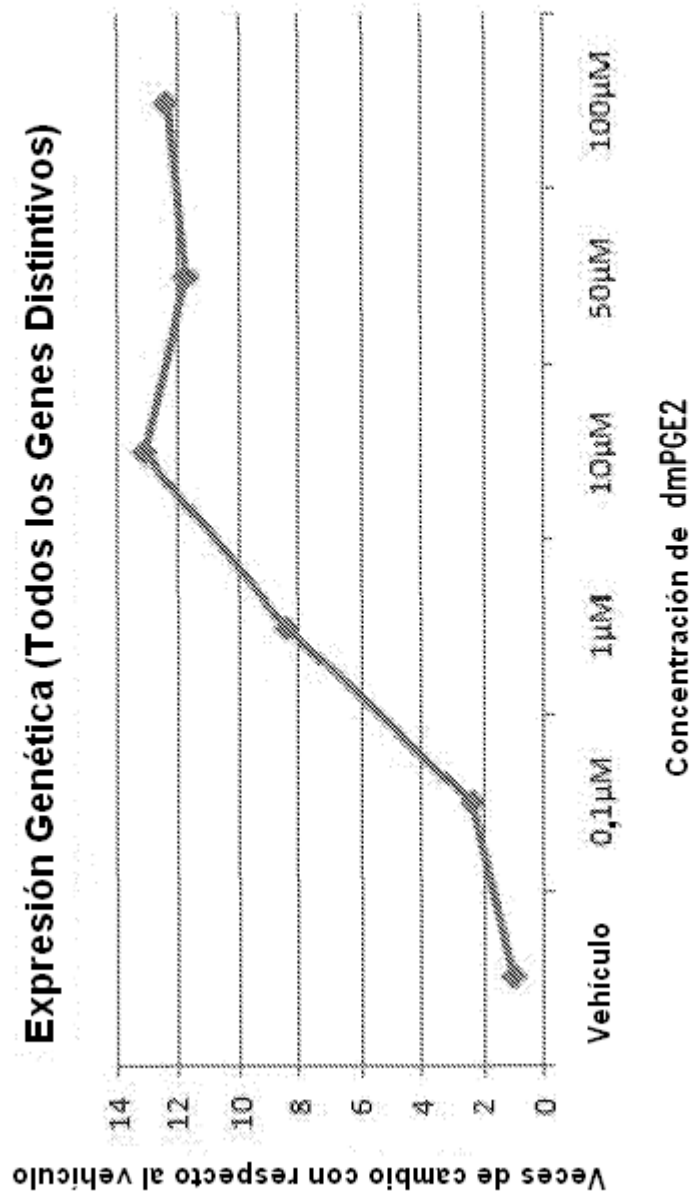
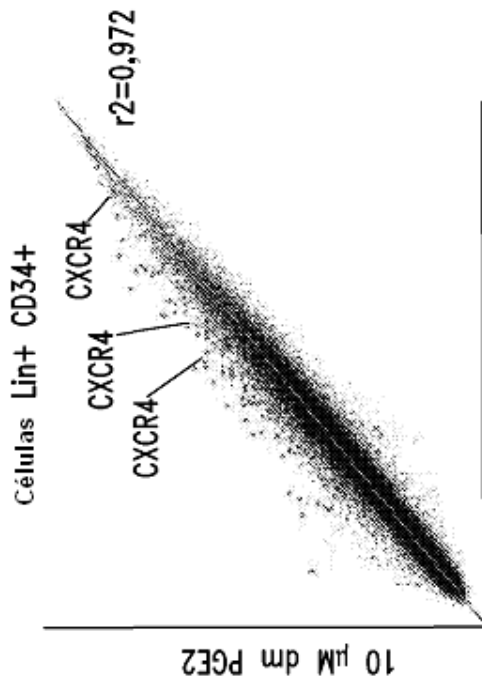
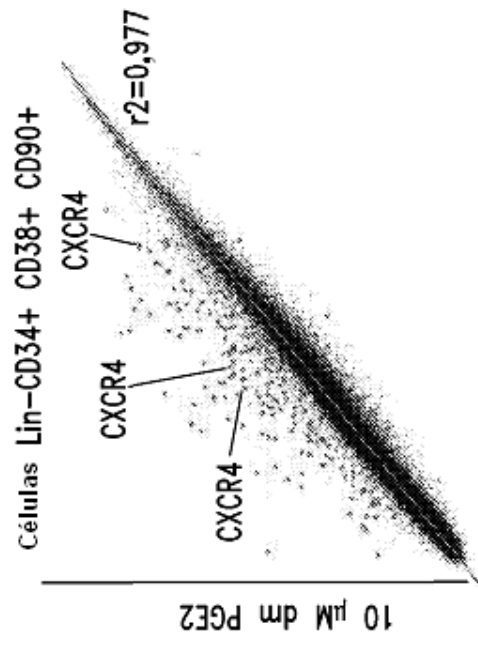


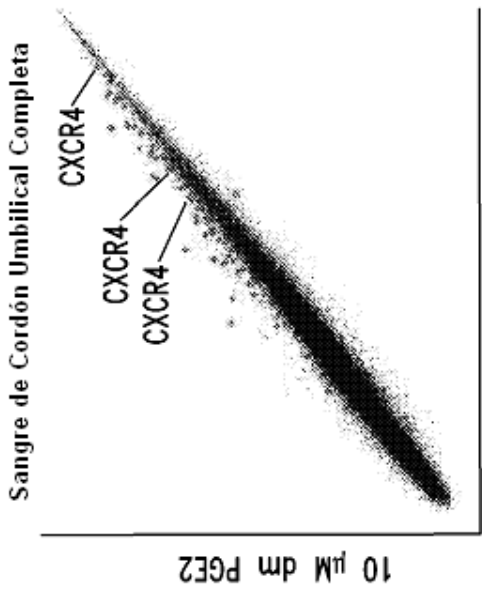
FIG. 16B



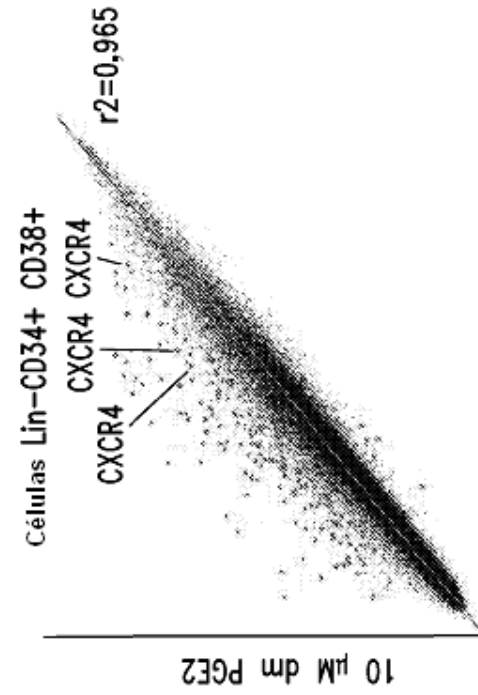
Vehículo
FIG. 17B



Vehículo
FIG. 17D



Vehículo
FIG. 17A



Vehículo
FIG. 17C

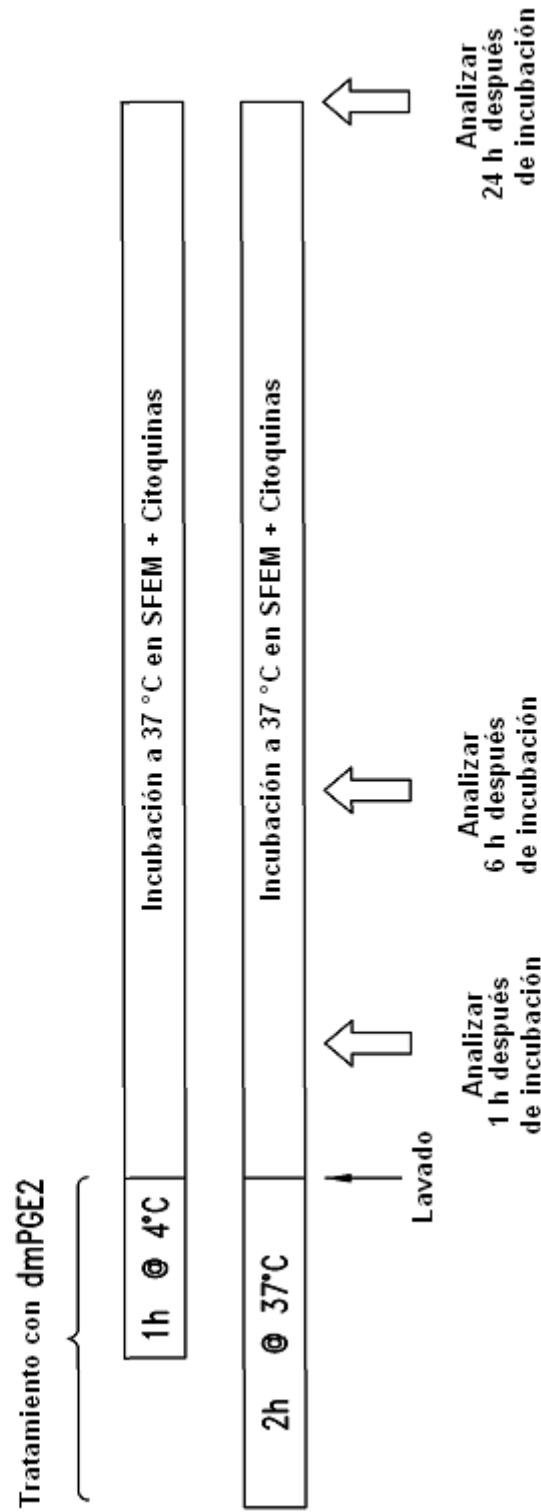


FIG. 18A

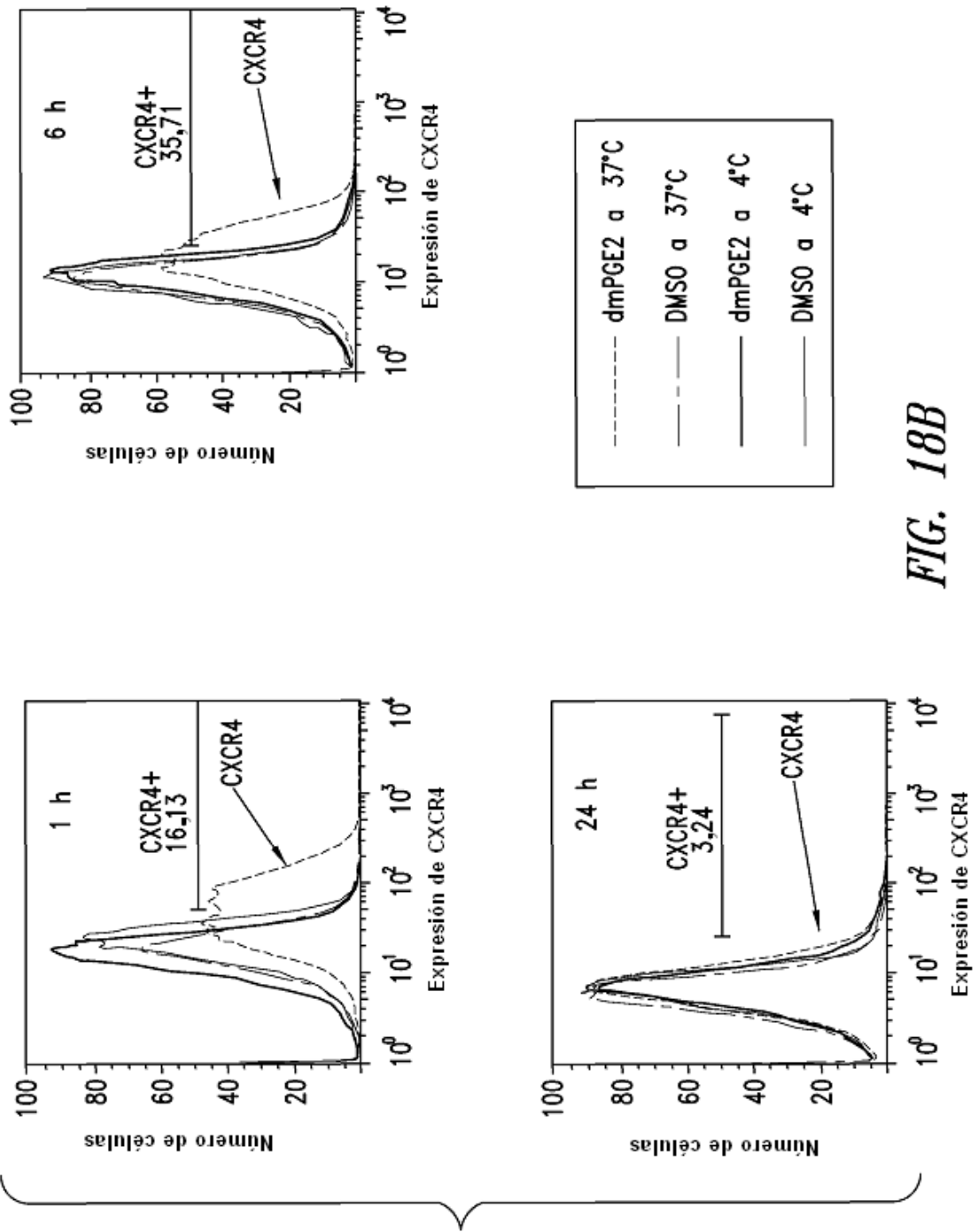


FIG. 18B

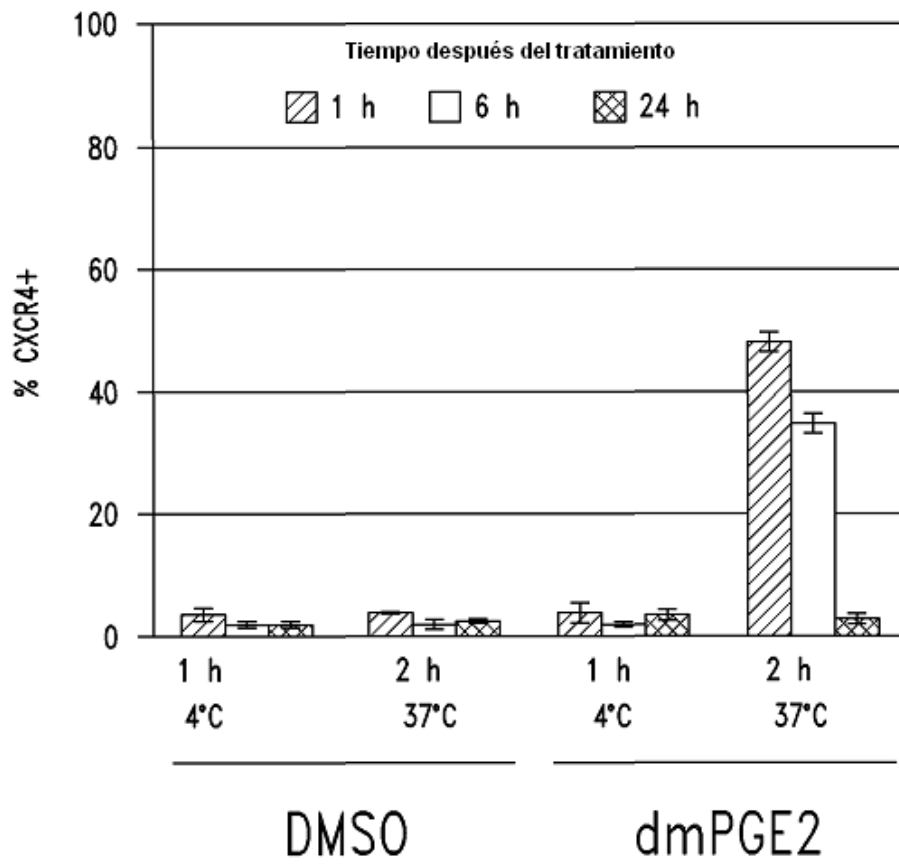


FIG. 18C

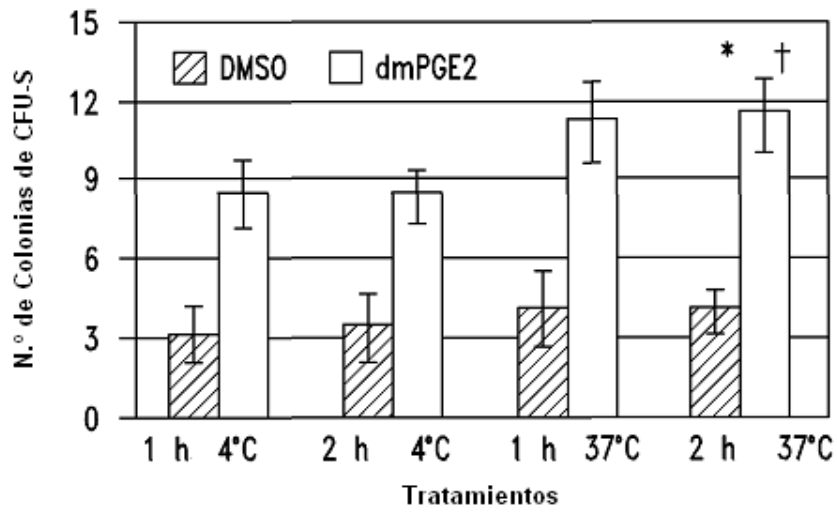


FIG. 19A

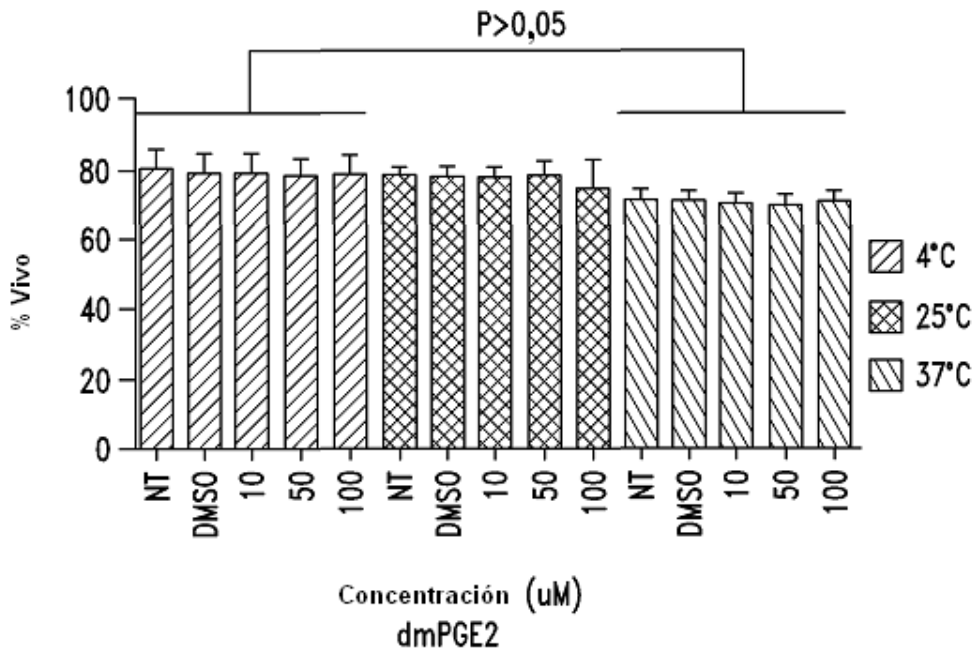


FIG. 19B

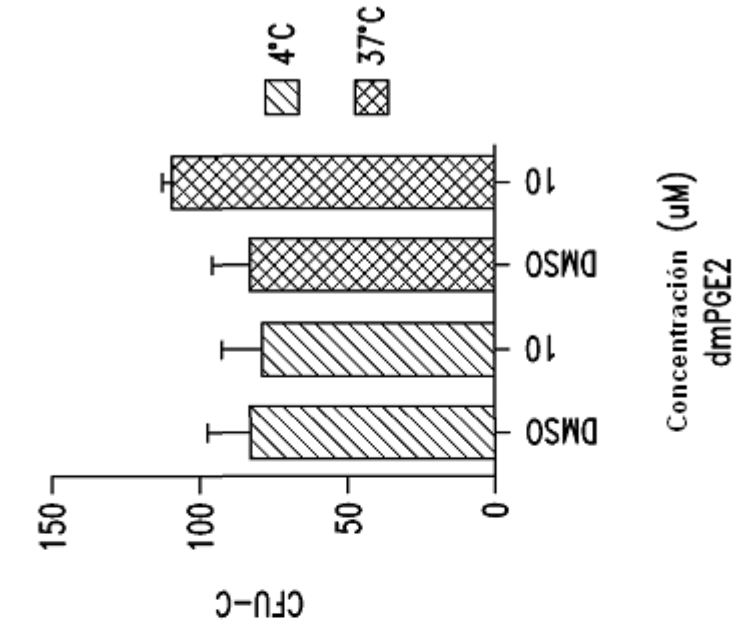


FIG. 19D

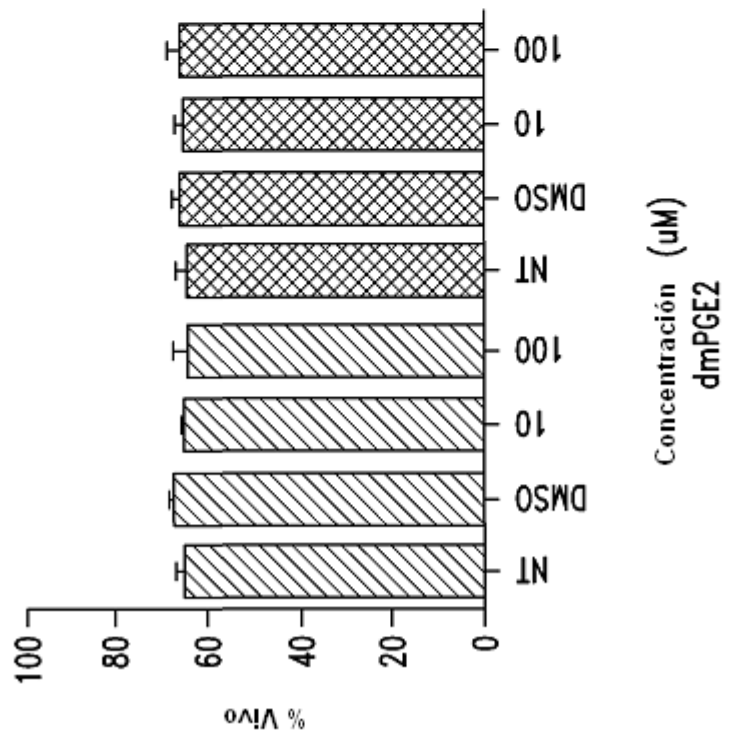


FIG. 19C

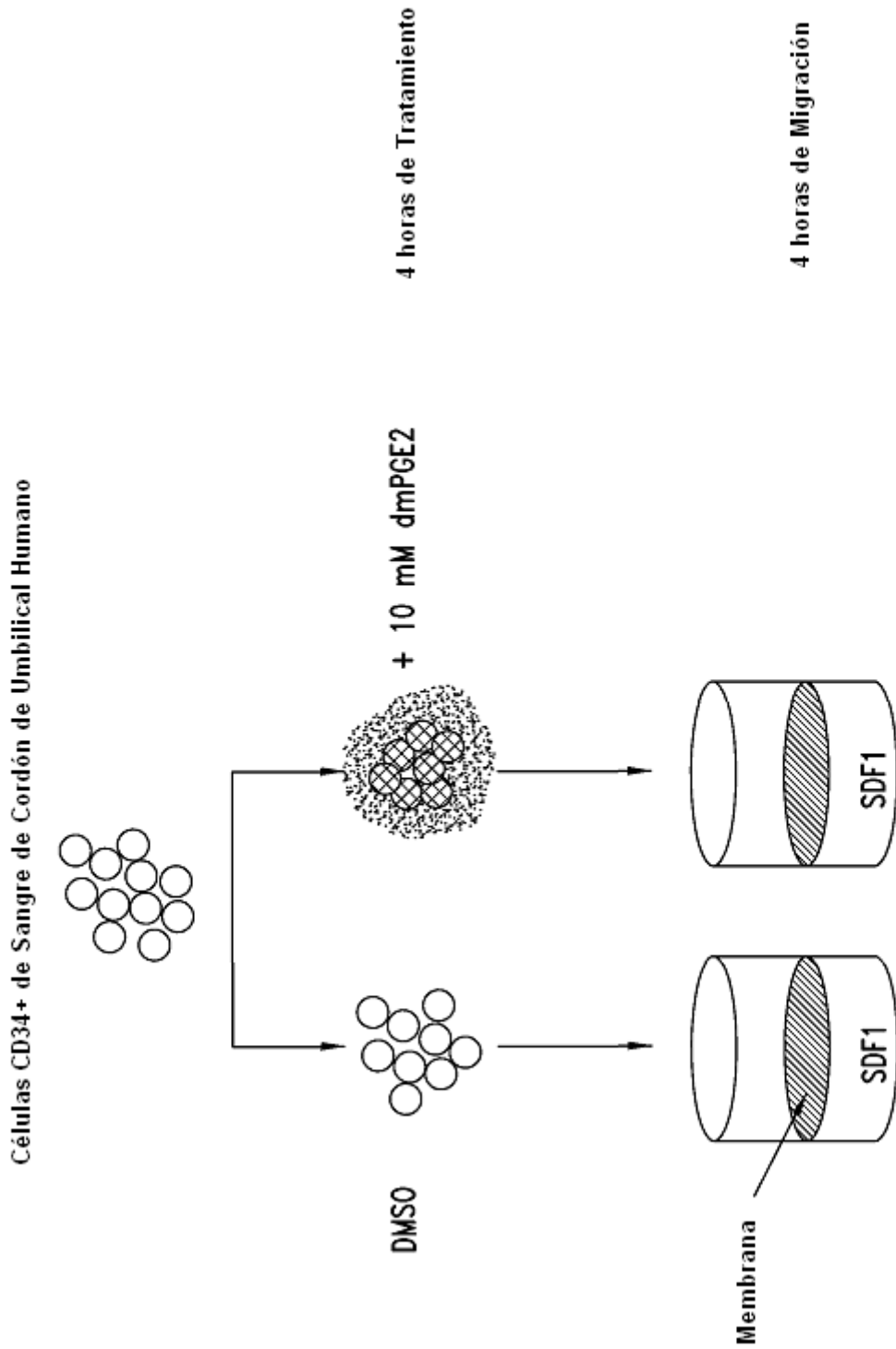


FIG. 20

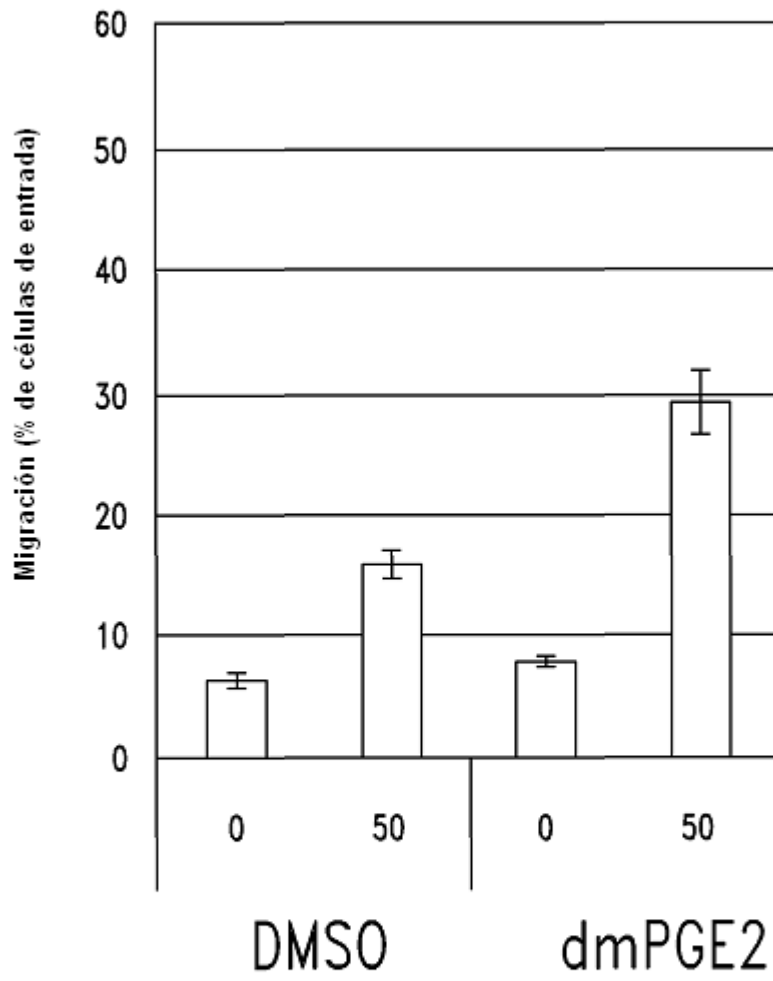


FIG. 21

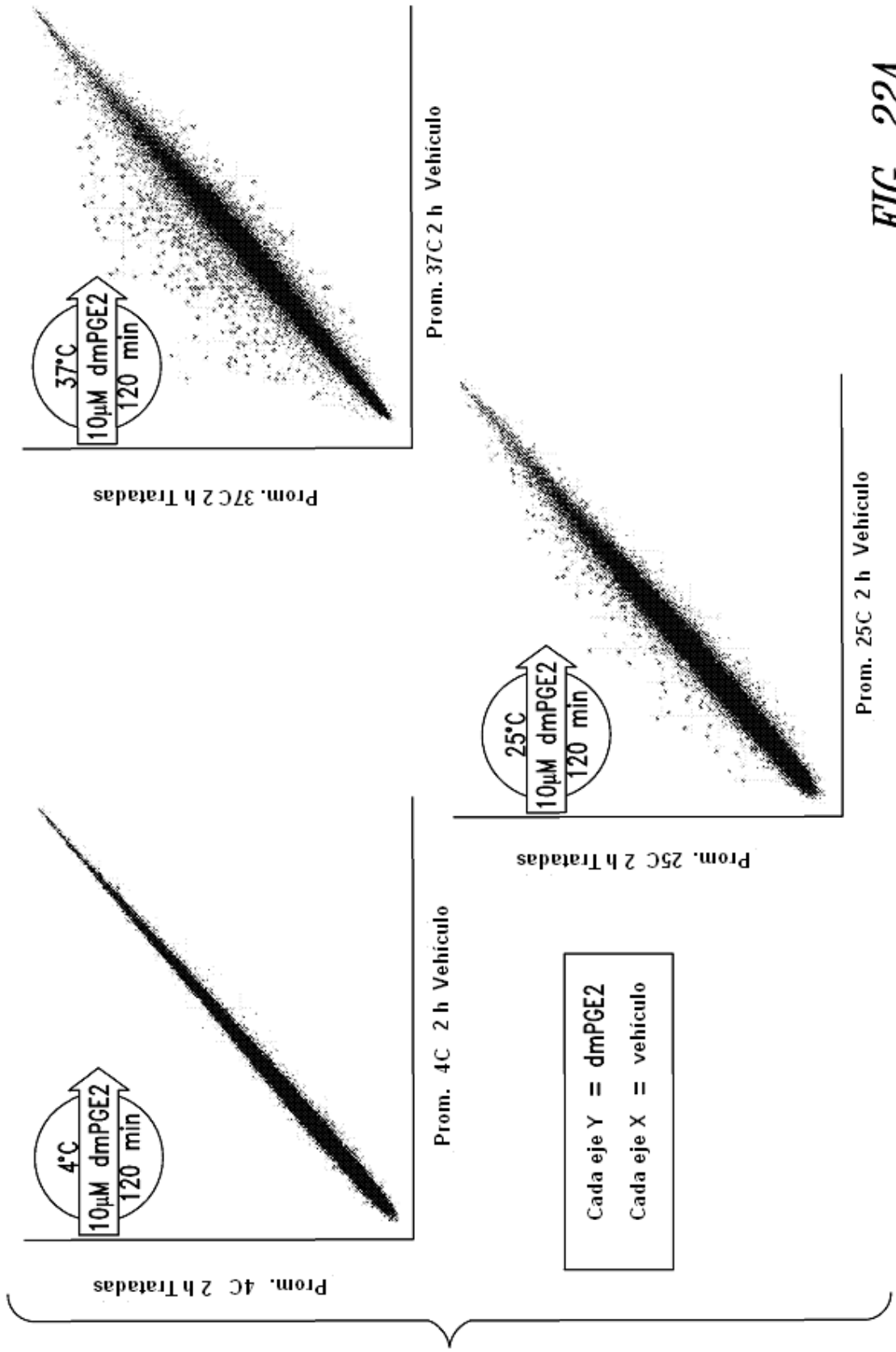


FIG. 22A

Símbolo del Gen	Descripción	Prom. Veces Cambio 4 grad. 2 h	Prom. Veces Cambio 25 grad. 2 h	Prom. Veces Cambio 37 grad. 2 h
TAC1	Taquiquina	1,01	4,51	60,96
HAS1	Hialuronano sintasa 1	0,98	12,45	43,13
DUSP4	Proteína fosfatasa 4 de doble especificidad	1,04	1,34	24,16
AREG	Antirregulina	1,06	1,78	22,74
GEM	Proteína GEM de unión a GTP	1,20	1,32	22,17
NR4A2	Proteína 1 relacionada con receptor nuclear	0,90	3,85	18,33
REH	Retina	1,17	1,36	16,60
CXCL6	Ligando 6 de quimiocina CXC (proteína quimiotáctica de granulocitos:	1,14	1,03	15,87
CREM	Modulador de elemento sensible a cAMP	1,01	1,98	12,97
COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1	1,06	4,15	12,83
CXCL5	Ligando 5 de quimiocina cxc	1,05	4,64	11,61
CA2	Anhidrasa carbónica II	0,96	4,15	10,63
THBS1	Trombospondina 1	1,04	2,31	8,70
FOSL2	Antígeno 2 relacionado con Fos	1,03	1,79	7,92
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC	1,05	2,79	7,76

FIG. 22B

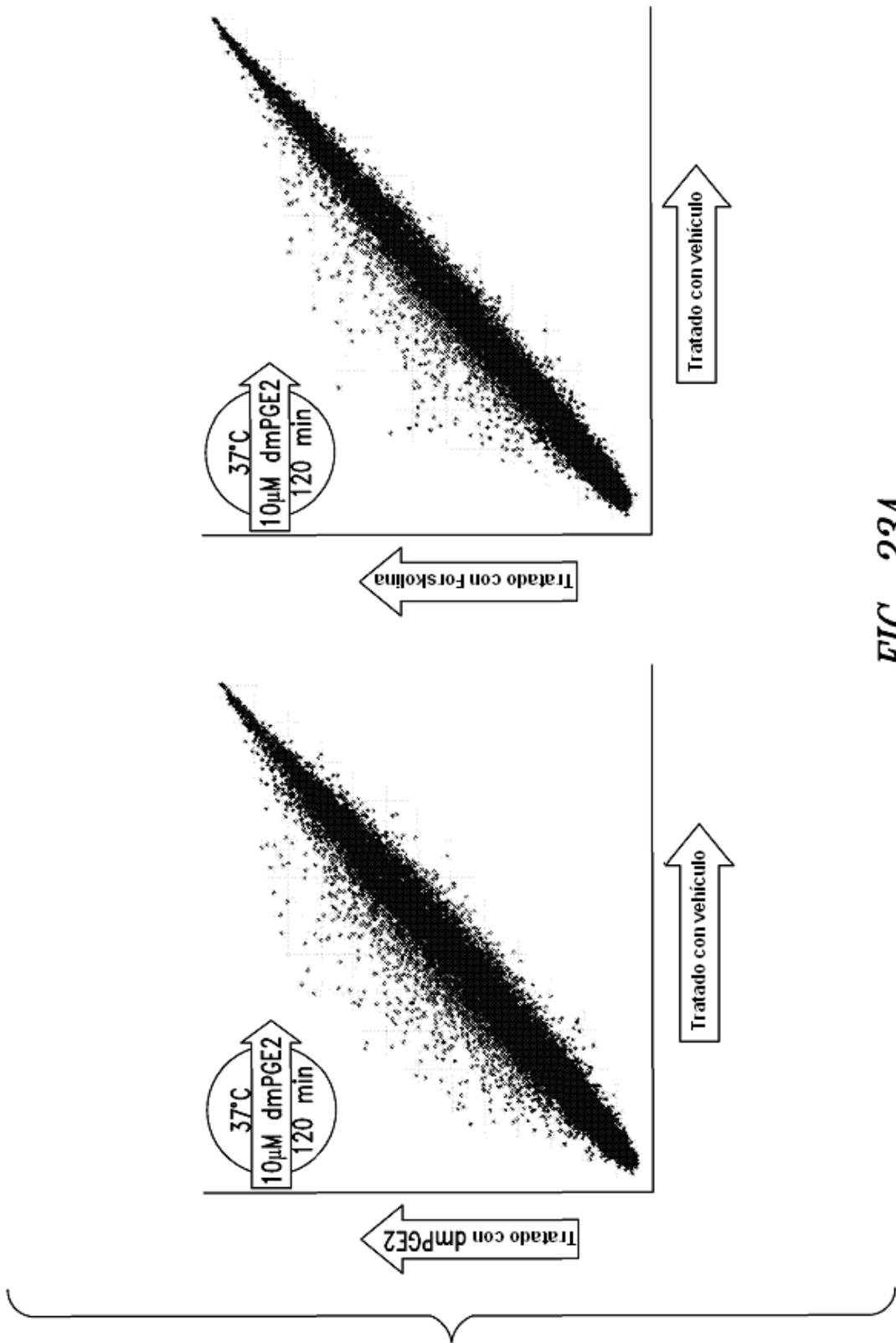


FIG. 23A

Símbolo del Gen	Descripción	Veces Cambio Tratado con dmPEG2	Veces Cambio Tratado con Forskolina
TAC1	Taquiquinina	157,83	38,99
AREG	Anfirregulina	41,18	16,39
GEM	Proteína GEM de unión a GTP	37,30	11,21
DUSP4	Proteína fosfatasa 4 de doble especificidad	19,66	14,49
HR4A2	Proteína 1 relacionada con receptor nuclear	16,26	6,99
CXCL6	Ligando 6 de quimiocina CXC (proteína 2 quimiotáctica de granulocitos)	19,20	9,25
CREM	Modulador de elemento sensible a cAMP	12,09	9,34
FOSL2	Antígeno 2 relacionado con Fos	7,41	5,30
CXCL5	Ligando 5 de quimiocina cxc	12,09	6,84
THBS1	Trombospondina 1	5,53	3,95
HAS1	Hialuronano sintasa 1	11,32	7,37
CA2	Anhidrasa carbónica II	6,46	3,14
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC	4,84	3,97
REH	Retina	3,38	8,53
VEGFA	Factor A de crecimiento endotelial vascular	2,31	3,16

Símbolo del Gen	Descripción	Veces Cambio Tratado con dmPEG2 100nM	Veces Cambio Tratado con dbcAMP 1nM
GEM	Proteína GEM de unión a GTP	93,06	57,09
HR4A2	Proteína 1 relacionada con receptor nuclear	73,70	36,25
DUSP4	Proteína fosfatasa 4 de doble especificidad	40,30	19,28
AREG	Anfirregulina	29,68	17,04
CREM	Modulador de elemento sensible a cAMP	15,50	7,88
CXCR4	Receptor 4 de quimiocina CXC	14,83	7,94
VEGFA	Factor A de crecimiento endotelial vascular	14,70	14,18
FOSL2	Antígeno 2 relacionado con Fos	11,05	7,23
THBS1	Trombospondina 1	9,72	6,91

FIG. 23B

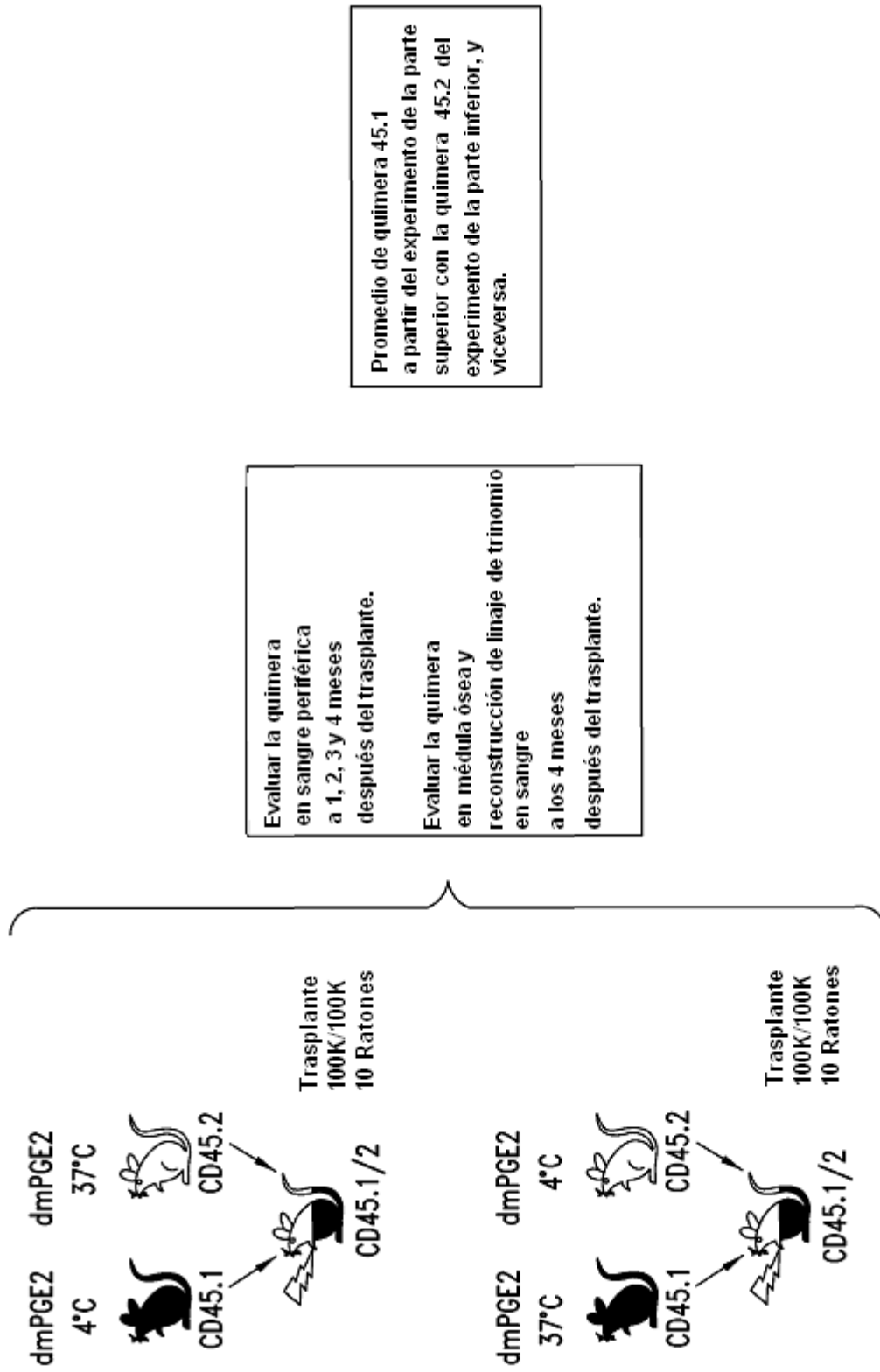


FIG. 24