

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 328**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2011 PCT/AU2011/000840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12000064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2011 E 11799995 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2593114**

54 Título: **Células que expresan STRO-1bright para tratar la enfermedad de injerto contra huésped**

30 Prioridad:

02.07.2010 US 398950 P

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

25.04.2018

73 Titular/es:

**MESOBLAST, INC. (100.0%)
275 Madison Avenue 4th Floor
New York NY 10016, US**

72 Inventor/es:

**ITESCU, SILVIU y
SCHUSTER, MICHAEL, DAVID**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 665 328 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

Células que expresan STRO-1^{bright} para tratar la enfermedad de injerto contra huésped

Campo

5 Esta invención es útil para mejorar el injerto de células progenitoras hematopoyéticas, mejorar el trasplante de la médula ósea y prevenir o reducir la enfermedad de injerto contra huésped. En una realización, la invención se puede usar para prevenir o aliviar las complicaciones posteriores al trasplante alogénico de la médula ósea, concretamente enfermedad de injerto contra huésped en pacientes mamíferos, especialmente en pacientes humanos.

Antecedentes

10 El trasplante de la médula ósea está indicado siguiendo un procedimiento que destruye la médula ósea. Por ejemplo, después de una radiación sistémica intensiva o quimioterapia, la médula ósea es el primer objetivo que falla. Los cánceres metastásicos se tratan comúnmente con quimioterapia muy intensiva, que tiene la intención de destruir el cáncer, pero también destruye efectivamente la médula ósea. Esto induce la necesidad de un trasplante de la médula ósea. Sin embargo, el alivio de cualquiera pero las condiciones más agudas que amenazan la vida que involucran trastornos de la médula ósea con trasplante de la médula ósea se considera generalmente como demasiado arriesgado, debido a la probabilidad del inicio de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD).

15 La GvHD es un trastorno inmunológico que es el factor principal que limita el éxito y la disponibilidad del trasplante alogénico de la médula ósea o de células madre. GvHD es una reacción inflamatoria sistémica que causa enfermedades crónicas y puede conducir a la muerte del mamífero huésped. En la actualidad, los trasplantes alogénicos invariablemente corren un riesgo grave de GvHD asociada, incluso cuando el donante tiene un alto grado de histocompatibilidad con el huésped.

20 La GvHD es causada por las células T del donante que reaccionan contra los antígenos huésped incompatibles distribuidos sistémicamente, causando inflamación poderosa. En GvHD, las células T adultas maduras que reconocen las diferencias entre el donante y el huésped se activan sistémicamente. Los procedimientos actuales para prevenir y tratar la GvHD implican la administración de fármacos tales como ciclosporina-A y corticosteroides. Estos tienen efectos secundarios graves, se deben administrar por períodos prolongados y son costosos de administrar y controlar. También se han intentado utilizar el agotamiento de las células T para evitar la GvHD, pero esto requiere instalaciones y experiencia sofisticadas y costosas. Un grado demasiado grande de agotamiento de las células T conduce a problemas graves de fracaso del injerto de las células madre de la médula ósea, falla de la reconstitución hematopoyética, infecciones o recaídas. La depleción más limitada de células T deja atrás a las células que todavía son competentes para iniciar la GvHD. Como resultado, los procedimientos actuales para tratar la GvHD solo tienen éxito en combinaciones limitadas de donantes y huéspedes, de modo que a muchos pacientes no se les puede ofrecer un tratamiento potencialmente salvavidas.

25 Las células madre mesenquimales (MSC) exhiben una potente actividad inmunosupresora que se ha explotado con éxito en el entorno clínico para tratar la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), una complicación por lo demás letal del trasplante de la médula ósea. Debido a la caracterización limitada, las preparaciones de MSC son bastante heterogéneas y esto limita la magnitud de su inmunosupresión y, por lo tanto, el beneficio clínico.

30 El documento WO 2010/025506 A1 describe un procedimiento de trasplante de células precursoras hematopoyéticas en un sujeto, en el que las células precursoras hematopoyéticas se cultivan en presencia de una población de células enriquecidas para células STRO-1^{bright} para expandir las células precursoras hematopoyéticas, y administrar las células precursoras hematopoyéticas expandidas al sujeto.

Resumen

35 En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores compararon las preparaciones de células madre mesenquimales y de células multipotenciales STRO-1^{bright} en términos de su efecto sobre GvHD. Sorprendentemente, la preparación de células multipotenciales STRO-1^{bright} fue muy superior a la preparación de células madre mesenquimales en la mejora de GvHD.

40 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} para usar en un procedimiento para tratar complicaciones de enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) en un paciente mamífero, cuyo procedimiento comprende la administración de la población de células al paciente mamífero.

45 En una realización de la presente invención, el procedimiento comprende además la administración de precursores de las células de linaje de la médula ósea. En una realización, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra al paciente mamífero antes de la administración de los precursores de las células del linaje de la médula ósea. En una realización, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-

¹_{bright} se coadministra con los precursores de las células de linaje de la médula ósea. En una realización, los precursores de las células de linaje de la médula ósea son células alogénicas administradas al paciente mamífero para tratar una enfermedad maligna o genética de la sangre.

5 En una realización de la presente invención, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} es alogénica.

En una realización de la presente invención, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.

10 En una realización de la presente invención, se administra una dosis de entre 0.1×10^6 a 5×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}. En una realización de la presente invención, se administra una dosis de entre 0.3×10^6 a 2×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}. En una realización de la presente invención, se administra una dosis baja de células que expresan STRO-1^{bright} que comprende entre 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}. En una realización de la presente invención, se administra una dosis baja de células que expresan STRO-1^{bright} que comprende aproximadamente 0.3×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}.

15 En una realización de la presente invención, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra una vez a la semana o con menos frecuencia.

En una realización de la presente invención, el paciente mamífero padece de anemia aplásica, mielofibrosis o falla de la médula ósea después de la quimioterapia y la radioterapia.

En una realización de la presente invención, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra en combinación con un fármaco inmunosupresor.

20 En una realización de la presente invención, la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se expande en el cultivo antes de la administración.

En una realización, el paciente mamífero se somete o está a punto de someterse a un trasplante de médula ósea.

25 En una realización, la enfermedad de injerto contra huésped es un resultado de una respuesta inmune de células T. En un ejemplo, las células T son de un donante y el antígeno es del receptor. Por ejemplo, las células T pueden estar presentes en un trasplante. En otra realización, las células T son del receptor y el antígeno es del donante.

En otra realización de este procedimiento, las células STRO-1^{bright} se modifican genéticamente para expresar una molécula para bloquear la coestimulación de las células T.

Las células STRO-1^{bright} pueden ser autogénicas o alogénicas. En una realización, las células STRO-1^{bright} son alogénicas.

30 La presente divulgación también contempla numerosas administraciones de las células. Por ejemplo, dicho procedimiento puede implicar la administración de las células y la monitorización del sujeto para determinar cuándo se produce uno o más síntomas de GvHD o recurre y la administración de una dosis adicional de las células. Los procedimientos apropiados para evaluar los síntomas de GvHD serán evidentes para el experto en el arte y/o se describen en este documento.

35 En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1^{bright} se administra una vez a la semana o con menos frecuencia, tal como, una vez cada cuatro semanas o con menos frecuencia.

40 En una realización, la población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} se administra por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo conectado a un órgano, por ejemplo, una aorta abdominal, una arteria mesentérica superior, una arteria pancreaticoduodenal o una arteria esplénica.

En una realización, el procedimiento para tratar GvHD comprende además administrar un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor se puede administrar durante un tiempo suficiente para permitir que las células trasplantadas sean funcionales. En un ejemplo, el agente inmunosupresor es ciclosporina. La ciclosporina se puede administrar en una dosificación de 5 a 40 mg/kg de peso corporal.

45 A lo largo de esta especificación, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Breve descripción de los dibujos

- Figura 1. Coexpresión de TNAP (STRO-3) y el marcador celular precursor mesenquimal, STRO-1^{bright} por BMMNC humano adulto. La inmunofluorescencia de doble color y la citometría de flujo se realizaron mediante incubación de BMMNC seleccionado para MACS STRO-1 y marcado indirectamente con un anticuerpo IgM de cabra anti-murino acoplado a FITC (eje x) y STRO-3 mAb (IgG1 murino) marcado indirectamente con una IgG de cabra anti-murino acoplada a PE (eje y). El histograma del gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recopilados como datos del modo lista. Las líneas verticales y horizontales se ajustaron a los niveles de reactividad de <1.0% de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1^{bright} coexpresó TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células STRO-1+ restantes no pudieron reaccionar con el STRO-3 mAb.
- Figura 2. Perfil de expresión génica de la progenie STRO-1^{bright} o STRO-1^{dim} de MPC STRO-1^{bright} cultivadas y expandidas. Se prepararon suspensiones de células individuales de MPC de la médula ósea expandida ex vivo mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Las células se tiñeron con el anticuerpo STRO-1 que se reveló posteriormente mediante incubación con IgM de cabra antimurino-isotiocianato de fluoresceína. El ARN celular total se preparó a partir de poblaciones purificadas de células que expresan STRO-1^{dim} o STRO-1^{bright}, después de la clasificación de células activadas por fluorescencia (A). Usando el procedimiento de extracción de RNAzolB, y procedimientos estándar, se aisló el ARN total de cada subpoblación y se usó como plantilla para la síntesis de ADNc. La expresión de diversos transcritos se evaluó mediante amplificación por PCR, usando un protocolo estándar como se describió previamente (Gronthos et al. J Cell Sci. 116:1827-1835, 2003). Los conjuntos de cebadores usados en este estudio se muestran en la tabla 2. Tras la amplificación, cada mezcla de reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (B). La expresión génica relativa para cada marcador celular se evaluó con referencia a la expresión del gen de mantenimiento, GAPDH, usando el software ImageQuant (C).
- Figura 3. Progenie STRO-1^{bright} de STRO-1 + MPC cultivado y expandido expresan altos niveles de SDF-1, la progenie STRO-1^{dim} no. (A) Las preparaciones aisladas de MACS de STRO-1 + BMMNCs se dividieron en diferentes subconjuntos de STRO-1 de acuerdo con las regiones, STRO-1^{bright} y STRO-1^{dim/dull} usando FACS. Se preparó ARN total a partir de cada subpoblación STRO-1 y se usó para construir una biblioteca de hibridación por sustracción de STRO-1^{bright} (B-C). Los filtros de nitrocelulosa replicados, que se han transferido con productos representativos de PCR amplificados a partir de clones bacterianos transformados con ADNc sustraído de STRO-1^{bright}. A continuación, los filtros se probaron con ADNc sustraído de ya sea STRO-1^{bright} (B) o STRO-1^{dim/dull} (C) marcado con [³²P] desoxicitidina trifosfato (dCTP). Las flechas indican la expresión diferencial de 1 clon que contiene un fragmento de ADNc correspondiente a SDF-1 humana. (D) Análisis de la transcriptasa inversa (RT)-PCR que demuestra la expresión relativa de los transcritos de SDF-1 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ARN total preparado a partir de poblaciones de BMMNC STRO-1 aisladas recientemente de MACS/FACS antes del cultivo. pb indica el par de bases.
- Figura 4. Eficiencia comparativa de MSC STRO-1^{negativa} (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) para la inhibición de la proliferación de células T. Las PBMC se estimularon con perlas recubiertas con CD3/CD28 durante 4 días en ausencia o presencia de las preparaciones A o B. La proliferación de células T se midió por incorporación de ³H-Tdr como conteos por minuto (cpm).
- Figura 5. Eficiencia comparativa de MSC STRO-1^{negativa} (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) para la inhibición de la proliferación de células T. Se estimularon PBMC con perlas recubiertas con CD3/CD28 durante 4 días en presencia de diferentes concentraciones de las preparaciones A o B. Se midió la proliferación de células T en los diversos cultivos por incorporación de ³H-Tdr y se informó como porcentaje de la proliferación de células T control en el que PBMC se estimularon en ausencia de MSC.
- Figura 6. Efectos comparativos de MSC STRO-1^{negativa} (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) en GvHD. Células mononucleares de la médula ósea agotadas de células T (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) de donantes B10.D2 (H2d) se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores (750cGy) BALB/c (H2d) irradiados letalmente. Después de 4 semanas, a los ratones receptores se les inyectó 1×10^6 MSC (preparación A1) o MPC (preparación B1) por ratón o no recibieron ningún tratamiento adicional (Control). Ocho ratones por grupo fueron inyectados. Los ratones se evaluaron a intervalos semanales. El tiempo se refiere al número de semanas.
- Figura 7. Efectos comparativos de MSC STRO-1^{negativa} (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) en GvHD. Células mononucleares de la médula ósea agotadas de células T (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) de donantes B10.D2 (H2d) se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores (750cGy) BALB/c (H2d) irradiados letalmente. Después de 4 semanas, a los ratones receptores se les inyectó 1 o 2×10^6 células de las preparaciones A o B (A1 A2, B1, B2) o no recibieron ningún tratamiento adicional (Ctr). Ocho ratones por grupo fueron inyectados.
- Figura 8. Efectos comparativos de dosis altas de MSC STRO-1^{negativa} (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) en GvHD. Las células mononucleares de la médula ósea agotadas de células T (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) de donantes B10.D2 (H2d) se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores (750cGy) BALB/c (H2d) irradiados letalmente. Después de 4 semanas, a los ratones receptores se les inyectaron 2×10^6 células de las preparaciones A o B (A2, B2) o no recibieron ningún tratamiento adicional (Control 2). Ocho ratones por grupo fueron inyectados, pero 4 y 3 ratones murieron poco después de la inyección en los grupos B2 y A2, respectivamente.

Figura 9. Efectos comparativos de dosis bajas de MSC STRO-1 negativa (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) en GvHD. Células mononucleares de la médula ósea agotadas de células T (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) de donantes B10.D2 (H2d) se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores (750cGy) BALB/c (H2d) irradiados letalmente. Después de 4 semanas, a los ratones receptores se les inyectaron 0.3×10^6 células de las preparaciones A o B (A0.3, B0.3) o no recibieron ningún tratamiento adicional (Control 2). Seis ratones por grupo fueron inyectados. El gráfico informa la puntuación de GvHD por cada ratón.

Figura 10. Efectos comparativos de dosis bajas de MSC STRO-1 negativa (preparación A) y MPC STRO-1^{bright} (preparación B) en GvHD. Células mononucleares de la médula ósea agotadas de células T (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) a partir de donantes B10.D2 (H2d) se inyectaron por vía intravenosa en ratones receptores (750cGy) BALB/c (H2d) irradiados letalmente. Después de 4 semanas, a los ratones receptores se les inyectaron 0.3×10^6 células de las preparaciones A o B (A0.3, B0.3) o no recibieron ningún tratamiento adicional (Control 2). Seis ratones por grupo fueron inyectados. El gráfico informa la puntuación promedio de GvHD en cada grupo.

Descripción detallada

Los resultados presentados en este documento muestran que una población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} fue inesperadamente muy superior a una preparación de células madre mesenquimatosas STRO-1 negativas en la mejora de GvHD.

De acuerdo con lo anterior, se divulga en este documento un procedimiento para aliviar el desarrollo de complicaciones de GvHD en un paciente mamífero que comprende administrar al paciente una población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de estas.

Por ejemplo, en este documento se divulga un procedimiento para aliviar el desarrollo de complicaciones de GvHD en un paciente mamífero causado por trasplante de la médula ósea que comprende administrar al paciente (a) precursores de las células de linaje de la médula ósea, y (b) una población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de estas, en el que la población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de estas se administra(n) en una cantidad eficaz para reducir la gravedad de GvHD en el paciente.

Como se usa en este documento, el término "factores solubles" se tomará para significar cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido, glicoproteína, glucopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc. producidos por células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas que son solubles en agua. Tales factores solubles pueden ser intracelulares y/o secretados por una célula. Tales factores solubles pueden ser una mezcla compleja (por ejemplo, sobrenadante) y/o una fracción de los mismos y/o pueden ser un factor purificado. En una realización, los factores solubles están o están contenidos en el sobrenadante. De acuerdo con lo anterior, cualquier realización en este documento dirigida a la administración de uno o más factores solubles se tomará para aplicarse mutatis mutandis a la administración de sobrenadante.

Los procedimientos divulgados en este documento pueden implicar la administración de una población de células enriquecidas en células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas solas, y/o factores solubles derivados de las mismas. Los procedimientos descritos en este documento también pueden implicar la administración de células de la progenie solas, o factores solubles derivados de las células de la progenie.

Los procedimientos divulgados en este documento también pueden implicar la administración de una población mixta de células STRO-1^{bright} y células de la progenie de las mismas, o factores solubles de un cultivo mixto de células STRO-1^{bright} y células de la progenie de las mismas.

Una aplicación preferida de la divulgación es para humanos, sin embargo, se espera que también sea aplicable a animales, y estos pueden incluir animales agrícolas tales como vacas, ovejas, cerdos y similares, animales domésticos tales como perros, gatos, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, hámsteres y conejos o animales que podrían usarse para deportes tales como caballos.

De este modo, las células STRO-1^{bright} y/o las células de su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se pueden usar para acondicionar el sistema inmune del receptor a células de la médula ósea donantes o extrañas administrando al receptor, antes, o al mismo tiempo que el trasplante de las células del donante, células STRO-1^{bright} y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas en una cantidad eficaz para reducir o eliminar una respuesta inmune contra el trasplante por las células T del receptor. Las células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas afectan a las células T del receptor de manera que la respuesta de las células T se reduce o elimina cuando se presenta con tejido donante o extraño.

De este modo, en el contexto del trasplante de la médula ósea (células madre hematopoyéticas), el ataque del huésped por el injerto se puede reducir o eliminar. La médula de donante se puede tratar previamente con las células STRO-1^{bright} receptoras y/o las células de la progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas antes del implante de la médula ósea o las células madre de sangre periférica en el receptor. En una realización preferida, la

- médula del donante se expone primero a células/tejido receptor y luego se trata con células STRO-1^{bright} y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas. Aunque no se limita a esto, se cree que el contacto inicial con el tejido o las células del receptor funciona para activar las células T en la médula. El tratamiento posterior con las células STRO-1^{bright} y/o sus células progenitoras y/o los factores solubles derivados de las mismas
- 5 inhibe o elimina la activación adicional de las células T en la médula, reduciendo o eliminando así un efecto adverso por el tejido donante, esto es, la terapia reduce o elimina la respuesta del injerto contra el huésped.
- En una realización adicional, un receptor de trasplante que padece una enfermedad de injerto contra huésped se puede tratar para reducir o eliminar la gravedad del mismo administrando a dichas células STRO-1^{bright} receptoras y/o células
- 10 de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de estas autólogas o alogénicas para el donante, que las células alogénicas pueden ser células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas autólogas al receptor o tercer parte de células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas, en una cantidad eficaz para reducir o eliminar un rechazo de injerto del huésped. Las células STRO-1^{bright} y/o las células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas inhiben o suprimen las células T activadas en el tejido donante de base de una respuesta inmune contra el receptor, reduciendo así o eliminando una respuesta de injerto contra huésped.
- 15 Las células STRO-1^{bright} del receptor y/o las células de su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se pueden obtener del receptor antes del trasplante y se pueden almacenar y/o expandirse por cultivo para proporcionar una reserva de células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas en cantidades suficientes para tratar un ataque de injerto en curso contra el huésped.
- Se contempla además que solo un único tratamiento con las células STRO-1^{bright} y/o las células de su progenie y/o los
- 20 factores solubles derivados de la misma descritos en este documento puede ser necesario, eliminando la necesidad de terapia con fármacos inmunosupresores crónicos. Alternativamente, se pueden emplear administraciones múltiples de células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.
- La dosificación de las células STRO-1^{bright} y/o células progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las
- 25 mismas varía dentro de amplios límites y, por supuesto, se ajustará a los requisitos individuales en cada caso particular. En general, en el caso de administración parenteral, es habitual administrar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 millones de células por kilogramo de peso corporal del receptor. El número de células utilizadas dependerá del peso y la condición del receptor, el número de o la frecuencia de las administraciones, y otras variables conocidas para los expertos en el arte.
- Las células se pueden suspender en un diluyente apropiado, a una concentración desde aproximadamente 0.01 a
- 30 aproximadamente 5×10^6 células/ml. Una forma del procedimiento implica administrar una dosis baja de células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas. Dicha baja dosis es, por ejemplo, entre 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas, tales como aproximadamente 0.3×10^6 células STRO-1^{bright} y/o progenie de las mismas.
- Los excipientes apropiados para soluciones de inyección son aquellos que son biológica y fisiológicamente compatibles
- 35 con las células y con el receptor, tales como una solución salina reguladora u otros excipientes apropiados. La composición para administración preferiblemente se formula, produce y almacena de acuerdo con procedimientos estándar que cumplen con la esterilidad y estabilidad apropiadas.
- Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente aspectos de la presente divulgación. Sin embargo, no son de ninguna manera una limitación de las enseñanzas o la divulgación tal como se establece en este documento.
- Células STRO-1^{bright} o células de la progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles derivados de las mismas
- 40 Las células STRO-1^{bright} son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos capilares, intestino, pulmón, nódulo linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y son por lo general capaces de diferenciarse en líneas germinales tales como mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo. De este modo, las células STRO-1^{bright} son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células que incluyen, pero no se limitan a,
- 45 tejidos conectivos adiposos, óseos, cartilagosos, elásticos, musculares y fibrosos. La vía específica de compromiso y diferenciación de linaje en la que entran estas células depende de diversas influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos del huésped. Las células STRO-1^{bright} son de este modo preferiblemente células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son ya sea células madre o son células precursoras que con el tiempo se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.
- 50 En una realización preferida, las células STRO-1^{bright} se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que se va a tratar o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o diferente). Los términos "enriquecido", "enriquecimiento" o variaciones de los mismos se usan en este documento para describir una población de células en la que la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de un número
- 55 de tipos de células particulares aumenta cuando se compara con la población no tratada.

En una realización, las células STRO-1^{bright} se enriquecen preferentemente con respecto a células STRO-1^{dim} o STRO-1^{intermedias}.

5 En una realización preferida, las células usadas en la presente divulgación expresan uno o más marcadores individual o colectivamente seleccionados del grupo que consiste en TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, CD45⁺, CD146⁺, 3G5⁺ o cualquier combinación de los mismos.

Por "individualmente" se entiende que la divulgación abarca los marcadores enumerados o grupos de marcadores por separado, y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores no se enumeren por separado en este documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y divisiblemente el uno del otro.

10 Por "colectivamente" se entiende que la divulgación abarca cualquier número o combinación de los marcadores enumerados o grupos de péptidos, y que, a pesar de que tales números o combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no enumerarse específicamente en este documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir tales combinaciones o subcombinaciones por separado y divisiblemente de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

15 Preferiblemente, las células STRO-1^{bright} son adicionalmente una o más de TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺ y/o CD146⁺.

20 Una célula a la que se hace referencia como "positiva" para un marcador dado, puede expresar ya sea un nivel bajo (lo o dim) o alto (bright, bri) de ese marcador dependiendo del grado en que el marcador está presente en la superficie de la célula, donde los términos se relacionan con la intensidad de la fluorescencia u otro marcador usado en el procedimiento de clasificación de las células. La distinción de lo (o dim o dull) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que se está ordenando. Una célula que se conoce como "negativa" para un marcador dado no está necesariamente ausente por completo de esa célula. Estos términos significan que el marcador se expresa a un nivel relativamente muy bajo por esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se detecta de manera detectable o es indetectable por encima de los niveles de referencia.

25 El término "bright", cuando se usa en este documento, se refiere a un marcador en una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca de forma detectable. Sin desear estar limitado por la teoría, se propone que las células "bright" expresen más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bright} producen una señal fluorescente mayor, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC como se determina mediante el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que las células no bright (STRO-1^{dull/dim}). Preferiblemente, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente el 0.1% de las células mononucleares de la médula ósea marcadas de manera más brillante contenidas en la muestra de partida. En otras realizaciones, las células "bright" constituyen al menos aproximadamente 0.1%, al menos aproximadamente 0.5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1.5%, o al menos aproximadamente 2%, de las células mononucleares de la médula ósea marcadas de manera más brillante contenidas en la muestra de partida. En una realización preferida, las células STRO-1^{bright} tienen una magnitud 2 log de la expresión mayor de la expresión superficial STRO-1 con respecto a la "referencia", a saber, las células que son STRO-1⁻. En comparación, las células STRO-1^{dim} y/o STRO-1^{intermedias} tienen una magnitud de menos de 2 log de la expresión mayor de la expresión superficial STRO-1, por lo general aproximadamente 1 log o menos que la "referencia".

40 Como se usa en este documento, el término "TNAP" pretende abarcar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En una realización preferida, la TNAP es BAP. En una realización particularmente preferida, TNAP como se usa en este documento se refiere a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con el número de acceso de depósito PTA-7282.

Además, en una realización preferida, las células STRO-1^{bright} son capaces de dar lugar a CFU-F clonogénica.

50 Se prefiere que una proporción significativa de las células multipotenciales sea capaz de diferenciarse en al menos dos líneas germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que pueden comprometerse las células multipotenciales incluyen células precursoras de huesos; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para células epiteliales de los conductos biliares y hepatocitos; células restringidas neuronales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos, líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina que responden a la glucosa. Otros linajes incluyen, pero no se limitan a, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de los siguientes: células epiteliales pigmentarias de la retina, fibroblastos, células de la piel tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células del músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento,

cartílago, adipocito, fibroblastos, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos.

En otra realización, las células STRO-1^{bright} no son capaces de generar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

5 En una realización, las células se toman del sujeto que se va a tratar, se cultivan in vitro usando técnicas estándar y se usan para obtener el sobrenadante o los factores solubles o células expandidas para administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En una realización alternativa, se usan células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otra realización útil, se usan células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie).

10 La presente divulgación también contempla el uso del sobrenadante o los factores solubles obtenidos o derivados de células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas (estas últimas también se denominan como células expandidas) que se producen a partir de cultivo in vitro. Las células expandidas de la divulgación pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimuladores en el medio de cultivo), el número de pasajes y similares. En ciertas realizaciones, las células de la progenie se obtienen después de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o aproximadamente 10 pasajes de la población parental. Sin embargo, las células de la progenie se pueden obtener después de cualquier cantidad de pasajes de la población parental.

20 Las células de la progenie se pueden obtener cultivando en cualquier medio apropiado. El término "medio", como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios líquidos de crecimiento, así como medios líquidos que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los medios gaseosos de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que están expuestas las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también se refiere al material que está destinado para su uso en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua u otro líquido se vuelve apropiada para que el cultivo celular se pueda denominar un "medio en polvo".

25 En una realización, las células de la progenie útiles para los procedimientos descritos en este documento se obtienen aislando las células multipotenciales TNAP⁺ STRO-1⁺ de la médula ósea usando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y luego cultivo expandiendo las células aisladas (véase Gronthos et al. Blood 85: 929-940, 1995 para un ejemplo de condiciones de cultivo apropiadas).

30 En una realización, tales células expandidas (progenie) (preferiblemente, al menos después de 5 pasajes) pueden ser TNAP⁻, CC9⁺, HLA clase I⁺, HLA clase II⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD3⁻, CD11a^c, CD31⁻, CD86⁻, CD34⁻ y/o CD80⁻. Sin embargo, es posible que, bajo diferentes condiciones de cultivo a las descritas en este documento, la expresión de diferentes marcadores pueda variar. También, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de células gastadas, no significa que hay una proporción menor de las células que no tengan estos fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9⁺). En una realización preferida, las células expandidas todavía tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

35 En una realización, una población de células expandidas usada para obtener el sobrenadante o los factores solubles, o células en sí, comprende células en las que al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 50%, de las células son CC9⁺.

En otra realización, una población de células expandidas usada para obtener el sobrenadante o los factores solubles, o células en sí, comprende células en las que al menos 40%, más preferiblemente al menos 45%, de las células son STRO-1⁺.

40 En una realización adicional, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectivamente o individualmente del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-1^{bright} y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

45 En una realización, las células de la progenie derivadas de células STRO-1^{bright} son positivas para el marcador STRO-1^{dim}. Estas células se denominan células comprometidas específicas para el tejido (TSCC) y están más comprometidas con la diferenciación que las células STRO-1^{bright}, por lo tanto, son menos capaces de responder a factores inductivos. Los ejemplos no limitantes de los linajes con los que TSCC se pueden comprometer incluyen progenitores de hepatocitos, que son pluripotentes para células epiteliales de los conductos biliares y hepatocitos; células restringidas neuronales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos, y precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos, líneas celulares

- beta pancreáticas secretoras de insulina que responden a la glucosa. Otras células precursoras comprometidas incluyen, pero no están limitadas a, condrocitos, osteoblastos, odontoblastos, productores de dentina y condrocitos, y células precursoras de los siguientes: células epiteliales pigmentarias de la retina, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales del conducto renal, células del
- 5 músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblastos, estroma medular, osteoclasto y estroma de soporte hemopoyético, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, vascular, células epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos. Los precursores incluyen aquellos que específicamente pueden conducir al tejido conectivo, en particular incluyendo los tejidos conectivos adiposo, areolar, óseo, cartilaginoso, elástico y fibroso.
- 10 En otra realización, las células de la progenie son progenie de células multipotenciales STRO-1⁺ expandidas multipotenciales (MEMP) como se define y/o describe en el documento WO 2006/032092. Los procedimientos de preparación de poblaciones enriquecidas de células multipotenciales STRO-1⁺ de las que se puede derivar la progenie se describen en los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto in vitro, las células multipotenciales STRO-1⁺ raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y generalmente estarán presentes
- 15 con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC). El documento WO 01/04268 se refiere a cosechar dichas células de la médula ósea a niveles de pureza de aproximadamente 0.1% a 90%. La población que comprende MPC de las que se deriva la progenie se puede cosechar directamente de una fuente de tejido, o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido ex vivo.
- 20 Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población cosechada, no expandida, de células multipotenciales STRO-1⁺ sustancialmente purificadas, que comprende al menos aproximadamente 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95% de las células totales de la población en la que están presentes. Este nivel se puede lograr, por ejemplo, seleccionando células que sean positivas para al menos un marcador seleccionado individual o colectivamente del grupo que consiste en TNAP, STRO-1^{bright}, 3G5⁺, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.
- 25 Las MEMPS se pueden distinguir de las células STRO-1^{bright} recién cosechadas porque son positivas para el marcador STRO-1^{bright} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). Por el contrario, las células STRO-1^{bright} recién aisladas son positivas tanto para STRO-1^{bright} como para ALP. En una realización preferida, al menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{bright}, ALP⁻. En una realización preferida adicional, las MEMPS son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, $\alpha\beta 1$. En aún otra realización preferida, las MEMP no presentan actividad de TERT y/o son negativos para el marcador CD18.
- 30 La población inicial de células STRO-1^{bright} se puede derivar de uno cualquier o más tipos de tejidos incluyendo médula ósea, células de pulpa dental, tejido adiposo y piel, o quizás más ampliamente de tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, nódulo linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.
- 35 Se entenderá que, al realizar la presente divulgación, la separación de las células que portan cualquier marcador de superficie celular dado se puede efectuar mediante una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, los procedimientos preferidos dependen de la unión de un agente de unión (por ejemplo, un fragmento de unión del anticuerpo o antígeno del mismo) al marcador en cuestión seguido de una separación de aquellos que presentan unión, ya sea unión de alto nivel, o unión de bajo nivel o sin unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o
- 40 moléculas basadas en anticuerpos, siendo preferiblemente anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales debido a la especificidad de estos últimos agentes. Los anticuerpos se pueden usar en ambas etapas, sin embargo, también se pueden usar otros agentes, de este modo los ligandos para estos marcadores también se pueden emplear para enriquecer las células que los portan, o que carecen de ellos.
- 45 Los anticuerpos o ligandos se pueden unir a un soporte sólido para permitir una separación en bruto. Las técnicas de separación preferiblemente maximizan la retención de la viabilidad de la fracción que se va a recoger. Se pueden emplear diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente en bruto. La técnica particular empleada dependerá de la eficacia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y la velocidad de rendimiento, y la necesidad de equipos sofisticados y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética, uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de
- 50 afinidad y "adsorción" con anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, pero no se limitan a, FACS. Los procedimientos para realizar FACS serán evidentes para el experto en el arte.
- Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos en este documento están disponibles comercialmente (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra STRO-1 están disponibles comercialmente en R & D Systems, EE. UU.), disponibles en ATCC u otra organización depositaria y/o se pueden producir usando técnicas reconocidas en la técnica.
- 55 Se prefiere que el procedimiento para aislar células STRO-1^{bright}, por ejemplo, comprenda una primera etapa que es una etapa de clasificación en fase sólida que usa, por ejemplo, selección de células activadas magnéticamente (MACS) que reconoce la expresión de alto nivel de STRO-1. A continuación, se puede seguir una segunda etapa de clasificación, si

se desea, para dar como resultado un mayor nivel de expresión de células precursoras. Esta segunda etapa de clasificación podría implicar el uso de dos o más marcadores.

5 El procedimiento para obtener células STRO-1^{bright} también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento usando técnicas conocidas. De este modo, el tejido se eliminará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido de origen se separarán luego en una denominada suspensión de células individuales. Esta separación se puede lograr por medios físicos o enzimáticos.

Una vez que se ha obtenido una población apropiada de células STRO-1^{bright}, se puede cultivar o expandir por cualquier medio apropiado para obtener MEMPs.

10 En una realización, las células se toman del sujeto que se va a tratar, se cultivan in vitro usando técnicas estándar y se usan para obtener el sobrenadante o los factores solubles o células expandidas para administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En una realización alternativa, las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas se usan para obtener el sobrenadante o los factores solubles. En otra realización útil, las células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie) se usan para obtener el sobrenadante o los factores solubles.

15 La divulgación se puede poner en práctica usando células de cualquier especie animal no humana, que incluye, pero no se limita a, células de primate no humano, células de animales ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, roedores, de aves y peces. Las células de primates incluyen, pero no están limitadas a, células de chimpancés, mandriles, monos cynomolgus y cualquier otro mono del nuevo o viejo mundo. Las células de animales ungulados incluyen, pero no están limitadas a, células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedores incluyen, pero no se limitan a, células de ratón, rata, conejillo de Indias, hámster y jerbo. Ejemplos de especies de lagomorfos incluyen conejos domesticados, liebres grandes, liebres, conejos de rabo blanco, conejos raquetas de nieve y conejos de roca. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar.

20 Las células útiles para los procedimientos descritos en este documento se pueden almacenar antes del uso, o antes de obtener el sobrenadante o factores solubles. Los procedimientos y protocolos para preservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamífero, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pollard, J. W. and Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, Second Edition, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, Fourth Edition, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.).

Células genéticamente modificadas

30 En una realización, las células STRO-1^{bright} y/o células de la progenie de las mismas están genéticamente modificadas, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés, por ejemplo, una proteína que proporciona un beneficio terapéutico y/o profiláctico, por ejemplo, insulina, glucagón, somatostatina, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, carboxipeptidasa, lipasa o amilasa pancreática o un polipéptido asociado o causante de una angiogénesis potenciada o un polipéptido asociado con la diferenciación de una célula en una célula pancreática o una célula vascular.

35 Los procedimientos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para el experto en el arte. Por ejemplo, un ácido nucleico que se va a expresar en una célula se une operativamente a un promotor para inducir la expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico está unido a un promotor operable en una variedad de células de un sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor viral, por ejemplo, un promotor CMV (por ejemplo, un promotor CMV-IE) o un promotor SV-40. Se conocen promotores apropiados adicionales en la técnica y se tomarán para aplicar *mutatis mutandis* a la presente realización.

40 Preferiblemente, el ácido nucleico se proporciona en forma de una construcción de expresión. Como se usa en este documento, el término "construcción de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de conferir expresión en un ácido nucleico (por ejemplo, un gen informador y/o un gen indicador contraseleccionable) al que está operativamente unido, en una célula. Dentro del contexto de la presente divulgación, se debe entender que una construcción de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento genómico o subgenómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar el ADN heterólogo en un formato que se puede expresar.

45 Los procedimientos para la construcción de una construcción de expresión apropiada para la realización de la divulgación serán evidentes para el experto en el arte y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al (En: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook et al (En: *Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Third Edition 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes de la construcción de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico plantilla apropiado usando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en una construcción de expresión apropiada, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

55 Los vectores apropiados para dicha construcción de expresión son conocidos en la técnica y/o se describen en este documento. Por ejemplo, un vector de expresión apropiado para el procedimiento de la presente divulgación en una

célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del conjunto de vectores ADNpc suministrado por Invitrogen, un vector del conjunto de vectores pCI (Promega), un vector del conjunto de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector del conjunto de vectores ADNpc (Invitrogen).

5 El experto en el arte conocerá vectores y fuentes adicionales de dichos vectores, tales como, por ejemplo, Invitrogen Corporation, Clontech o Promega.

10 Los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o una construcción génica que los comprende en una célula para expresión son conocidos para los expertos en el arte. La técnica usada para un organismo dado depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en las células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas tal como mediante el uso de lipofectamina (Gibco, MD, EUA) y/o cellfectina (Gibco, MD, EE. UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas tal como mediante el uso de tungsteno recubierto con ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EUA), entre otros.

15 Alternativamente, una construcción de expresión de la divulgación es un vector viral. Los vectores virales apropiados son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Los sistemas basados en virus convencionales para la administración de un ácido nucleico y la integración de ese ácido nucleico en el genoma de una célula huésped incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector viral adenoasociado. Alternativamente, un vector adenovirico es útil para introducir un ácido nucleico que permanece episomal en una célula huésped. Los vectores virales tienen un procedimiento eficiente y versátil de transferencia de genes en células y tejidos diana. Además, se han observado eficiencias de transducción elevadas en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

20 Por ejemplo, un vector retroviral generalmente comprende repeticiones terminales largas (LTR) que actúan en cis con capacidad de empaquetamiento para hasta 6-10 kb de secuencia foránea. Los mínimos LTR que actúan en cis son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de un vector, que luego se usa para integrar la construcción de expresión en la célula diana para proporcionar una expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales ampliamente usados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de leucemia del mono gibbon (GaLV), virus de inmunodeficiencia en simios (SrV), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J Virol.* 56:2731-2739 (1992); Johann et al., *J. virol.* 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virology* 76:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:274-2318 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller and Rosman *BioTechniques* 7:980-990, 1989; Miller, A. D. *Human Gene Therapy* 7:5-14, 1990; Scarpa et al *Virology* 75:849-852, 1991; Burns et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:8033-8037, 1993).

30 Se han desarrollado también diversos sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV) para la administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,173,414 y 5,139,941; las Publicaciones Internacionales Nos. WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski et al. *Molec. Cell. Biol.* 5:3988-3996, 1988; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5:533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; y Zhou et al. *JExp. Med.* 179:1867-1875, 1994.

40 Los vectores virales adicionales útiles para administrar una construcción de expresión de la divulgación incluyen, por ejemplo, los derivados de la familia de virus de la viruela, tales como el virus vaccinia y el poxvirus aviar o un alfavirus o un vector del virus conjugado (por ejemplo, el descrito en Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 56:317-321, 1989).

Ensayo de potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles

Los procedimientos para determinar la capacidad de los factores solubles derivados de las células STRO-1^{bright} para tratar o prevenir o retrasar el inicio o la progresión de GvHD serán evidentes para el experto en el arte.

45 Por ejemplo, los ensayos in vitro apropiados para determinar la actividad inmunosupresora de los factores solubles se describen en el ejemplo 5 de este documento.

En otro ejemplo, la eficacia de los factores solubles se puede evaluar en un modelo in vivo de GvHD como se describe en los ejemplos 6 y 7 en este documento.

50 Será evidente para los expertos en el arte a partir de lo anterior que la presente divulgación también proporciona un procedimiento para identificar o aislar un factor soluble para el tratamiento, prevención o retraso de GvHD, comprendiendo el procedimiento:

(i) administrar un factor soluble a un sujeto de prueba que padece GvHD y evaluar la progresión de GvHD en el sujeto;

(ii) comparar el nivel de GvHD en el sujeto en (i) con el nivel GvHD en un sujeto de control que padece GvHD al que no se ha administrado el factor soluble, en el que la GvHD reducida en el sujeto de prueba en comparación con el sujeto de control indica que el factor soluble trata, previene o retrasa GvHD.

Composiciones celulares

5 En una realización, las células STRO-1^{bright} y/o las células de su progenie se administran en forma de una composición. Preferiblemente, dicha composición comprende un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Los términos "portador" y "excipiente" se refieren a composiciones en cuestión que se usan convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, la administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mac Publishing Company (1980). Un portador también puede reducir cualquier efecto secundario indeseable del compuesto activo. Un portador apropiado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el portador. En un ejemplo, el transportador no produce un efecto adverso significativo local o sistémico en los receptores a las dosis y concentraciones empleadas para el tratamiento.

15 Los portadores apropiados para esta divulgación incluyen los usados convencionalmente, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, solución de Ringer, una solución reguladora, hialuronano y glicoles son vehículos líquidos preferidos, particularmente (cuando son isotónicos) para soluciones. Los portadores y excipientes farmacéuticos apropiados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares.

20 En otro ejemplo, un portador es una composición de medios, por ejemplo, en la que se cultiva o suspende una célula. Preferiblemente, dicha composición de medios no induce ningún efecto adverso en un sujeto al que se administra.

Los portadores y excipientes preferidos no afectan adversamente la viabilidad de una célula y/o la capacidad de una célula para reducir, prevenir o retrasar la disfunción pancreática.

25 En un ejemplo, el portador o excipiente proporciona una actividad reguladora para mantener las células y/o los factores solubles a un pH apropiado para ejercer así una actividad biológica, por ejemplo, el portador o excipiente es solución salina reguladora con fosfato (PBS). PBS representa un portador o excipiente atractivo porque interacciona mínimamente con células y factores y permite la liberación rápida de las células y factores, en dicho caso, la composición de la divulgación se puede producir como un líquido para la aplicación directa a la corriente sanguínea o en un tejido o una región que rodea o adyacente a un tejido, por ejemplo, mediante inyección.

30 Las células STRO-1^{bright} y/o las células de su progenie también se pueden incorporar o incrustar dentro de armazones que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son perjudiciales para el receptor. Estos armazones proporcionan soporte y protección a las células que se van a trasplantar a los sujetos receptores. Los armazones biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de tales armazones.

35 Una variedad de diferentes armazones se puede usar con éxito en la práctica de la divulgación. Los armazones preferidos incluyen, pero no se limitan a armazones biológicos y degradables. Los armazones biodegradables naturales incluyen armazones de colágeno, fibronectina y laminina. El material sintético apropiado para un armazón de trasplante celular debería ser capaz de soportar un crecimiento celular y un funcionamiento celular extensos. Tales armazones también pueden ser reabsorbibles. Los armazones apropiados incluyen armazones de ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe por Vacanti, et al. J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhidridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

En otro ejemplo, las células se pueden administrar en un armazón de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).

45 Las composiciones celulares útiles para la presente divulgación se pueden administrar solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre, o células de la médula ósea. Las células de diferentes tipos se pueden mezclar con una composición de la divulgación inmediatamente o poco antes de la administración, o se pueden cocultivar juntas durante un período de tiempo antes de la administración.

50 Preferiblemente, la composición comprende una cantidad eficaz o una cantidad de células terapéutica o profiláctica eficaz. Por ejemplo, la composición comprende aproximadamente 1×10^5 células STRO-1^{bright}/kg a aproximadamente 1×10^7 células STRO-1^{bright}/kg o aproximadamente 1×10^6 células de brillo STRO-1/kg a aproximadamente 5×10^6 células STRO-1^{bright}/kg. La cantidad exacta de células que se va a administrar depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y el alcance y la gravedad de la disfunción pancreática.

5 En algunas realizaciones, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación de un sujeto, sin embargo, eso permite que los factores secretados por las células entren en la circulación. De esta manera, los factores solubles se pueden administrar a un sujeto permitiendo que las células secreten los factores en la circulación del sujeto. Dicha cámara puede implantarse igualmente en un sitio en un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, por ejemplo, implantados en o cerca de un órgano trasplantado.

En algunas realizaciones, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes del inicio de la terapia con composiciones celulares. De acuerdo con lo anterior, el trasplante con células STRO-1^{bright} alogénicas, o incluso células STRO-1^{bright} xenogénicas, o su progenie puede ser tolerado en algunos casos.

10 Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o se puede lograr administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden estar encapsuladas en una cápsula que es permeable a los nutrientes y el oxígeno requerido por la célula y los factores terapéuticos, la célula aún es impermeable a los factores y células inmunes humorales. Preferiblemente, el encapsulante es hipoalergénico, está situado de manera fácil y estable en un tejido diana, y proporciona una protección añadida a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células se pueden modificar genéticamente para reducir su inmunogenicidad.

Composiciones de factores solubles

20 En una realización, el sobrenadante o los factores solubles derivados de las células STRO-1^{bright} y/o derivados de las células de la progenie se administran en forma de una composición, por ejemplo, que comprende un portador y/o excipiente apropiado. Preferiblemente, el portador o excipiente no afecta adversamente al efecto biológico de los factores solubles o el sobrenadante.

25 En una realización, la composición comprende una composición en cuestión para estabilizar un factor soluble o un componente del sobrenadante, por ejemplo, un inhibidor de proteasa. Preferiblemente, el inhibidor de proteasa no se incluye en una cantidad suficiente para tener un efecto adverso sobre un sujeto.

30 Las composiciones que comprenden sobrenadantes o factores solubles derivados de células STRO-1^{bright} y/o derivados de células progenie se pueden preparar como suspensiones líquidas apropiadas, por ejemplo, en medio de cultivo o en un portador estable o una solución reguladora, por ejemplo, solución salina reguladora con fosfato. Los portadores apropiados se describen en este documento anteriormente. En otro ejemplo, las suspensiones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1^{bright} y/o células derivadas de la progenie son suspensiones oleosas para inyección. Los solventes o vehículos lipófilos apropiados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se utilizarán para inyección también pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes apropiados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el sobrenadante o los factores solubles en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes descritos anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

40 En general, las dispersiones se preparan incorporando el sobrenadante o los factores solubles en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo. De acuerdo con un aspecto alternativo de la divulgación, el sobrenadante o los factores solubles se pueden formular con uno o más compuestos adicionales que mejoran su solubilidad.

50 Se describen otros portadores o excipientes de ejemplo, por ejemplo, en Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.

55 Las composiciones terapéuticas por lo general deberían ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez

apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede 5 conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los factores solubles se pueden administrar en una formulación de liberación temporal, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y 10 biocompatibles, tal como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y poliláctico, copolímeros poliglicólicos (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general para los expertos en el arte.

El sobrenadante o los factores solubles se pueden administrar en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar una liberación lenta de los factores solubles.

15 Modos de administración

El sobrenadante o los factores solubles derivados de células STRO-1^{bright}, las células STRO-1^{bright} o su progenie se pueden implantar quirúrgicamente, inyectar, administrar (por ejemplo, por medio de un catéter o jeringa) o de otra manera administrar directa o indirectamente en el sitio que necesita reparación o aumento, por ejemplo, un órgano o en el sistema sanguíneo de un sujeto.

20 Preferiblemente, el sobrenadante o los factores solubles derivados de células STRO-1^{bright}, las células STRO-1^{bright} o su progenie se administran a la corriente sanguínea de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1^{bright}, las células STRO-1^{bright} o su progenie se administran por vía parenteral. Las rutas de ejemplo de administración parenteral incluyen, pero no están limitadas a, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal. Preferiblemente, el sobrenadante o 25 factores solubles derivados de células STRO-1^{bright}, células STRO-1^{bright} o su progenie se administran intraarterialmente, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo conectado a un páncreas, por ejemplo, una aorta abdominal, una arteria mesentérica superior, una arteria pancreaticoduodenal o una arteria esplénica.

En el caso de la administración de células a una aurícula o ventrículo del corazón, se prefiere que las células se administren a la aurícula o ventrículo izquierdo para evitar las complicaciones que pueden surgir de la entrega rápida de 30 células a los pulmones.

Preferiblemente, el sobrenadante o los factores solubles derivados de las células STRO-1^{bright}, las células STRO-1^{bright} o su progenie se inyectan en el sitio de administración, por ejemplo, usando una jeringa o a través de un catéter o una línea central.

35 La selección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de varios factores, que incluyen la tasa de renovación de suero o tejido de la entidad, el nivel de síntomas y la inmunogenicidad de la entidad. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de compuesto terapéutico entregado al paciente consistente con un nivel aceptable de efectos secundarios. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de formulación administrada depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se trata.

40 En una realización, los factores solubles o sobrenadantes derivados de células STRO-1^{bright}, las células STRO-1^{bright} o su progenie se administran como una única dosis de bolo. Alternativamente, los factores solubles o sobrenadantes derivados de células STRO-1^{bright}, células STRO-1^{bright} o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita los efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y la actividad del compuesto que se usa. La determinación de la 45 dosis apropiada se realiza por un médico, por ejemplo, usando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica para afectar el tratamiento o se prevé que afecten al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se incrementa en pequeños incrementos a partir de entonces hasta que se alcanza el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas diagnósticas importantes incluyen las de los síntomas de la diabetes.

50 Los ejemplos que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas se dan solo con fines comparativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de MSC

Las MSC se generan de novo a partir de la médula ósea como se describe en el documento US 5,837,539. Aproximadamente 80-100 ml de médula se aspiraron en jeringas que contenían heparina estéril y se llevaron al

Laboratorio de Terapia Celular MDACC para la generación de MSC. Las células mononucleares de la médula ósea se aislaron usando ficoll-hypaque y se colocaron en dos matraces T175 con 50 ml por matraz de medio de expansión MSC que incluye MEM alfa modificado (α MEM) que contiene gentamicina, glutamina (2 mM) y suero fetal bovino (FBS) al 20% (v/v) (Hyclone).

5 Las células se cultivaron durante 2-3 días en 37°C, 5% de CO₂ en cuyo momento se eliminaron las células no adherentes; las células adherentes restantes se cultivaron continuamente hasta que la confluencia celular alcanzó 70% o más (7-10 días), y luego las células se tripsinizaron y se reemplazaron en seis matraces T175 con medio de expansión MSC (50 ml de medio por matraz). Como se describe en la tabla 5 del documento US 5,837,539, las MSC aisladas y expandidas de esta manera son STRO-1 negativas.

10 Ejemplo 2: inmunoselección de MPC mediante selección de células STRO-3⁺

La médula ósea (BM) es recolectada de voluntarios adultos sanos y normales (20-35 años), de acuerdo con los procedimientos aprobados por the Institutional Ethics Committee of the Royal Adelaide Hospital. En resumen, se aspiran 40 ml de BM de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de heparina de litio.

15 Se preparan BMMNC por separación en gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) como se describió previamente (Zannettino, A.C. et al. (1998) Blood 92: 2613-2628). Después de la centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, la capa leucocitaria se retira con una pipeta de transferencia y se lavó tres veces en "HHF", compuesto de solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene suero de ternera fetal al 5% (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

20 Las células STRO-3⁺ (o TNAP⁺) posteriormente se aislaron mediante clasificación magnética de células activadas como se describe previamente (Gronthos et al. (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. and Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940). En resumen, se incuban aproximadamente 1-3 x 10⁸ BMMNC en solución reguladora de bloqueo, que consiste en suero de conejo normal al 10% (v/v) en HHF durante 20 minutos en hielo. Las células se incuban con 200 μ l de una solución de 10 μ g/ml de STRO-3 mAb en solución reguladora de bloqueo durante 1 hora en hielo. Las células se lavan posteriormente dos veces en HHF mediante centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución 1/50 de γ -biotina anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en solución reguladora HHF y las células se incuban durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron dos veces en solución reguladora MACS (PBS libre de Ca²⁺ - y Mn²⁺ suplementado con BSA al 1%, EDTA 5 mM y azida sódica al 0.01%) como anteriormente y se resuspendió en un volumen final de 0.9 ml de solución reguladora MACS.

30 Se añaden a la suspensión celular cien μ l de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) y se incuban en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lavó dos veces y se resuspendió en 0.5 ml de solución reguladora MACS y posteriormente se cargó en una columna de mini MACS (Columns MS, Miltenyi Biotec), y se lavó tres veces con 0.5 ml de solución reguladora MACS para recuperar las células que no se unen a la STRO-3 mAb (depositado el 19 de diciembre de 2005 con American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-7282 - véase la Publicación Internacional No. WO 2006/108229). Después de la adición de 1 ml más de solución reguladora MACS, la columna se retira del imán y las células TNAP⁺ se aíslan por presión positiva. Se puede teñir una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y se puede determinar la pureza mediante citometría de flujo.

Ejemplo 3: Las células seleccionadas por el STRO-3 mAb son células STRO-1^{bright}

40 Los experimentos se diseñaron para confirmar el potencial de usar STRO-3 mAb como un único reactivo para aislar las células STRO-1^{bright}.

45 Dado que STRO-3 (IgG1) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), la capacidad de STRO-3 para identificar CFU-F clonogénica se evaluó mediante un análisis FACS de doble color basado en su coexpresión con células STRO-1⁺ aisladas usando el procedimiento MACS (Figura 1). El histograma del gráfico de puntos representa 5 x 10⁴ eventos recopilados como datos del modo lista. Las líneas verticales y horizontales se ajustaron a los niveles de reactividad de <1.0% de fluorescencia media obtenida con los anticuerpos de control no coincidentes, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1^{bright} coexpresó TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células STRO-1⁺ restantes no pudieron reaccionar con el STRO-3 mAb. Las células aisladas por FACS de los cuatro cuadrantes se analizaron posteriormente para determinar la incidencia de CFU-F (Tabla 1).

50 Tabla 1: Enriquecimiento de células de la médula ósea humana mediante análisis de FACS de doble color basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (consultar la figura 1). Las células clasificadas FACS se cultivaron en condiciones clonogénicas estándar en MEM alfa suplementado con FCS al 20%. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias del día 14 (CFU-F) por 10⁵ células recubiertas con \pm SE (n = 3 aspirados de la médula ósea diferentes). Estos datos sugieren que las MPC humanas están restringidas exclusivamente a la fracción positiva de TNAP de BM que coexpresa el antígeno STRO-1 de manera más brillante.

Fracción de la médula ósea	Frecuencia de CFU-F/10 ⁵ células	Enriquecimiento (aumento de pliegue)
BMMNC no fraccionada	11.0 ± 2.2	1.0
TNAP+/STRO-1 ^{bright}	4,511 ± 185	410
TNAP+/STRO-1 ^{dull}	0.0	0.0

Ejemplo 4: expresión relativa de proteína de superficie y gen de células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright}

- 5 En la primera serie de experimentos, se empleó un análisis semicuantitativo de RT-PCR para examinar el perfil de expresión génica de diversos genes asociados al linaje expresados por poblaciones de STRO-1^{dull} o STRO-1^{bright}, aisladas por clasificación de células activadas por fluorescencia (Figura 2A). En la segunda serie de experimentos, se empleó citometría de flujo y análisis de fluorescencia de canal medio para examinar el perfil de expresión de proteína de superficie de diversas proteínas asociadas a linaje expresadas por poblaciones de STRO-1^{dull} o STRO-1^{bright}, aisladas por clasificación de células activadas por fluorescencia.
- 10 Se preparó ARN celular total a partir de ya sea 2 x 10⁶ células primarias seleccionadas STRO-1^{dull} o STRO-1^{bright}, pellas de condrocitos y otros cultivos inducidos y se lisaron usando el procedimiento de extracción RNAzolB (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX), según las recomendaciones del fabricante. El ARN aislado de cada subpoblación se usó luego como plantilla para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). La expresión de diversos transcritos se evaluó mediante amplificación por PCR, usando un protocolo estándar como se describió previamente (Gronthos et al., J. Hueso and Min. Res. 14:48-57, 1999). Los conjuntos de cebadores usados en este estudio se muestran en la tabla 2. Después de la amplificación, cada mezcla de reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. La integridad del ARN se evaluó mediante la expresión de GAPDH.
- 15 La expresión génica relativa para cada marcador celular se evaluó con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, usando el software ImageQant (Figura 2B, C). Además, se usó el análisis de citometría de flujo de doble color para examinar el perfil de expresión de proteína de MPC expandidas ex vivo basándose en su expresión de una gama más amplia de marcadores asociados a linaje celular en combinación con el anticuerpo STRO-1. En la Tabla 3 se presenta un resumen del fenotipo general basado en la expresión del gen y la proteína de células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright} cultivadas. Los datos indican que MPC STRO-1^{bright} expandidas ex vivo presentan una expresión diferencialmente más alta de marcadores asociados con células perivasculares, incluyendo angiopoyetina-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1_β, TNF_α, y RANKL. Las comparaciones entre la proteína y los perfiles de expresión génica de las células cultivadas STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright} se resumen en las tablas 3 y 4.
- 20 También se realizaron estudios de hibridación sustractiva con el fin de identificar genes expresados de manera única por las células STRO-1^{bright}. En resumen, se aislaron STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright} como se describió anteriormente (véase la figura 3A). El ARN total se preparó a partir de células STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright} reunidas a partir de 5 muestras diferentes de médula usando el sistema ARN STAT-60 (TEL-TEST). La síntesis de la primera cadena se realizó usando el kit de síntesis SMART ADNc (Clontech Laboratories). El ARNm resultante/híbrido de ADNc monocatenario se amplificó por PCR a larga distancia (kit de PCR Advantage 2; Clontech) usando sitios de cebador específicos en los extremos primarios 3' y 5' formados durante el procedimiento de RT inicial de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Después de la digestión con RsaI del ADNc de STRO-1^{bright}, se usaron 2 alícuotas para ligar diferentes oligonucleótidos adaptadores específicos usando el kit de Sustracción de ADNc de PCR-Select de Clontech. Se realizaron dos rondas de hibridación sustractiva usando ADNc de STRO-1^{bright} (probador) y STRO-1^{dull} (conductor), y viceversa, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Este procedimiento también se realizó a la inversa usando ADNc probador STRO-1^{dull} híbrido contra ADNc conductor STRO-1^{bright}.
- 25 Para identificar genes expresados de manera única por la población STRO-1^{bright}, se usó ADNc sustraído de STRO-1^{bright} para construir filtros de micromatriz de baja densidad replicados que comprendían 200 clones bacterianos seleccionados al azar transformados con los ADNc restados de STRO-1^{bright} ligados en un vector de clonación T/A. Las micromatrices se sondearon posteriormente con ya sea ADNc sustraído STRO-1^{bright} o con STRO-1^{dull} marcado con [³²P] dCTP (Figura 3B-C). El cribado diferencial identificó un total de 44 clones, que se expresaron muy diferencialmente entre las subpoblaciones STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright}. La secuenciación de ADN de todos los clones expresados diferencialmente reveló que solo 1 clon era representativo de un mitógeno de células estromales conocido; concretamente, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Gronthos and Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995). Curiosamente, se encontró que 6 de los 44 clones contenían insertos de ADN correspondientes a la quimioquina, factor 1 derivado del estroma (SDF-1). La gran abundancia de transcritos de SDF-1 en células STRO-1^{bright} humanas se

confirmó mediante RT-PCR semicuantitativa de RNA total preparado a partir de subpoblaciones STRO-1^{bright} recién clasificadas, STRO-1^{dull} y STRO-1^{negativa} de la médula ósea (Figura 3D y Tabla 3).

Tabla 2. cebadores de RT-PCR y condiciones para la amplificación específica de ARNm humana

Gen diana	Secuencias cebadoras (5'-3') sentido/antisentido	Tamaño del producto
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG/ CATGGAGAAGGCTGGGGCTC	417
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC/ GCTGGACTCCTACTGTAAGGG	364
IL-1 β	AGGAAGATGCTGGTTCCTCTC/ CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC	151
FLT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT/ GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG	380
TNF- α	TCAGATCATCTTCTCGAACC/ CAGATAGATGGGCTCATACC	361
KDR	TATAGATGGTGTAAACCCGGA/ TTTGTCACTGAGACAGCTTGG	450
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG/ TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG	538
Leptina	ATGCATTGGGAACCCTGTGC/ GCACCCAGGGCTGAGGTCCA	492
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA/ TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG	632
PPAR γ 2	AACTGCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC/ AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC	341
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC/ CGTAGAAGCGCCGATAGGC	289
MyoD	AAGCGCCATCTTTGAGGTA/ GCGAGAAACGTGAACCTAGC	270
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC/ TATAGCTCATTGCAGCCTCG	150
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT/ TCATCGCTCAGGAGGTCCTT	370

Nestina	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA/ CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT	460
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT/ CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC	598
Colágeno tipo X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA/ TTTTCCCACTCCAGGAGGGC	387
Aggrecan	CACTGTTACCGCCACTTCCC/ ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG	184

Tabla 3. Resumen de la expresión génica relativa en poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull}. Se presenta una lista de genes que muestran expresión medible y diferencial entre las poblaciones STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull}, según lo determinado por la PCR de transcripción inversa. Los valores representan la expresión génica relativa con referencia al gen de mantenimiento de la casa, GAPDH.

5

Tejido	Marcador	Expresión génica relativa a GAPDH	
		STRO-1 ^{Bright}	STRO-1 ^{Dull}
Neuronas	GFAP (Proteína ácida fibrilar glial)	0.1	0.7
Hueso	OCN (Osteocalcina)	1.1	2.5
	OSX (Osterix)	0.4	1.3
	CBFA-1 (Factor de unión a la proteína-1 del núcleo)	0.3	0.6
Inmunoregulador	RANKL (Activador del receptor del factor nuclear κ B)	1.6	0.3
	SDF-1-alfa (factor-1-alfa derivado del estroma)	3.2	0.1
Grasa	Leptina	3.1	4.2
Cardiomiocitos	GATA-4	1.1	2.9
Células endoteliales	Ang-1 (Angiopoyetina-1)	1.5	0.8
Condrocitos	Sox 9	0.3	1.1
	COL X (Colágeno X)	3.5	2.8
Citoquinas proinflamatorias	TNF-alfa (Necrosis tumoral alfa)	1.7	0.9

10

15

Para correlacionar la expresión de la superficie de la proteína con la densidad de expresión de STRO-1, se prepararon suspensiones de células individuales de MPC de la médula ósea derivadas de células expandidas ex vivo por separación de tripsina/EDTA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo STRO-1 en combinación con anticuerpos que identifican una amplia gama de marcadores asociados al linaje celular. Se identificó STRO-1 usando un isotiocianato de fluoresceína - IgM de cabra anti-murino, mientras que todos los demás marcadores se identificaron usando ya sea ficoeritrina - IgG-de cabra anti-ratón o anti-conejo. Para aquellos anticuerpos que identifican antígenos intracelulares, las preparaciones celulares se marcaron primero con el anticuerpo STRO-1, se fijaron con etanol al 70% frío para permeabilizar la membrana celular y luego se incubaron con anticuerpos específicos del antígeno intracelular. Los anticuerpos de control emparejados con isotipo se usaron en condiciones idénticas. El análisis de citometría de flujo de doble color se realizó usando un citómetro de flujo COULTER EPICS y se recogieron los datos de modo de lista. Los

gráficos de transferencia representan 5,000 eventos de modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador de célula de linaje (eje y) y STRO-1 (eje x). Los cuadrantes verticales y horizontales se establecieron con referencia a los anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente.

5 Tabla 4. Resumen de la expresión de proteína relativa en poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull}. Se presenta una lista de proteínas que muestran expresión diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull} según lo determinado por citometría de flujo. Los valores representan la intensidad de fluorescencia media relativa de la tinción.

Tejido	Marcador	Intensidad media de fluorescencia	
		STRO-1 ^{Bright}	STRO-1 ^{Dull}
Neuronas	Neurofilamento	1.7	20.5
Hueso	ALK PHOS (fosfatasa alcalina)	5.7	44.5
Inmunoregulador	RANKL (Activador del receptor del factor nuclear κ B)	658.5	31.0
Células epiteliales	CytoKeratin 10+13	1.2	23.3
	Cytokeratin 14	1.8	8.8
Músculo liso	α -SMA (Actina del músculo liso alfa)	318.0	286.0
Condrocitos	Biglycan	84.4	65.9
Fibroblasto Basal	Tenascina C	22.2	6.9
Cardiomiocito	Troponina C	2.5	15.0

10 Estos resultados muestran que SDF-1 α y RANKL son altamente expresados por células STRO-1^{bright}. Esto es importante porque se sabe que ambas proteínas están implicadas en la regulación positiva de las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ que confieren protección contra trastornos inmunes tales como GVHD (Loser et al., Nature Medicine 12:1372-1379, 2006; Hess, Biol. Blood Marrow Transplant, 12 (1 Suppl 2):13-21, 2006; y Meiron et al., J. Exp. Medicine 205:2643-2655, 2008).

Ejemplo 5. Actividad inmunosupresora in vitro

15 Para evaluar la actividad inmunosupresora de células STRO-1^{bright} expandidas en cultivo (MPC (B)), se usó estimulación con CD3/CD28 como lectura. Los resultados se compararon con una población de células de STRO-1 negativas derivadas de la médula ósea, expandidas en cultivo, aisladas como en el ejemplo 1 (MSC (A)). Se estimularon células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con perlas recubiertas con CD3/CD28 en presencia de 4 concentraciones crecientes de preparaciones de MSC y MPC. La proliferación de células T se midió mediante la incorporación de 3H-Tdr.

20 Se analizaron las MSC (A) y MPC STRO-1^{bright} (B) para determinar su capacidad para suprimir la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a la estimulación con CD3/CD28. Se añadieron MSC y MPC o MSC humano de control adquirido comercialmente (Lonza) en diferentes proporciones a los cultivos de PBMC. Después de 3 días, se añadió 3H-Tdr durante 18 horas y luego se recogieron los cultivos.

25 La proliferación de PBMC en respuesta a CD3/CD28 se inhibió de una manera dependiente de la dosis por todas las preparaciones. Sin embargo, la preparación B fue claramente superior al efecto producido por la preparación A así como también al control hMSC (Figura 4). En una proporción MSC: PBMC 1: 100, MPC B inhibía todavía el 70% de la proliferación de células T de control, mientras que el control adquirido comercialmente MSC (Lonza) y MSC A producían una inhibición del 50% y 60%, respectivamente (Figura 5).

Ejemplo 6: Inducción y tratamiento de GvHD

30 Se investigó la actividad inmunosupresora in vivo de células STRO-1^{bright} (MPC (B)) usando un modelo de enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) basado en un par de receptores donantes no apareados para múltiples loci de histocompatibilidad menores. Se inyectaron células mononucleares de la médula ósea agotadas de células (BMMC) (5×10^6) y esplenocitos (30×10^6) de donantes B10.D2 (H2d) por vía intravenosa en ratones receptores BALB/c (H2d)

- irradiados letalmente (750cGy). En esta situación, los linfocitos esplénicos de B10.D2 reconocen y atacan a los tejidos receptores BALB/c y producen pérdida de peso, fibrosis y pérdida de cabello. La enfermedad se controló usando el sistema de puntuación convencional pesando los animales y evaluando las manifestaciones de la piel desde la semana 4-5 después del trasplante. Como comparación, se evaluó la actividad inmunosupresora de células STRO-1 negativas derivadas de la médula ósea aisladas como en el ejemplo 1 (MSC (A)).
- 5
- Mientras que un grupo de control positivo de ratones no recibió ningún tratamiento adicional, los grupos experimentales se inyectaron por vía intravenosa con MSC (A) o MPC STRO-1^{bright} (B) en una dosis de 2×10^6 , 1×10^6 o 0.3×10^6 /ratón desde la semana 4 cada semana por 3 veces. Los ratones fueron controlados dos veces por semana. Cada grupo contenía ocho ratones.
- 10 Ejemplo 7: Efectos de MSCs y MPCs en el desarrollo de GvHD
- Los ratones recibieron 1 o 2×10^6 MSC A (A1 y A2), 1 o 2×10^6 MPC B (B1 y B2). La cinética de la enfermedad en ausencia o presencia de tratamiento MSC se informa en la figura 6. Tras la infusión de 1×10^6 células, hubo una clara diferencia entre los efectos de B y A. Mientras que los ratones que recibieron la preparación A no presentaron ninguna diferencia sustancial de los que no recibieron células, el grupo al que se inyectó la preparación B mostró un dramático efecto beneficioso sobre la gravedad de la enfermedad. Trece semanas después del trasplante, los ratones que habían recibido B1 tenían una puntuación promedio de GvHD de 0.5 en comparación con 2.3 en los otros grupos.
- 15
- Luego se investigó si el efecto anti-GvHD era dependiente de la dosis. Por lo tanto, a un grupo de ratones se les inyectó una dosis más alta (2×10^6 por ratón) y una con una dosis más baja (0.3×10^6 por ratón) de A o B de acuerdo con las mismas modalidades descritas para la dosis anterior. La figura 7 informa los efectos de la dosis más alta. El efecto terapéutico de altas dosis de MPC (B2) fue superior en relación con A2, sin GvHD visto en absoluto durante las primeras 11 semanas en este grupo. A las 14 y 15 semanas, las consecuencias de GvHD por ratón fueron incluso más dramáticas (Figura 8) sin ningún ratón sobreviviendo en el grupo A1.
- 20
- Finalmente, la inyección de una dosis inferior (0.3×10^6 por ratón) demostró nuevamente que, a las 9 semanas, las MPC STRO-1^{bright} (B) tenían un efecto superior sobre la reducción de la puntuación de GVHD que A (Figuras 9 y 10).
- 25
- Los datos de este estudio piloto han demostrado consistentemente que las MPC STRO-1^{bright} presentaban capacidades inmunosupresoras superiores en comparación con ya sea ningún tratamiento o tratamiento con MSC STRO-1 negativas. Esto fue evidente en el ensayo in vitro y, lo más importante, en el ensayo in vivo. Las MPC STRO-1^{bright} produjeron un efecto clínico dramático en la prevención de GvHD administradas en intervalos de dosis de $0.3-2 \times 10^6$ células por ratón.

REIVINDICACIONES

1. Una población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} para su uso en un procedimiento para tratar complicaciones de enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) en un paciente mamífero, cuyo procedimiento comprende la administración de la población de células al paciente mamífero.
- 5 2. La población de células para su uso según la reivindicación 1, en la que el procedimiento comprende además la administración de precursores de las células de linaje de la médula ósea.
3. La población de células para su uso según la reivindicación 2, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra al paciente mamífero antes de la administración de los precursores de las células del linaje de la médula ósea.
- 10 4. La población de células para su uso según la reivindicación 2, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se coadministra con los precursores de las células del linaje de la médula ósea.
5. La población de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que los precursores de las células de linaje de la médula ósea son células alogénicas administradas al paciente mamífero para tratar una enfermedad maligna o genética de la sangre.
- 15 6. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} es alogénica.
7. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa.
- 20 8. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que se administra una dosis de entre 0.1×10^6 a 5×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}.
9. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que se administra una dosis de entre 0.3×10^6 a 2×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}.
- 25 10. La población de células para su uso según la reivindicación 1, en la que se administra una dosis baja de células que expresan STRO-1^{bright} que comprenden entre 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}.
11. La población de células para su uso según la reivindicación 10, en la que se administra una dosis baja de células que expresan STRO-1^{bright} que comprende aproximadamente 0.3×10^6 células que expresan STRO-1^{bright}.
12. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra una vez a la semana o con menos frecuencia.
- 30 13. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que el paciente mamífero padece de anemia aplásica, mielofibrosis o falla de la médula ósea después de la quimioterapia y la radioterapia.
14. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se administra en combinación con un fármaco inmunosupresor.
- 35 15. La población de células para su uso según cualquier reivindicación precedente, en la que la población de células enriquecidas en células que expresan STRO-1^{bright} se expande en el cultivo antes de la administración.

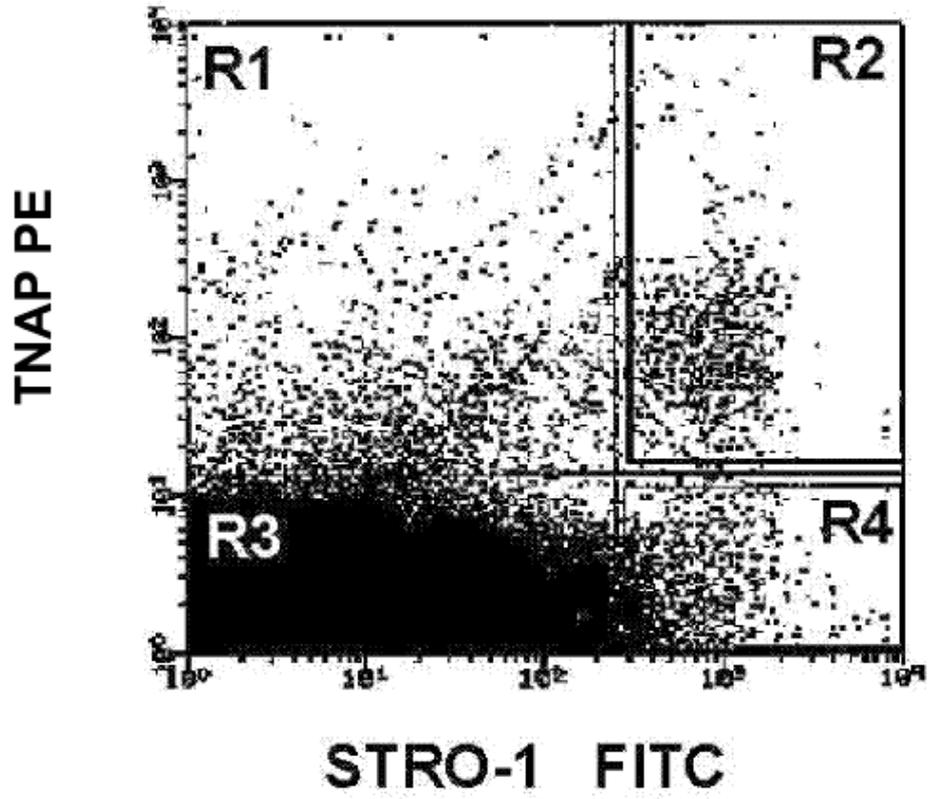


Figura 1

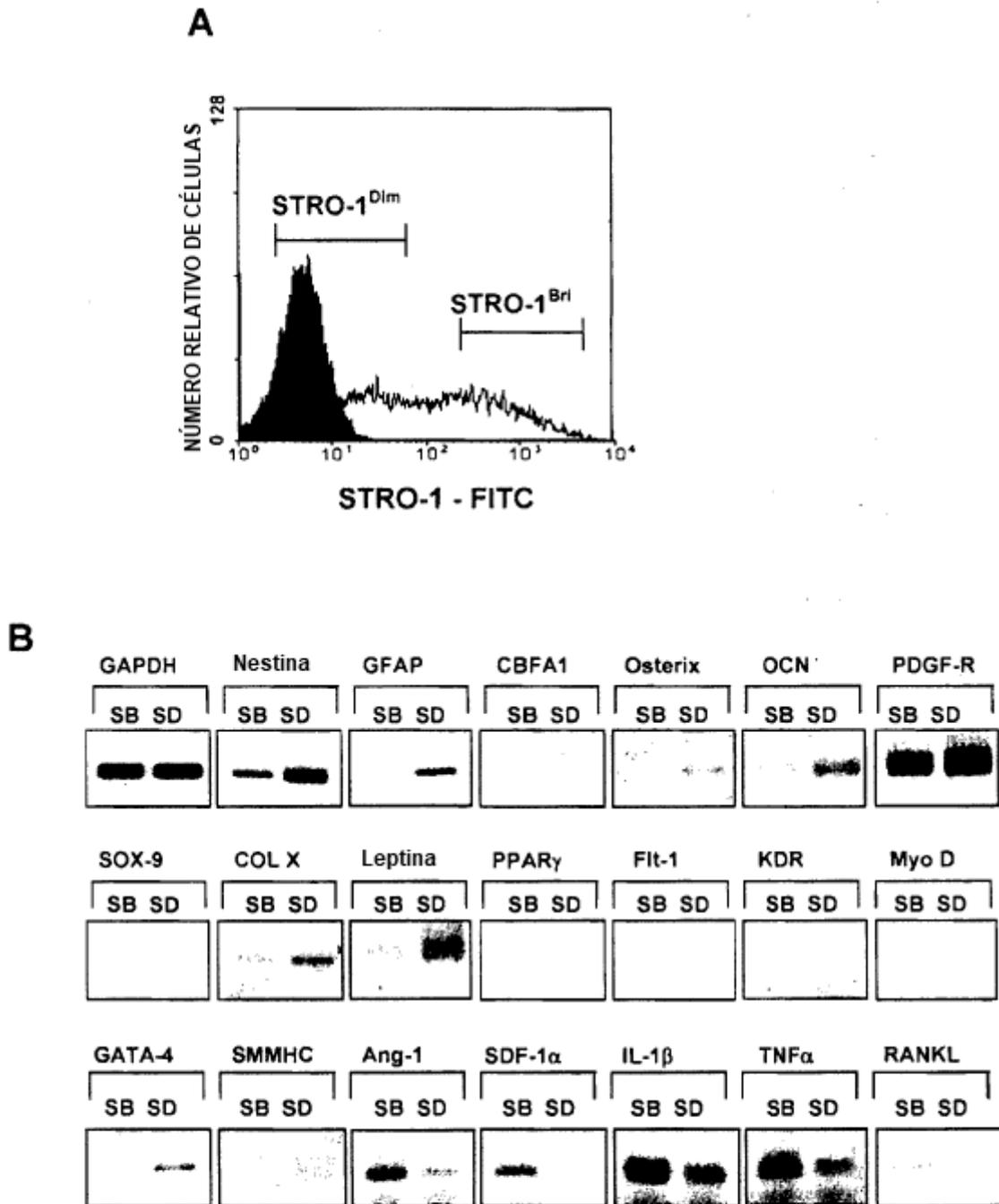


Figura 2

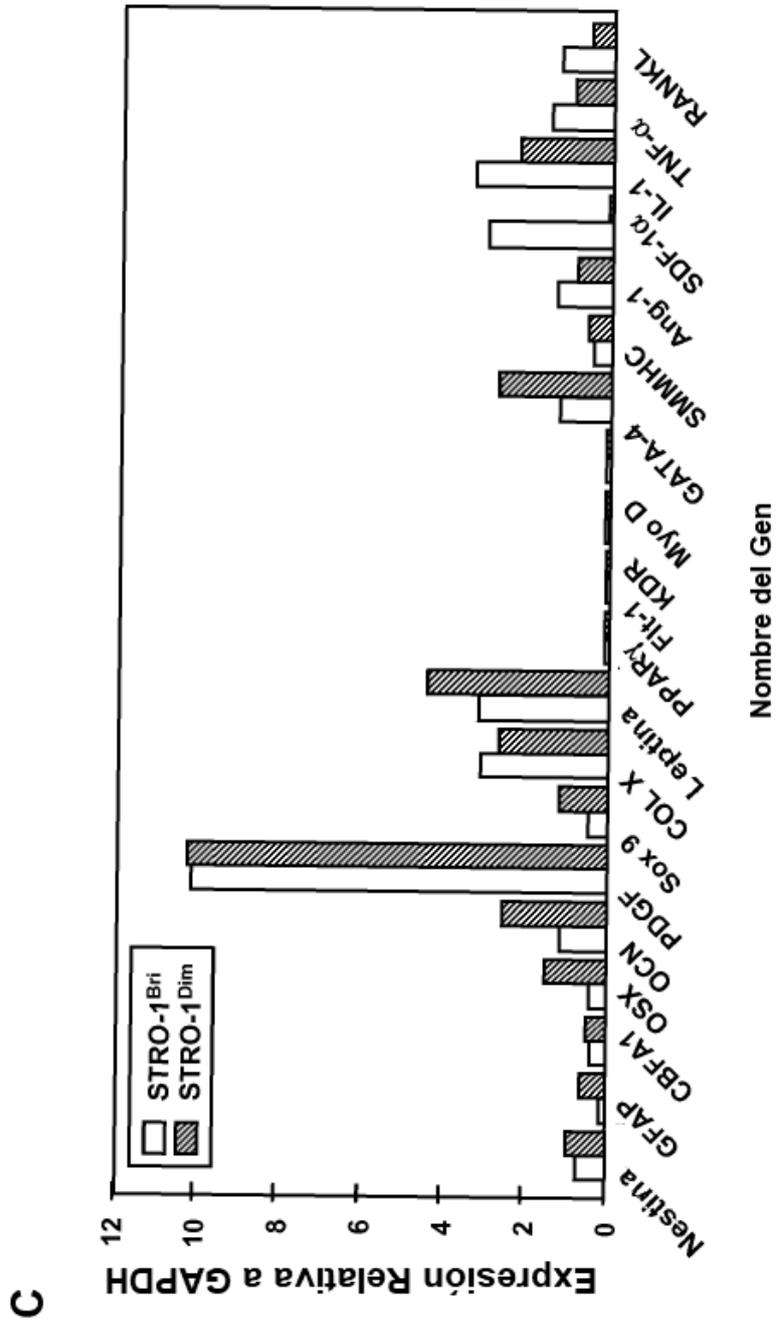


Figura 2 (continuación)

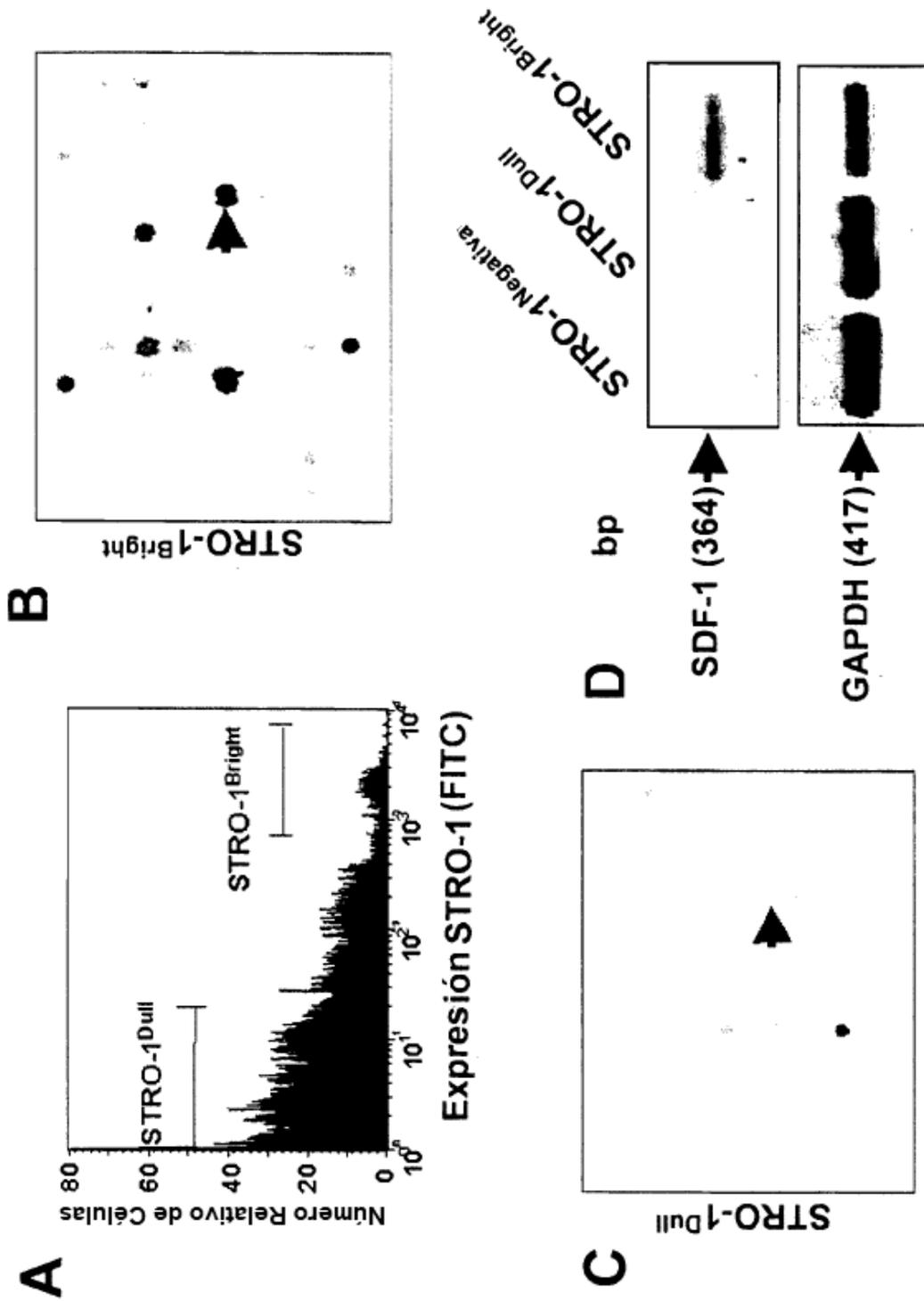


Figura 3

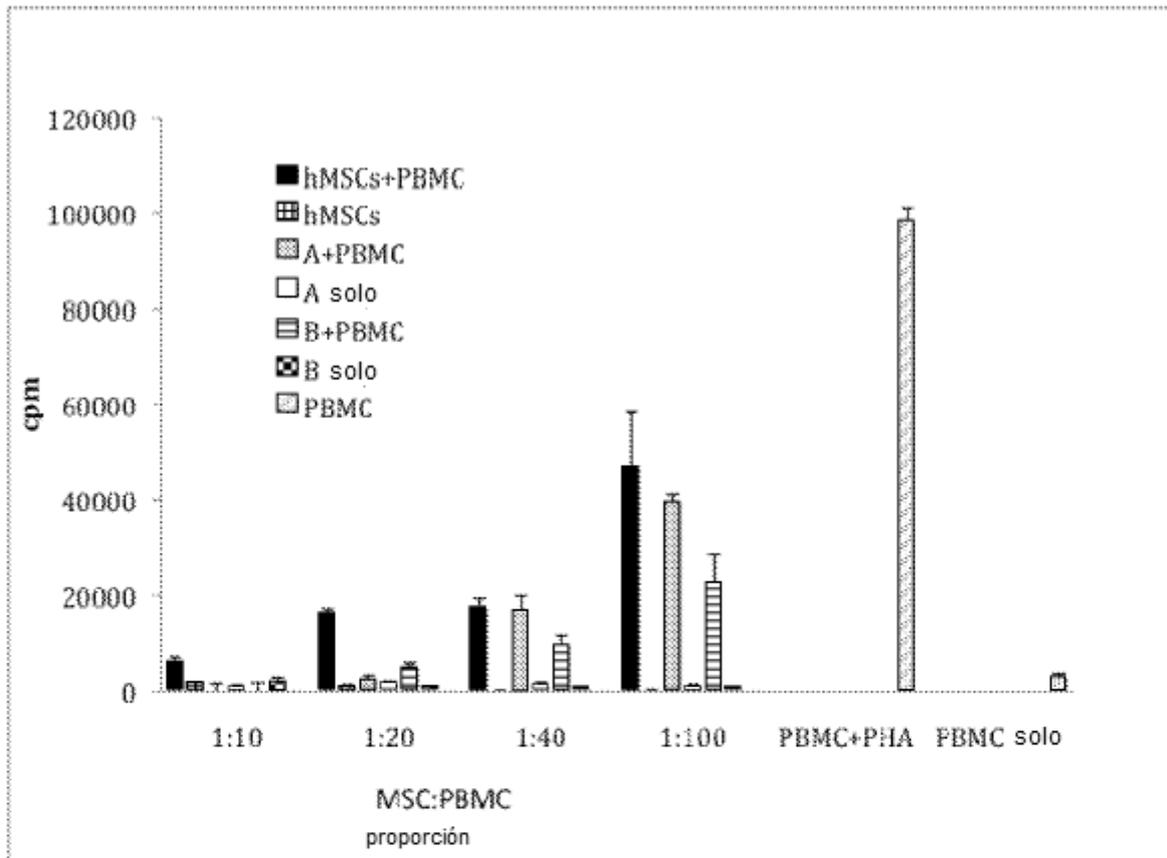


Figura 4

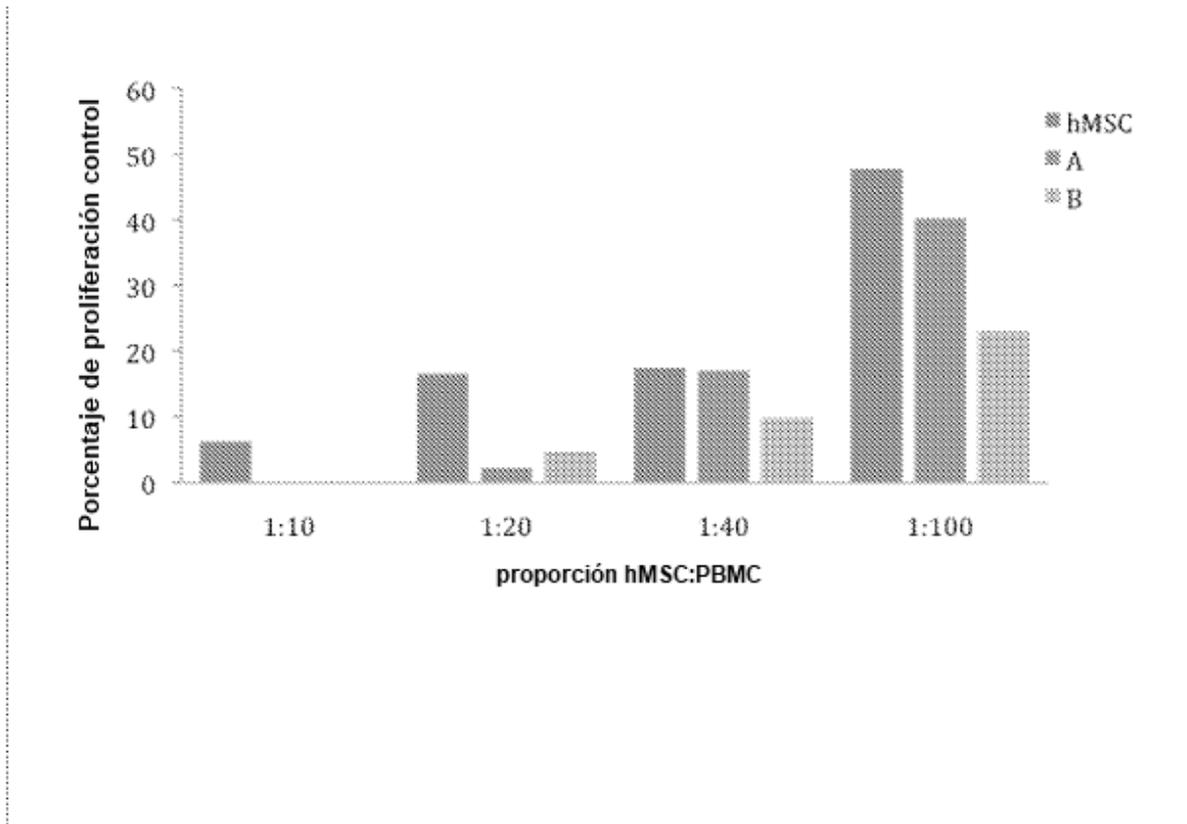


Figura 5

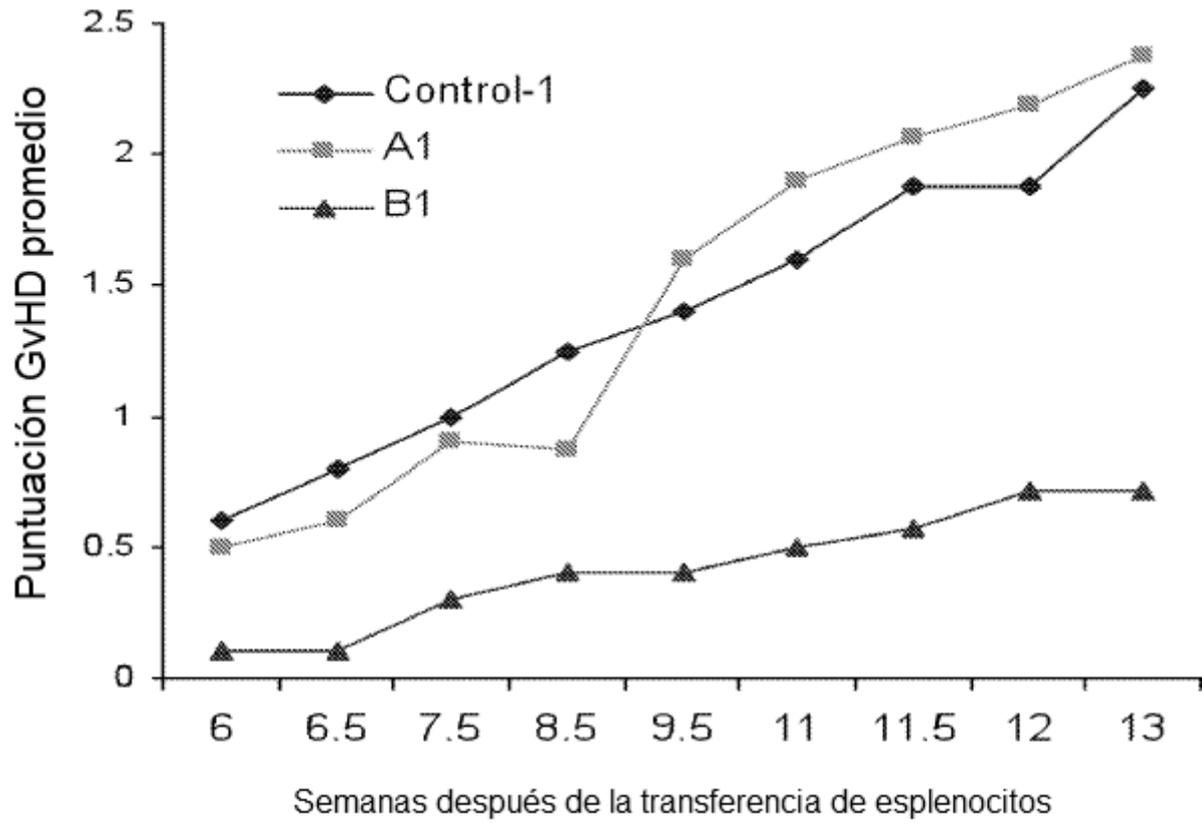


Figura 6

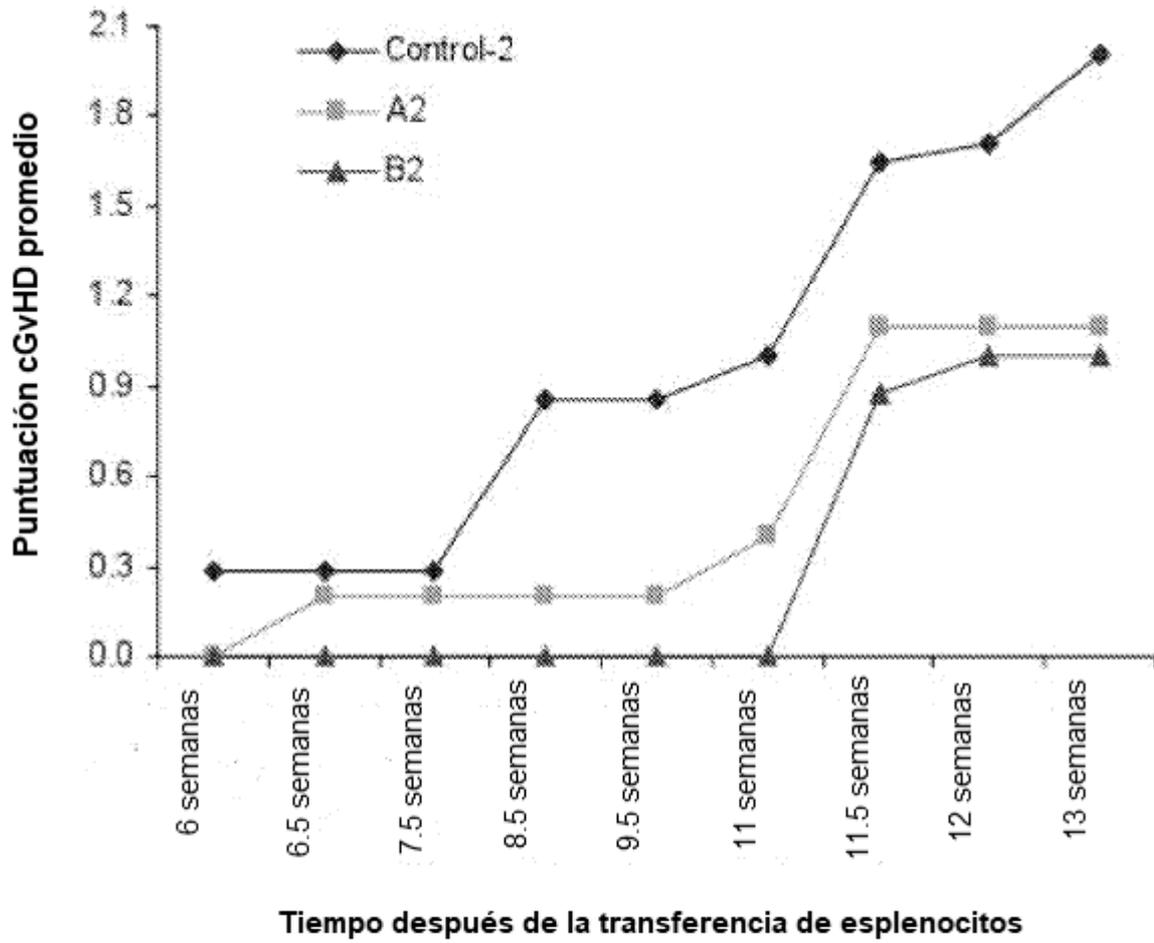


Figura 7

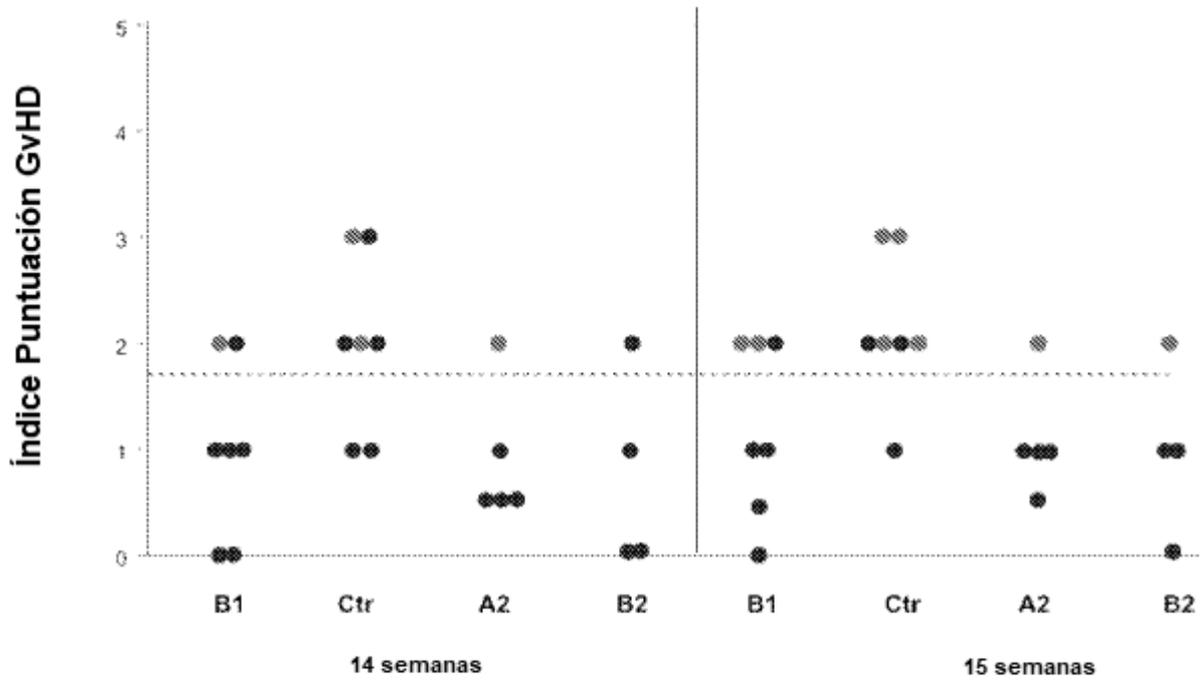


Figura 8

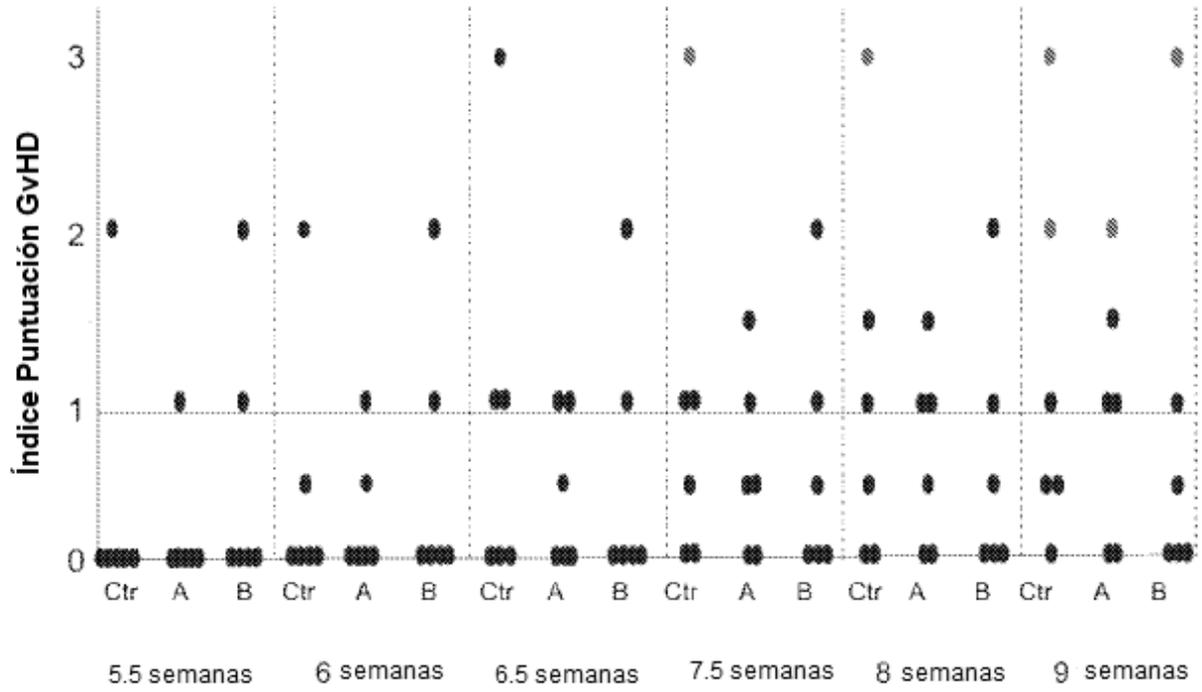


Figura 9

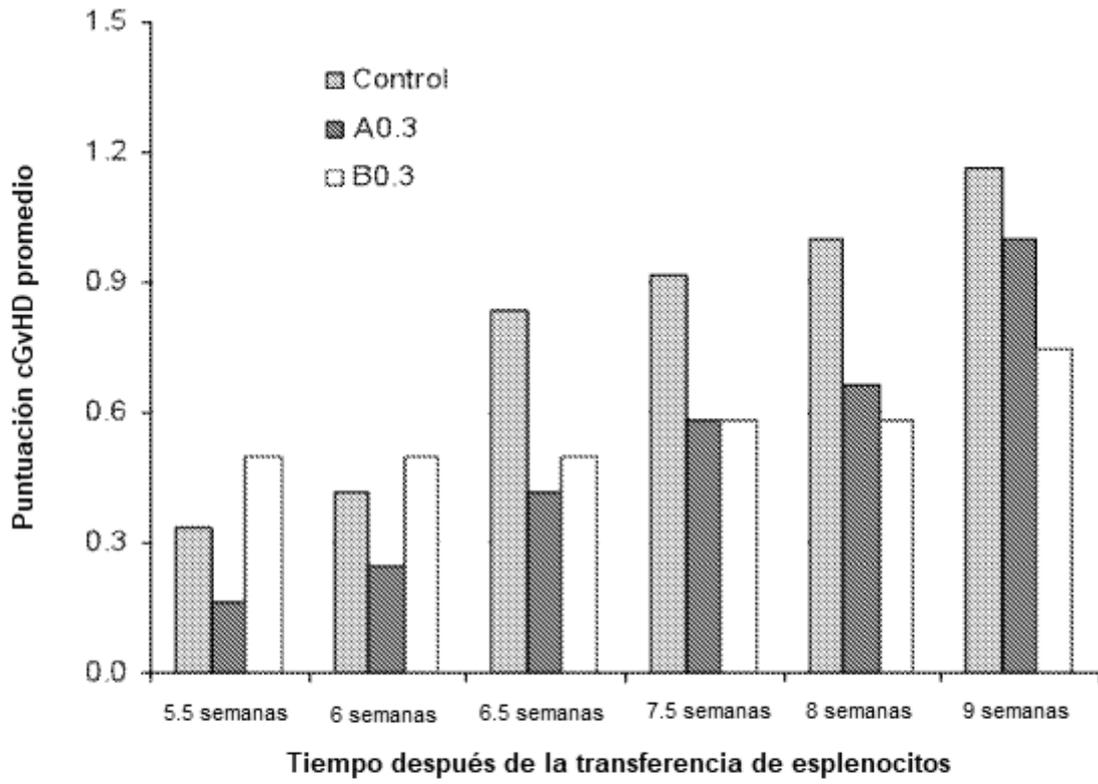


Figura 10