

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 471**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/42** (2015.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

**A61K 35/54** (2015.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 16151376 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3034087**

54 Título: **Células pulmonares fetales de mamífero y uso terapéutico de las mismas**

30 Prioridad:

**08.12.2011 US 201161568240 P**

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

**22.06.2018**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.  
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95  
7610002 Rehovot , IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;  
SHEZEN, ELIAS y  
ROSEN, CHAVA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 673 471 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 pulmonares fetales de mamífero y uso terapéutico de las mismas

**Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención, se refiere a células pulmonares embrionarias de mamífero y proporciona el uso de las mismas para aplicaciones terapéuticas.

Las enfermedades respiratorias son una causa importante de mortalidad y morbilidad, clasificadas por la Organización Mundial de la Salud como la segunda en incidencia, prevalencia, morbilidad, mortalidad y coste. La mayoría de los tratamientos actualmente disponibles solo mejoran ligeramente la calidad de vida de los pacientes con neumopatía y no evitan la pérdida de superficie de intercambio gaseoso, que es una consecuencia importante de la evolución en una variedad de patologías pulmonares. Por lo tanto, actualmente, el único tratamiento definitivo para la neumopatía en fase terminal es la sustitución del órgano dañado, pero muchos pacientes mueren mientras están en la lista de espera debido a una grave escasez de órganos para trasplantes.

Estudios previos definieron "intervalos óptimos" para el trasplante de precursores embrionarios humanos y porcinos de diferentes órganos. Estos "intervalos óptimos" para trasplantes se definieron por tres parámetros: falta de riesgo de teratoma, propiedades funcionales del tejido en crecimiento, así como baja capacidad inmunógena. Por ejemplo, la implantación en ratones SCID de diferentes tejidos precursores embrionarios de cerdo, pusieron de manifiesto distintos "intervalos" de tiempo durante los cuales el tejido presenta propiedades adecuadas para el trasplante, presentando los riñones y el hígado propiedades óptimas a los 28 días mientras se demostraba que el "intervalo" pulmonar se presenta mucho más tarde, a los 56 días, de edad de gestación porcina [Eventov-Friedman S. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. of Sciences* (2005) 102 (8): 2928]. Los estudios que utilizan tejido precursor pancreático de cerdo sugirieron su óptimo a los 42 días, en cuyo momento, este tejido demuestra una marcada capacidad para corregir la hiperglucemia provocada por estreptozotocina en ratones inmunodeprimidos, y más recientemente, en primates no humanos. Además, estudios recientes han demostrado que el trasplante de tejidos de bazo embrionario de cerdo, recogidos en momentos puntuales de gestación específicos, puede corregir la hemofilia en ratones con hemofilia A.

Durante la última década, la posible función curativa de los tratamientos basados en células madre ha sido ampliamente investigada. Los resultados recientes sugieren que tejidos adultos procedentes de células madre prematuras, tal como la médula ósea o la sangre del cordón umbilical, líquido amniótico o placenta, incluidas las células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales o fibrocitos circulantes y una variedad de otras poblaciones, podrían injertarse estructuralmente y diferenciarse como células epiteliales de las vías respiratorias y alveolares o como células vasculares endoteliales o intersticiales pulmonares y podrían utilizarse en la reparación y regeneración de pulmones lesionados o enfermos [Baber S. R. *et al.*, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. Am. Thoracic Soc.*; (2007) 292 (2): H1120; Weiss D. J. *Pulm. Pharmacol. Ther.* (2008) 21 (4): 588-94; Weiss D. J. *et al.*, *Proceedings of the American Thoracic Society: Am. Thoracic Soc.*; (2008) pág. 637; Sueblinvong V. y Weiss D. J. *Translational Research*. (2010) 156 (3): 188-205]. Sin embargo, la falta de transdiferenciación epitelial significativa, la estructura sumamente compleja del pulmón, compuesta por más de 40 tipos de células diferentes, y una baja tasa de trasplante de células trasplantadas en el pulmón, en diferentes modelos experimentales, representan un desafío importante.

La técnica anterior adicional incluye:

La publicación PCT nº WO 2006/038211 se refiere a métodos para proporcionar una función de órgano y/o tejido pancreático, linfóide/hematopoyético o pulmonar a un mamífero. El método comprende trasplantar al paciente un trasplante de órgano/tejido pancreático, linfóide/hematopoyético o pulmonar de mamífero en desarrollo, respectivamente. El trasplante pulmonar descrito en el documento WO 2006/038211 se encuentra en fase de desarrollo que corresponde esencialmente al de un órgano/tejido pulmonar porcino en fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación.

La publicación PCT nº WO 2004/078022 se refiere a métodos para tratar un trastorno relacionado con la fisiología o morfología de órganos o tejidos patológicos. El método se realiza trasplantando a un paciente un trasplante de órgano o tejido de mamífero (p. ej., trasplante de órgano o tejido renal, pancreático, hepático, cardíaco o linfóide) seleccionado que no expresa o presenta sustancialmente al menos una molécula capaz de estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el paciente.

**50 Compendio de la invención**

Según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo una población aislada de la suspensión celular de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en donde el tejido pulmonar fetal está en una fase de desarrollo correspondiente a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 semanas de gestación.

Según la presente descripción, se proporciona un método para regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad

terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, regenerando así el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial.

5 Según la presente descripción, se proporciona un método para tratar una enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, tratando de este modo la enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa.

10 Según la presente descripción, se proporciona un método para tratar un trastorno o lesión pulmonar en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención, tratando de este modo el trastorno o lesión pulmonar.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un paciente que lo necesita.

15 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención para uso en el tratamiento de un trastorno o lesión pulmonar en un paciente que lo necesita.

20 Según la presente descripción, se proporciona un banco de células que comprende un gran número de poblaciones celulares aisladas de tejidos pulmonares fetales de mamífero, en donde los tejidos pulmonares fetales están en una fase de desarrollo que corresponde esencialmente a la de un órgano/tejido pulmonar humano en fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 semanas de gestación, y en donde el gran número de poblaciones celulares se han tipado en ALH para formar un banco de células alogénicas, cada una dispuesta individualmente dentro de recipientes separados.

Según algunas realizaciones de la invención, la fase de gestación es de 20 a 21 semanas de gestación.

25 Según algunas realizaciones de la invención, la fase de gestación es de 21 a 22 semanas de gestación.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.

Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión celular comprende una población heterogénea de células.

30 Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión celular comprende células progenitoras.

Según algunas realizaciones de la invención, las células progenitoras se seleccionan del grupo que consiste en células progenitoras epiteliales, células progenitoras mesenquimatosas y células progenitoras endoteliales.

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+).

35 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+) y citoqueratina 14+ (CK14+).

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador c-Kit+ CD45- CD34- CD31- CD326- CD271-.

40 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador c-Kit+ CD34+ D31+.

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD326+.

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador CD34+ CD31+ CD14+ CD45+.

45 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador CD34+ CD31+ CD45- CD105+.

Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador nestina+ y/o de una proteína+ relacionada con el gen de calcitonina (PRGC+).

50 Según algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una expresión del marcador alfa actina+ del músculo liso (alfa-SMA+) y/o de una Vimentina+.

Según algunas realizaciones de la invención, las células son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende la generación de un pulmón híbrido.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, el pulmón híbrido comprende la formación de estructuras alveolares, bronquiales y/o bronquiolares y/o estructuras vasculares.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende una capacidad para sintetizar tensioactivo y/o una capacidad para transportar iones.

- 10 Según algunas realizaciones de la invención, las células son capaces de regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial.

Según algunas realizaciones de la invención, las células son células epiteliales que expresan RTFQ.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido epitelial se selecciona del grupo que consiste en un tejido pulmonar, un tejido del aparato digestivo, un tejido de órgano reproductivo, un tejido del aparato urinario, un tejido renal, un tejido cutáneo, un tejido cardíaco, un tejido isquémico y un tejido cerebral.

- 15 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido mesenquimatoso se selecciona del grupo que consiste en un tejido linfático, un tejido del sistema circulatorio y un tejido conjuntivo.

Según algunas realizaciones de la invención, el tejido endotelial se selecciona del grupo que consiste en un tejido linfático y un tejido del sistema circulatorio.

- 20 Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además acondicionar al paciente bajo un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal antes de la administración.

Según algunas realizaciones de la invención, la administración se realiza por vía intravenosa.

- 25 Según algunas realizaciones de la invención, la administración se efectúa por una vía seleccionada del grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intralveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intraesternal, intramucosa, transmucosa, transnasal, rectal e intestinal.

Según algunas realizaciones de la invención, el método comprende además tratar al paciente con un régimen inmunodepresor antes, junto con o después del trasplante.

Según algunas realizaciones de la invención, la composición se formula para administración intravenosa.

- 30 Según algunas realizaciones de la invención, la composición se formula para administración por una vía seleccionada del grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intralveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intraesternal, intramucosa, transmucosa, transnasal, rectal e intestinal.

Según la invención, la composición farmacéutica comprende además un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal.

- 35 Según la descripción, el acondicionamiento subletal, letal o supraletal se selecciona del grupo que consiste en una irradiación corporal total (ICT), una irradiación corporal parcial, un acondicionamiento mieloablativo, un bloqueo coestimulador, un agente quimioterapéutico y/o una inmunoterapia de anticuerpos.

Según la invención, el acondicionamiento comprende tratamiento con naftaleno.

- 40 Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento comprende además irradiación corporal total (ICT).

Según algunas realizaciones de la invención, el acondicionamiento comprende irradiación corporal total (ICT).

Según algunas realizaciones de la invención, el ICT comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-7,5 Gy.

Según algunas realizaciones de la invención, el paciente es un paciente humano.

- 45 Según algunas realizaciones de la invención, el tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.

Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión celular no es clónica con el paciente.

Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión celular es alogénica con el paciente.

Según algunas realizaciones de la invención, las células alogénicas se seleccionan del grupo que consiste en ALH idéntico, ALH parcialmente idéntico y ALH no idéntico con el paciente.

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, la población aislada de la suspensión celular es xenogénica con el paciente.

Según algunas realizaciones de la invención, el trastorno o lesión pulmonar se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia de proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

10

Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en un trastorno, enfermedad o lesión pulmonar; trastorno, enfermedad o lesión renal; trastorno, enfermedad o lesión hepático; trastorno, enfermedad o lesión cardíaco; trastorno, enfermedad o lesión del aparato digestivo; trastorno, enfermedad o lesión de la piel y trastorno, enfermedad o lesión cerebral.

15

Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, defectos de cicatrización de heridas, cáncer, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), carencia de proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar, lesión pulmonar y degeneración de la córnea.

20

25

Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad o afección cardíaca, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunitarios, leucemia, cáncer, enfermedad de células falciformes, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos.

- 30 Según algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido endotelial es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad vascular, isquemia, enfermedad de células falciformes, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunitarios.

Según algunas realizaciones de la invención, el banco de células comprende además un catálogo que comprende información sobre las células tipadas con ALH del gran número de poblaciones de células.

- 35 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o pruebas de las realizaciones de la invención, se describen a continuación a modo de ejemplo métodos y/o materiales. En caso de conflicto, regulará la memoria de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente restrictivos.
- 40

### Breve descripción de los dibujos

En la presente memoria se describen algunas realizaciones de la invención, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para una exposición ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden llevarse a la práctica las realizaciones de la invención.

45

En los dibujos:

Las Fig. 1A-R representan el crecimiento y desarrollo de tejidos precursores embrionarios humanos recogidos en diferentes momentos puntuales de gestación. Se implantaron tejidos embrionarios humanos bajo las cápsulas suprarrenales de ratones NOD-SCID. Los implantes se evaluaron macroscópicamente o mediante tinción inmunohistológica después de 8 semanas. La figura 1A es un compendio del tamaño macroscópico de implantes de diferentes puntos de gestación: tamaño medio (+DT), basado en los ejes largo (L) y corto (W) y altura (H) de los implantes, 6-8 semanas después del trasplante (los datos mostrados son el promedio de seis experimentos independientes); la figura 1B es una fotografía que ilustra un aspecto macroscópico típico de los implantes recogidos

50

55

a las 20 semanas de la gestación; las figuras 1C-F son fotografías del examen microscópico de hematoxilina y tinción con eosina (H & E) del implante obtenidas después de 20 semanas del tejido, mostrando un aspecto normal de los canalículos alveolares, alvéolos, tráquea cubierta de epitelio ciliado, capa muscular y cartilago, y monocapa alveolar/epitelial; las figuras 1G-H son fotografías que ilustran la inmunotinción para la proteína tensioactiva C (sp-C) en rojo, y la citoqueratina-18 (CK-18) en verde, a menor aumento (figura 1G) y mayor aumento (figura 1H); la figura 1I es una fotografía que ilustra la inmunotinción para regulador de membrana de fibrosis quística RTFQ en rojo y CK-18 en verde; las figuras 1J-R son fotografías que ilustran la tinción H & E típica de implantes obtenidos de tejidos en 15 semanas (figuras 1J-L), 18 semanas (figuras 1P-R), y 24 semanas (figuras 1M-O), respectivamente. Las flechas indican quiste. En (figura 1M) se ilustra la imagen macroscópica de un quiste.

Las Fig. 2A-O representan la identificación de células madre prematuras y sus nichos en el pulmón embrionario humano. Las figuras 2A-D son fotografías que ilustran la tinción H & E de tejidos pulmonares embrionarios humanos en diferentes momentos puntuales de gestación, revelando estructuras bronquiales y bronquiolares sin ninguna estructura alveolar; las figuras 2E-F son fotografías que ilustran la tinción inmunohistológica que muestra una alta expresión de células CK5+ en las vías respiratorias grandes y la coexpresión de CK5 y CK14 en el bronquio grande. Las flechas y las cabezas de flecha indican regiones con alta y baja expresión de CK5, respectivamente. Las células CK5+ en las estructuras alveolares bronquiales y en desarrollo se asocian a una innervación rica, ilustrada por contacto con nestina+ y las células PRGC+ (figura 2G), así como por tinción de neurofilamentos (NF) (figura 2H); la figura 2I es una fotografía que ilustra células positivas a actina de músculo liso alfa; la figura 2J es una fotografía que ilustra células mesenquimatosas Vimentina+ que residen en las proximidades de las células madre CK5+; las figuras 2K-N son fotografías que ilustran tinciones para CK5 (rojo) en diferentes momentos puntuales, incluidas 15 (figura 2K), 17 (figura 2L), 20 (figura 2M) y 22 (figura 2N) semanas de gestación humana que demuestran diferencias en el nivel de expresión de CK5; la figura 2O es un gráfico que ilustra el análisis morfométrico cuantitativo del área de tejido ocupada por células madre CK5+ que presenta cantidades significativamente (prueba de la t) más altas a las 20-22 semanas, un diamante representa un valor p que no es significativo, dos diamantes representan p < 0,002).

Las Fig. 2P-Z representan el análisis de FACS de células madre no hematopoyéticas prematuras en tejido pulmonar embrionario humano recogido en diferentes momentos puntuales de gestación. Las figuras 2P-Q ilustran análisis de FACS representativos de células de pulmón de 20 semanas que presentan doble tinción con anti-CD45 y anti-CD34. Se representan tres subpoblaciones en las células CD45 no hematopoyéticas, incluidas las células CD45-CD34<sup>alta</sup>, CD45-CD34<sup>intermedia</sup> y CD45-CD34<sup>neg.</sup>; las figuras 2R-T ilustran la doble tinción con anti-CD 117 (c-kit) y anti-CD271 (marcador de diferenciación mesenquimatoso) que ponen de manifiesto el nivel de cada subpoblación; las figuras 2U-Z ilustran el porcentaje de células CD117+ positivas aisladas en la población CD45-CD34<sup>neg.</sup> en diferentes tejidos pulmonares embrionarios humanos.

Las Fig. 3A-C representan la tinción triple con CK5, lectina ULEX y CD117 antes del trasplante de tejidos pulmonares recogidos a las 21 w. Las vías respiratorias centrales (figura 3 A) y el bronquio principal (figura 3B) muestran alta expresión de CK5 en las vías respiratorias grandes, rodeadas por grandes vasos sanguíneos. Células CD117+ raras residen en espacios perivasculares. En la región de las vías respiratorias más pequeñas (figura 3C), se observa una expresión menor de CK5, en íntimo contacto con vasos sanguíneos más pequeños, mientras que numerosas células CD117+ residen dentro de estos vasos sanguíneos (rosa, doble positivo para la lectina ULEX y CD117).

Las Fig. 4A-K representan la tinción triple con E-caderina, CD34 y CD117 antes del trasplante de tejidos pulmonares recogidos a las 21 w. La figura 4A ilustra la tinción única para CD34; la figura 4B ilustra la tinción única para CD117; la figura 4C ilustra una fusión con tinción de E-caderina. Se representan imágenes panorámicas de dos regiones vecinas, que incluyen grandes bronquios y estructuras alveolares en desarrollo. La mayoría de las células CD34+ en la región del desarrollo de estructuras alveolares coexpresan CD117 (figuras 4D-G), mientras que en la región de las vías respiratorias grandes, pueden verse células CD117+ positivas aisladas raras en íntima proximidad a los vasos sanguíneos (figuras 4H-K).

Las Fig. 5A-D son fotografías que representan una vista panorámica de tres campos vecinos en 20 semanas de pulmón humano que ilustran la presencia de regiones CK5 positivas (rojo, figura 5A) con diferente intensidad de expresión, que están rodeadas por vasos sanguíneos (azul, figura 5B) y células positivas alfa-SMA (verde, figura 5C) tanto en bronquios grandes como en alveolos en desarrollo, (azul, figura 5B), que sugieren nichos distintos (la superposición de los 3 compartimentos se muestra en la figura 5D). Bar = 50 µm.

Las Fig. 6A-L representan el análisis de FACS policromático de dos muestras diferentes de pulmón humano adulto. El análisis policromático de FACS de tejidos de pulmón humano adulto se realizó en paralelo a tejidos de pulmón embrionario humano. La suspensión de células aisladas se tiñó, después de la disociación enzimática con colagenasa y dispasa de los tejidos, y se tiñó con anticuerpos específicos CD34 (específico para progenitores hematopoyéticos y endoteliales), CD45 (células hematopoyéticas), CD31 (marcador de células endoteliales), CD 117 (c-KIT, para identificar células madre prematuras), CD271 (marcador de células madre mesenquimatosas NGFR) y CD326 (marcador de diferenciación epitelial CPEAM) o referencias de isotipos equivalentes. En ambas muestras, se identificaron poblaciones de CD34+ y CD34<sup>+</sup> (figuras 6A, 6D, 6G y 6J). Se observaron diferencias prominentes entre tejidos de pulmón adultos y embrionarios. Se identificaron cantidades mucho más bajas de células CD34<sup>+</sup> en

pulmones adultos. Cuando se analizó la presencia de la población c-kit<sup>+</sup>, se identificaron poblaciones muy pequeñas de CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup> (figuras 6B, 6E, 6H y 6K); la mayoría de las células CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> fueron positivas para el marcador CD31 y solo un pequeño porcentaje negativo para el marcador CD31 (figuras 6C, 6F, 6I y 6L), y la mayoría de la población de CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> se encontró negativa para CD31 y CD326 (figuras 6F y 6L).

5 Las Fig. 7A-I representan el análisis FACS de HEL de 20 semanas, que demuestra las subpoblaciones CD45-CD34<sup>+</sup> y CD45-CD34<sup>-</sup> (figura 7A). Tinción con CD117<sup>+</sup> dentro de las subpoblaciones de células CD34 positivas (figura 7B) y negativas (figura 7C). La mayoría de la subpoblación CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> es positiva para los marcadores CD31 o CD326 (figuras 7D, 7F-G). La mayoría de las células CD34<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup> son negativas para los marcadores CD31 y CD326 (figuras 7E, 7H-I). En las figuras 7F-I, se demuestran histogramas representativos, donde la línea roja marca el control de isotipo de los marcadores CD31 y CD326, la línea azul muestra la subpoblación CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> y la línea verde muestra la subpoblación CD34<sup>+</sup>CD326<sup>+</sup> (figuras 7F-G); en las figuras 7H-I, la línea azul marca la subpoblación CD34-CD31<sup>+</sup> y la línea verde marca la subpoblación CD34-CD326<sup>+</sup>. Estos hallazgos confirman la existencia de dos poblaciones diferentes de CD117<sup>+</sup>, como se demuestra por inmunohistoquímica.

10 Las Fig. 8A-D representan tinción inmunohistológica de 15 semanas (figuras 8A-B) y 17 semanas (figuras 8C-D) HEL para marcador ulix-vascular (azul), CK5 (verde) y CD 117 (rojo), mostrando el modelo de expresión CD117 doble. Varias células CD117<sup>+</sup> aisladas se encuentran en íntima proximidad de grandes vías respiratorias y vasos sanguíneos, mientras que la mayoría de ellas se encuentran en los vasos sanguíneos alrededor de las estructuras alveolares en desarrollo.

20 Las Fig. 9A-D representan el análisis de pulmón humano de 20 semanas para la presencia de progenitores endoteliales prematuros y tardíos (CPE). Esta figura identifica la presencia de dos pequeñas subpoblaciones CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> distintas (figura 9B). La primera identificada por tinción positiva para CD14 y CD45 (figura 9C), mientras que la segunda subpoblación es CD45-CD105<sup>+</sup> (figura 9D).

25 Las Fig. 10A-E representan la caracterización de tejidos embrionarios antes y después de la implantación bajo las cápsulas suprarrenales de ratones clónicos. Las figuras 10A-C son fotografías que ilustran una tinción H & E típica que demuestra el escaso crecimiento de los tejidos pulmonares E14 (figura 10A) y E17 (figura 10B) 12 semanas después del trasplante bajo las cápsulas suprarrenales de ratones SCID (n = 7), comparado con el marcado crecimiento y diferenciación alcanzados después de implantes embrionarios de ratón E16 (n = 5) (figuras 10C-E); las figuras 10D-E son fotografías que ilustran la tinción H & E que demuestra vías respiratorias grandes (flechas grandes) y estructuras alveolares (flechas pequeñas) y tinción con citoqueratina en implantes de pulmón fetal de ratón E16.

30 La Fig. 10F es una representación esquemática de fases paralelas en el desarrollo del pulmón de ratón y humano. El "intervalo óptimo" para el trasplante está dentro de la fase canalicular del desarrollo.

35 Las Fig. 11A-Y representan la caracterización de los progenitores pulmonares en el pulmón embrionario de ratón E16 antes del trasplante. La figura 11A es una fotografía que ilustra la tinción con H&E del pulmón embrionario E16 que muestra estructuras inmaduras y ausencia de estructuras alveolares; la figura 11B es una fotografía que ilustra células CK-5 positivas (azul) en el tejido de ratón E16, similar al pulmón embrionario humano, tienen mayor expresión en las vías respiratorias grandes. Numerosos cuerpos neuroepiteliales, teñidos positivamente por PRGC (rojo) y tirosina hidroxilasa (TH, verde) se encuentran en la muestra completa, y se localizan en nichos; la figura 11C es una fotografía que ilustra que las células CCSP positivas se encuentran en las regiones de las vías respiratorias grandes, también ricas en células nestina positivas y rodeadas por células alfa-SMA positivas (figura 11D, flechas blancas), indicativas de nichos de células madre; las figuras 11E-G son análisis FACS policromáticos representativos de células CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD326<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD104<sup>+</sup> en suspensiones de células aisladas procedentes de pulmones de E13, E14, E15 y E16 después del tratamiento con colagenasa y dispasa (n=10, 10, 12 y 10 respectivamente, los valores representan la media ± DT de dos experimentos diferentes). Se demuestra una abundancia significativamente mayor de esta población celular en el pulmón E15-16 (p < 0,007); la figura 11Y es un compendio de las cantidades de células CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD326<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD104<sup>+</sup> que muestran la significación estadística calculada por la prueba de la t de Student (un diamante representa p < 0,037, dos diamantes representan p < 0,007, las estrategias de activación de células se describen en el apartado Ejemplos más adelante).

45 Las Fig. 12A-F son fotografías que representan la tinción inmunohistoquímica del pulmón C57B1 de adulto, demostrando la presencia de nestina y PRGC (figuras 12A-B), similares a su expresión en nichos de células madre en el pulmón de ratón embrionario (figura 12A - ampliación menor - barra = 50 µm, figura 12B - mayor ampliación - barra = 20 µm). El cuadro en (figura 12A) indica la posición de la ampliación que se muestra en (figura 12B); las figuras 12C-F son fotografías que ilustran la tinción triple del pulmón C57B1 adulto para alfa-SMA (verde, figura 12C), PRGC (rojo, figura 12D) y E-caderina (recubrimiento azul con alfa-SMA y PRGC, figura 12E), barra = 50 µm; y la figura 12F ilustra un área ampliada del cuadrado marcado en la figura 12E, barra = 20 µm.

55 Las Fig. 13A-D representan la microscopía fluorescente de pulmones híbridos con bajo aumento de potencia mostrando diferentes números de focos de células GFP<sup>+</sup> injertadas después de diferentes regímenes de acondicionamiento. Las figuras 13A-C son fotografías de imágenes representativas de pulmones híbridos de animales tratados con 6 Gy ICT (figura 13A), NA solamente (figura 13B), y NA más 6 GY ICT (figura 13C); la figura

13D es un análisis morfométrico cuantitativo de parches GFP+ de células injertadas por mm<sup>3</sup>, siguiendo diferentes regímenes de acondicionamiento (n = 10 en cada grupo). Se presentan los resultados de 3 experimentos independientes.

Las Fig. 14A-L son fotografías que representan la tinción de células CCSP<sup>+</sup> antes y después de la infusión de células E16. La figura 14A ilustra los luces de vías respiratorias grandes de ratones de referencia no tratados; la figura 14B ilustra los pulmones de los animales de experimentación 1 día después del acondicionamiento con naftaleno y 6 Gy ICT, mostrando la descamación de las células CCSP<sup>+</sup>; la figura 14C ilustra los pulmones de animales acondicionados con naftaleno y 6 Gy ICT 30 días después de la infusión de células E16, mostrando una notable regeneración de la capa epitelial con células GFP<sup>+</sup> injertadas (verde) en luces bronquiales, que están vascularizadas, como se indica por tinción para VE caderina; las figuras 14D-L ilustran que las linfocitos Trasplantadas (figuras 14D-F) se incorporan a la capa epitelial, regeneran CCSP<sup>+</sup> células (rojas) son capaces de producir tensioactivo (figuras 14G-I) y presentan potencial de transporte iónico, indicado mediante tinción para RTFQ (figuras 14J-L).

Las Fig. 15A-C son fotografías que muestran microscopía de 2 fotones que ponen de manifiesto el nivel de hibridación en pulmones implantados. Imágenes de pulmón por microscopía de 2 fotones representativas de ratones trasplantados a las 6 (figuras 15A-B) y 16 (figura 15C) semanas después del trasplante, sin (figura 15A), y con co-tinción de vasos sanguíneos con puntos Quantum no específicos (rojo) (figura 15B).

Las Fig. 16A-L son fotografías que representan la caracterización inmunohistológica de pulmones híbridos a las 16 semanas después del trasplante. Las figuras 16A-D son imágenes representativas de pulmón híbrido teñido con anticuerpo anti-GFP (verde), anticuerpo anti-CD31 (rojo) y anticuerpo anti-pancitoqueratina (azul), que demuestra la incorporación de células GFP<sup>+</sup> en compartimentos vasculares y epiteliales de pulmones trasplantados, sin signos de cicatrización o fibrosis; las figuras 16E-H son imágenes representativas de pulmones híbridos teñidos con anticuerpo anti-GFP (verde) y anticuerpo anti AQP-5 (rojo), que muestran la incorporación de tejido trasplantado en la superficie de intercambio gaseoso de los alveocitos tipo I; las figuras 16I-L son imágenes de pulmón híbrido teñido con anticuerpo anti-GFP (verde), anti-CD31 (rojo) y anti-sp-C (azul), que demuestra la participación de alveocitos tipo II de linfocitos Trasplantadas en la síntesis de tensioactivo.

Las Fig. 17A-E son fotografías que muestran el aspecto del pulmón C57B1 no trasplantado de referencia analizado por microscopía de 2 fotones, barra = 90 μm (pulmón de referencia, figura 17A) o triple tinción de pulmón híbrido con anticuerpos anti-GFP (verde), anticitoqueratina (azul), y anti-CD31, que demuestran hibridación en compartimentos tanto epiteliales como vasculares del pulmón, y la incorporación completa en las estructuras, sin signos de cicatrización o fibrosis, con baja ampliación, barra = 200 μm (figuras 17B-E). En el canal fluorescente verde, los focos híbridos GFP+ están indicados por línea de puntos (figura 17B). En los canales rojo y azul, las mismas regiones híbridas también están indicadas por línea de puntos, lo que demuestra una transición suave del tejido receptor al donante en los compartimentos tanto vascular (figura 17C) como epitelial (figura 17D), y la superposición de todas las capas se muestra en la (figura 17E).

Las Fig. 18A-I son fotografías que representan el trasplante y la incorporación de células de pulmón de seres humanos en el pulmón del ratón en diferentes momentos puntuales posteriores al trasplante. Las figuras 18A-C ilustran la hibridación en el pulmón del ratón 6 semanas después del trasplante, mostrando la tinción para MHC de ratón (rojo) y tejido humano positivo para MNF-116 (verde) a bajo aumento; las figuras 18D-F ilustran hibridación en el pulmón del ratón 6 semanas después del trasplante, mostrando tinción para MHC de ratón (rojo) y tejido humano positivo para MNF-116 (verde), a gran aumento; las figuras 18G-I ilustran un campo adicional, teñido como en las (figuras 18D-F).

Las Fig. 19A-F son fotografías que muestran hibridación típica en el bronquio pulmonar del ratón trasplantado a las 7 semanas después del trasplante. Las figuras 19A y 19D ilustran células humanas que se originan a partir de células embrionarias humanas que se tiñeron selectivamente con un cóctel de anticuerpos antihumanos de ratón incluidos anti-MNF (marcador epitelial), anti-Vimentina 9 humana (típica de células de estroma) y CD31 antihumano de ratón (marcador de células endoteliales) ) marcado con Daylight 488 (verde); las figuras 19B y 19E ilustran células de origen de ratón en el pulmón de ratón que se tiñeron con lectina de Bandeira marcada con Alexa-fluor 546 (rojo). Se sabe que este último se une a a-Gal expresado en células endoteliales y epiteliales de ratón. El cuadro superior muestra el campo híbrido a bajo aumento (figura 19C), el cuadro inferior muestra la misma región bajo gran aumento (figura 19F).

Las Fig. 20A-F son fotografías que representan hibridación típica en los alvéolos pulmonares de un ratón trasplantado a las 7 semanas después del trasplante. Las figuras 20A y 20D ilustran células humanas que se originan a partir de células embrionarias humanas que se tiñeron selectivamente con un cóctel de anticuerpos antihumanos de ratón incluidos anti-MNF (marcador epitelial), anti-Vimentina 9 humana (típica de células de estroma) y CD31 anti-humano de ratón (marcador de células endoteliales) marcado con Day light 488 (verde); las figuras 20B y 20E ilustran células de origen de ratón en el pulmón de ratón que se tiñeron con lectina de Bandería marcada con Alexa-fluor 546 (rojo). Se sabe que este último se une a a-Gal expresado en células endoteliales y epiteliales de ratón, pero no en sus homólogos humanos. El cuadro superior muestra el campo híbrido a bajo aumento (figura 20C); el cuadro superior muestra la misma región a gran aumento (figura 20F).

Las Fig. 21A-C son fotografías que muestran la incorporación de células humanas en el parénquima pulmonar. La figura 21A ilustra células humanas que se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos antihumanos incluidos anti-MNF117, anti-V9, anti-CD31 como se descrito anteriormente, y con anticuerpo anti-citoqueratina de conejo (rojo), que tiñe la citoqueratina tanto de ratón como humana (figura 21B). La combinación de ambos colores muestra células humanas en el parénquima pulmonar (figura 21C).

Las Fig. 22A-C son fotografías que muestran la incorporación de células humanas en la superficie de intercambio gaseoso del pulmón. Las células humanas se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos antihumanos incluidos anti-MNF117, anti-V9 y anti-CD31, como se describió anteriormente (figura 22A) y con anti-AQP-5 de cabra (rojo), que tiñe tanto AQP-5 de ratón como humano (figura 22B). La combinación de ambos colores demuestra células humanas en la superficie de intercambio gaseoso del pulmón (figura 22C).

Las Fig. 23A-F son fotografías que muestran que las células de pulmón humano injertadas en los alvéolos de un ratón híbrido participan en la producción de tensioactivo. Las células humanas se tiñeron (verde) con una mezcla de anticuerpos antihumanos incluidos anti-MNF117, anti-V9 y anti-CD31 como se describió anteriormente (figuras 23A y 23D), y con anticuerpo anti-SPC de conejo (rojo), que tiñe la proteína C tensioactivo tanto de ratón como humana (figura 23B). La combinación de ambos colores demuestra la participación del tejido humano trasplantado en la producción de tensioactivo (figura 23C). El cuadro inferior (figuras 23D-F) muestra la tinción a gran aumento del área cuadrada indicada en la (figura 23C).

Las Fig. 24A-H son fotografías que representan el injerto de 20 semanas suspensión de células aisladas de pulmón humano teñidas con CMTMR en el pulmón de un ratón NOD-SCID, barra = 500  $\mu$ m (figura 24A); parches GFP<sup>+</sup> que indican células de pulmón que se originan a partir de células de pulmón embrionarias de ratón trasplantadas en el modelo de trasplante clónico, barra = 1 mm (figura 24B); las figuras 24C-E ilustran tinción de referencia con anticuerpo citoqueratina MNF 116 antihumano de ratón (verde, figura 24C) y MHC de rata anti-ratón (rojo, figura 24D) de tejido pulmonar embrionario humano, que es positivo para MNF116 y negativo para MHC de ratón (la superposición de dos se muestra en la figura 24E); las figuras 24F-H ilustran la tinción de referencia de células de pulmón de ratón con anticuerpos anti-MHC anti-ratón MNF116 humano, demostrando tinción negativa para MNF116 y tinción positiva para MHC de ratón, barra = 50  $\mu$ m.

Las Fig. 25A-D son fotografías que representan el seguimiento a largo plazo de ratones implantados con tejido pulmonar embrionario de ratón E16 que no presentan pruebas de teratoma. La figura 25A ilustra un aspecto macroscópico del pulmón trasplantado un año después del trasplante que presenta bordes lisos y ausencia de tumores; las figuras 25B-C ilustran la tinción con H & E que presenta morfología normal del pulmón trasplantado en menor (figura 25B) y mayor aumento (figura 25C) un año después del trasplante; la figura 25D ilustra vistas coronales de imágenes CT de pulmón *in vivo* de un animal trasplantado típico que presenta aspecto radiológico normal del pulmón experimental.

#### Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a células pulmonares embrionarias de mamífero y, proporciona el uso de las mismas para aplicaciones terapéuticas.

Los principios y la operación de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en la presente memoria son a efectos de la descripción y no deben considerarse como restrictivos.

Estudios previos han definido "intervalos" para el trasplante de tejidos embrionarios humanos y porcinos de diferentes órganos, incluidos riñón, hígado, páncreas, pulmón y corazón. Así, por ejemplo, se demostró que el "intervalo" del pulmón se producía a los 42 a 80 días de la edad de gestación porcina [Publicación PCT n° WO 2006/038211; Eventov-Friedman S. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. of Sciences* (2005) 102 (8): 2928]. Estudios adicionales sugieren que los progenitores prematuros proceden de tejidos adultos, como la médula ósea o de la sangre del cordón umbilical, líquido amniótico o placenta, incluidas células madre mesenquimatosas, progenitores endoteliales o fibrocitos circulantes y una variedad de otras poblaciones, podrían injertarse estructuralmente y diferenciarse como células epiteliales de las vías respiratorias y alveolares o como células endoteliales vasculares o pulmonares intersticiales y podrían utilizarse en la reparación y regeneración de pulmones lesionados o enfermos.

Cuando se reduce la presente invención a la práctica, los presentes inventores han identificado una población celular única de tejido pulmonar embrionario, obtenida a partir de un "intervalo" de 20-22 semanas de edad de gestación humana, que comprende una multitud de células progenitoras de pulmón que pueden usarse para la reparación de pulmones lesionados/enfermos. Sorprendentemente, se puede usar una suspensión de dicha población celular, que no mantiene una estructura hística, para regenerar tejidos pulmonares epiteliales, mesenquimatosos y endoteliales.

Como se muestra a continuación y en el apartado Ejemplos siguiente, los presentes inventores han ilustrado, por primera vez, que se puede utilizar una suspensión de población celular aislada, concretamente a las 20-22 semanas de gestación humana (véase el ejemplo 1, en el apartado Ejemplos siguiente) para regenerar el tejido pulmonar y reanudar la funcionalidad pulmonar después de la administración.

- 5 Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que una población celular aislada de 20-22 semanas de gestación humana y un "intervalo" canalicular similar de tejido pulmonar embrionario de ratón, definido a los 15-16 días de gestación (véase el ejemplo 1, en el siguiente apartado Ejemplos), presentó los contenidos más altos de supuestos precursores pulmonares (incluidas las células progenitoras epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas) en comparación con los tejidos recogidos en momentos puntuales de gestación iniciales o después (véase el ejemplo 1, en el siguiente apartado Ejemplos). Además, la administración (p. ej., administración intravenosa) de suspensiones de células aisladas obtenidas a partir de tejidos de este intervalo de gestación consiguió una notable reparación pulmonar. Específicamente, las células precursoras de pulmón alojadas, diferenciadas e integradas en pulmones lesionados de ratones dando como resultado la formación de una unidad respiratoria completa incluida la formación de nuevas células epiteliales y nuevos vasos sanguíneos (véase el ejemplo 2, en el siguiente apartado Ejemplos). Además, este proceso se mejoró notablemente tras el posterior acondicionamiento de los ratones receptores usando tratamiento con naftaleno, con o sin irradiación corporal total (ICT) subletal, que conduce a hibridación sustancial y duradera en diferentes linajes celulares de los pulmones lesionados (véase el ejemplo 2, en el siguiente apartado Ejemplos). Tomados en conjunto, estos resultados corroboran el uso de suspensiones de células aisladas de tejido precursor de pulmón embrionario humano, recogidas a las 20-22 semanas de gestación, para el tratamiento de afecciones epiteliales, mesenquimatosas y endoteliales incluidas enfermedades y lesiones pulmonares.

- Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como principio activo una población aislada de la suspensión celular de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en la que el tejido pulmonar fetal se encuentra en una fase de desarrollo correspondiente a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 semanas de gestación.

- La frase "población aislada de la suspensión celular" como se emplea en la presente memoria se refiere a células que se han aislado de su entorno natural (p. ej., el cuerpo humano) se extraen del tejido mientras que se mantiene la viabilidad pero no se mantiene una estructura de tejido (es decir, estructura del tejido no vascularizado) y no están unidas a un soporte sólido.

Dependiendo de la aplicación, el método puede efectuarse usando una población aislada de la suspensión celular que comprende células clónicas o no clónicas (con respecto a un paciente).

Como se emplea en la presente memoria, el término células "clónicas" se refiere a células que esencialmente son genéticamente idénticas con el paciente o esencialmente con todos los linfocitos del paciente.

- 35 Los ejemplos de células clónicas incluyen células procedentes del paciente (también denominado en la técnica "autólogas"), de un clon del paciente, o de un gemelo idéntico del paciente.

Como se emplea en la presente memoria, la expresión células "no clónicas" se refiere a células que no son esencialmente genéticamente idénticas a las del paciente o esencialmente a todos los linfocitos del paciente, tales como células alogénicas o células xenogénicas.

- 40 Como se emplea en esta memoria, el término "alogénica" se refiere a una célula que procede de tejido pulmonar de un donante que es de la misma especie que el paciente, pero que es sustancialmente no clónica con el paciente. Generalmente, los mamíferos gemelos no cigóticos, no consanguíneos de la misma especie son alogénicos entre sí. Se apreciará que una célula alogénica pueda ser idéntica a ALH, parcialmente idéntica a ALH o diferente de ALH (es decir, que muestra uno o más determinantes de ALH dispares) con respecto al paciente.

- 45 Como se emplea en la presente memoria, el término "xenogénico" se refiere a una célula que expresa sustancialmente antígenos de una especie diferente con relación a la especie de una proporción sustancial de los linfocitos del paciente. Generalmente, los mamíferos consanguíneos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

- La presente invención prevé que las células xenogénicas se obtienen de una variedad de especies, tal como se describe con más detalle a continuación.

Las células o tejidos de origen xenogénico (p. ej., origen porcino) se obtienen preferiblemente a partir de una fuente que se sabe que está libre de zoonosis, tales como retrovirus endógenos porcinos. De forma similar, las células o tejidos procedentes de personas se obtienen preferiblemente a partir de fuentes sustancialmente exentas de patógenos.

- 55 Según una realización de la presente invención, el paciente es un ser humano y la población aislada de células es de origen humano (p. ej., un feto humano).

Dependiendo de la aplicación y las fuentes disponibles, las células de la presente invención pueden ser sin tratamiento previo o estar genéticamente modificadas. Dichas determinaciones están dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

5 Dado que es probable que las células no clónicas provoquen una reacción inmunitaria cuando se administran al paciente, se han desarrollado varios métodos para reducir la probabilidad de rechazo de células no clónicas. Estos incluyen suprimir el sistema inmunitario del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas inmunoaislantes, semipermeables antes del trasplante. Alternativamente, las células pueden ser usos que no expresan antígenos de superficie xenogénicos, como los desarrollados en animales transgénicos (p. ej., cerdos).

10 La expresión "tejido pulmonar" como se emplea en esta memoria se refiere a un tejido u órgano pulmonar. El tejido pulmonar de la presente invención puede ser un órgano o tejido completo o parcial. Por lo tanto, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender el pulmón derecho, el pulmón izquierdo o ambos. El tejido pulmonar de la presente invención puede comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco lóbulos (del pulmón derecho o izquierdo). Además, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender uno o más segmentos pulmonares o lóbulos pulmonares. Además, el tejido pulmonar de la presente invención puede comprender cualquier  
15 número de bronquios y bronquiolos (p. ej., el árbol bronquial) y cualquier número de alvéolos o sacos alveolares.

Según una realización de la presente invención, el tejido pulmonar se encuentra en una fase de desarrollo que corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de aproximadamente 20 a aproximadamente 21 días de gestación, aproximadamente 20,5 a aproximadamente 21,5 días de gestación, aproximadamente de 20 a aproximadamente 22 días de gestación, aproximadamente 21 a aproximadamente 22  
20 días de gestación.

Según la invención, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 días de gestación.

Según otra realización específica, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de aproximadamente 21 a aproximadamente 22 días de  
25 gestación.

Según otra realización específica, el tejido pulmonar está en una fase de desarrollo que corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación de aproximadamente 20 a aproximadamente 21 días de gestación.

Como se ha mencionado, el tejido pulmonar de la presente invención se obtiene de un organismo de mamífero.

30 Por lo tanto, el tejido pulmonar de la presente invención puede proceder de cualquier mamífero. Los orígenes de especies adecuadas para el tejido pulmonar comprenden los principales animales domesticados o el ganado, y los primates, que se han caracterizado ampliamente con respecto a la correlación de la fase de diferenciación con la fase de gestación. Dichos animales incluyen ganado porcino (p. ej., cerdos), bovino (p. ej., vacas), equino (p. ej., caballos), ovino (p. ej., cabras, ovejas), felinos (p. ej., *Felis domestica*), caninos (p. ej., *Canis domestica*), roedores  
35 (p. ej., ratón, rata, conejo, conejillo de indias, jerbo, hámster) y primates (p. ej., chimpancé, macaco de la India, macaco, tití).

Según una realización específica, el tejido pulmonar procede de un ser humano.

Según una realización específica, el tejido pulmonar procede de un organismo no humano.

40 Se pueden emplear diversos métodos para obtener un tejido pulmonar en una fase de desarrollo que corresponde esencialmente a la de un tejido pulmonar obtenido de seres humanos, como se ha dado a conocer actualmente. La obtención de dicho tejido pulmonar se puede realizar recogiendo el tejido pulmonar de un feto en desarrollo en dicha fase de gestación (es decir, correspondiente a las 20-22 semanas de gestación del ser humano), p. ej., por un procedimiento quirúrgico. Los expertos en la técnica entenderán que la fase de gestación de un organismo es el período de tiempo transcurrido después de la fertilización del ovocito que genera el organismo.

45 Alternativamente, puede obtenerse un tejido pulmonar en una fase de desarrollo deseada por cultivo *in vitro* de células, órganos/tejidos. Dicha diferenciación *in vitro* controlada de células, tejidos u órganos se lleva a cabo rutinariamente, por ejemplo, usando cultivo de estirpes de células madre embrionarias para generar cultivos que contienen células/tejidos/órganos de linajes deseados. Por ejemplo, para la generación de linajes pulmonares, consultar, por ejemplo, a Otto W. R., 1997. *Int. J. Exp. Pathol.* 78: 291-310.

50 La tabla siguiente proporciona un ejemplo de las fases de gestación de tejidos pulmonares humanos y porcinos en los cuales estos pueden proporcionar tejidos pulmonares que están esencialmente en las fases de desarrollo correspondientes:

Tabla 1: Fases de gestación correspondientes de cerdos y seres humanos

Fase de gestación de tejido pulmonar porcino (días)	Fase de gestación de tejido pulmonar humano (días*)
18	44
20	49
22	54
23	56-57
25	61-62
26	63
28	68-69
31	75
38	92
42	102
46	112
49	119
56	136
62	151
72	175
80	195
88	214

La fase de gestación (en días) de un tejido pulmonar perteneciente a una especie determinada que se encuentra en una fase de desarrollo que corresponde esencialmente a la de un tejido pulmonar porcino puede calcularse según la siguiente fórmula: [fase de gestación del tejido pulmonar porcino en días] / [período de gestación del cerdo en días] x [fase de gestación del tejido pulmonar de una especie dada en días]. De forma similar, la fase de gestación (en días) de un tejido pulmonar perteneciente a una especie determinada que se encuentra en una fase de desarrollo que corresponde esencialmente a la de un tejido pulmonar humano puede calcularse según la siguiente fórmula: [fase de gestación del tejido pulmonar humano en días] / [período de gestación de seres humanos en días] x [fase de gestación del tejido pulmonar de una especie dada en días]. La fase de gestación de cerdos es de aproximadamente 115 días y la de seres humanos de aproximadamente 280 días.

\* para el cálculo semanal dividir los números por 7.

Una vez se obtiene el tejido pulmonar fetal, la presente invención contempla además la generación de una población aislada de células a partir del mismo.

Como se emplea en esta memoria, "suspensión de células aisladas" se refiere a una suspensión de células aisladas pulmonares fetales que comprende células aisladas o agregados celulares de no más de 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 1.500, 2.000 células en un agregado.

La suspensión de células aisladas de la presente invención puede obtenerse por cualquier medio mecánico o químico (p. ej., enzimático). Existen varios métodos para disociar grupos de células para formar suspensiones de células aisladas de tejidos primarios, células unidas en cultivo y agregados, p. ej., fuerzas físicas (disociación mecánica tal como raspador de células, trituración a través de una pipeta de agujero estrecho, aspiración con aguja fina, disgregación en vórtice y filtración forzada a través de una malla de nilón fino o acero inoxidable), enzimas (disociación enzimática tal como tripsina, colagenasa, Acutasa y similares) o combinación de ambas.

Por lo tanto, por ejemplo, la digestión enzimática del tejido pulmonar fetal en células aisladas se puede realizar sometiendo el tejido a una enzima tal como colagenasa tipo IV (Worthington biochemical corporation, Lakewood, NJ, EE. UU.) y/o dispasa (productos de Invitrogen Corporation, Grand Island NY, EE. UU.). Por ejemplo, el tejido pulmonar puede ser digerido por enzimas picando finamente el tejido con una hoja de afeitar en presencia de, p. ej.

colagenasa, dispasa y  $\text{CaCl}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 1 hora. El método puede comprender además la eliminación de restos no específicos de la suspensión celular resultante mediante, por ejemplo, filtración secuencial a través de filtros (por ejemplo filtros de 70 y 40  $\mu\text{m}$ ), esencialmente como se describe en "Materiales generales y métodos experimentales" del apartado Ejemplos más adelante.

- 5 Además, la disociación mecánica del tejido pulmonar fetal en células aisladas se puede realizar usando un dispositivo diseñado para cortar el tejido en un tamaño predeterminado. Dicho dispositivo puede adquirirse en CellArtis Goteborg, Suecia. Además o alternativamente, la disociación mecánica se puede realizar manualmente usando una aguja tal como una aguja de 27 g (BD Microlance, Drogheda, Irlanda) mientras se observa el tejido/células bajo un microscopio invertido.
- 10 Después de la disociación enzimática o mecánica del tejido pulmonar fetal, las células pulmonares fetales disociadas se cortan aún más en pequeñas masas utilizando puntas de pipeta Gilson de 200  $\mu\text{l}$  (p. ej., pipeteando arriba y abajo las células).

Según la presente invención, la suspensión de células aisladas de células pulmonares fetales humanas comprende células viables. La viabilidad celular se puede controlar usando cualquier método conocido en la técnica, como por ejemplo, usando un ensayo de viabilidad celular (p. ej., MultiTox Multiplex Assay disponible en Promega), citometría de flujo, azul de tripano, etc.

- Generalmente, la población aislada de células pulmonares fetales se usa inmediatamente para el trasplante. Sin embargo, en situaciones en las que las células deben mantenerse en suspensión antes del trasplante, p. ej., durante 1-12 horas, las células pueden cultivarse en un medio de cultivo que sea capaz de soportar su viabilidad. Dicho medio de cultivo puede ser un medio acuoso que incluye una combinación de sustancias tales como sales, nutrientes, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas tales como citocinas, factores de crecimiento y hormonas, todos los cuales son necesarios para mantener la población aislada de células pulmonares fetales en un estado viable. Por ejemplo, un medio de cultivo según este aspecto de la presente invención puede ser un medio de cultivo histórico sintético tal como Ko-DMEM (productos de Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE. UU.), DMEM/F12 (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), medio Mab ADCB (HyClone, Utah, EE. UU.) o DMEM/F12 (Biological Industries, Biet Haemek, Israel) enriquecido con los aditivos necesarios. Preferiblemente, todos los ingredientes incluidos en el medio de cultivo de la presente invención son sustancialmente puros, con una calidad de cultivo histórico.
- 20
- 25

Las células aisladas del tejido pulmonar fetal pueden comprender una población heterogénea de células.

- 30 Según una realización, la población aislada de la suspensión celular comprende células progenitoras. Las células progenitoras pueden comprender, por ejemplo, células progenitoras epiteliales, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras hematopoyéticas y/o células progenitoras endoteliales.

Según una realización, las células comprenden una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+).

- 35 Según una realización, las células comprenden una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+) y citoqueratina 14+ (CK14+).

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador c-Kit+ CD45- CD34-.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador c-Kit+ CD45- CD34- CD31- CD326- CD271.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador c-Kit+ CD34+.

- 40 Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador c-Kit+ CD34+ CD31+.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador c-Kit+ CD34+ CD326+.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador CD34+ CD31+ CD14+ CD45+.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador CD34+ CD31+ CD45- CD105+.

Según una realización, las células comprenden una expresión de marcador nestina+.

- 45 Según una realización, las células comprenden una expresión del marcador de proteína+ (PRGC+) relacionado con el gen de calcitonina.

Según una realización, las células comprenden una expresión del marcador alfa actina+ (alfa-SMA+) del músculo liso.

Según una realización, las células comprenden una expresión del marcador Vimentina+.

Según una realización específica, cada una de las poblaciones de células mencionadas anteriormente puede ser de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de purificación.

La purificación de tipos celulares específicos puede llevarse a cabo por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como por ejemplo, mediante purificación por afinidad (p. ej., mediante el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcaje por ELISA de captura) usando anticuerpos específicos que reconocen cualquiera de los marcadores de células descritos anteriormente (p. ej., CK5, CK14, c-Kit, CD31, CD34, CD45, CD105, CD271, CD326, etc.).

- 5
- Según una realización de la presente invención, la población aislada de la suspensión celular comprende una mezcla no purificada de la población aislada de células pulmonares fetales.
- 10 Según otra realización, la población aislada de la suspensión celular comprende una población de células pulmonares fetales específica del tipo de células (como se indica con más detalle anteriormente). El aislamiento de dichas células puede llevarse a cabo por cualquier método conocido por el experto en la técnica, como por ejemplo, mediante purificación por afinidad (p. ej., tal como mediante el uso de perlas MACS, clasificador FACS y/o marcaje por ELISA de captura, como se mencionó anteriormente) o mediante erradicación (p. ej., destrucción) de células no
- 15

deseadas con anticuerpos específicos dirigidos a las mismas.

Se apreciará que las células en la población aislada de células de la suspensión celular son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional, incluida la generación de un pulmón híbrido. El pulmón híbrido comprende estructuras alveolares, bronquiales y/o bronquiolares, y/o estructuras vasculares. Además, el tejido pulmonar estructural/funcional comprende la capacidad de sintetizar tensioactivo [p. ej., proteína secretora de células de Clara (CCSP), acuaporina-5 (AQP-5) y proteína C tensioactiva (sp-C)], detectable por tinción celular específica, y/o una capacidad para transportar iones (p. ej., como se indica por tinción para regulador transmembrana de fibrosis quística RTFQ). Las células en la población aislada de la suspensión celular son además capaces de regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial (p. ej., tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial, indicado por la formación de un tejido pulmonar híbrido completo que comprende todos estos componentes).

- 20
- 25 Por lo tanto, el uso de células aisladas del tejido pulmonar fetal es especialmente beneficioso en situaciones en las que hay necesidad de regenerar tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial, incluido tejido pulmonar.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención.

- 30
- Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para tratar un enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención.

- 35 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para tratar un trastorno o lesión pulmonar en un paciente que lo necesita, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de algunas realizaciones de la presente invención. .

Como se emplea en esta memoria, la expresión "tejido epitelial" se refiere a un tejido que reviste cualquiera de las cavidades o superficies de las estructuras en todo el cuerpo de los mamíferos. Ejemplos de tejidos epiteliales incluyen, pero no están limitados al, tejido pulmonar, tejido del aparato digestivo, tejido de los órganos reproductores, tejido de las vías urinarias, tejido renal, tejido cutáneo, tejido isquémico, tejido cardíaco, tejido endotelial, tejido circulatorio y tejido cerebral.

- 40

Como se emplea en esta memoria, la expresión "tejido mesenquimatoso" se refiere a un tejido conectivo en el cuerpo del mamífero que procede principalmente de mesodermo. Ejemplos de tejidos mesenquimatosos incluyen, pero no se limitan a, los tejidos conectivos del cuerpo, la sangre y los vasos linfáticos.

- 45

Como se emplea en esta memoria, la expresión "tejido endotelial" se refiere a una capa delgada de células que reviste la superficie interior de los vasos sanguíneos y vasos linfáticos. Ejemplos de tejidos endoteliales incluyen, pero no se limitan a, tejidos linfáticos y tejidos del sistema circulatorio (p. ej., vasos sanguíneos).

Como se emplea en esta memoria, la expresión "regenerar un tejido" se refiere a la reconstrucción de un tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial de manera que se forma un tejido funcional (es decir, un tejido que funciona como tejido innato en la región especificada). Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, la regeneración se refiere a al menos aproximadamente un aumento del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial.

- 50

Cualquier método conocido por un experto en la técnica puede usarse para evaluar la regeneración de un tejido epitelial (p. ej., tejido pulmonar), tejido mesenquimatoso (p. ej., tejido conjuntivo) o tejido endotelial (p. ej., vasos

- 55

sanguíneos) como por ejemplo, usando rayos X, ultrasonidos, CT, MRI, tinción histológica de una muestra de tejido del tejido epitelial (p. ej., por tinción para proteínas secretoras de células de Clara (CCSP), acuaporina-5 y proteína C tensioactiva), tejido mesenquimatoso (p. ej., por tinción para la expresión de Vimentina<sup>+</sup>) o tejidos endoteliales (p. ej., por tinción para la expresión de CD31).

- 5 Como se emplea en esta memoria, los términos "sujeto" o "sujeto que lo necesita" se refieren a un mamífero, preferiblemente un ser humano, hombre o mujer de cualquier edad, que padece o está predispuesto a un daño o deficiencia del tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial como resultado de una enfermedad, trastorno o lesión.

- Como se emplea en esta memoria, el término "tratamiento" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la evolución de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o  
10 prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

- Como se emplea en esta memoria, la expresión "enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficiosa" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, afección o a cualquier afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica que implica una pérdida o deficiencia en el tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial. Generalmente, dicha  
15 enfermedad o afección incluye un trastorno, enfermedad o lesión pulmonar; un trastorno, enfermedad o lesión renal; un trastorno, enfermedad o lesión hepático; un trastorno, enfermedad o lesión del aparato digestivo; un trastorno, enfermedad o lesión de la piel; un trastorno, enfermedad o lesión vascular; un trastorno, enfermedad o lesión cardíaco; o un trastorno, enfermedad o lesión cerebral.

- Ejemplos de enfermedades o afecciones en las que la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, quemaduras cutáneas, úlceras cutáneas, heridas en la piel, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística, enfisema, asbestosis, fibrosis pulmonar (p. ej. fibrosis pulmonar idiopática), hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, insuficiencia pulmonar, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), hernia diafragmática congénita, síndrome de dificultad  
20 respiratoria del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia de proteína B tensioactiva (p. ej., insuficiencia de proteína B tensioactiva homocigótica), proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar, degeneración de la córnea y cáncer.

- Ejemplos de enfermedades o afecciones en las que la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, enfermedades o afecciones cardíacas, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos autoinmunitarios, leucemia y linfoma, cáncer (p. ej., cáncer de mama), anemia deprimada, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos.  
30

- Ejemplos de enfermedades o afecciones en las que la regeneración de tejido endotelial es beneficiosa incluyen, pero no se limitan a, enfermedades vasculares, isquemia, drepanocitosis, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunitarios [p. ej., lupus eritematoso disseminado (LED) y el síndrome de anticuerpos antifosfolípidicos (aPS)].  
35

- Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos concretos de enfermedades cancerosas incluyen, pero no están limitadas a: leucemia mieloide tal como la leucemia mielógena crónica. Leucemia mielógena aguda con maduración. Leucemia promielocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda con aumento de basófilos, leucemia monocítica aguda. Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia; linfoma maligno, tal como el no hodgkiniano de Burkitt; leucemia linfocítica, tal como la leucemia linfoblástica aguda. Leucemia linfocítica crónica; enfermedades mieloproliferativas, tales como tumores sólidos, meningioma benigno, tumores mixtos de las glándulas salivales, adenomas de colon; adenocarcinomas, tales como  
40 cáncer de pulmón microcítico, de riñón, de útero, de próstata, de vejiga, de ovario, de colon, sarcomas, liposarcoma, mixoide, sarcoma sinovial, rhabdomyosarcoma (alveolar), condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor de Ewing; otros incluyen el disgerminoma testicular y ovárico, retinoblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, melanoma maligno, mesotelioma, de mama, piel, próstata y ovario.

- Ejemplos de trastornos/enfermedades autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares (p. ej., aterosclerosis, trombosis, infarto de miocardio, etc.), enfermedades reumatoideas (p. ej., artritis reumatoide y espondilitis anquilosante), enfermedades glandulares (p. ej., enfermedad pancreática, diabetes tipo I, enfermedad tiroidea, enfermedad de Graves, tiroiditis, etc.), enfermedades gastrointestinales (p. ej., enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, enfermedad celiaquía, colitis, ileitis y enfermedad de Crohn), enfermedades cutáneas (p. ej., enfermedades cutáneas vesiculares autoinmunitarias, tales como, pero no limitadas a, pénfigo vulgar, pénfigo vesicular y pénfigo foliáceo), enfermedades hepáticas (p. ej., hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmunitaria), enfermedades neurológicas (p. ej., esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia grave, neuropatías, neuropatías motoras; Síndrome de Guillain-Barre y neuropatías autoinmunitarias, miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton; enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome del hombre rígido; síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías  
50  
55

autoinmunitarias; neuropatías disímunitarias; neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita, neuritis, neuritis óptica y enfermedades neurodegenerativas), enfermedades musculares (p. ej., miositis, miositis autoinmunitaria, síndrome de Sjogren primario y enfermedad autoinmunitaria de músculo liso), enfermedades nefríticas (p. ej., nefritis y nefritis intersticial autoinmunitaria), enfermedades relacionadas con la reproducción (p. ej., 5 pérdida fetal repetida), enfermedades del tejido conectivo (por ejemplo, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunitarias del oído y enfermedades autoinmunitarias del oído interno) y enfermedades diseminadas (p. ej., lupus eritematoso diseminado y esclerosis general). Como se emplea en esta memoria, la expresión "trastorno o lesión pulmonar" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, afección o a cualquier afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica que implique una pérdida o 10 insuficiencia en el tejido pulmonar.

Ejemplos de enfermedad o afección asociada a un trastorno o lesión pulmonar incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, enfisema, asbestosis, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar (p. ej., fibrosis pulmonar idiopática), hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, insuficiencia pulmonar, lesión pulmonar aguda (p. 15 ej. síndrome de dificultad respiratoria en adultos), hernia diafragmática congénita, síndrome de dificultad respiratoria de del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), insuficiencia de proteína B tensoactiva (p. ej., insuficiencia de proteína B tensoactiva homocigótica), proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

La administración de la población aislada de la suspensión celular al sujeto puede efectuarse de numerosas maneras, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo, fase o gravedad de la enfermedad 20 a tratar, los parámetros físicos o fisiológicos específicos del individuo, y/o el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y el propósito, la administración de la población aislada de la suspensión celular puede efectuarse por una vía seleccionada del grupo que consiste en intratraqueal, intrabronquial, intralveolar, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intracardiaca, intramuscular, intramuscular, intraserosa, transmucosa, transnasal, rectal e intestinal.

25 Según una realización, la administración se realiza por vía intravenosa.

Alternativamente, la administración de la población aislada de la suspensión celular al sujeto se puede efectuar por administración de la misma en diversos puntos anatómicos adecuados para que tengan efecto terapéutico. Por lo tanto, dependiendo de la aplicación y el propósito, la población aislada de células pulmonares fetales puede administrarse en un punto anatómico homotópico (un punto anatómico normal para el tipo de órgano o tejido de las 30 células), o en un punto anatómico ectópico (un punto anatómico anormal ubicación para el tipo de órgano o tejido de las células).

Por consiguiente, dependiendo de la aplicación y el propósito, la población aislada de células pulmonares fetales puede implantarse p. ej., trasplantarse) favorablemente bajo las cápsulas suprarrenales, o en el riñón, la grasa testicular, la hipodermis, el epiplón, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad cardíaca, el corazón, la cavidad 35 torácica, el pulmón, el páncreas, la piel y/o el espacio intrabdominal.

Por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o afección gastrointestinal, la población aislada de la suspensión celular de la presente invención puede administrarse en el hígado, la vena porta, las cápsulas suprarrenales, la hipodermis, el epiplón, el bazo, el espacio intrabdominal, el páncreas, la grasa testicular y/o un asa intestinal (la subserosa de un asa en U del intestino delgado). Para el tratamiento de una enfermedad o afección 40 pulmonar, la población aislada de la suspensión celular de la presente invención puede administrarse en el pulmón, bajo las cápsulas suprarrenales, el hígado, la vena porta, la hipodermis, el epiplón, el bazo, el espacio intrabdominal, el páncreas y/o la grasa testicular.

La población aislada de células pulmonares fetales de algunas realizaciones de la invención puede administrarse a un organismo propiamente dicho, o en una composición farmacéutica donde se mezcla con vehículos o excipientes 45 adecuados.

Como se emplea en esta memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a un preparado de uno o más de los principios activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

50 En la presente memoria la expresión "principio activo" se refiere a la población aislada de la suspensión celular de un tejido pulmonar fetal de mamífero responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse indistintamente se refieren a un vehículo o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está 55 incluido en estas frases.

En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar además la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes

incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en la presente memoria por referencia.

- 5 Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intracardiaca, p. ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

- 10 Los métodos convencionales para la administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína de fusión híbrida que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie de la célula endotelial en combinación con un agente que es incapaz de atravesar la BHE) en un intento de aprovechar una de las rutas de transporte endógeno de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (p. ej., conjugación
- 15 de agentes hidrosolubles con portadores de lípidos o colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la BHE por perturbación hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tal como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente a los sistemas de transporte endógeno, efectos
- 20 secundarios biológicos potencialmente indeseables relacionados con la administración generalizada de una molécula híbrida compuesta de un motivo portador que podría estar activo fuera del SNC, y el posible riesgo de daño cerebral en las regiones del cerebro donde se interrumpe la BHE, lo que lo convierte en un método de administración subóptimo.

- Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local en lugar de generalizada, por ejemplo, mediante inyección de la composición farmacéutica directamente en una región hística de un paciente (p. ej., tejido pulmonar).

Las composiciones farmacéuticas de algunas realizaciones de la invención se pueden fabricar por procesos bien conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

- 30 Las composiciones farmacéuticas para su uso según algunas realizaciones de la invención por lo tanto pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparados que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

- Para inyectables, los principios activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, la formulación se usan en penetrantes apropiados para la barrera a penetrar. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

- Para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la
- 40 composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Los preparados farmacológicos para uso oral pueden elaborarse usando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir excipientes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en especial, cargas tales como azúcares, incluidos lactosa, sacarosa,
- 45 manitol o sorbitol; preparados de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden agregarse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar-agar o ácido alginico o una de sus sales tal como alginato de sodio.

- 50 Los núcleos de grageas cuentan con revestimientos adecuados. Con este objeto, pueden usarse soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

- 55 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras de gelatina así como cápsulas blandas, selladas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los

principios activos pueden disolverse o ponerse en suspensión en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden agregarse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

5 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

10 Para administración por inhalación nasal, los principios activos para uso según algunas realizaciones de la invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverizador en aerosol en un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis individual puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un dispensador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

15 La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede formularse para administración parenteral, p. ej., por inyección intravenosa en emboladas o infusión continua. Las formulaciones para inyectables se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

20 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas del preparado activo en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los principios activos se pueden preparar en forma de suspensiones de inyección oleosas o acuosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas de inyectables pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para su redisolución con un vehículo adecuado, p. ej., una solución acuosa estéril, exenta de pirógenos, antes de su uso.

30 La composición farmacéutica de algunas realizaciones de la invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, p. ej., bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de algunas realizaciones de la invención incluyen composiciones en donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos (es decir, población aislada de la suspensión celular que comprende células pulmonares fetales) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., enfermedad epitelial, como enfermedad o afección pulmonar) o prolongar la supervivencia del paciente en tratamiento.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

40 Para cualquier preparado usado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

45 Un ejemplo de modelo animal que puede usarse para evaluar la cantidad terapéuticamente eficaz de una población aislada de células pulmonares fetales comprende el modelo animal murino (p. ej., ratones), en el que la lesión pulmonar se provoca mediante, p. ej., inyección intraperitoneal de naftaleno (p. ej., más del 99% puro) con o sin más irradiación (p. ej., 40-48 horas después de la administración de naftaleno), como se describe en detalle en el apartado Ejemplos más adelante.

50 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en la presente memoria se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden seleccionarse por cada médico a la vista de la afección del paciente. (Véase, p. ej., Fingl, *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1, pág. 1).

La cantidad de la dosis y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar amplias cantidades de principio activo que sean suficientes para producir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, CEM). La CEM variará para cada preparado, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para conseguir la CEM dependerán de las características individuales y la vía de administración. Los ensayos de  
5 detección se pueden usar para determinar las concentraciones en el plasma.

Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosis puede ser de una sola o varias administraciones, con un curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produzca la curación o se consiga la disminución de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del paciente que se trate, la gravedad de la  
10 afección, la forma de administración, el criterio del médico, etc.

Según una realización, la población aislada de la suspensión celular comprende al menos aproximadamente  $0,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $0,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $3,5 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $4,5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5,5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $7,5 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $8,5 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $9,5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal del paciente.

15 Según una realización específica, la población aislada de suspensión celular comprende al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por kilogramo de peso corporal del paciente.

Las composiciones de algunas realizaciones de la invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de  
20 plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para administración. El envase o dispensador también puede acomodarse mediante un aviso relacionado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la U.S.  
25 Food and Drug Administration para medicamentos de venta con receta o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden un preparado de la invención formulado en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se indicó con más detalle anteriormente.

Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, lo que implica vehículos esféricos pequeños, y macroencapsulación, lo que implica membranas de hoja plana y fibra hueca más grandes (Uludag, H. *et al.*, 2000). Technology of mammalian cell encapsulation. Adv. Drug Deliv. Rev. 42, 29-64).

Los métodos para preparar microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos en: Lu, M. Z. *et al.* (2000) Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poli(allylamine). *Biotechnol. Bioeng.* 70, 479-483; Chang, T. M. y Prakash, S. (2001) Procedures for  
35 microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. *Mol. Biotechnol.* 17, 249-260; and Lu, M. Z., *et al.* (2000). A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate). *J. Microencapsul.* 17, 245-521.

Por ejemplo, las microcápsulas se preparan utilizando colágeno modificado en un complejo con una envoltura de terpolímero de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), lo que da como resultado un espesor de cápsula de 2-5  $\mu\text{m}$ . Dichas microcápsulas pueden encapsularse además con 2-5  
40  $\mu\text{m}$  adicionales de envolturas de terpolímeros con el fin de dar una superficie lisa cargada negativamente y para minimizar la absorción de proteína del plasma (Chia, S. M. *et al.* (2002). Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. *Biomaterials* 23, 849-856).

Otras microcápsulas son a base de alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. (2003). Encapsulated islets in diabetes treatment. *Diabetes Technol. Ther.* 5, 665-668), o sus derivados. Por ejemplo, pueden prepararse microcápsulas por complejación de polielectrolitos entre los polianiones alginato de sodio y sulfato de celulosa  
45 sódica y el polication hidrocioruro de poli(metilen-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

Se apreciará que la encapsulación celular mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Por lo tanto, por ejemplo, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se redujo de 1 mm a 400  $\mu\text{m}$  (Canaple, L. *et al.*  
50 (2002). Improving cell encapsulation through size control. *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 13, 783-96). Además, se descubrió que las biocápsulas nanoporosas con tamaño de poro bien controlado de tan solo 7 nm, con composiciones químicas de superficie adaptadas y microarquitecturas precisas inmovilizan con éxito los microambientes para células (Véase: Williams, D. (1999). Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices. *Med. Device Technol.* 10, 6-9 y Desai, T. A. (2002). Microfabrication technology for  
55 pancreatic cell encapsulation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 633-646).

Como se menciona, para facilitar el injerto de células no clónicas, la presente invención contempla además tratar al paciente con un régimen de inmunosupresión antes, junto con o después de la administración de la población aislada de la suspensión celular.

5 Una orientación amplia para seleccionar y administrar regímenes inmunodepresores adecuados para trasplantes se proporciona en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, véase: Kirkpatrick C. H. y Rowlands D. T. Jr., 1992. *JAMA*. 268, 2952; Higgins R. M., *et al.*, 1996. *Lancet* 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom T. B., 1996. *New Engl. J. Med.* 331, 365; Midthun D. E. *et al.*, 1997. *Mayo Clin. Proc.* 72, 175; Morrison V. A. *et al.*, 1994. *Am. J. Med.* 97, 14; Hanto D. W., 1995. *Annu. Rev. Med.* 46, 381; Senderowicz A. M. *et al.*, 1997. *Ann. Intern. Med.* 126, 882; Vincenti F. *et al.*, 1998. *New Engl. J. Med.* 338, 161; Dantal J. *et al.*, 1998. *Lancet* 351, 623).

10 Según una realización, el régimen inmunodepresor consiste en administrar al menos un agente inmunodepresor al paciente.

Los ejemplos de agentes inmunodepresores incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, tacrolimus, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE), etanercept, Copaxona, prednisona, metilprednisolona, azatiopreno, ciclofosfamida y fludarabina, CTLA4-Ig, anticuerpos anti CD40, anticuerpos anti ligando CD40, anticuerpos anti B7, anticuerpos anti CD3 (por ejemplo, anticuerpo OKT3 anti CD3 humano), micofenolato mofetilo, daclizumab [un anticuerpo de la cadena alfa (CD25) anti-IL2R humanizado (IgG1 Fc)], y anticuerpos anti linfocitos T conjugados con toxinas (por ejemplo, cadena A del cólera, o toxina de *Pseudomonas*), bloqueadores de TNF.alfa., un agente biológico que se dirige a una citocina inflamatoria, y un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), incluidos, ácido acetilsalicílico, salicilato de magnesio y colina, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, paracetamol, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2, tramadol, rapamicina (sirolimus) y análogos de rapamicina (tales como CCI-779, RAD001, AP23573). Estos agentes pueden administrarse individualmente o en combinación.

15  
20  
25

Dependiendo del tipo de células y la enfermedad o afección a tratar, y para facilitar el injerto de la población aislada de células pulmonares fetales, el método puede comprender más favorablemente acondicionar al paciente en condiciones subletales, letales o supraletales antes de la administración de la población aislada de la suspensión celular.

30

Como se usa en esta memoria, los términos "subletal", "letal" y "supraletal", cuando se refieren al acondicionamiento de pacientes de la presente invención, se refieren a tratamientos mielotóxicos y/o linfocitotóxicos que, cuando se aplican a una población representativa de los pacientes, respectivamente, son generalmente: no letales para esencialmente todos los miembros de la población; letales para algunos pero no para todos los miembros de la población; o letales para esencialmente todos los miembros de la población en condiciones normales de esterilidad.

35

Según una realización, el acondicionamiento comprende la irradiación corporal total (ICT), la irradiación linfóide total (ILT, es decir, la exposición de todos los ganglios linfáticos, timo y bazo), la irradiación corporal parcial (p. ej., la exposición específica de los pulmones, riñones, cerebro, etc.), el acondicionamiento mieloablativo, el bloqueo coestimulador, la inmunoterapia con agentes quimioterapéuticos y/o con anticuerpos.

40 Como se ilustra más adelante en el apartado Ejemplos, el acondicionamiento de un paciente utilizando naftaleno induce la ablación específica en el sitio de células de Clara en bronquiolos respiratorios y en uniones broncoalveolares y por lo tanto facilita el injerto de la población aislada de células pulmonares fetales. Para eliminar de manera más eficaz células madre de pulmón residenciales (que pueden proliferar rápidamente después del tratamiento con naftaleno), el paciente se sometió además a ICT subletal (p. ej., 6 Gy) antes de la administración de la población aislada de células pulmonares fetales (véase el ejemplo 2 del apartado Ejemplos más adelante).

45

Por lo tanto, según una realización de la presente invención, el protocolo de acondicionamiento comprende el tratamiento con naftaleno.

Según una realización, el tratamiento con naftaleno se administra al paciente 1-10 días (p. ej., 3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión celular.

50 Según una realización, el acondicionamiento comprende tratamiento con naftaleno y tratamiento de ICT.

Según una realización, el ICT comprende una dosis de irradiación única o fraccionada en el intervalo de 0,5-1 Gy, 0,5-1,5 Gy, 0,5-2,5 Gy, 0,5-5 Gy, 0,5-7,5 Gy, 0,5-10 Gy, 0,5-15 Gy, 1-1,5 Gy, 1-2 Gy, 1-2,5 Gy, 1-3 Gy, 1-3,5 Gy, 1-4 Gy, 1-4,5 Gy, 1-1,5 Gy, 1-7,5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy o 10-15 Gy.

55

Según una realización específica, el ICT comprende una dosis de irradiación única o fraccionada dentro del intervalo de 1-7,5 Gy.

Según una realización, el tratamiento de ICT se administra al paciente 1-10 días (p. ej., 1 - 3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión celular.

- 5 Según una realización, el tratamiento con naftaleno se administra al paciente 2-10 días (p. ej. 3 días) antes de la administración de la población aislada de la suspensión celular y el tratamiento de ICT se administra al paciente 40-48 horas después (p. ej. 1 día) antes a la administración de la población aislada de la suspensión celular.

- 10 Según una realización, cuando se usa irradiación corporal parcial, la exposición es específica para un órgano o tejido a tratar (p. ej., pulmones, riñones, hígado, páncreas, cerebro, etc.). En tales casos, es aconsejable proteger los órganos del cuerpo no irradiados para evitar el daño no deseado de órganos/tejidos.

- 15 Según una realización, el acondicionamiento comprende un agente quimioterapéutico (p. ej., agentes mieloablativos). Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, Busulfán, Mylerán, Busulfex, Fludarabina, Melfalán, Dimetil milerán y Tiotepa y ciclofosfamida. Los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse al paciente en una sola dosis o en varias dosis, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (p. ej., dosis diarias) antes del trasplante.

- 20 Según una realización, el acondicionamiento comprende una inmunoterapia de anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-CD52 (p. ej., Alemtuzumab vendido bajo los nombres comerciales de, p. ej., Campath, MabCampath, Campath-1H y Lemtrada) y un agente antitimocito globulina (ATG) [p. ej., Timoglobulina (ATG de conejo, rATG, disponible en Genzyme) y Atgam (ATG equina, eATG, disponible en Pfizer)]. Según una realización, el anticuerpo se administra al paciente en una dosis única o en varias dosis, p. ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis (p. ej., dosis diarias) antes del trasplante.

- 25 Según una realización, el acondicionamiento comprende el bloqueo coestimulador. Así, p. ej., el acondicionamiento puede comprender administrar temporalmente al paciente al menos un inhibidor de coestimulación de linfocitos T y al menos un inhibidor de ligando CD40, y más preferiblemente puede comprender además administrar al paciente un inhibidor de proliferación de linfocitos T.

Según una realización, el inhibidor de coestimulación de linfocitos T es CTLA4-Ig, el inhibidor de ligando CD40 es anticuerpo de ligando anti-CD40 y el inhibidor de la proliferación de linfocitos T es rapamicina. Alternativamente, el inhibidor de coestimulación de linfocitos T puede ser un anticuerpo anti-CD40. Alternativamente, el inhibidor de coestimulación de linfocitos T puede ser un anticuerpo específico para B7-1, B7-2, CD28, anti-LFA-1 y/o anti-LFA3.

- 30 Después del trasplante de la población aislada de la suspensión celular en el paciente según las presentes enseñanzas, es aconsejable, según la práctica médica habitual, controlar la funcionalidad del crecimiento y la inmunocompatibilidad de las células trasplantadas según una cualquiera de las diversas técnicas convencionales. Por ejemplo, la funcionalidad de los tejidos pulmonares regenerados puede controlarse después del trasplante mediante pruebas de función pulmonar habituales (p. ej., análisis de propiedades funcionales de los implantes en desarrollo, indicados por la capacidad de sintetizar tensioactivo, detectable mediante tinción de
- 35 proteína C tensioactiva (sp-C) ) y la capacidad para transportar iones, indicada por la tinción para el regulador transmembrana de la fibrosis quística RTFQ).

- 40 La población aislada de células pulmonares fetales descrita en la presente memoria puede almacenarse individualmente o puede estar comprendida en un banco, clasificándose cada población según un parámetro particular (p. ej., tipo ALH).

- 45 Por tanto, según otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un banco de células que comprende un gran número de poblaciones celulares aisladas de tejidos pulmonares fetales de mamífero, en donde los tejidos pulmonares fetales están en una fase de desarrollo esencialmente correspondiente a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 semanas de gestación, y en donde el gran número de poblaciones celulares se han tipado con ALH para formar un banco de células alogénicas, cada una individualmente dispuesta dentro de recipientes separados.

Según una realización, el órgano/tejido pulmonar humano está en una fase de gestación tal como la descrita con detalle en la presente memoria anteriormente.

- 50 Según una realización, el banco no comprende células de fases de gestación distintas a las mencionadas anteriormente.

Según una realización, el banco no comprende células de fases de gestación distintas a las 20-22 semanas de gestación anteriores.

Según una realización, el banco no comprende células de tejidos distintos al pulmón.

Según una realización, el banco no comprende células de tejidos posnatales o de adultos.

5 El banco de células pulmonares fetales de mamífero de este aspecto de la presente invención es una colección física de una o más poblaciones de células pulmonares fetales de mamíferos provenientes de fetos en una edad de gestación correspondiente a 20-22 semanas de gestación humana. Dichos bancos preferiblemente contienen más de una muestra (es decir, alícuota) de cada población de células pulmonares fetales. La recogida de poblaciones de células pulmonares fetales se describió anteriormente. Las poblaciones de células pulmonares fetales pueden provenir de diversos organismos de mamíferos, tal como se describió anteriormente.

10 Las poblaciones de células pulmonares fetales se almacenan en condiciones apropiadas (generalmente por congelación) para mantener las células (p. ej., células progenitoras) vivas y en funcionamiento. Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales se almacenan como poblaciones conservadas en el congelador. Otros métodos de conservación se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.656.498, n° 5.004.681, n° 5.192.553, 5.955.257 y n° 6.461.645. Los métodos para depositar células madre se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2003/0215942.

15 Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales almacenadas en el banco se caracterizan según características predeterminadas incluidas, pero no limitadas a, características morfológicas, perfil de diferenciación, tipo de sangre, complejo mayor de histocompatibilidad [antígeno leucocitario humano (ALH)], enfermedad del donante o información genotípica relacionada o no relacionada con una enfermedad o afección.

Según una realización, las poblaciones de células pulmonares fetales almacenadas en el banco se caracterizan según la tipificación de ALH.

20 Según una realización, el banco de células comprende además un catálogo que comprende información sobre las características predeterminadas (p. ej., células de tipo ALH) de las poblaciones de células pulmonares fetales.

25 La catalogación puede constituir la creación de un registro centralizado de las características obtenidas para cada población de células, tal como, pero no limitado a, un registro escrito ensamblado o una base de datos informática con la información ingresada en el mismo. El banco de células pulmonares fetales facilita la selección de un gran número de muestras de una muestra específica de células pulmonares fetales adecuadas para las necesidades de un investigador o un médico.

30 Según otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para aislar células progenitoras pulmonares fetales de mamífero, que comprende: (a) obtener un tejido pulmonar fetal de mamífero, en donde el tejido pulmonar fetal se encuentra en una fase de desarrollo que corresponde esencialmente al de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada de un intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 22 semanas de gestación; (b) detectar la expresión del marcador en células de tejido pulmonar fetal de un marcador seleccionado del grupo que consiste en CK5, CK14, CD271, CD34, c-Kit, CD326, CD31 y CD45 y una combinación de los mismos; y (c) aislar las células que presentan la expresión del marcador, aislando de este modo las células progenitoras pulmonares fetales de mamífero.

35 Según una realización, la población aislada de células comprende al menos dos veces más células CK5+ en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 15 o 17 semanas de gestación.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado células epiteliales recién formadas en pequeños bronquiolos de un pulmón del paciente.

40 Según una realización, la población aislada de células da como resultado la expresión de células Pneumocyte tipo 1 y/o células Pneumocyte tipo 2 en unos alvéolos de un pulmón del paciente.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado una expresión de células CD31<sup>+</sup> en un vaso sanguíneo de un pulmón del paciente.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado conductos alveolares más amplios en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 18 semanas de gestación.

45 Según una realización, la población aislada de células da como resultado paredes alveolares más delgadas en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 18 semanas de gestación.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado más estructuras bronquiales y bronquiolares en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 18 semanas de gestación.

50 Según una realización, la población aislada de células no da como resultado la formación de quistes en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 15 o 24 semanas de gestación.

Según una realización, la población aislada de células da como resultado la expresión positiva de la proteína C tensioactiva (sp-C) y/o RTFQ en comparación con un tejido u órgano pulmonar obtenido en aproximadamente 15 o 24 semanas de gestación.

Como se emplea en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

- 5 La terminología "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluido pero no limitado a".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

- 10 La expresión "consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

Tal como se emplea en esta memoria, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir un gran número de compuestos, incluidas las mezclas de los mismos.

- 15 En toda esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos así como cada uno de los valores numéricos dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como del 1 al 6 tiene subintervalos descritos específicamente, tal como del 1 al 3, del 1 al 4, del 1 al 5, del 2 al 4, del 2 al 6, del 3 al 6, etc., así como a los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

- 20 Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria, quiere decir que incluye cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y " que varía/varía desde" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se emplean indistintamente y quiere decir que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

- 25 Como se emplea en esta memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada incluidos, pero no limitados a, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras conocidas, medios, técnicas y procedimientos por profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

- 30 Se aprecia que algunas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuada en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se delinearon anteriormente y como se reivindica en la apartado de reivindicaciones más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

#### 40 Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no restrictiva.

- 45 Generalmente, la nomenclatura empleada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, p. ej., "Molecular Cloning: A laboratory Manual", Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology " Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vols. 1-4, Cold Laboratory Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se expone en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, C. T. (1994); Mishell y Shiigi (eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoanálisis disponibles están ampliamente descritos en la bibliografía científica y de

patentes, véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 3.791.932; nº 3.839.153; nº 3.850.752; nº 3.850.578; nº 3.853.987; nº 3.867.517; nº 3.879.262; nº 3.901.654; nº 3.935.074; nº 3.984.533; nº 3.996.345; nº 4.034.074; nº 4.098.876; nº 4.879.219; nº 5.011.771 y nº 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

- 10 Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Materiales generales y procedimientos experimentales

Xenotrasplantes de pulmón fetal

*Animales*

- 15 Los animales se mantuvieron en las condiciones aprobadas por el Institutional Animal Care and Use Committee en el Weizmann Institute. Las cepas de ratones utilizadas incluían: NOD-SCID, RAG <sup>-/-</sup>, Balb- Nude, C57BL/6J (CD45.2) y C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J. Todos los ratones tenían entre 6 y 10 semanas de edad. Se mantuvieron en jaulas pequeñas (hasta cinco animales en cada jaula) y se les alimentó con alimentos estériles y agua ácida.

- 20 Procedimientos animales

*Procedimiento de trasplante*

Los trasplantes de los tejidos precursores embrionarios se realizaron bajo anestesia general (2,5% de 2,2,2-tribromoetanol, 97% en PBS, 10 ml/kg administrados por vía intraperitoneal) como se describió anteriormente [Katchman H. *et al.*, *Stem Cells* (2008) 26 (5): 1347-55].

- 25 *Implantación bajo las cápsulas suprarrenales*

El riñón del anfitrión se expuso a través de una incisión lateral izquierda. Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de las cápsulas suprarrenales, y los tejidos precursores del donante se injertaron bajo las cápsulas suprarrenales en fragmentos de 1-2 mm de diámetro.

- 30 Se obtuvieron tejidos pulmonares fetales humanos, de 15 a 24 semanas de gestación, de abortos legales cuando se obtuvo el consentimiento informado por escrito para el uso de tejido pulmonar según un protocolo aprobado por el Comité de Ética de Helsinki. La edad fetal se determinó en función de la información clínica y se confirmó mediante mediciones de la longitud del pie fetal. Para asegurar que el tejido del trasplante procede del pulmón fetal, solo se usaron lóbulos pulmonares completos para la preparación de tejido del xenotrasplante. Las vías respiratorias inferiores recientes se cortaron en condiciones estériles en piezas de 1-3 mm<sup>3</sup>. La intervención quirúrgica se realizó en ratones inmunodeficientes anestesiados y se colocó tejido pulmonar fetal humano bajo las cápsulas suprarrenales de cada ratón (una pieza). Los xenotrasplantes se recogieron en diferentes momentos después del trasplante.

- 40 Para el trasplante clónico de pulmón embrionario de ratón bajo las cápsulas suprarrenales de ratones C57BL, se recogieron pulmones de diferentes embriones en edad de gestación (14-17 días de gestación) y se injertaron bajo las cápsulas suprarrenales en fragmentos de 1-2 mm de diámetro. Para asegurar que el tejido del trasplante procedía del pulmón fetal, solo se usaron lóbulos pulmonares completos para la preparación del tejido del trasplante.

Los animales que recibieron implantes se sacrificaron a las 2-20 semanas después del trasplante. Los riñones que llevaban los injertos trasplantados se extrajeron entonces y se fijaron en paraformaldehído al 4% o se conservaron congelados.

- 45 Las secciones de tejido se tiñeron de forma rutinaria con hematoxilina y eosina (H&E). La evaluación de la diferenciación y función del trasplante se realizó mediante marcaje histoquímico e inmunohistoquímico.

*Análisis morfométrico*

- 50 Los pulmones embrionarios humanos de diferentes edades de gestación se congelaron en el compuesto de temperatura de corte óptima (TCO) y se cortaron en cryocut. Se tiñeron secciones de 12  $\mu$ m consecutivas con anticuerpo primario anti-CK5 humano de conejo (Abeam) y anticuerpo secundario anti-Day Light 594 de conejo en burro. Las áreas de interés se cuantificaron utilizando el programa Image Pro (Media Cybernetics, Crofton, MD). Se analizaron al menos 3-4 muestras diferentes de pulmones de la misma edad de gestación.

*Lesión pulmonar por naftaleno*

Para los estudios de lesiones pulmonares, se les administró a los ratones una inyección intraperitoneal de naftaleno (más del 99% puro; Sigma-Aldrich), disuelto en aceite de maíz, 200 mg por kg de peso corporal, 40-48 horas antes del trasplante].

- 5 Para la lesión en "ambos pulmones", los animales tratados con naftaleno se continuaron irradiando (40-48 horas después de la administración de naftaleno): los ratones C57BL se irradiaron con 6 Gy ICT; los ratones NOD-SCID se irradiaron con 3-4 Gy ICT.

Suspensión y trasplante de células en un solo pulmón

*Preparación e inyección de células*

- 10 Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de pulmones de 15-24 semanas digeridos con enzimas. En resumen, la digestión pulmonar se llevó a cabo por picando finamente el tejido con una hoja de afeitar en presencia de 0,1% de colagenasa, 2,4 U/ml de dispasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM a 37°C durante 1 h. La eliminación de restos no específicos se realizó por filtración secuencial a través de filtros de 70 y 40  $\mu\text{m}$ .

- Después del acondicionamiento con naftaleno (NA), ICT, o ambos, cada animal fue trasplantado con  $1 \times 10^6$  células de pulmón embrionarias de positivas a GFP, inyectadas en la vena de la cola 4-8 horas después de la irradiación.

*Citometría de flujo*

- 20 Suspensiones de células aisladas procedentes de pulmón embrionario humano (15-24 semanas) y de ratón (14-17 semanas), y suspensiones de células aisladas adultas de ratón y adultas humanas fueron analizadas por citometría de flujo policromática. Todas las muestras se tiñeron con anticuerpos conjugados o referencias de isotipos coincidentes según las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos eran de Bioscience, BD y Biolegend. La lista completa de anticuerpos utilizados en el estudio se resume en la Tabla 2, a continuación. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el programa informático Flow Jo (versión 7.6.5).

*Inmunohistoquímica*

- 25 Se sacrificaron animales en diferentes momentos puntuales después del trasplante; los pulmones se inflaron con una solución de PFA al 4% y se mantuvieron durante 24 horas, luego se conservaron congelados en sacarosa al 30% y se congelaron instantáneamente en isopentano preenfriado con aire líquido, o se procesaron embebidos en parafina. Se cortaron bloques de parafina en secciones de 4  $\mu\text{m}$ , y se tiñeron después de desparafinado en xileno y rehidratación como se describió anteriormente [Hecht G. *et al.*, *Proc. Nat. Acad. of Sci.* (2009) 106 (21): 8659].
- 30 El resumen de los anticuerpos usados en el estudio se describe en la Tabla 2, a continuación. Todos los anticuerpos secundarios eran de Jackson Immunoresearch Laboratories.

Las imágenes se tomaron con la cámara digital Olympus (DP70) y algunas veces se procesaron por Adobe Photoshop 7.0. Para todas las tinciones inmunohistoquímicas, se realizó un control negativo usando la misma técnica pero omitiendo el anticuerpo primario mientras se agregaba el anticuerpo secundario marcado.

- 35 Tabla 2: Lista de los anticuerpos usados en el estudio

<b>Anticuerpos principales</b>	<b>Anticuerpos secundarios</b>
Anticuerpo anti-CK de conejo (Abcam)	Anti-Daylight 488 de ratón
Anticuerpo anti-CK18 humano en ratón (Daco)	Anti-Daylight 594 de ratón
Anticuerpo anti-CK14 humano en ratón (Daco)	Anti-Daylight 488 de rata
Anti-MNF humano en ratón (Santa Cruz)	Anti-Daylight 594 de rata
Anticuerpo anti-Ki-67 humano en ratón (Daco)	Anti-AMCA de rata
Anticuerpo anti-nestina humano en ratón (MBL)	Anti-Alexa Fluor 488 de conejo
Anticuerpo anti-nestina de ratón en cabra (Santa Cruz)	Anti-Cy5 de conejo
Anticuerpo anti-CCSP de ratón en conejo (Abcam)	Anti-AMCA de conejo
Anti-GFP de conejo (Abcam)	Anti-Alexa Fluor 488 de cabra
Anti-GFP de pollo (Abcam)	Anti-Rojo de Rodamina de cabra

Anti-PRGC humano en cabra (Santa Cruz)	Anti-AMCA de cabra
Anticuerpo anti-tirosina hidrolasa de pollo (Abcam)	Anti-Alexa Fluor 488 de pollo
Anticuerpo anti-proteína C tensioactiva de conejo (Santa Cruz)	
Anti-CFTR de conejo (Abcam)	
Anticuerpo anti-CD31 humano en rata (Daco)	
Anticuerpo anti-CD31 de ratón en conejo (Daco)	
Anticuerpo anti-CD11c humano en ratón (Daco)	
Anticuerpo anti-CD20 de conejo (Daco)	
Anticuerpo anti-CD3 de ratón (Daco)	
Anticuerpos anti-Sca-PE de ratón; anti-Sca-FICT de ratón (Biolegend)	
Anticuerpo anti-CD45-APC de ratón (Biolegend)	
Anticuerpos anti-CD31-APC de ratón; anti-CD31-PE-Cy7 de ratón (Biolegend)	
Anti-CD326-Percp-Cy5.5 de ratón (Biolegend)	
Anti-CD49f-FITC de ratón (Biolegend)	
Anti-CD24-PE-Cy7 de ratón (Biolegend)	
Anti-CD104-Pacific Blue de ratón (Biolegend)	
Anti-CD90-Pacific Blue de ratón (Biolegend)	
Anti-CD73-PE de ratón (Biolegend)	
Anti-CD45-APC-Cy77 humano (Biolegend)	
Anti-CD326-APC humano (Biolegend)	
Anti-CD117-PE humano (Biolegend)	
Anti-CD271-FITC humano (Biolegend)	
Anti-CD31-Pacific Blue humano (Biolegend)	
Anti-CD34-Percp humano (Biolegend)	
Anti-CD14-PE humano (Mylteni)	
Anti-CD105-Pacific Blue humano (Mylteni)	
Anti-CD2-FITC humano (BD)	
Anti-CD20-PE humano (BD)	

(A destacar que todos los anticuerpos secundarios se adquirieron de Jackson ImmunoResearch o Abcam)

#### Microscopia de dos fotones

5 Antes del diagnóstico por la imagen, se practicó la eutanasia a los ratones o se les inyectó por vía intravenosa con un trazador sanguíneo Quantum dots, 655 nanopartículas para marcaje vascular (Invitrogen – Molecular Probes) y a continuación se les practicó la eutanasia. Se extirparon los pulmones y se colocaron bajo una cámara de diagnóstico por la imagen cubierta con vidrio.

10 Se utilizó un microscopio Ultima™ Multiphoton (Prairie Technologies Middleton, WI) que incorpora un láser de Ti-zafiro Mai Tai™ pulsado (Newport Corp., CA). El láser se sintonizó a 850 nm para excitar simultáneamente EGFP y el trazador sanguíneo. Se utilizó un objetivo 20X (NA 0,95) o 40X (NA 0,8) sumergido en agua o el objetivo aéreo 10 X (NA 0,3) de Olympus.

Para crear una pila Z típica, se escanearon secciones del pulmón que contenían células GFP a una profundidad de aproximadamente 30-150  $\mu\text{m}$  con pasos en Z de 3  $\mu\text{m}$ . Los datos se analizaron usando el programa informático Velocity® (Perkin-Elmer, Coventry, Reino Unido).

*Diagnóstico por la imagen Micro-CT*

- 5 Se realizó diagnóstico por la imagen Micro-CT bajo 10 ml/kg de anestesia general (2,2,2-tribromoetanol al 2,5%, 97% en PBS) administrada por vía intraperitoneal.

Se realizaron experimentos de micro-CT *in vivo* en un escáner TomoScope® 30S Duo (CT Imaging, Alemania) equipado con dos sistemas de fuente-detector. El voltaje de operación de ambos tubos fue de 40 kV. El tiempo de integración del primer y segundo protocolos fue de 90 ms (360 rotaciones) y 5 minutos (3.600 rotaciones) y se obtuvieron imágenes axiales a una resolución isotrópica de 80  $\mu\text{m}$ . Se analizó el procesamiento de los datos de CT utilizando el programa informático ImageJ.

*Análisis estadístico*

Se evaluaron las diferencias entre los grupos por la prueba de la t de Student. Los datos se expresan como media+ DT o media+ SEM, como se indicó, y se consideraron estadísticamente significativos para valores de  $p \leq 0,05$ .

- 15 Ejemplo 1

"Intervalo" óptimo para recoger tejido precursor de pulmón embrionario humano

Potencial de crecimiento de los tejidos pulmonares embrionarios humanos recogidos en diferentes momentos puntuales de gestación

20 Para evaluar la influencia de la fase embrionaria sobre el crecimiento y el potencial de diferenciación, los tejidos progenitores embrionarios de pulmón que se originaron a partir de fetos humanos de 15 a 24 semanas se trasplantaron en primer lugar bajo las cápsulas suprarrenales de ratones NOD-SCID. En general, tras el examen 8 semanas después del trasplante, más del 98% de los trasplantes de tejido de donantes de todas las edades sobrevivieron y todos los trasplantes recuperados demostraron un aumento en el tamaño, sin pruebas de neoplasia en ninguno de los trasplantes recuperados. Sin embargo, los resultados fueron claramente diferentes cuando se intentó un trasplante similar usando pulmones anteriores o posteriores a la gestación como tejidos donantes.

25 Como se puede ver en la figura 1A, el tejido recogido a las 20-22 semanas ( $n = 25$ , 1-3 mm de tamaño) presentó un crecimiento mejorado a las 8 semanas después del trasplante (alcanzando un tamaño de  $300,7 \pm 15,2$  mm), en comparación al tejido recogido a las 15-19 o 23-24 semanas de gestación ( $61,6 \pm 3,5$  mm y  $10,6 \pm 2,0$  mm, respectivamente).

- 30 Para obtener una evaluación cuantitativa de los diferentes atributos estructurales en el implante pulmonar en crecimiento, mostrado macroscópicamente en la figura 1B, se empleó análisis morfométrico.

35 Como se muestra en las figuras 1C-F, todos los elementos del árbol respiratorio, similares en su aspecto al tejido pulmonar humano adulto, se detectaron en implantes en crecimiento en tejido de 20-22 semanas. Por lo tanto, la formación de conductos alveolares con alvéolos (figuras 1C-F), la tráquea cubierta con epitelio ciliado (figura 1E), capas musculares y cartilago (figura 1E) y monocapas epiteliales alveolares (figura 1F), se mostraron todos por los implantes en crecimiento. Asimismo, parámetros que definen las propiedades funcionales de los implantes en desarrollo, como lo indica la capacidad para sintetizar tensioactivo, detectable por tinción para la proteína C tensioactiva (sp-C) (figuras 1G-H) y la capacidad para transportar iones, como se indica mediante tinción para regulador transmembrana de la fibrosis quística RTFQ (figura 1I), se expresaron claramente. Generalmente, estos marcadores funcionales que aparecen relativamente tarde durante el proceso de maduración, coinciden con los elementos más diferenciados que expresan a citoqueratina 18 (CK18) y no se expresan en tejido 20 semanas antes del trasplante (datos no mostrados).

45 Sorprendentemente, y en contraste con los resultados anteriores, los implantes que se originaron en tejido recogido a las 15 semanas (figura 1J-L) o 24 semanas (figura 1M-O) desarrollaron quistes y fueron negativos para la tinción para sp-C y RTFQ (datos no mostrados), mientras que los implantes que se originaron a partir del tejido de 18 semanas, aunque presentaban todos los patrones de diferenciación y maduración, incluida la tinción para sp-C y RTFQ (datos no mostrados), todavía eran defectuosos, porque los conductos alveolares formados eran más estrechos y las paredes alveolares eran más gruesas (figura 1P-R). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el "intervalo" óptimo para recoger tejido pulmonar embrionario humano para trasplante está comprendido entre 50 las 20-22 semanas de gestación.

Identificación de progenitores de células madre y sus nichos en tejido pulmonar embrionario humano en diferentes momentos puntuales de gestación

Después de la identificación del tejido pulmonar embrionario humano del "intervalo" óptimo para el trasplante, se evaluó la presencia de supuestas células madre en este tejido del "intervalo" en comparación con los tejidos recogidos en momentos puntuales anteriores o posteriores de gestación.

- Como se muestra en las figuras 2A-D, la tinción H&E puso de manifiesto que se encuentran más estructuras bronquiales y bronquiolares en los tejidos recogidos a las 20-22 semanas en comparación con los tejidos recogidos en momentos puntuales anteriores. Para definir las posibles diferencias en los niveles de células progenitoras en estos tejidos, se examinó la presencia de la supuesta subpoblación progenitora de células pulmonares epiteliales basales, previamente mostradas para expresar citoqueratinas 5 (CK5) y 14 (CK14). Estos marcadores distintos disminuyen tras la diferenciación, en paralelo a la expresión del fenotipo positivo a CK8/CK18 más maduro.
- 10 Como puede verse en la figura 2E, se encontró una notable frecuencia de células CK5 positivas en las vías respiratorias grandes junto con la expresión de CK14 (figura 2F), mientras que se encontró una abundancia algo menor en los alvéolos en desarrollo. Además, esta tinción inmunohistológica puso de manifiesto que las células CK5<sup>+</sup> estaban rodeadas por células nestina<sup>+</sup> (figura 2G), y algunas de ellas presentaban propiedades de cuerpos neuroepiteliales marcados por la proteína relacionada con el gen de calcitonina (PRGC). Como se puede ver en la
- 15 figura 2H, esta inervación se puso de manifiesto además por tinción para neurofilamentos (NF), lo que sugiere una arquitectura de nichos de células madre similares a las definidas anteriormente para células madre hematopoyéticas en la médula ósea y en las vías respiratorias del ratón adulto. Además, en línea con un informe muy reciente sobre el nicho BM, el nicho de CK5<sup>+</sup> epitelial también contenía células actina positiva de músculo liso alfa (figura 2I y figuras 5A-D) y células Vimentin<sup>+</sup> mesenquimatosas (figura 2J).
- 20 Es importante destacar que el análisis morfológico demostró una abundancia relativa de células progenitoras CK5<sup>+</sup> en el tejido 'intervalo' de 20-22 semanas de gestación, lo que sugiere que el intervalo óptimo probablemente está relacionado con un mayor número de estas células progenitoras. Por lo tanto, en el tejido recogido a las 20-22 semanas de gestación, se encontró que el área de CK5<sup>+</sup> representa un promedio de 14,1%± 5,6 del tejido pulmonar total, en comparación con 5,26%±1,06 (P = 0,0006) o 6,05%±0,18 (P = 0,002), en tejidos de 15 semanas y 17
- 25 semanas, respectivamente (figuras 2K-O).

Tomados en conjunto, este "intervalo de oportunidad" para recoger pulmón embrionario como fuente para trasplante se puede explicar en parte por la frecuencia de células progenitoras epiteliales positivas CK5, y sus respectivos nichos. Para investigar más a otras supuestas células progenitoras en diferentes tejidos embrionarios, se utilizó un análisis FACS para determinar la presencia de varios fenotipos atribuidos recientemente a células madre de pulmón humano pluripotenciales. En particular, la atención se centró en dos fenotipos. El primero, una subpoblación rara, teñida positiva para c-kit (CD 117) y negativa para muchos marcadores de diferenciación, incluido CD34, fue descrita recientemente por Kajstura *et al.*, principalmente en tejido pulmonar adulto, pero también en tejido embrionario, los

30 autores sugirieron que estas células representan una célula madre de pulmón multipotente, con capacidad de autorrenovación [Kajstura J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* (2011) 364 (19): 1795-806; Anversa P. *et al.*, *Nat. Med.* (2011) 17 (9):1038-9] y con potencial regenerativo para todos los linajes pulmonares. Sin embargo, Suzuki *et al.* mantienen que en el pulmón embrionario, las células C-Kit<sup>+</sup> también expresan CD34 y son probablemente células progenitoras endoteliales [Moodley Y. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* (2011) 365 (5): 464-6; Suzuki T. *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2010) 181 (1 Meeting Abstracts): A4898], por lo tanto, también se evaluó la presencia de células C-Kit<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> (figuras 2P-Z).

- 40 Para ello, se analizaron las suspensiones de células aisladas obtenidas de tejidos pulmonares embrionarios humanos tratados enzimáticamente, recogidos a las 16, 18 y 20 semanas de gestación, se analizó la expresión de varios marcadores de diferenciación incluidos CD34 (específico para células progenitoras hematopoyéticas y endoteliales), CD45 (células hematopoyéticas), CD31 (marcador para células endoteliales), CD117 (c-KIT, para identificar células progenitoras prematuras), CD271 (NGFR, marcador de células madre mesenquimatosas) y CD326
- 45 (CPEAM, marcador de diferenciación epitelial).

Sorprendentemente, la población de CD45 negativas, no hematopoyéticas, se encontró que comprende tres poblaciones de progenitoras c-Kit<sup>+</sup> distintas, incluidas las células CD34<sup>alta</sup>, CD34<sup>intermedia</sup> y CD34<sup>negativa</sup> (figuras 2P-T). Mientras que la última población es compatible con las células madre de pulmón adultas pluripotenciales prematuras, las demás células CD34<sup>+</sup> podrían diferenciarse más fuertemente hacia el linaje endotelial que también

50 expresa grandes cantidades de CD31 (figuras 5A-I).

- Curiosamente, la subpoblación de C-Kit<sup>+</sup> CD34<sup>neg</sup> fue claramente más abundante en los tejidos recogidos a las 20 semanas (aproximadamente hasta el 2-3 % de la población de CD34<sup>neg</sup>) en comparación con edades de gestación más tempranas (menos de 0,15%) o con el tejido pulmonar adulto utilizado como referencia (menos de 0,45%, figuras 6A-L). Estas células exclusivas C-Kit<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> CD271<sup>-</sup>, que también son negativas para CD31 y CD326
- 55 (figuras 7A-I), en línea con Kajstura *et al.*, también podrían identificarse por inmunohistología. Por lo tanto, como se muestra en las figuras 3A -C, estas supuestas células progenitoras estaban presentes en pocas cantidades en las proximidades de grandes vías respiratorias, principalmente en espacios perivasculares.

Significativamente, cuando los tejidos pulmonares se analizaron CD 117 y CD34 por tinción inmunohistológica, se encontraron varias subpoblaciones celulares distintas similares a las encontradas por el análisis FACS. El análisis de

un pulmón humano de 20 semanas se muestra en las figuras 4A-K; la mayoría de las células CD117<sup>+</sup> coexpresaron CD34 y residieron en los vasos sanguíneos (figuras 4A-C) que rodean los alvéolos en desarrollo (figuras 4D-G), mientras que la subpoblación menor de células positivas CD117<sup>+</sup> aisladas se encontraron muy cercanas a los grandes vasos sanguíneos y grandes vías respiratorias (figura 4H-K). Un patrón similar de distribución de células CD117<sup>+</sup> se encontró en tejidos pulmonares de edad de gestación más temprana (figuras 8A-D), aunque el porcentaje total puesto de manifiesto por FACS fue significativamente mayor en el tejido de 20 semanas (figuras 2A-Z). Además, como se muestra en las figuras 9A-D, los tejidos embrionarios de 20 semanas también presentan células progenitoras endoteliales (CPE) prematuras y tardías que pueden desempeñar un papel exclusivo en la reparación microvascular de pulmón. Por lo tanto, también se constató que este tejido mostraba la presencia de dos subpoblaciones distintas de CD34<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup>. La primera identificada por tinción positiva para CD14 y CD45, mientras que la segunda subpoblación es CD45<sup>+</sup> CD105<sup>+</sup>, en línea con estudios previos que sugieren la presencia de estos dos tipos principales de CPE en sangre periférica humana [Yoder M. C. *et al.*, *Blood*. (2007) 109 (5): 1801-9]. Las primeras denominadas "CPE prematuras" se caracterizan por un crecimiento prematuro *in vitro*, positividad para CD34/CD31/CD14, incapacidad para formar tubos en un ensayo de formación de Matrigel y grandes cantidades de secreción de citocinas. El otro tipo de CPE, denominado "CPE de crecimiento tardío", células endoteliales de crecimiento (CEC) o células formadoras de colonias endoteliales (CFCE) se caracteriza por positividad para CD31 y CD105, falta de CD45 y CD14, y la capacidad única para formar espontáneamente vasos sanguíneos humanos cuando se implantan en un gel en ratones inmunodeficientes, integrándose con vasos murinos de la circulación general.

## 20 Ejemplo 2

*Prueba de concepto en modelos de ratón para el potencial regenerativo de trasplantes de pulmón embrionario en el "intervalo"*

"Intervalo" óptimo para recoger tejido precursor de pulmón embrionario de ratón para trasplante

Con el fin de evaluar el potencial curativo del tejido embrionario derivado de pulmón en modelos de ratón apropiados, se definió inicialmente el "intervalo" óptimo para la recolección de pulmón embrionario de ratón para trasplante, como para su homólogo humano. Así, el tejido embrionario de pulmón de ratón se recolectó en diferentes momentos de gestación (E14-E17), se implantó debajo de las cápsulas suprarrenales de ratones clónicos, y 8 semanas después del trasplante, se evaluaron los implantes para determinar la presencia de parénquima pulmonar, estructuras bronquiales y alveolares, así como para la presencia no deseada de fibrosis y quistes.

Como puede verse en las figuras 10A-E, doce semanas después del trasplante renal subcapsular, el tejido pulmonar E14 y E17 dio como resultado la formación de tejido quístico y fibrótico (figuras 10A-B), mientras que el pulmón embrionario de ratón E15-E16 mostró un marcado potencial para diferenciarse aún más y alcanzar la fase alveolar (figura 10C-E). Por lo tanto, de forma similar al tejido pulmonar humano, la fase canalicular del desarrollo pulmonar ofrece el intervalo óptimo para la recogida de tejido para trasplante (figura 10F). Además, de forma similar al tejido humano del "intervalo", el tejido pulmonar E16 no mostró alvéolos (figura 11A); las células CK-5 positivas fueron abundantes en las vías respiratorias grandes, y se encontraron numerosos cuerpos neuroepiteliales dentro de la muestra completa, que se tiñeron positivamente con PRCG y se localizaron en nichos (figura 11B) de manera similar a la médula ósea y al pulmón de ratón adulto (figuras 12A-F). Del mismo modo, se encontraron células CCSP positivas en las regiones de las vías respiratorias grandes, que eran ricas en células de nestina positivas (figura 11C), que sugieren nichos de células madre, y estaban rodeados por células alfa-SMA positivas (figura 11D).

Además, al igual que sus equivalentes humanos, el tejido E15-E16 se enriqueció con supuestos progenitores en comparación con tejidos de gestación prematuros o posteriores, como se demuestra por análisis FACS de células CD45<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD104<sup>+</sup>, recientemente creadas como supuestos progenitores pulmonares en pulmón de ratón adulto [McQualter J. L. *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2010) 107(4): 1414]. Por lo tanto, como se puede ver en las figuras 3E-Y, que describen el análisis FACS representativo de las suspensiones de células aisladas E13, E14, E15 y E16, se encontraron cantidades notablemente más altas de células CD45<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD104<sup>+</sup> en tejido pulmonar E15 y E16 (0,062% ± 0,007 y 0,073% ± 0,005, respectivamente) en comparación con el nivel en tejido E13 y E14 (0,002 ± 0,00057% y 0,012 ± 0,0057%, respectivamente).

50 Trasplante de células de pulmonares embrionarias de ratón E16 para el tratamiento de la lesión pulmonar

Teniendo en cuenta que los tejidos E15-16 presentan un marcado crecimiento y potencial de diferenciación tras el trasplante, este tejido "intervalo" se evaluó más en un modelo de ratón para lesión pulmonar.

Con ese fin, estas células se evaluaron inicialmente en un modelo basado en la inducción de lesiones con naftaleno, tal como se describió anteriormente [Stripp B. *et al.*, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (1995) 269(6):791]. Este modelo de lesión pulmonar simula enfermedades pulmonares causadas por lesión epitelial leve, detectable por cambios en la expresión de células de Clara pulmonares.

La localización anatómica específica de las células de Clara en los bronquiolos respiratorios y en las uniones broncoalveolares permitió localizar con precisión el sitio de la lesión después de la exposición a naftaleno, y probar

la capacidad de una suspensión de células individuales de células "intervalo " embrionarias para colonizar y restaurar la capa epitelial dañada en receptores singénicos.

5 Dos días después de la administración de naftaleno, los ratones C57BL receptores se infundieron con  $1 \times 10^6$  células pulmonares E16, procedentes de ratones hembra preñadas positivas a GFP. Posteriormente, en los pulmones de los animales tratados se evaluó histológicamente la presencia de células positivas a GFP en diferentes momentos puntuales. Estos experimentos iniciales (no mostrados) pusieron de manifiesto que la extirpación de células de Clara por naftaleno era temporal y no podría permitir el injerto y el desarrollo significativos de células de Clara procedentes de donantes. Por tanto, los autores de la presente supusieron que podría requerirse un régimen de acondicionamiento más agresivo, que elimine más eficazmente la proliferación de células madre residentes, para la evaluación de la capacidad regenerativa de las células del donante, como se encuentra comúnmente en estudios que miden la inducción de quimerismo después del trasplante de médula ósea.

Para probar esta hipótesis, 40 horas después de la lesión con naftaleno, los animales se trataron además con ICT subletal (6 Gy) para eliminar las células madre de pulmón residentes, que posiblemente son inducidas a proliferar mediante tratamiento previo con naftaleno.

15 Después de 1 día, los ratones recibieron células de pulmonares E16, y se les siguió para el injerto y el desarrollo de células procedentes de donantes en sus pulmones mediante tinción inmunohistológica acoplada con análisis morfométrico, así como por microscopia de 2 fotones.

20 Como se muestra en las figuras 13A-C, los "parches" GFP positivos, que indican el injerto de células procedentes de donantes en los pulmones receptores, aumentaron notablemente 30 días después del trasplante, en ratones acondicionados tanto con naftaleno como con 6 Gy ICT (figura 13C) en comparación con ICT solo (figura 13A), o naftaleno solo (figura 13B). Este marcado impacto del acondicionamiento en el nivel de quimerismo pulmonar se demuestra cuantitativamente en la figura 13D, que representa el análisis morfométrico de los parches GFP encontrados en tres experimentos independientes que comprenden un total de nueve ratones en cada grupo. Por lo tanto, mientras que se encontraron 55 focos/mm<sup>3</sup> de focos procedentes de donantes en ratones acondicionados con naftaleno y 6 Gy TBE, solo se encontraron 10-12 focos/mm<sup>3</sup> y 2-3 focos/mm<sup>3</sup> en ratones acondicionados con naftaleno o ICT solo, respectivamente.

30 El examen inmunohistológico de ratones que presentan pulmones quiméricos, además puso de manifiesto el nivel de integración en elementos funcionales en los pulmones receptores. Como se muestra en la figura 14A, las luces de las vías respiratorias grandes de ratones de referencia no tratados mostraban claramente la presencia de células CCSP<sup>+</sup> de Clara, y estas células se sometieron a extirpación y exfoliación inmediatamente después del acondicionamiento (figura 14B). Sin embargo, los ratones trasplantados después del acondicionamiento de elección, presentaban el día 30 después del trasplante, la formación de una nueva capa epitelial, y las células GFP<sup>+</sup> injertadas se encontraron en las luces bronquiales. Estas células GFP<sup>+</sup> procedentes del donante se incorporaron a las vías respiratorias bronquiales y alveolares del anfitrión, y se vascularizaron, como se muestra mediante tinción para V-caderina (figura 14C); también expresaron CCSP (figuras 14D-F), y fueron positivos para Sp-c (figuras 14G-I) y la expresión de CFTR (figuras 14J-L), lo que sugiere su capacidad para producir tensioactivo y participar en el transporte de iones. Como era de esperar, estos marcadores funcionales específicos eran mostrados diferencialmente por las células GFP<sup>+</sup> injertadas según su ubicación. Por lo tanto, en las vías respiratorias grandes, las células eran positivas para CCSP, y en los alvéolos, las células injertadas eran positivas para sp-C, pero se encontró que todas las células expresaban CFTR, lo cual es de especial importancia para la posible corrección de la fibrosis quística (FQ).

45 Curiosamente, cuando se analizaron en momentos puntuales posteriores al trasplante, los focos iniciales crecían claramente en tamaño y, por lo tanto, ocupaban una mayor proporción de los pulmones injertados. Esto se demostró además por microscopia de 2 fotones, que permite la visión directa de los pulmones inmediatamente después del sacrificio, con o sin tinción conjunta intravital de los vasos sanguíneos con puntos Quantum rojos para el marcaje vascular fluorescente (datos no mostrados). Como se puede ver en las figuras 15A-C, aunque un injerto moderado del pulmón por células de tipo donante se encontró a las 6 semanas después del trasplante, con una integración predominante de células GFP<sup>+</sup> trasplantadas en las estructuras broncoalveolares y vasculares (figuras 15A-B), se encontró un mayor desarrollo de las células de tipo de donante que ocupaban casi la tercera parte del tejido pulmonar, 4 meses después del trasplante (figura 15C).

50 Además, la evaluación inmunohistológica de estos pulmones quiméricos 16 semanas después del trasplante, puso de manifiesto la integración completa de las células procedentes del donante, en la superficie de intercambio gaseoso en la interfase de los vasos sanguíneos y en las estructuras epiteliales alveolares (figuras 16A-L) Por lo tanto, las células GFP<sup>+</sup> se encontraron mediante triple tinción con CD31 y anticuerpos anti-pan-citoqueratina para ser incorporadas en los compartimentos vasculares y epiteliales de los pulmones trasplantados, sin signos de cicatrización o fibrosis (figuras 16A-D y figuras 17A-E). Del mismo modo, la tinción con AQP (figuras 16E-H) y SP-C (figuras 16I-L) puso de manifiesto la incorporación de células procedentes de donantes en la superficie de intercambio gaseoso de alveocitos tipo I y tipo II, respectivamente.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que las células pulmonares embrionarias recogidas del tejido en el "intervalo" podrían ofrecer una nueva fuente de células para la reparación del tejido pulmonar. Además, se prevé que la terapia con dichas células podría ser más eficaz si se combina con un acondicionamiento subletal, aunque esto podría ser menos crítico en situaciones clínicas en las que los progenitores pulmonares del anfitrión están notablemente extirpados por la lesión en curso.

Trasplante de una suspensión celular única procedente de pulmón embrionario humano de 20-22 semanas en ratones NOD-SCID, después de la inducción de lesión pulmonar con naftaleno e ICT

Para investigar la capacidad de las células pulmonares embrionarias humanas en el 'intervalo' para integrarse en pulmones lesionados, se creó un modelo de lesión pulmonar en ratones SCID inmunodeficientes. Teniendo en cuenta que los ratones NOD-SCID son más sensibles a ICT, se usaron 3,0 Gy ICT en lugar de 6,0 Gy ICT usados en los estudios con tejido de ratón donante, descritos anteriormente. Además, como reemplazo para el marcaje genético de GFP, se usó inmunohistología con anticuerpos específicos de ratón y humanos para distinguir entre células epiteliales, endoteliales y mesenquimatosas del hospedador y del donante.

Por lo tanto, aunque la infusión de  $1 \times 10^6$  células recogidas después de la digestión enzimática de células de pulmón embrionarias humanas de 20 semanas en ratones NOD-SCID, acondicionadas con NA solo, no produjo ningún nivel apreciable de injerto (datos no mostrados), se alcanzó un notable quimerismo después de la infusión del mismo número de células en ratones NOD-SCID acondicionados con naftaleno y tratamiento posterior con 3.0 Gy ICT (figuras 18A-I y 19A-F).

En un experimento inicial a corto plazo, se tiñó una suspensión de células aisladas procedente de pulmón embrionario humano (20 semanas) con el colorante fluorescente de seguimiento, 5- (y - 6)((4clorometil)benzoil)amino-tetrametil-rodamina (CMTMR), y las células se infundieron en ratones NOD-SCID acondicionados. Cuando se examinaron 2 semanas más tarde, las células humanas injertadas se pudieron visualizar en parches distintos en el pulmón de los ratones receptores (figura 24A), al igual que los parches GFP<sup>+</sup> encontrados en el modelo de trasplante singénico (figura 24B). Como la tinción con CMTMR es temporal, se llevó a cabo una segunda serie de experimentos para distinguir las células humanas y de ratón en momentos puntuales posteriores al trasplante, mediante tinción inmunohistológica usando un anticuerpo anti-MHC de ratón no reactivo en cruz con tejido humano de referencia (figuras 24C-E), y el anticuerpo MNF 116 anti-citoqueratina humana (tiñendo células epiteliales humanas), no reactivo en cruz con tejido de ratón de referencia, verificado mediante doble tinción en las figuras 24F-H.

Es importante destacar que, a las 6 semanas después del trasplante, la doble tinción con estos anticuerpos puso de manifiesto claramente un nivel significativo de quimerismo. Como se puede ver en las figuras 18A-C, que muestran los bronquios de ratón con pocos aumentos, la doble tinción con los marcadores de ratón y humano demuestra claramente la incorporación de células humanas en la estructura pulmonar, y esto puede apreciarse además con gran aumento de dos campos diferentes (figuras 18D-F y 18G-I, respectivamente).

En una tercera serie de experimentos, las células de pulmón embrionarias humanas recogidas a las 20 semanas se trasplantaron en NOD-SCID tratados con NA y ICT ligeramente superior (4 Gy).

Los pulmones del ratón se tiñeron 7 semanas después del trasplante con marcadores adicionales característicos anti-ratón y anti-humano. Por lo tanto, el anticuerpo MNF 116 (anti-citoqueratina humana en ratón (tinción de células epiteliales humanas), anti-V9 humano en ratón (tinción de vimentina 9, típico de células de estroma) y anti-CD31 humano en ratón (tinción de células endoteliales) se mezclaron y se colocaron en la sección del tejido; las secciones se incubaron a continuación con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Daylight 488 (verde). Las figuras 19A y 19D muestran la tinción selectiva por este cóctel de anticuerpos de tejidos humanos en la estructura bronquial del pulmón del ratón. Las células de origen de ratón en el pulmón de ratón se tiñeron con lectina de Bandería. Se sabe que esta última se une al resto  $\alpha$ -Gal expresado en células endoteliales y epiteliales de ratón, y como puede verse, no es reactiva en cruz con el tejido humano cuando se controla solo (figuras 19B y 19E) o juntamente con tinción MNF (figuras 19C y 19F). Además, usando marcadores similares, también podría detectarse notable quimerismo en los alvéolos de ratones trasplantados (figuras 20A-F). Es importante que también se constató que las células pulmonares humanas procedentes del trasplante de células embrionarias humanas presentan varios marcadores funcionales importantes.

Como se puede ver en las figuras 21A-C, la doble tinción de las células humanas marcadas en verde por la mezcla descrita anteriormente (figura 21A) junto con un marcador general de citoqueratina, dio como resultado la tinción de todas las células epiteliales de origen tanto de ratón como humano (figura 21B), que ilustra distintas células epiteliales en la población de células humanas en el pulmón injertado (figura 21C). Asimismo, las células humanas positivas para aquaporina-5 (AQP-5), típicas de los alveocitos tipo I (figuras 22A-C) y las células humanas positivas para la proteína tensioactiva C (SP-C) característica de los alveocitos tipo II (figuras 23A-F) se distinguieron claramente en los pulmones quiméricos de los animales trasplantados 7 semanas después del trasplante.

Por lo tanto, las células de pulmón procedentes de seres humanos no solo se incorporan al pulmón lesionado de ratón sino que también expresan AQP-5, necesario para realizar intercambio gaseoso, o SP-C, lo que indica la producción de tensoactivo por los alvéolos.

El tratamiento con células madre procedentes de pulmón embrionario no está asociado al desarrollo de teratoma

- 5 Uno de los problemas más controvertidos en el trasplante de células madre embrionarias, que limita su aplicación clínica, es la posible tumorigenia de los tejidos trasplantados. En estudios previos en los que los presentes inventores intentaron definir el "intervalo" óptimo para diferentes tejidos precursores embrionarios de cerdo, los resultados mostraron que más allá de E28, ninguno de los tejidos probados presenta ningún riesgo de formación de teratoma [Eventov-Friedman S. *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (2005) 102(8):2928]. Por lo tanto, considerando que los pulmones embrionarios se desarrollan tardíamente en la embriogénesis y que, por consiguiente, el "intervalo" de elección para el tejido pulmonar embrionario de ratón, cerdo o humano representa una fase relativamente tardía de la gestación, el riesgo de inducción de teratoma asociado a dichos tejidos precursores es probablemente muy bajo. Sin embargo, para verificar aún más esta importante cuestión, se realizó un análisis histológico detallado de los ratones trasplantados (n = 30) hasta 12 meses después del trasplante; no se encontraron pruebas de ningún tumor en el tejido pulmonar trasplantado. Además, el seguimiento a largo plazo de los ratones trasplantados mediante micro TC de pulmón (resolución de 80  $\mu$ m) no puso de manifiesto ninguna lesión sospechosa de ocupar espacio en estos ratones. En las figuras 25A-D se muestra un resumen de estos resultados con imágenes representativas.

#### Exposición

- 20 Los presentes resultados ilustran que el tejido embrionario de pulmón de ratón o humano, obtenido en la fase canalicular, puede ofrecer una fuente óptima para la sustitución de tejido por trasplante. Además, se propuso que el pulmón embrionario humano, rico en progenitores prematuros, se asemeja en sus atributos a los tejidos de la médula ósea y la sangre del cordón umbilical, cuyo uso para el trasplante en enfermedades hematopoyéticas ha aumentado drásticamente en la última década. Los tejidos embrionarios del "intervalo", que presentaron crecimiento y diferenciación óptimos tras la implantación en ratones singénicos o SCID, se enriquecen significativamente para diversos progenitores epiteliales, mesenquimatosos y endoteliales, en comparación con tejido de momentos puntuales anteriores o posteriores de gestación. Además, el análisis detallado de estos progenitores prematuros en sus respectivos tejidos embrionarios, pusieron de manifiesto que los progenitores epiteliales residen en nichos específicos, similares a los descritos ampliamente para nichos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Por lo tanto, los presentes resultados documentaron, en la proximidad de células progenitoras de pulmón putativas, el conjunto de células endoteliales, células positivas a nestina y células mesenquimatosas, que también están típicamente inervadas, según se constató por tinción positiva para CGRP y neurofilamentos. Estos resultados son coherentes con estudios que indican la posible existencia de nichos de células madre en el pulmón de ratón adulto [Engelhardt J. F. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. (2001) 24(6): 649-52].
- 35 Además de definir el intervalo óptimo para el uso de tejido fetal en el trasplante, que se correlaciona con la aparición de nichos de progenitores pulmonares embrionarios humanos, el presente estudio también arroja luz sobre un debate en curso sobre el fenotipo de los progenitores de pulmón humano. Por lo tanto, mientras que Kajstura *et al.* [Kajstura *et al.* 2011, anteriormente] describieron una pequeña población de células c-kit<sup>+</sup> que son negativas para todos los demás marcadores y residen en áreas perivasculares discretas cerca de estructuras de vías respiratorias grandes, los presentes inventores encontraron en alvéolos en desarrollo, otra población de células c-kit<sup>+</sup>, que reside en vasos sanguíneos, muy cerca de progenitores CK5<sup>+</sup>, que expresan antígenos tanto CD34 como CD31, como sugieren Suzuki *et al.* (Suzuki *et al.* 2010, anteriormente). Por lo tanto, el tejido embrionario pulmonar del 'intervalo', caracterizado en la presente memoria, contiene ambas supuestas poblaciones de progenitores positivos c-kit. La íntima proximidad y la interacción potencial de las células positivas a c-kit con progenitores epiteliales CK5<sup>+</sup> es coherente con la sugerencia reciente de que la activación de c-kit es crucial para el desarrollo normal y el mantenimiento de estructuras alveolares [Lindsey J. Y. *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. (2011) 183 (1 Meeting Abstracts): A2445].

- Es importante destacar que los tejidos del "intervalo canalicular óptimo" presentan el nivel más alto de todos los tipos de progenitores en relación con los tejidos pulmonares de fases de desarrollo anteriores; por lo tanto, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que el trasplante intravenoso de la mezcla de células no fraccionadas, de forma similar a la metodología utilizada en el trasplante de médula ósea, podría ser el enfoque preferido. De hecho, el trasplante de una suspensión de células aisladas de pulmón de ratón E15-E16 o tejido pulmonar humano de 20-22 semanas demostró la notable capacidad regenerativa de estas células después de la lesión pulmonar inducida por la combinación de naftaleno y 6.0 Gy de ICT subletal. Fundamentalmente, este nivel de acondicionamiento previo al trasplante fue necesario para crear quimerismo cuando los progenitores del pulmón del anfitrión estaban presentes en cantidades significativas, como se constató después de la inducción de la lesión con naftaleno. Una observación similar fue hecha recientemente por Duchesneau *et al.* [Duchesneau P. *et al.*, *Molecular Therapy*. (2010) 18(10): 1830-6] quienes demostraron que el injerto de las células procedentes de la médula ósea en las estructuras pulmonares puede aumentarse notablemente mediante la intensificación del acondicionamiento utilizando el agente mieloablativo busulfano además del naftaleno. Claramente, este requisito de acondicionamiento puede variar en su

intensidad en diferentes situaciones clínicas, dependiendo del nivel de lesión pulmonar a los progenitores del anfitrión afectados por el proceso patológico.

Tomados en conjunto, los presentes resultados pusieron de manifiesto un injerto robusto en diferentes compartimentos del pulmón del anfitrión y la formación de toda la unidad respiratoria incluidos los siguientes elementos: a) Células epiteliales recién formadas en pequeños bronquiolos, manifestadas por las células GFP<sup>+</sup> CCSP<sup>+</sup>. b) Células de tipo 1 neumocitos (GFP<sup>+</sup> AQP-5<sup>+</sup>), importantes para la superficie de intercambio gaseoso dentro de los alvéolos. c) Células de tipo 2 neumocitos (GFP<sup>+</sup> Sp-C<sup>+</sup>), importantes para la producción de tensioactivo en los alvéolos. d) Presencia robusta de células GFP<sup>+</sup> CD31<sup>+</sup> en el sistema vascular. Además, el tejido injertado presenta, junto con elementos respiratorios, la expresión de CFTR requerida para el transporte de iones, especialmente crítica para pacientes con FQ.

Este injerto bastante drástico después de la "lesión doble", al contrario que el condicionamiento con cada agente solo, podría explicarse por la competencia entre los progenitores del anfitrión y del donante para sus respectivos nichos. Reynolds *et al.* [Reynolds S. D. *et al.*, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. (2004) 287 (6): L1256-65] demostraron que la eliminación de la población de células que expresan CCSP por naftaleno da como resultado inflamación alveolar secundaria, edema y agotamiento de la población de células alveolares de tipo II. Por lo tanto, la lesión selectiva de las vías respiratorias puede servir como la lesión incitadora en enfermedades caracterizadas por una función alveolar gravemente comprometida. Además, Volscaert *et al.* [Volscaert T. *et al.*, *J. Clin. Invest.* (2011) 121(11):4409] demostraron que la cascada de señalización embrionaria Wnt/Fgf10 se reactiva en células de músculo liso parabronquiales maduras (PSMC) después de la lesión inducida por naftaleno, de una manera que activa la señalización de Notch y la posterior transición epitelial a mesenquimatosa; este resultado indica que la activación de esta vía embrionaria podría servir probablemente como un activador para la incorporación eficaz del tejido embrionario de pulmón en los diferentes compartimentos pulmonares. Del mismo modo, se demostró que la lesión pulmonar inducida por radiación induce la degradación de la barrera alveolar sanguínea y la disfunción de la microcirculación y, por lo tanto, podría permitir el predominio de las células endoteliales procedentes del donante (45-47).

Independientemente del mecanismo involucrado, el injerto marcado en el modelo de ratón de células procedentes de donantes obtenidas en ambas estructuras bronquiolares y alveolares es llamativo. Este quimerismo, que aumenta con el tiempo, probablemente puede atribuirse a los múltiples progenitores donantes en el tejido pulmonar embrionario implantado, lo que permite que la descendencia de las células madre pluripotenciales autorrenovables iniciales reemplace gradualmente a las células anfitrionas o donantes procedentes de precursores posteriores.

También se observó una integración y desarrollo pulmonar similares cuando se probaron progenitores de pulmón humano en ratones NOD-SCID, aunque en este sistema, la pérdida potencial de comunicación cruzada con las citocinas de ratón podría reducir el injerto. Por lo tanto, en tres series de experimentos, los presentes resultados ilustraron que las células humanas procedentes del donante se incorporan en las estructuras tanto bronquiolares como alveolares, que presentan características similares a las descritas anteriormente para las células de pulmón de ratón embrionario singénico.

Se requieren más estudios para definir protocolos de inmunodepresión óptimos que permitan el trasplante satisfactorio en receptores clónicos. En general, la fase embrionaria prematura puede hacer que el tejido del donante implantado sea menos inmunógeno; sin embargo, los trasplantes de tejido embrionario no pueden eludir la vía indirecta de rechazo. No obstante, este desafío puede abordarse mediante protocolos que incluyen agentes que provocan el bloqueo coestimulador. Alternativamente, el nivel marcado de progenitores hematopoyéticos (resultados no publicados) en el tejido pulmonar embrionario podría dar como resultado un quimerismo hematopoyético que podría producir tolerancia central hacia las células pulmonares procedentes del donante después del trasplante. Además, la posibilidad de crioconservar suspensiones de células aisladas de tejido pulmonar de 20-22 semanas, que podría mejorar notablemente la disponibilidad de trasplantes, también podría permitir crear bancos de donantes de tipo HLA como para la sangre del cordón umbilical y, por lo tanto, podría reducir posiblemente los requisitos de inmunodepresión.

Por último, el presente tejido embrionario de ratón en el "intervalo" no presentó riesgo de teratoma cuando se fue seguido de periodos de tiempo prolongados después del trasplante, mediante micro TC de alta resolución (80  $\mu$ m) así como mediante examen patológico al final del periodo de seguimiento.

En resumen, los presentes resultados demuestran por primera vez que la fase canalicular de gestación ofrece un "intervalo" óptimo para recoger tejido precursor de pulmón embrionario humano y de ratón para el trasplante regenerativo. Este tejido, que no presenta riesgo de teratoma, está muy enriquecido para varios tipos de progenitores que se identificaron por inmunohistología en sus respectivos nichos, de forma similar a las HSC en la médula ósea. El injerto marcado, la diferenciación y la incorporación robusta de estos progenitores en los pulmones lesionados se pueden proporcionar por infusión de una suspensión de células aisladas preparada por digestión enzimática del tejido pulmonar embrionario. Al igual que en el trasplante de médula ósea, la inducción del quimerismo pulmonar depende de alguna forma de acondicionamiento, a fin de reducir la competencia con los precursores endógenos de tipo anfitrión. Aunque se han defendido varios intentos de aislar células madre pluripotenciales de pulmones adultos y de propagar estas células en cultivo con el propósito de un trasplante

regenerativo, los presentes resultados demuestran que el tejido pulmonar embrionario recogido a las 20-22 semanas de gestación podría ofrecer una modalidad alternativa más simple para la reparación pulmonar.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

5

Además, la mención o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe interpretarse como un reconocimiento de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se usen encabezados de los apartados, no debería interpretarse como necesariamente restrictivos.

## REIVINDICACIONES

1. Una población aislada de la suspensión celular de un tejido pulmonar fetal de mamífero, en donde dicho tejido pulmonar fetal es una fase de desarrollo correspondiente a la de un órgano/tejido pulmonar humano en una fase de gestación seleccionada de un intervalo de 20 a 22 semanas de gestación, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en el que la regeneración de tejido epitelial, mesenquimatoso y/o endotelial es beneficioso en un paciente que lo necesita, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo consistente en un trastorno, enfermedad o lesión pulmonar; trastorno, enfermedad o lesión renal; trastorno, enfermedad o lesión hepático; trastorno, enfermedad o lesión cardíaco; trastorno, enfermedad o lesión del aparato digestivo; trastorno, enfermedad o lesión de la piel; y trastorno, enfermedad o lesión cerebral; y en donde dicho paciente se somete a un protocolo de acondicionamiento subletal, letal o supraletal antes de la administración de la población aislada de la suspensión celular, en donde dicho protocolo de acondicionamiento comprende el tratamiento con naftaleno.
2. La población aislada de células para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho protocolo de acondicionamiento comprende además la irradiación corporal total (ICT).
3. La población aislada de células para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha ICT comprende una dosis de irradiación única o fraccionada en el intervalo de 1-7,5 Gy.
4. La población aislada de células para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha fase de gestación dura de 20 a 21 semanas.
5. La población aislada de células para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha fase de gestación dura de 21 a 22 semanas.
6. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha población aislada de la suspensión celular no es singénica respecto al paciente.
7. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho tejido pulmonar fetal de mamífero es un tejido humano.
8. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichas células comprenden una expresión del marcador seleccionada del grupo consistente en:
- una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+); o  
una expresión del marcador citoqueratina 5+ (CK5+) y citoqueratina 14+ (CK14+); o  
una expresión del marcador c-Kit+ CD45- CD34- CD31- CD326- CD271-; o  
una expresión del marcador c-Kit+ CD34+ D31+; o  
una expresión del marcador c-Kit+ CD34+ CD326+; o  
una expresión del marcador CD34+ CD31+ CD14+ CD45+; o  
una expresión del marcador CD34+ CD31+ CD45- CD105+; o  
una expresión del marcador nestina+ y/o de una proteína+ relacionada con el gen de calcitonina (PRGC+);  
y  
una expresión del marcador alfa actina+ del músculo liso (alfa-SMA+) y/o de una Vimentina+.
9. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dichas células son capaces de regenerar un tejido pulmonar estructural/funcional o regenerar un tejido epitelial, mesenquimatoso o endotelial.
10. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho tejido pulmonar estructural/funcional comprende la generación de un pulmón híbrido y/o una capacidad para realizar intercambio gaseoso y/o una capacidad para sintetizar tensioactivos y/o una capacidad para transportar iones.
11. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde: dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido epitelial es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en úlceras crónicas, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Alzheimer, defectos de cicatrización de heridas, cáncer, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), carencia de proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar, lesión pulmonar y degeneración de la córnea;
- dicha enfermedad o afección en la que la regeneración del tejido mesenquimatoso es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad o afección cardíaca, diabetes, sordera, enfermedad de Crohn, trastornos

autoinmunitarios, leucemia, cáncer, enfermedad de células falciformes, esclerosis lateral amiotrófica y trastornos metabólicos; y

dicha enfermedad o afección en la que la regeneración de tejido endotelial es beneficiosa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad vascular, isquemia, enfermedad de células falciformes, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, diabetes y trastornos autoinmunitarios.

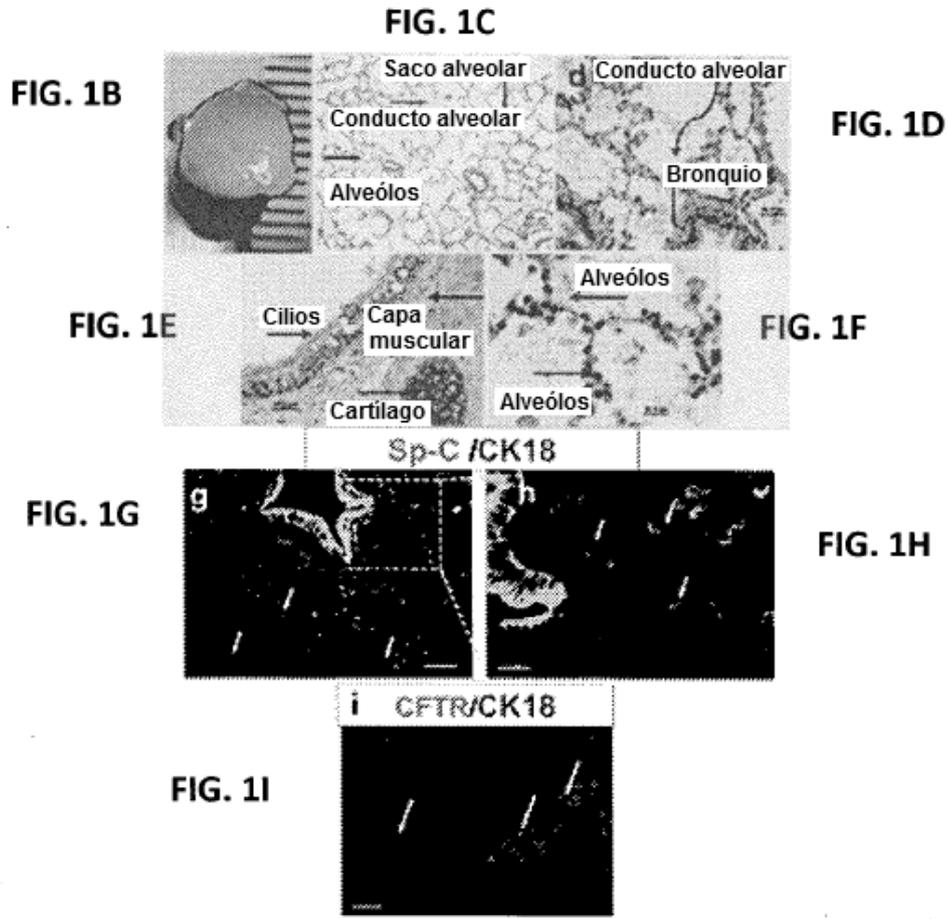
12. La población aislada de células para su uso según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno o lesión pulmonar se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, neumopatía obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón, sarcoidosis, lesión pulmonar aguda (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), síndrome de dificultad respiratoria del prematuro, neumopatía crónica del prematuro (displasia broncopulmonar), deficiencia de proteína B tensioactiva, hernia diafragmática congénita, proteinosis alveolar pulmonar, hipoplasia pulmonar y lesión pulmonar.

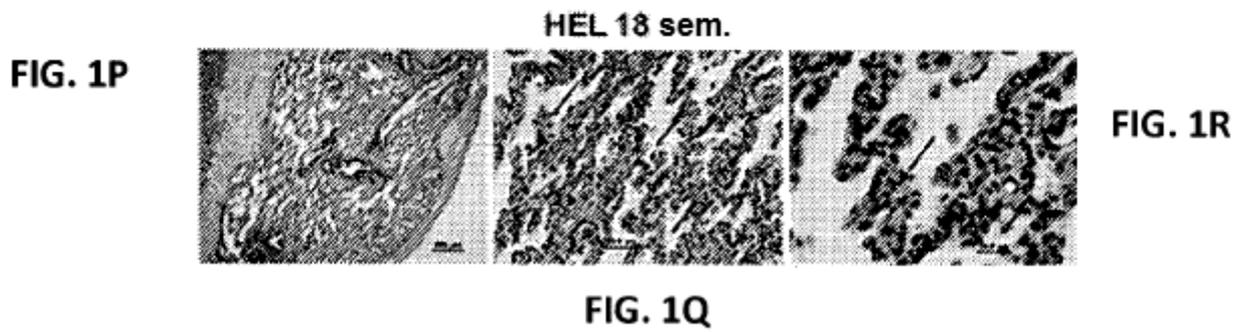
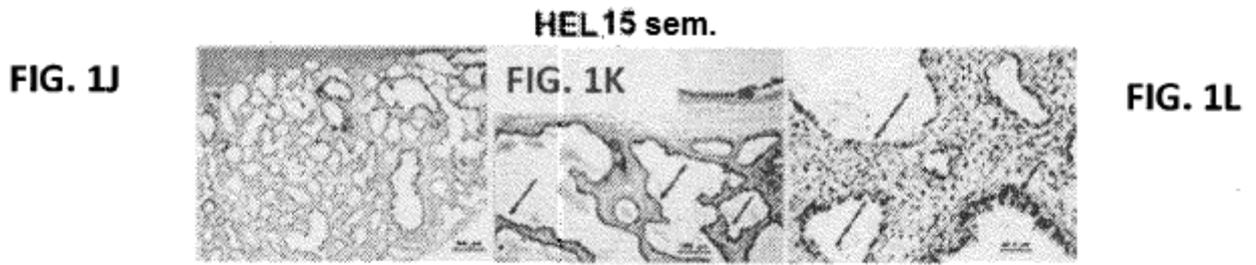
13. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha población aislada de suspensión de células se formula por administración intravenosa.

14. La población aislada de células para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho paciente es un paciente humano.

**FIG. 1A**

Edad de gestación	15-19 semanas (n=30)	20-22 semanas (n=25)	23-24 semanas (n=10)
Dim. injerto ◇ (mm <sup>3</sup> )	61 ± 3	300 ± 15	10 ± 2
Media ±D.T.			





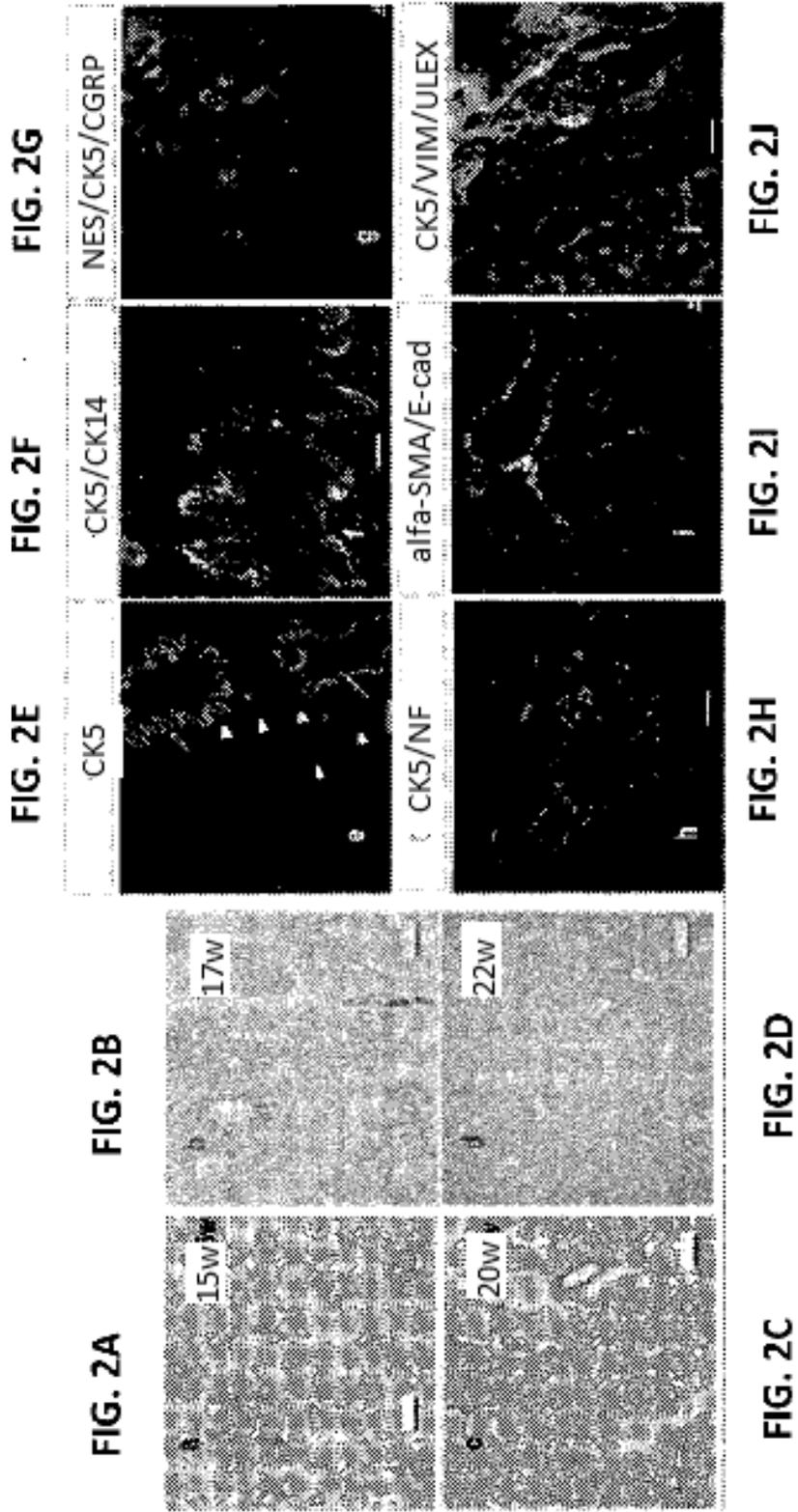


FIG. 2K

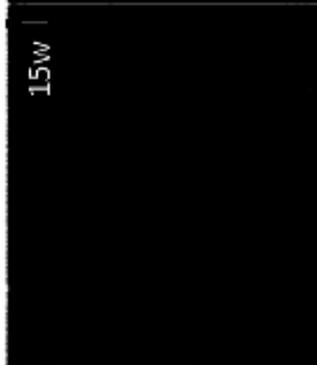


FIG. 2L



FIG. 2O

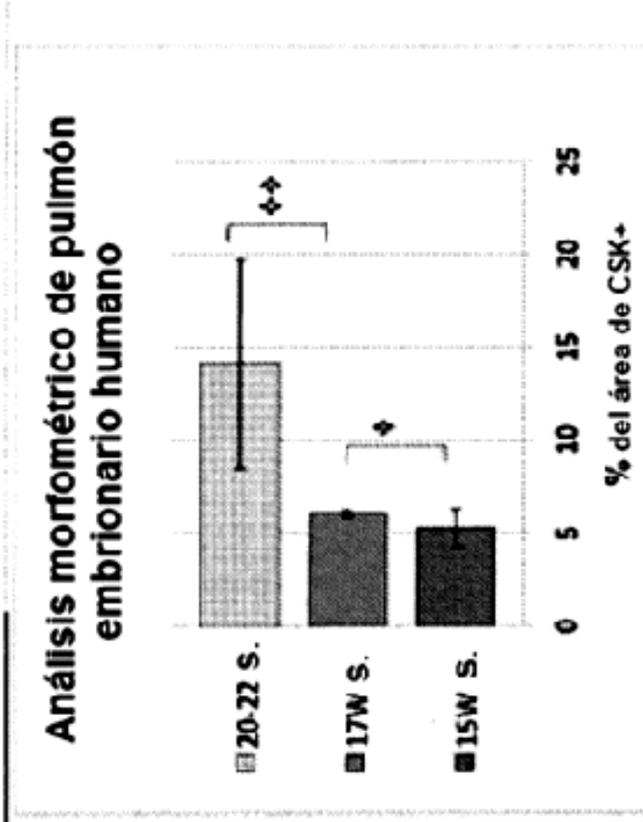


FIG. 2M

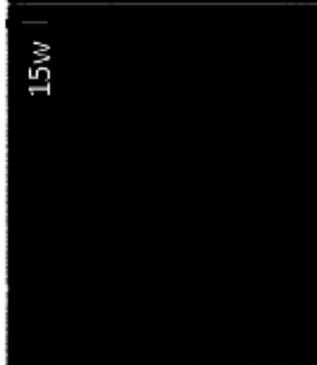
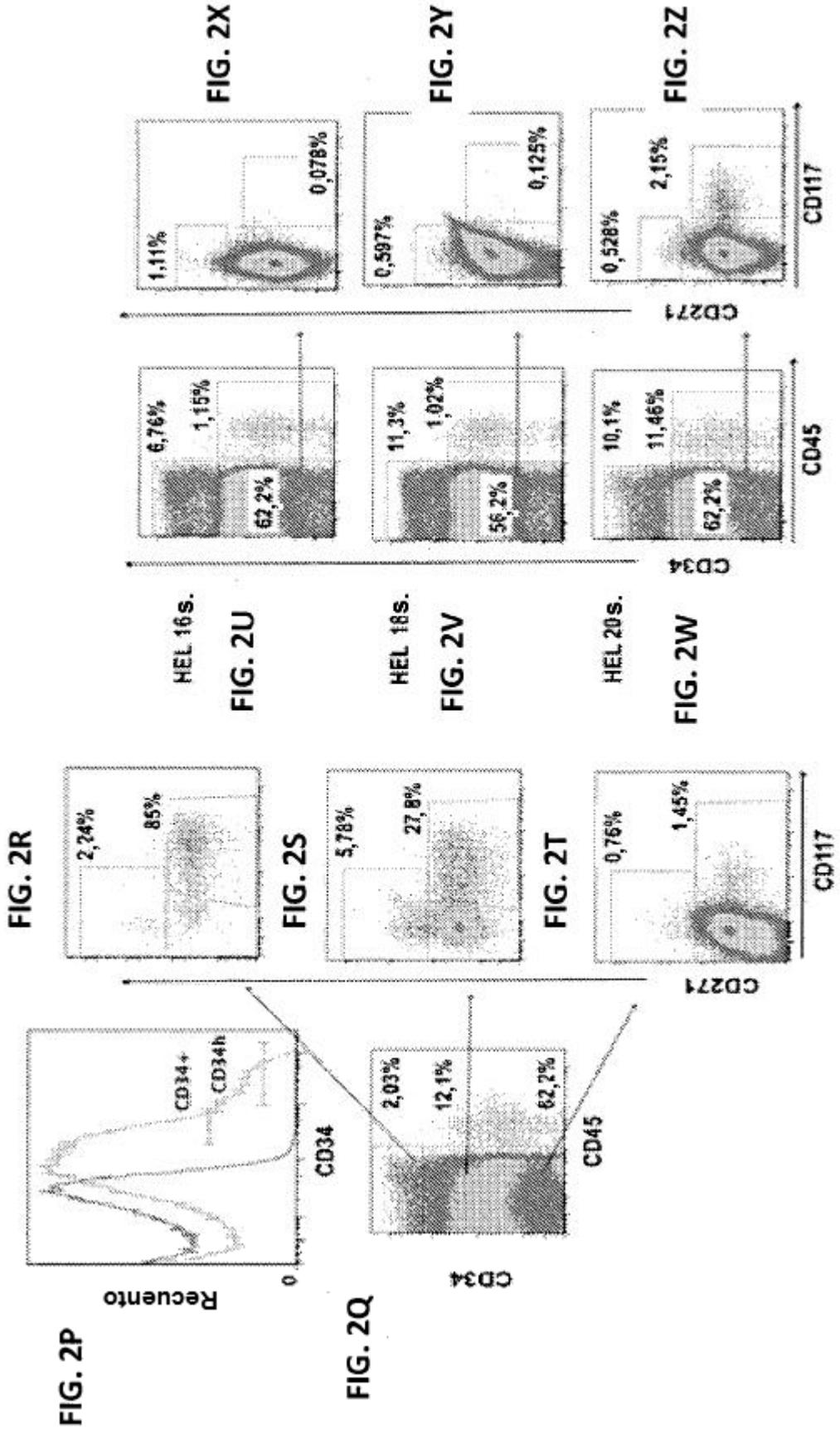


FIG. 2N





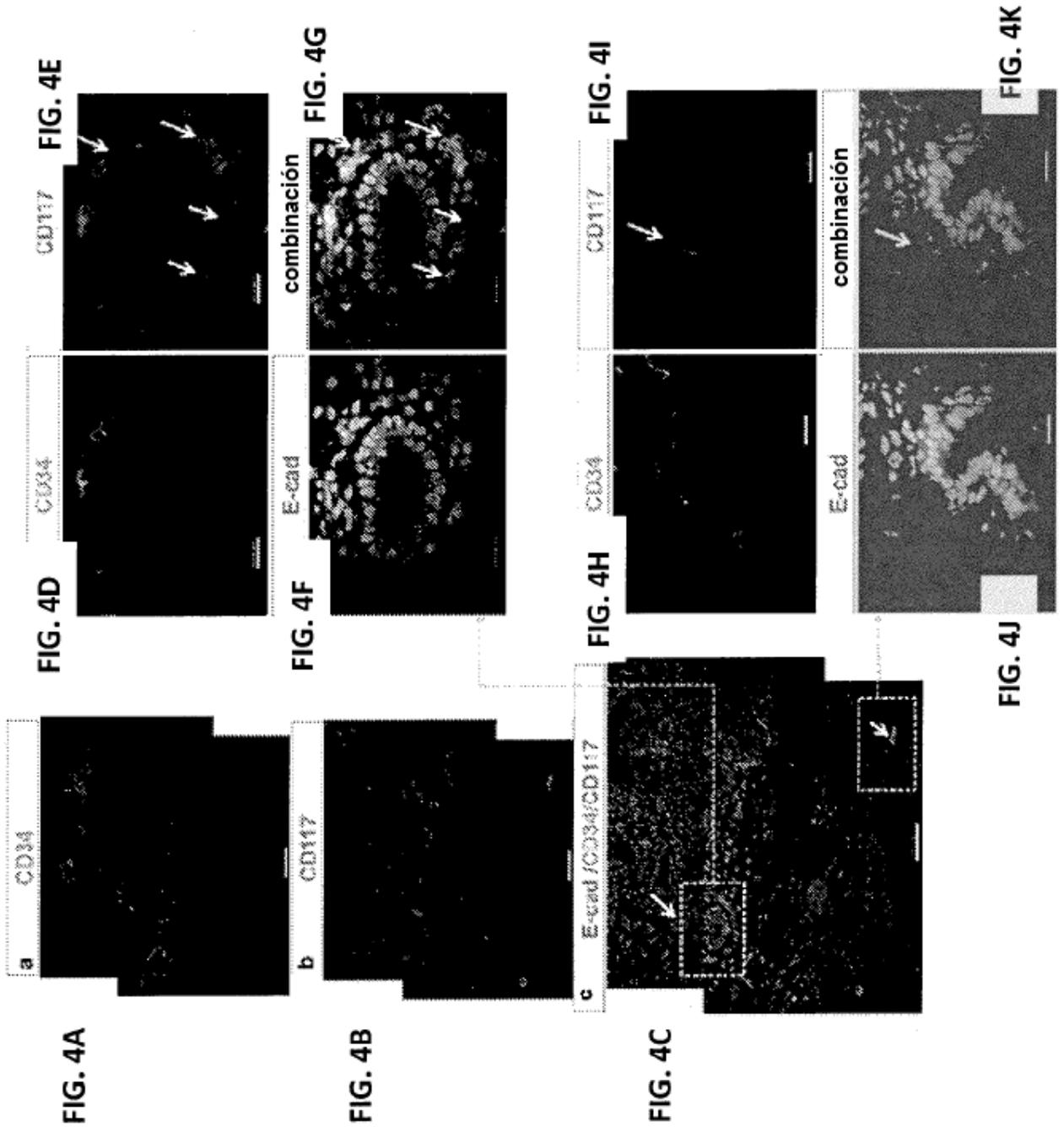
CD117/CK5/ULEX/Circunscrición a vaso sanguíneo y CD117

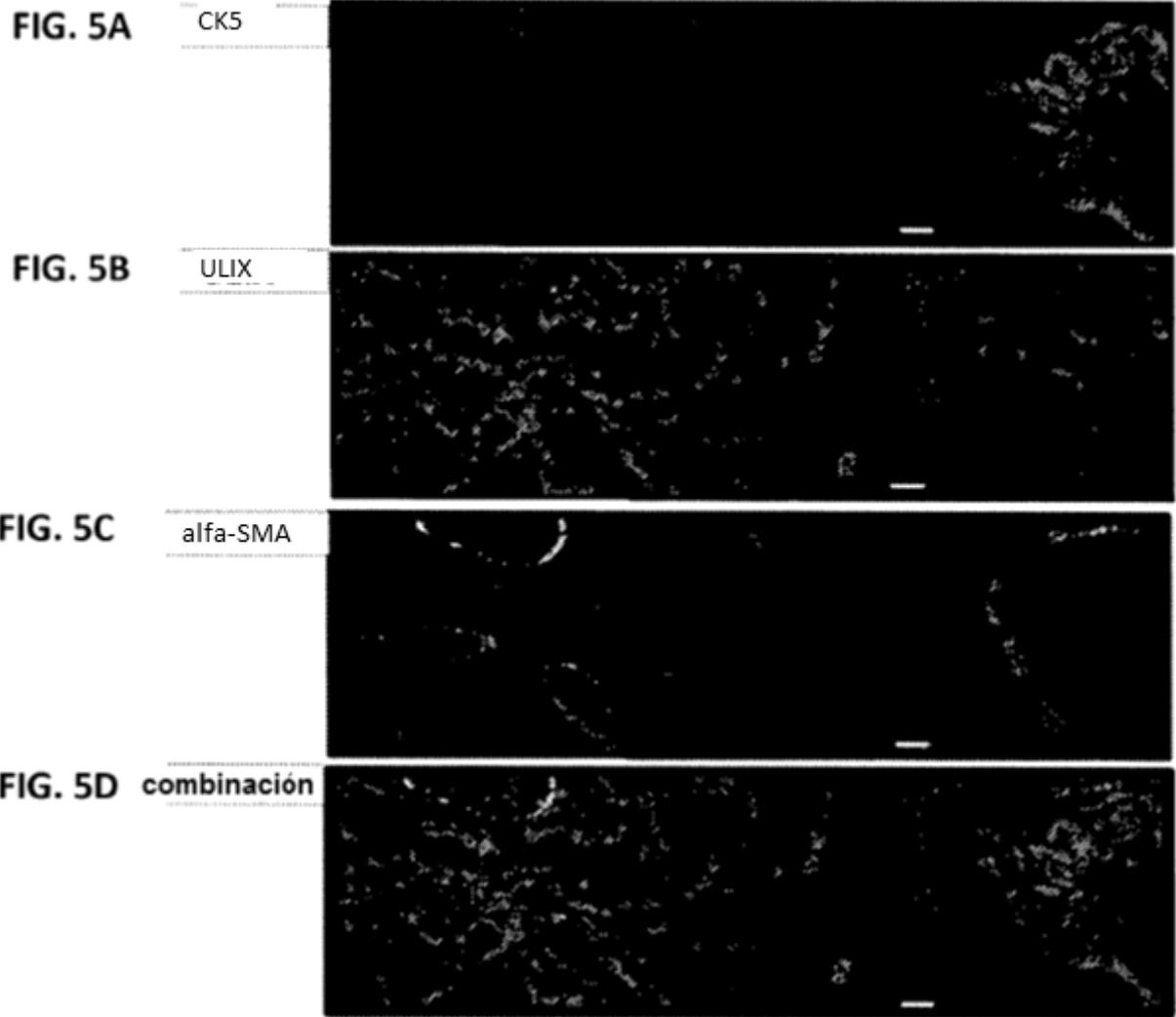


FIG. 3A

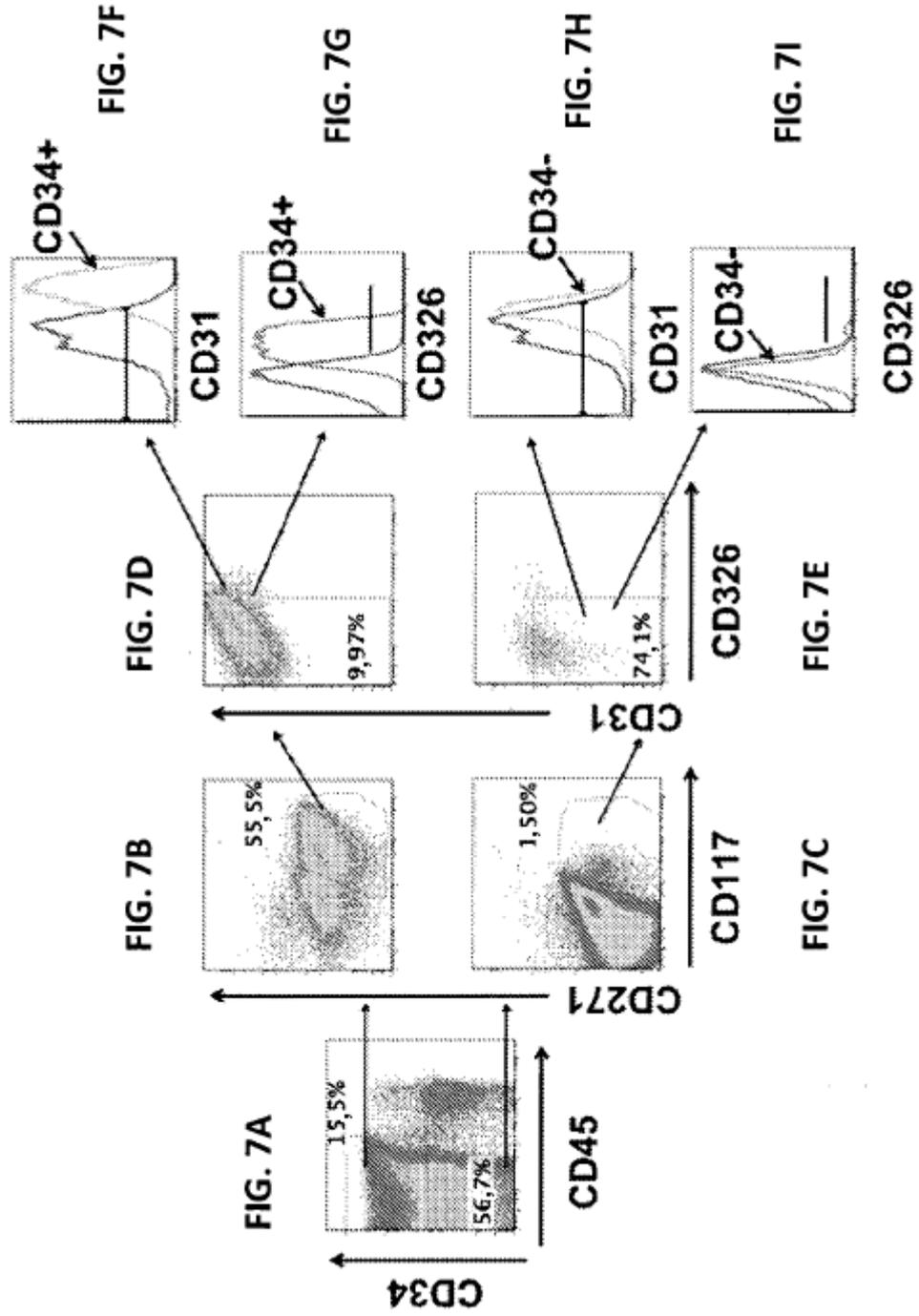
FIG. 3B

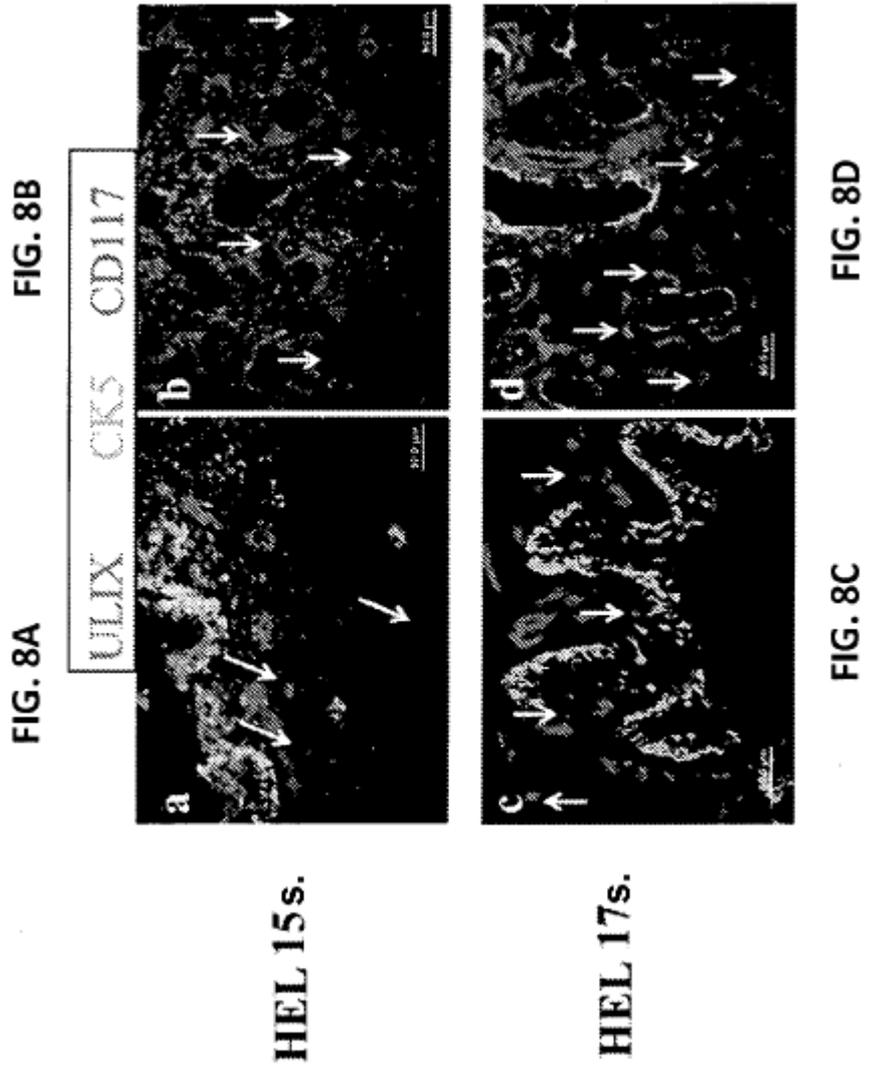
FIG. 3C

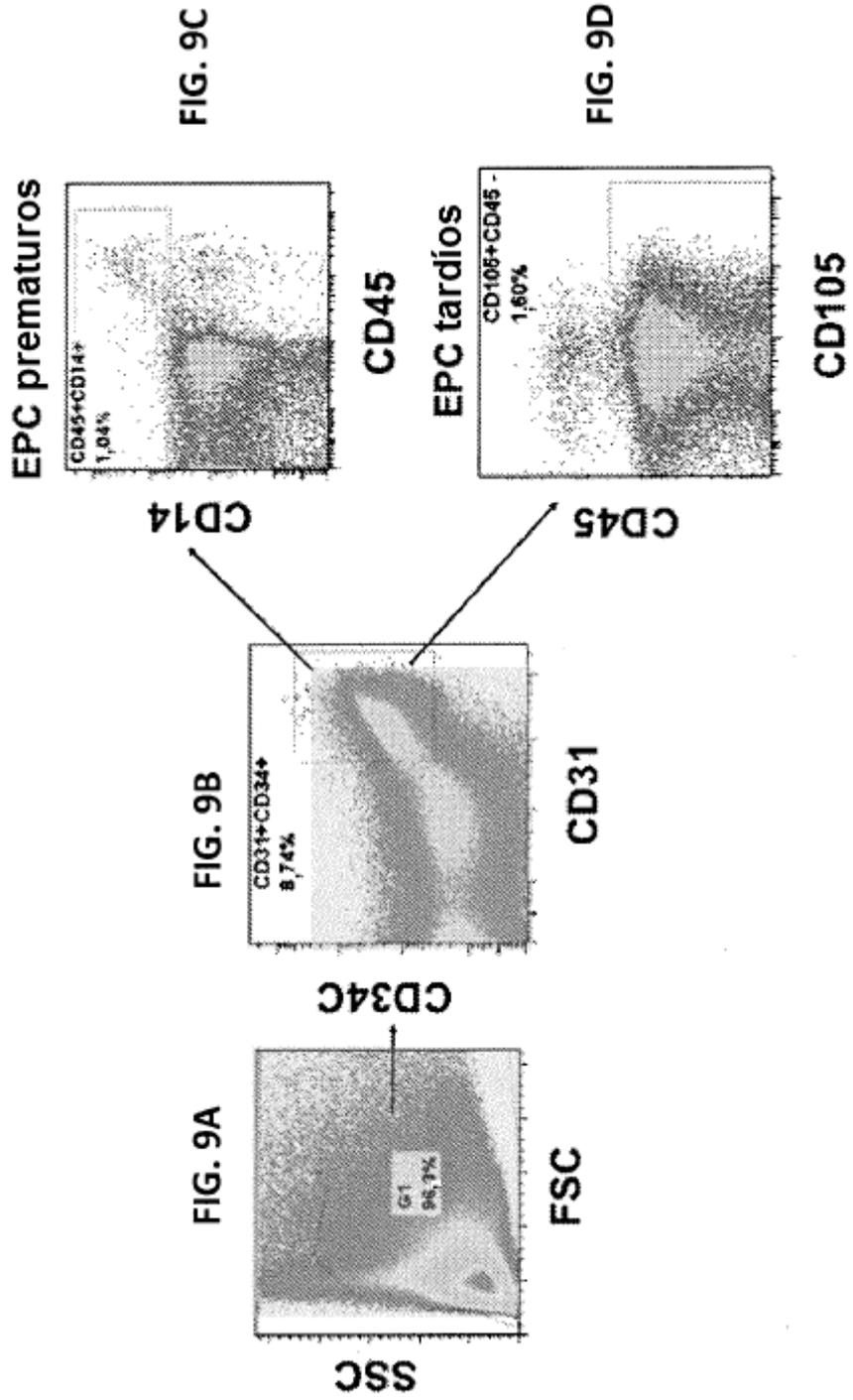




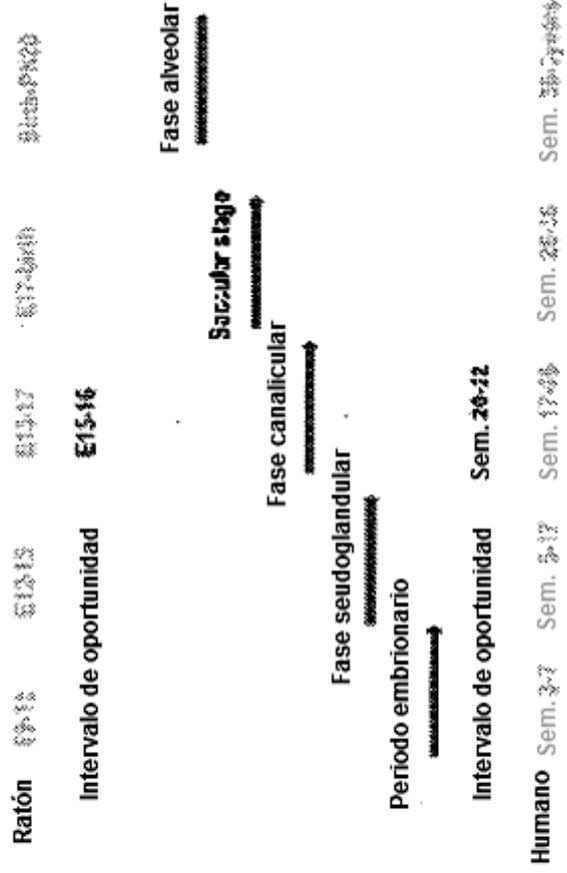






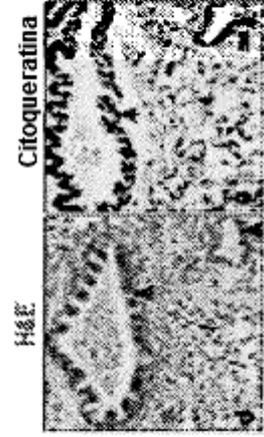
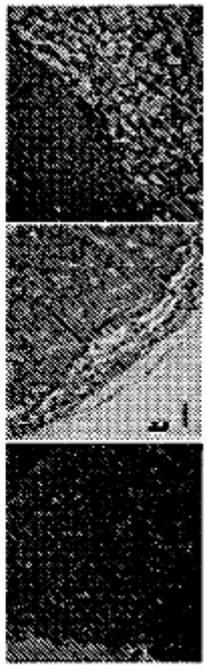


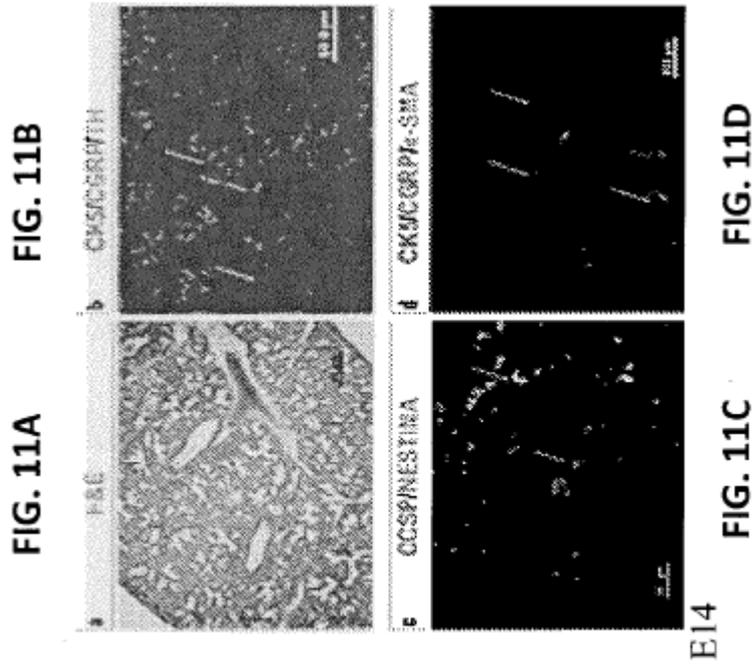
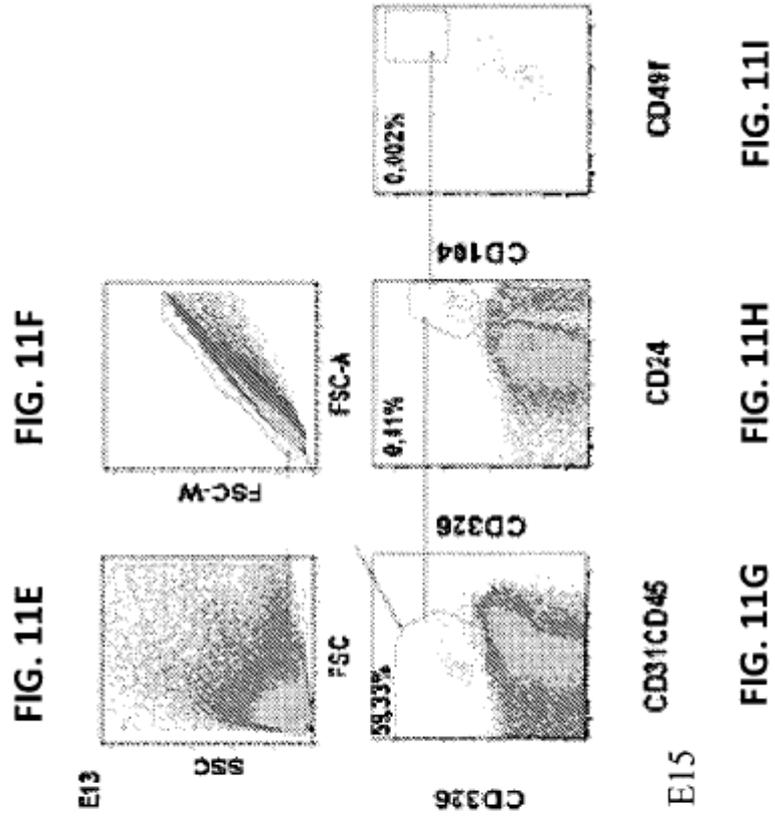
**FIG. 10F**



**FIG. 10A** **FIG. 10B** **FIG. 10C** **FIG. 10D** **FIG. 10E**

Trasplante pulmonar de ratón E14    Trasplante pulmonar de ratón E17    Trasplante pulmonar de ratón E16





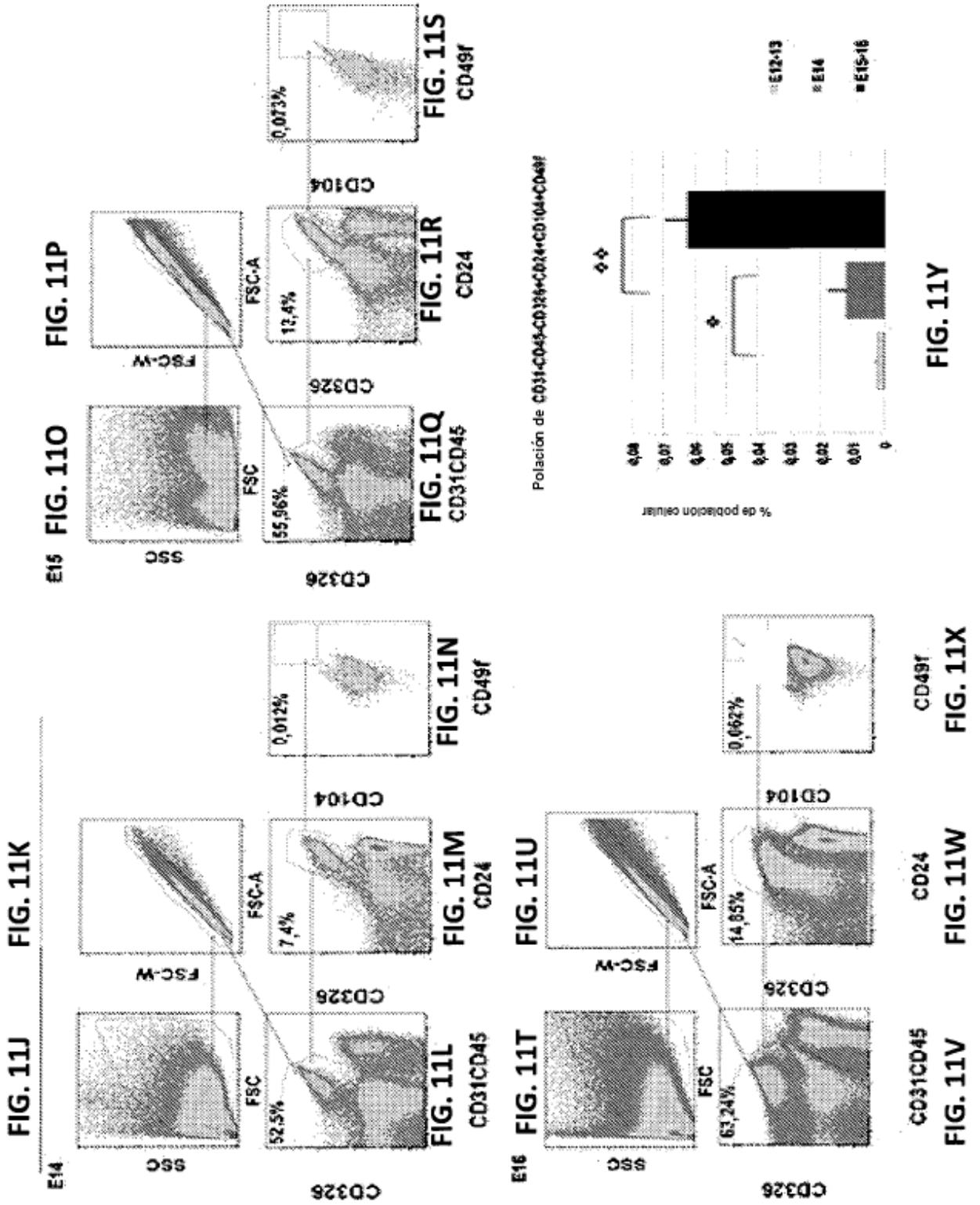
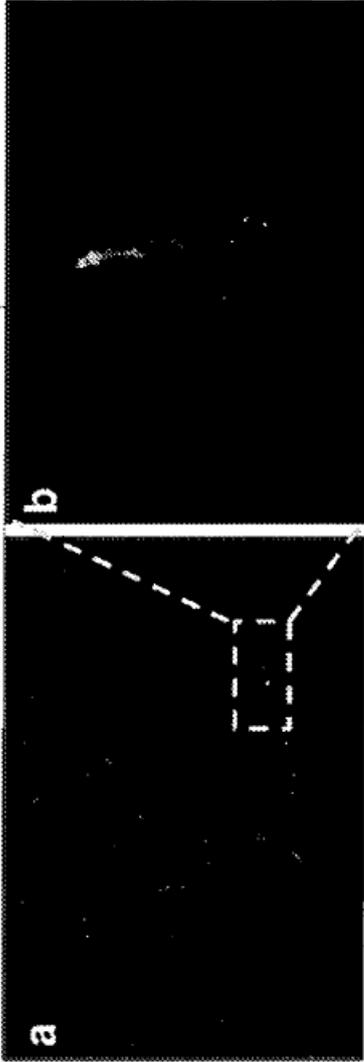


FIG. 12A



NESTINA / CGRP

FIG. 12B

FIG. 12C



E-cad / CGRP /  $\alpha$ -SMA

FIG. 12D

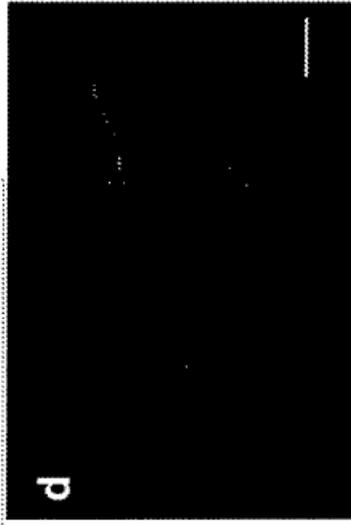


FIG. 12E

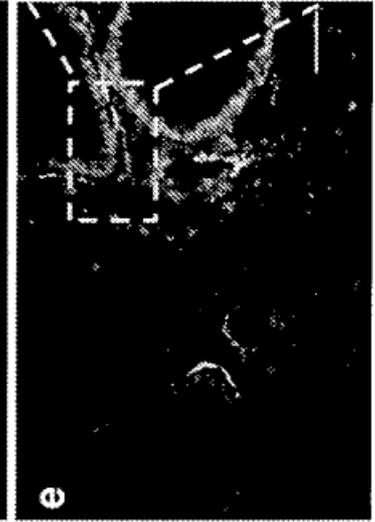


FIG. 12F

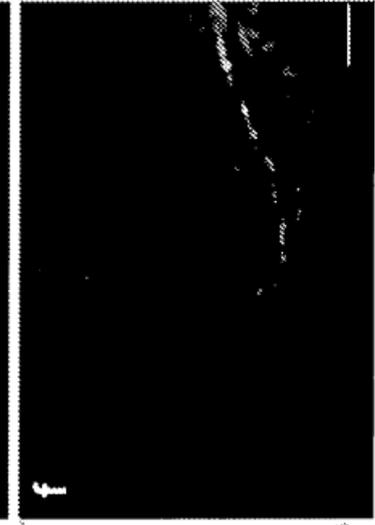


FIG. 13A

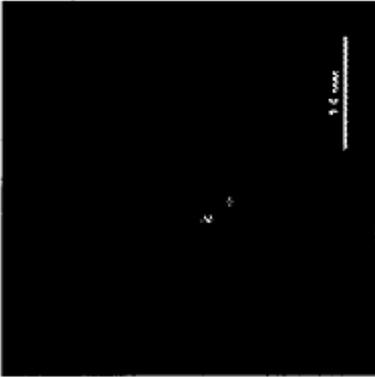
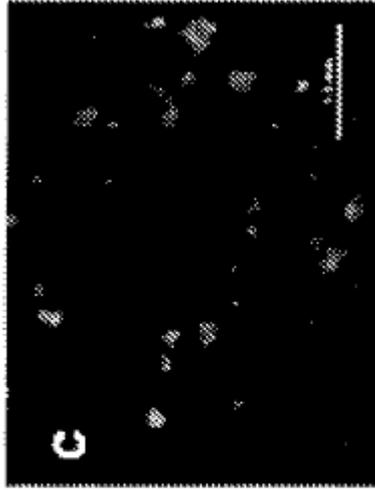


FIG. 13B



FIG. 13C



Número de focos de GFP+ en pulmones trasplantados

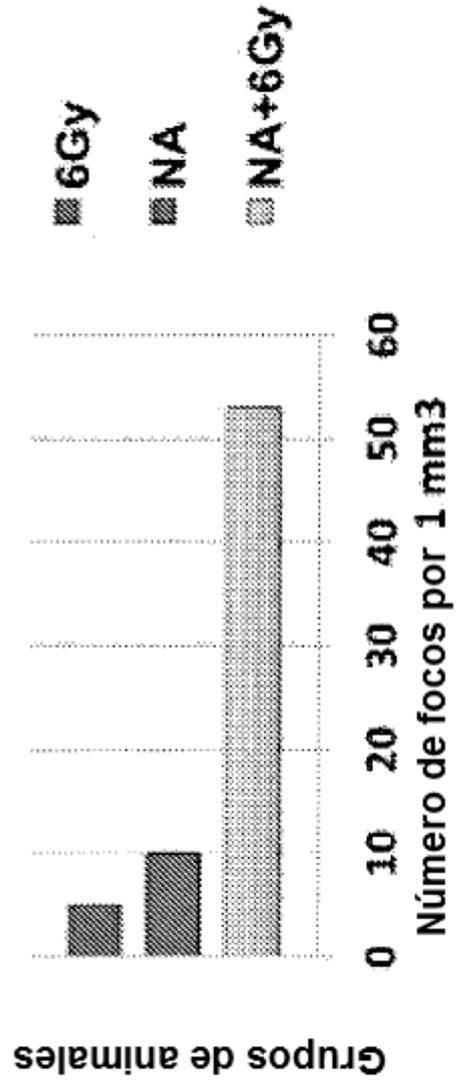


FIG. 13D

FIG. 14C



FIG. 14F



FIG. 14I



FIG. 14L



FIG. 14B



FIG. 14E



FIG. 14H



FIG. 14K

FIG. 14A



FIG. 14D



FIG. 14G

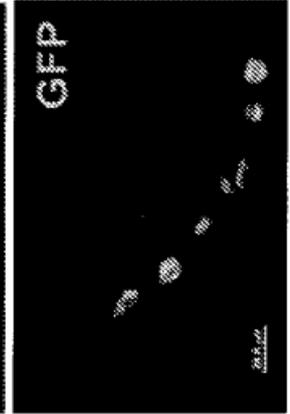
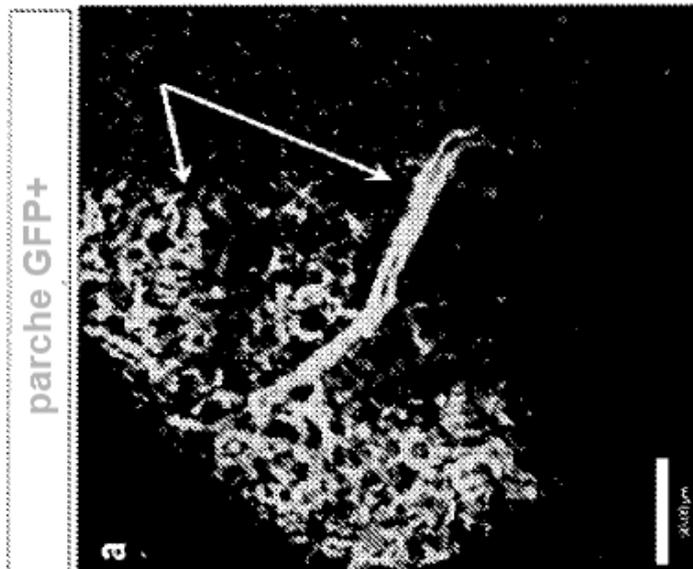
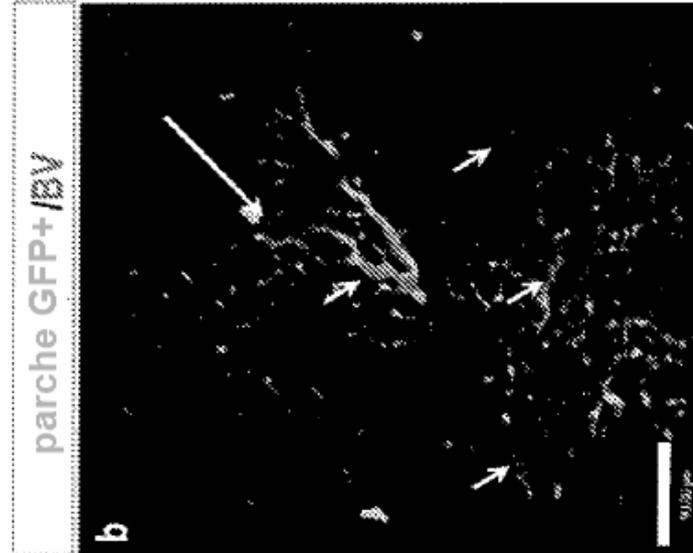


FIG. 14J

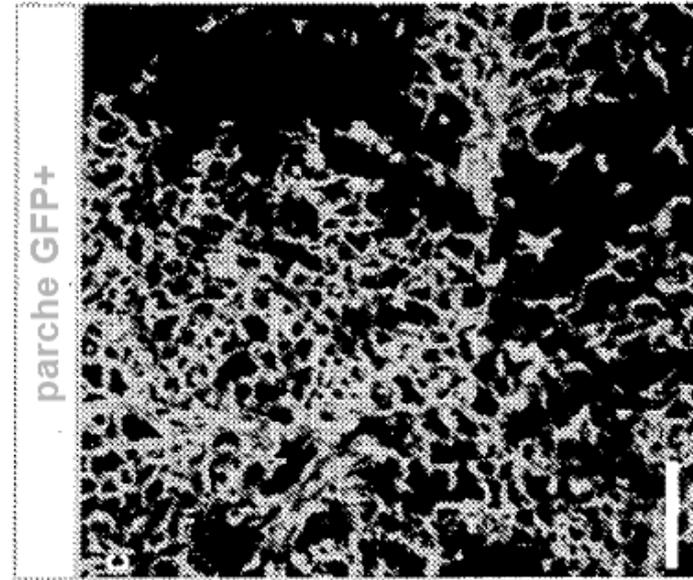
**FIG. 15A**



**FIG. 15B**



**FIG. 15C**



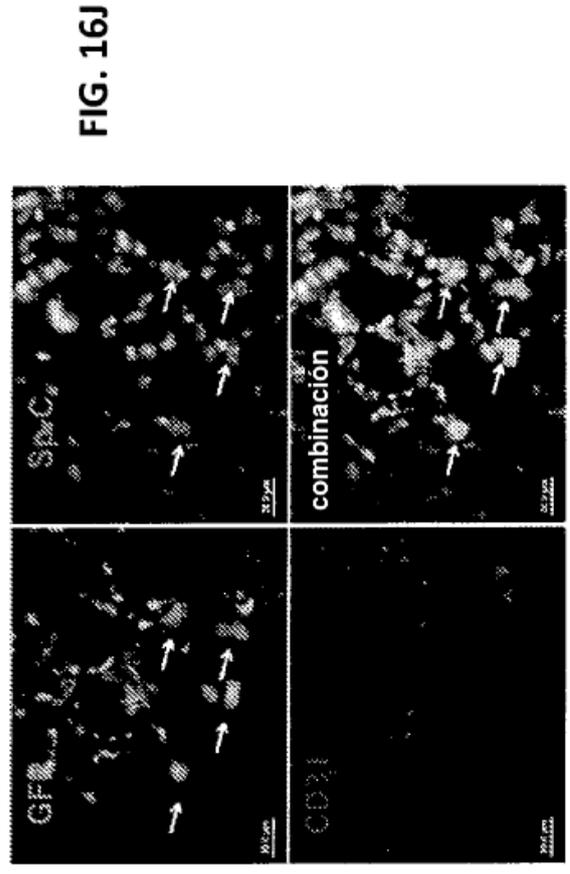
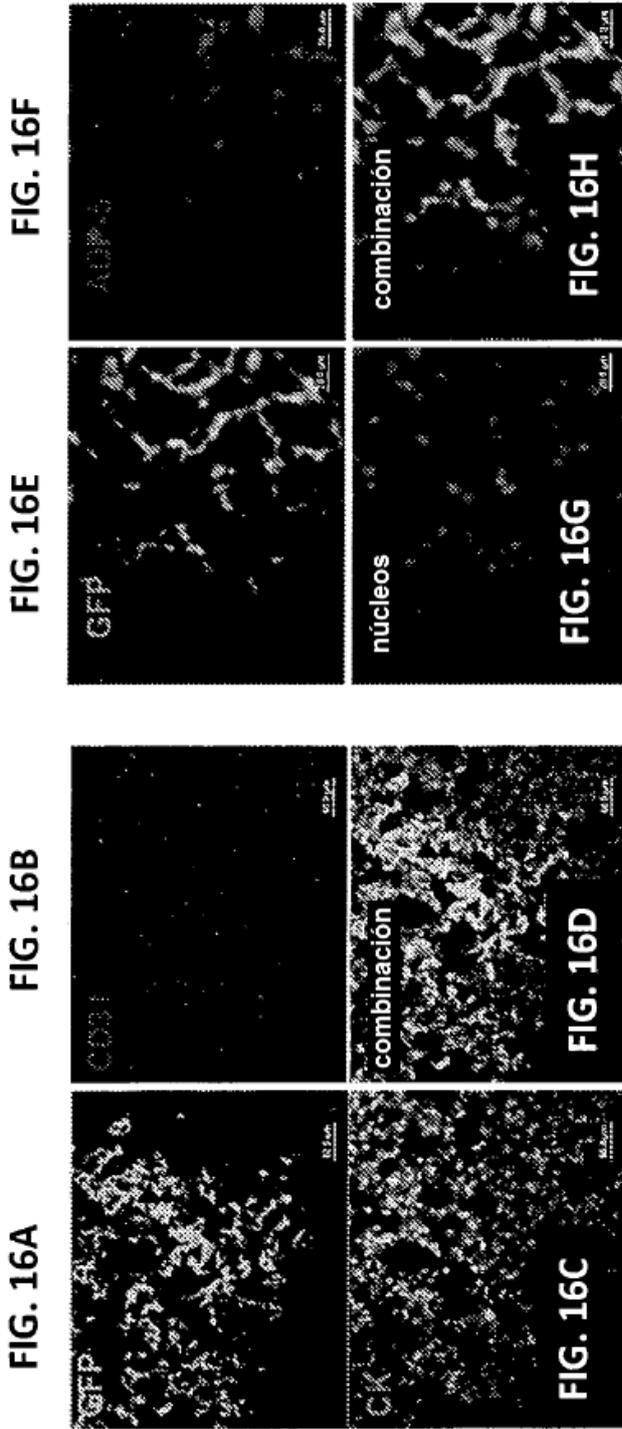
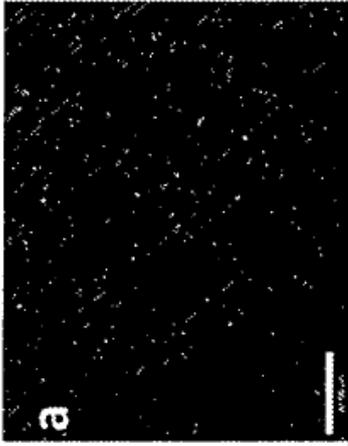


FIG. 17A



b GFP



c CK

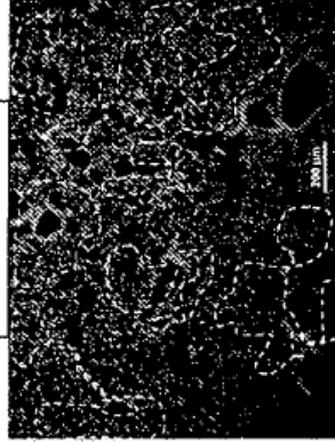
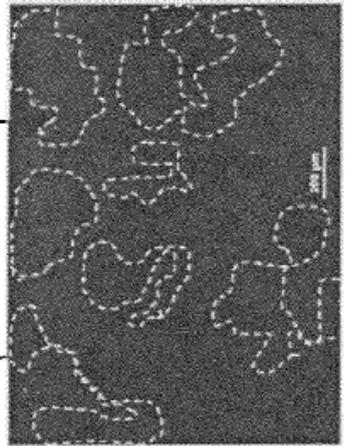


FIG. 17B

FIG. 17C

d CD31



e combinación

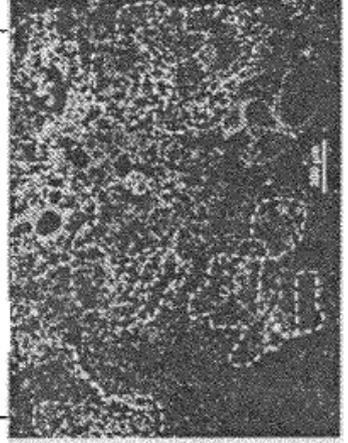
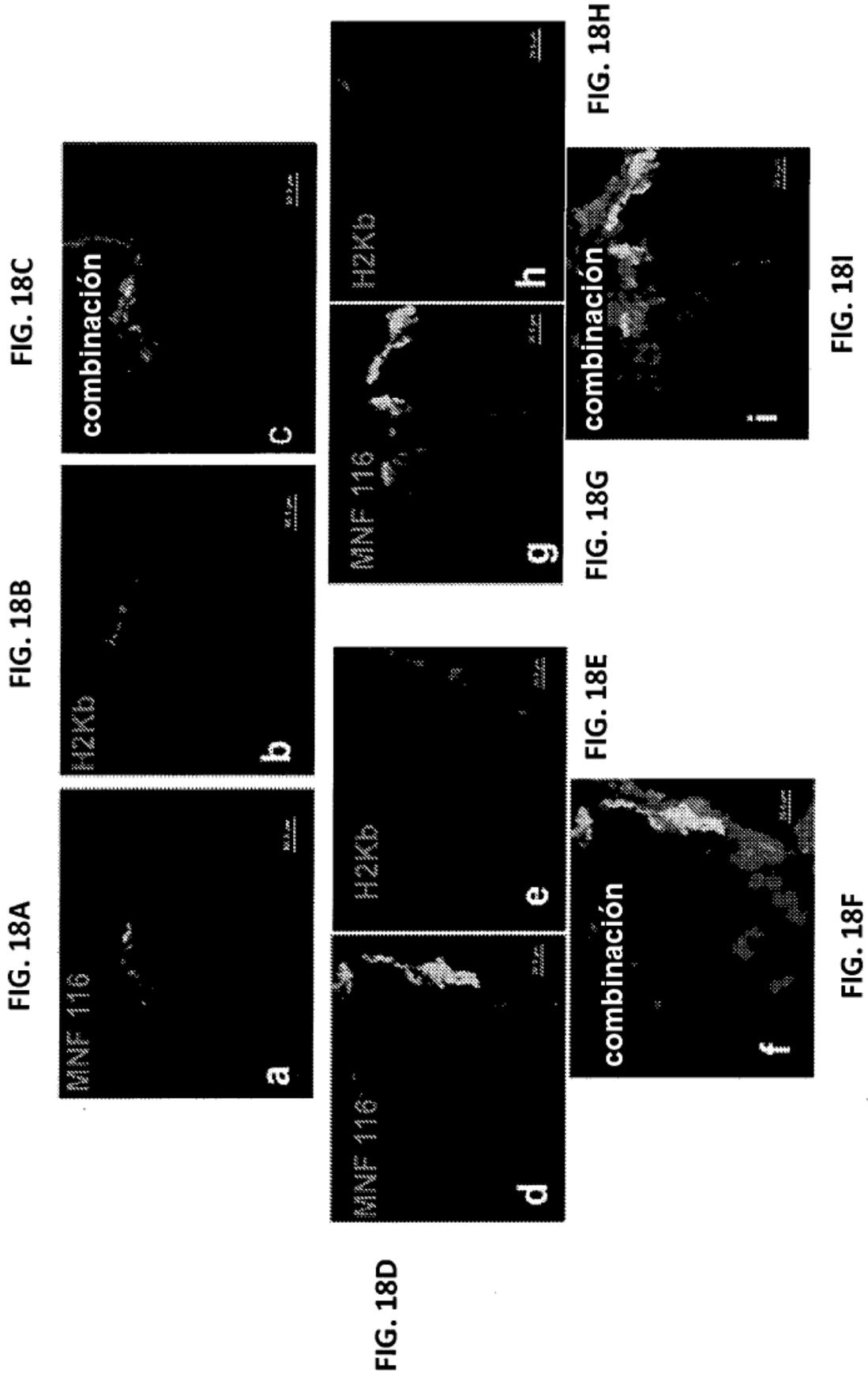


FIG. 17D

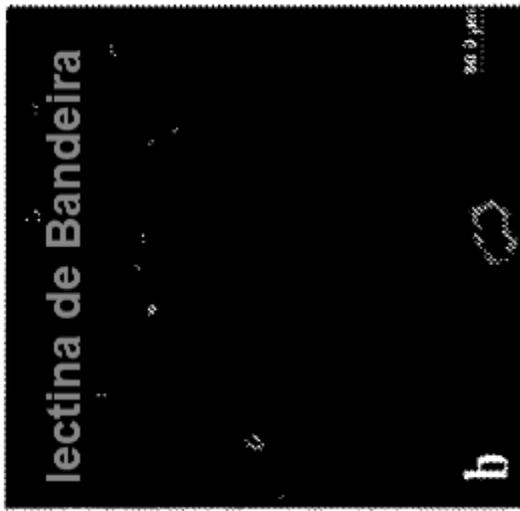
FIG. 17E



**FIG. 19A**



**FIG. 19B**



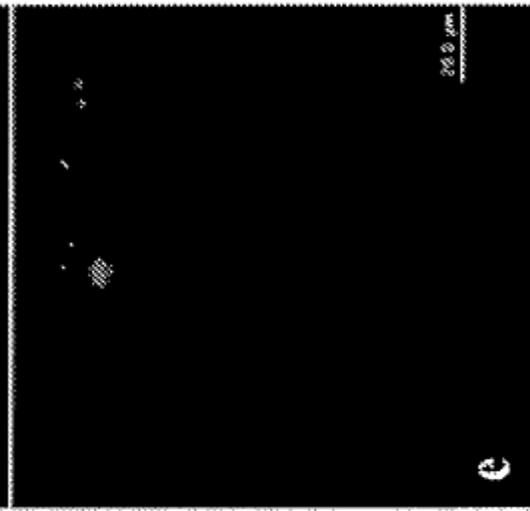
**FIG. 19C**



**FIG. 19D**



**FIG. 19E**



**FIG. 19F**

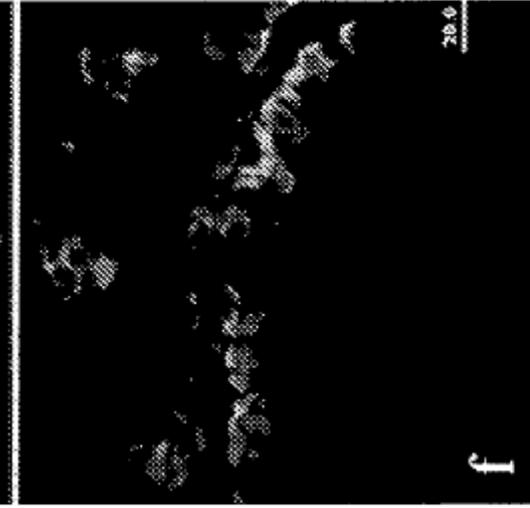


FIG. 20A



FIG. 20B



FIG. 20C



FIG. 20D

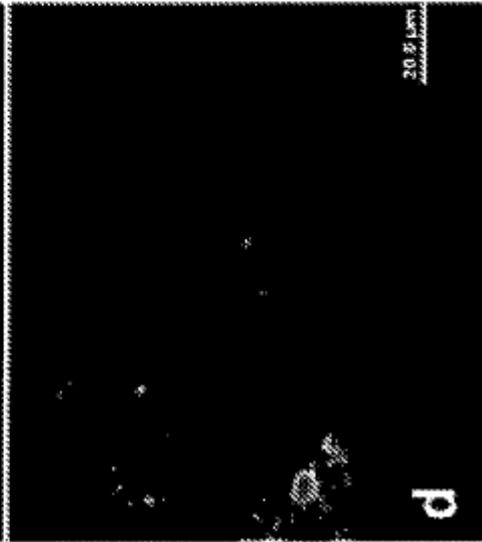


FIG. 20E



FIG. 20F



FIG. 21A

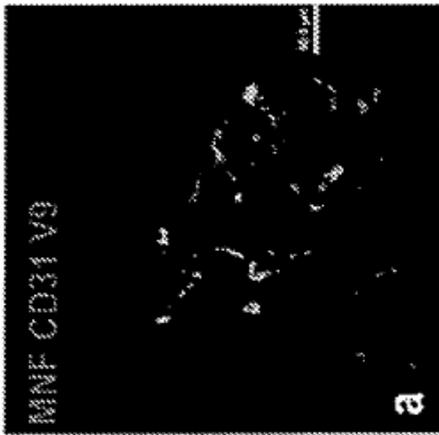


FIG. 21B

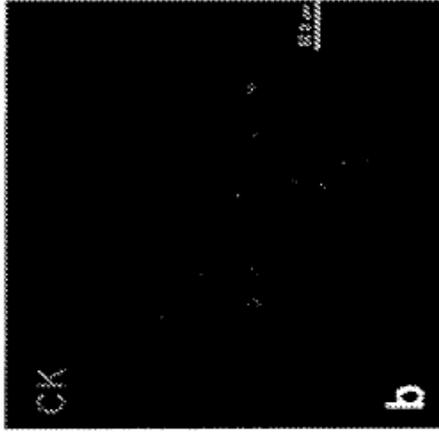


FIG. 21C

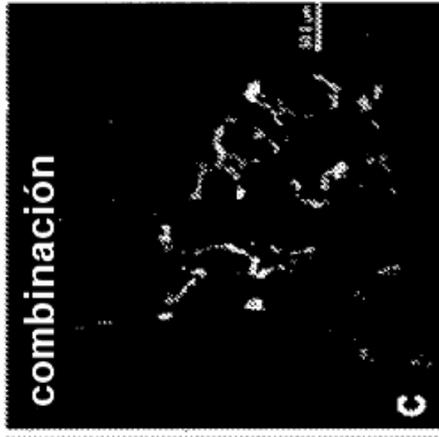


FIG. 22A



FIG. 22B



FIG. 22C

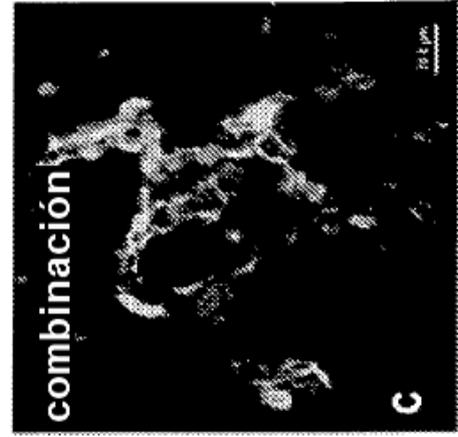


FIG. 23A



FIG. 23B

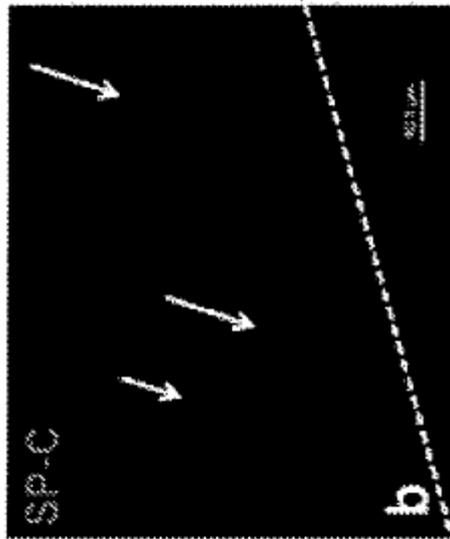


FIG. 23C

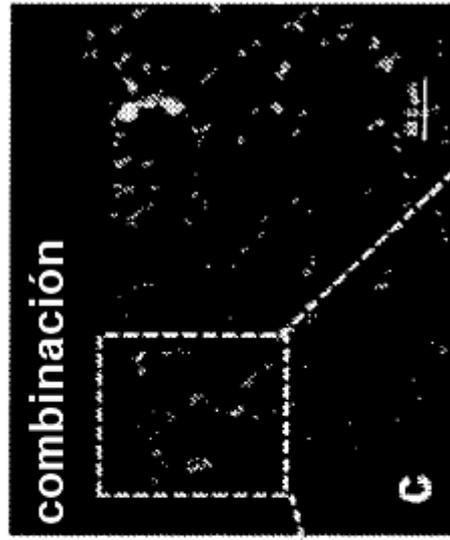


FIG. 23D

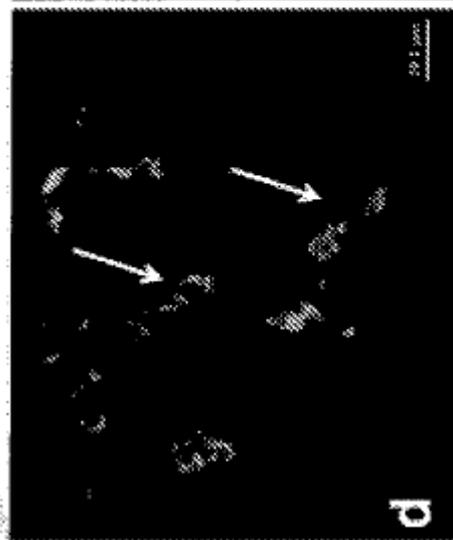


FIG. 23E



FIG. 23F

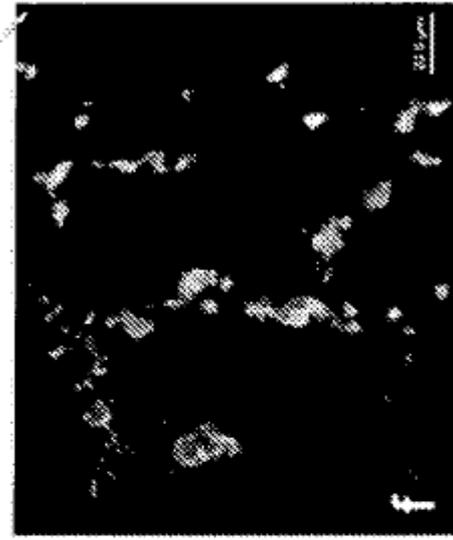


FIG. 24A



FIG. 24B

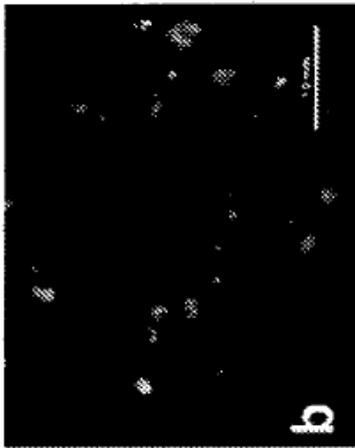


FIG. 24C



FIG. 24E



FIG. 24F

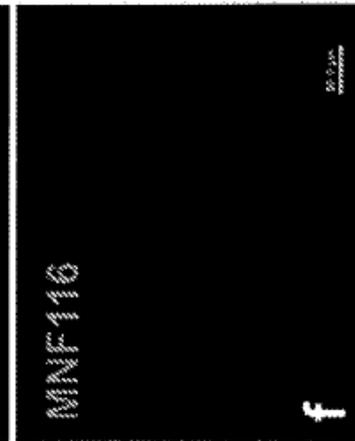


FIG. 24H



FIG. 24D



g



FIG. 24G

FIG. 25C



FIG. 25B



FIG. 25A

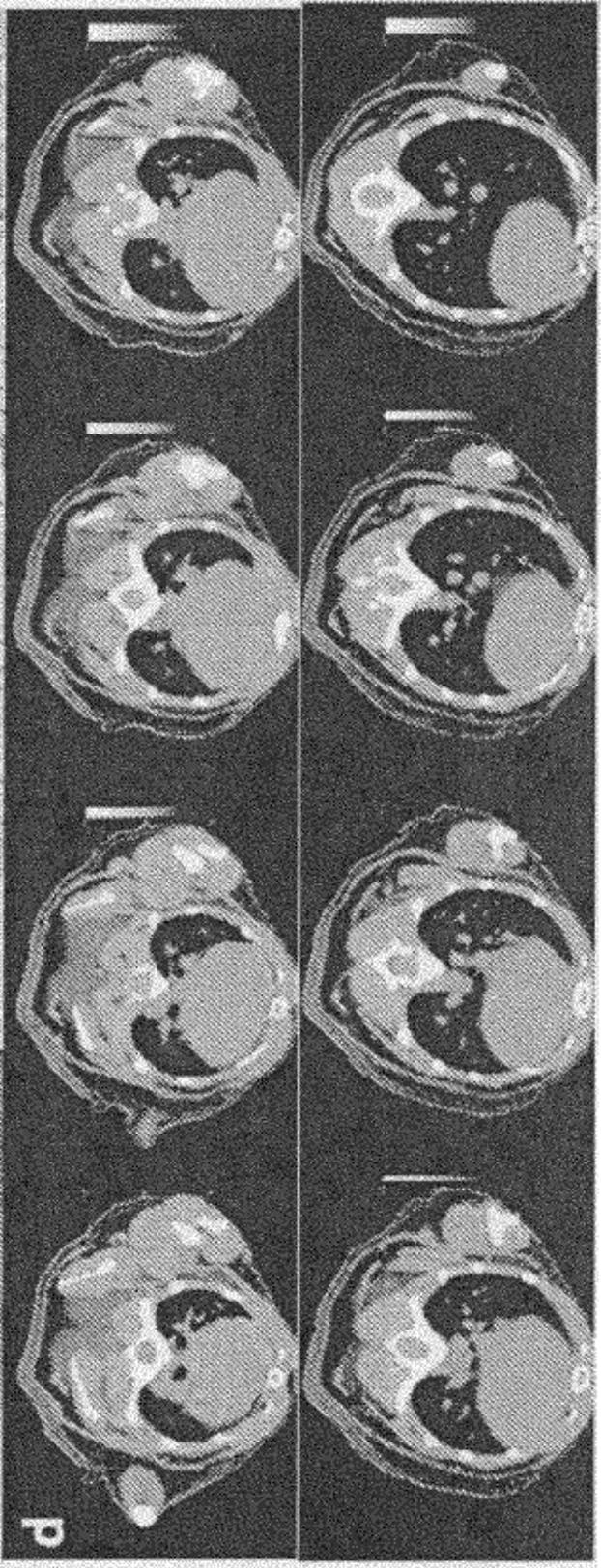


FIG. 25D