

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 693**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/GB2012/051600**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12735321 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2729562**

54 Título: **Células progenitoras de linaje mesodérmico**

30 Prioridad:

06.07.2011 GB 201111503
06.07.2011 GB 201111505
06.07.2011 GB 201111509
06.07.2011 GB 201111500

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2018

73 Titular/es:

CELL THERAPY LIMITED (100.0%)
Institute of Life Sciences First Floor, Room 137
School of Medicine Swansea University Singleton
Park
Swansea SA2 8PP, GB

72 Inventor/es:

HOUZE, THOMAS AVERELL;
EVANS, MARTIN JOHN;
REGINALD, AJAN;
PIEPER, INA LAURA y
PERKINS, BRIAN LEE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 675 693 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 progenitoras de linaje mesodérmico

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a células progenitoras de linaje mesodérmico y a su uso en terapia.

10 **Antecedentes de la invención**

Las células madre mesenquimatosas (CMM) son células madre adultas multipotentes. Las CMM se diferencian para formar las diferentes células especializadas que se encuentran en los tejidos esqueléticos. Por ejemplo, pueden diferenciarse en células cartilaginosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células adiposas (adipocitos).

15 Las CMM se usan en una diversidad de terapias, tales como el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) y el infarto de miocardio. Una vez administradas al paciente, las CMM normalmente migran (o migran de forma dirigida) al tejido dañado y ejercen sus efectos terapéuticos a través de la señalización paracrina y promoviendo la supervivencia, reparación y regeneración de las células vecinas en el tejido dañado.

20 Las terapias actuales normalmente implican la infusión de una mezcla de subtipos de CMM, algunos de los cuales no migran eficientemente al tejido de interés. Esto requiere el uso de una alta dosis de células que puede conducir a efectos secundarios colaterales y efectos secundarios relacionados con el volumen. Las CMM normalmente se obtienen de la médula ósea y, por tanto, es difícil obtener grandes cantidades.

25 **Sumario de la invención**

Los inventores han identificado sorprendentemente una nueva clase de células progenitoras de linaje mesodérmico (PLM) que tienen un patrón de expresión de marcadores específico. Pueden aislarse poblaciones homogéneas de las PLM de la invención a partir de células mononucleares (CM), tales como CM de sangre periférica. Las PLM son capaces de reparar y de migrar eficientemente a tejidos dañados.

30 La invención proporciona una célula progenitora de linaje mesodérmico, en la que la célula (a) expresa niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y (b) no expresa niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

40 La invención también proporciona:

- una población que comprende dos o más células progenitoras de la invención;
- una composición farmacéutica que comprende (a) una célula progenitora de la invención o una población de la invención y (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable;
- un método de producción de una población de la invención, que comprende (a) cultivar células mononucleares (CM) con lisado de plaquetas en condiciones de oxígeno de menos del 20 % de oxígeno (O₂) y en condiciones que permitan a las células progenitoras adherirse de manera que las CM se diferencien en células progenitoras de linaje mesodérmico y (b) recoger y cultivar las células progenitoras que tengan un patrón de expresión de la invención y que de ese modo produzcan una población de la invención;
- una población de la invención para su uso en la reparación de un tejido dañado en un paciente; y
- una población de la invención para su uso en un método de tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en un paciente que lo necesite.

55 **Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra un gel de RT-PCR que confirma la presencia de CD44 y la ausencia de CD34 en las PLM de la invención.

La Fig. 2 muestra los resultados del análisis por FACS en las PLM de la invención. Esto confirma que las células son positivas para al menos CD73 y CD90 y negativas para CD14, CD34 y CD45.

La Fig. 3 muestra resultados adicionales del análisis por FACS, en concreto los histogramas para CD90 (arriba) y CD73 (abajo).

La Fig. 4 muestra histogramas de FACS para la falta de CD14, CD34 y CD45 en células teñidas (Fig. 4a) y sin teñir (Fig. 4b).

La Fig. 5 muestra que las células progenitoras de linaje mesodérmico migran al sitio de fractura de una manera dependiente del tiempo y de CXCR4. Se realizó bioluminiscencia (BLI) los días 1 (primera fila), 3 (segunda fila), 7

(tercera fila) y 14 (cuarta fila) después de la fractura/trasplante en ratones con fractura de tibia que recibieron un trasplante ya sea de 106 PLM-P-Act-Luc (PLM) (columna izquierda), PLM-fl-Act-Luc-CXCR4+ (CXCR4(+)) (columna central) o PLM-P-Act-Luc-CXCR4- (CXCR4(-)) (columna derecha).

5 Descripción detallada de la invención

Ha de entenderse que pueden adaptarse diferentes aplicaciones de los productos y métodos desvelados a las necesidades específicas en la técnica. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares de la invención solamente y no tiene por objeto ser limitante.

Además, como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye "células", la referencia a "un tejido" incluye dos o más de dichos tejidos, la referencia a "un paciente" incluye dos o más de dichos pacientes y similares.

PLM de la invención

La presente invención proporciona una célula progenitora de linaje mesodérmico (PLM). La PLM expresa niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), pero no expresa niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

Las PLM de la invención tienen numerosas ventajas. Las principales ventajas se resumirán en el presente documento. Sin embargo, serán evidentes ventajas adicionales a partir del análisis a continuación.

Las PLM de la invención pueden usarse ventajosamente para la reparación de tejidos dañados en pacientes. Las PLM son capaces de migrar (o migrar de forma dirigida) eficientemente a un tejido dañado y ejercer efectos antiinflamatorios en el tejido. Esto se analiza con más detalle a continuación. Una de las habilidades más importantes de las PLM es migrar (o migrar de forma dirigida) a sitios lesionados, lo que implica quimiotaxis. Esto se basa en la señalización de quimiocinas y utiliza mecanismos tales como la rodadura, la adhesión y la transmigración. Los efectos antiinflamatorios de las PLM promueven la supervivencia, la reparación y la regeneración de las células vecinas en el tejido dañado. Las células también son capaces ejercer efectos paracrinos tales como la secreción de factores angiogénicos, quimiotácticos y antiapoptóticos.

Como se analiza con más detalle a continuación, las PLM se producen a partir de células mononucleares (CM), tales como CM periféricas, tomadas de un individuo humano. Puesto que las PLM se producen a partir de CM, pueden producirse fácilmente (tal como a partir de sangre periférica) y pueden ser autólogas para el paciente que se ha de tratar y evitar de este modo el riesgo de rechazo inmunológico por el paciente.

Es posible, en principio, producir un número ilimitado de PLM a partir de un solo individuo, puesto que pueden obtenerse diversas muestras de CM (es decir, diversas muestras de sangre). Sin duda es posible producir grandes cantidades de PLM a partir de un solo individuo. Por tanto, las PLM de la invención pueden hacerse en grandes cantidades.

Las PLM de la invención se producen en condiciones clínicamente pertinentes, por ejemplo, en ausencia de cantidades traza de endotoxinas y otros contaminantes ambientales, así como productos animales tales como suero de ternera fetal. Esto hace que las PLM de la invención sean particularmente adecuadas para la administración a pacientes.

Puesto que las PLM de la invención se producen a partir de CM, son sustancialmente homólogas y pueden ser autólogas. También evitan la variación de donante-a-donante, que con frecuencia se produce con las células madre mesenquimatosas (CMM). Pueden producirse numerosas poblaciones de PLM de la invención a partir de una única muestra tomada del paciente antes de que haya comenzado cualquier otra terapia, tal como quimioterapia o radioterapia. Por tanto, las PLM de la invención pueden evitar cualquiera de los efectos perjudiciales de esos tratamientos.

Las PLM de la invención pueden hacerse rápidamente. Pueden producirse PLM a partir de CM en menos de 30 días, tal como en aproximadamente 22 días.

La producción de PLM a partir de CM evita las implicaciones morales y éticas implicadas en el uso de células madre mesenquimatosas (CMM) derivadas de células madre embrionarias humanas (CMEh).

Las PLM de la invención se producen normalmente a partir de CM humanas. Las PLM de la invención son, por tanto, normalmente humanas.

5 Las PLM de la invención pueden identificarse como células progenitoras de linaje mesodérmico usando métodos convencionales conocidos en la técnica, incluyendo la expresión de marcadores restringidos de linaje, características estructurales y funcionales. Las PLM expresarán niveles detectables de marcadores de superficie celular que se sabe que son característicos de las células progenitoras de linaje mesodérmico. En particular, además de los marcadores que se analizan con más detalle a continuación, las PLM pueden expresar actina de músculo liso α , cadena α de colágeno de tipo I, GATA6, Mohawk y vimentina (Sági B et al *Stem Cells Dev.* 20 de marzo de 2012; 21 (5): 814-28).

15 Las PLM de la invención son capaces de completar satisfactoriamente ensayos de diferenciación *in vitro* para confirmar que son de linaje mesodérmico. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, ensayos de diferenciación adipogénica, ensayos de diferenciación osteogénica y ensayos de diferenciación neurogénica (Zaim M et al, *Ann Hematol.* Agosto de 2012; 91 (8): 11175-86).

20 Las PLM de la invención no son células madre. En particular, no son células madre mesenquimatosas (CMM). Se diferencian terminalmente. Aunque pueden forzarse en las condiciones adecuadas *in vitro* a diferenciarse, por ejemplo, en células cartilaginosas u óseas, no se diferencian *in vivo*. Las PLM de la invención producen sus efectos mediante la migración al tejido dañado y ejerciendo señalización paracrina en el tejido dañado. En particular, las PLM son preferentemente capaces de inducir efectos antiinflamatorios en el tejido dañado. Esto se analiza con más detalle a continuación.

25 Las PLM de la invención se caracterizan normalmente por una morfología en forma de huso. Las PLM son normalmente similares a fibroblastos, es decir, tienen un cuerpo celular pequeño con unos pocos procesos celulares que son largos y delgados. Las celdas normalmente tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 μ m de diámetro.

30 Las PLM de la invención se distinguen de las PLM conocidas a través de su patrón de expresión de marcadores. Las PLM de la invención expresan niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD271. Las PLM de la invención pueden sobreexpresar uno o más, tal como todos, de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD271. Las PLM de la invención sobreexpresan uno o más de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD271 si expresan más que otras PLM y/o CMM. Las PLM de la invención no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

35 CD29 (integrina Beta 4) es una unidad de integrina asociada a receptores de antígenos muy tardíos. Se sabe que se une con la subunidad alfa 3 para crear un complejo $\alpha 3\beta 1$ que reacciona con netrina-1 y reelina.

40 CD44 es una glucoproteína de la superficie celular implicada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración. En seres humanos, el antígeno CD44 está codificado por el gen CD44 en el cromosoma 11.

45 CD73, también conocido como ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT, EC 3.1.3.5), es una ectoenzima de superficie celular de 70 kDa unida a glucosilfosfatidilinositol que se encuentra en muchos tipos de cánceres humanos y de ratón.

45 CD90 (o Thy-1) es una proteína de superficie celular conservada anclada con glucofosfatidilinositol (GPI) y muy N-glicosilada de 25-37 kDa con un único dominio de inmunoglobulina similar a V. Se descubrió originariamente como un antígeno de timocito.

50 CD105 (o Endoglina) es una glucoproteína de membrana de tipo I localizada sobre superficies celulares y es parte del complejo receptor TGF beta.

50 CD271, también conocido como receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR) o p75NTR, pertenece a la superfamilia del receptor de neurotrofina de baja afinidad y el receptor de factor de necrosis tumoral.

55 CD 14 es un componente del sistema inmunitario innato y existe en dos formas. Está anclado en la membrana por una cola de glucosilfosfatidilinositol (mCD14) o aparece en forma soluble (sCD14). CD14 soluble aparece después del desprendimiento de mCD14 (48 kDa) o se secreta directamente desde vesículas intracelulares (56 kDa).

60 CD34 es una glucoproteína de superficie celular y funciona como un factor de adhesión célula-célula. Por ejemplo, media la fijación de las células madre a la matriz extracelular de la médula ósea o directamente a las células estromales.

65 CD45 es una proteína tirosina fosfatasa (PTP) localizada en células hematopoyéticas excepto eritrocitos y plaquetas. CD45 también se denomina antígeno leucocitario común, T220 y B220 en ratones. Las proteínas tirosina cinasas constituyen una familia de enzimas inductoras citoplásmicas y similares a receptor que catalizan la desfosforilación de restos de fosfotirosina y se caracterizan por dominios catalíticos homólogos.

Pueden usarse métodos convencionales conocidos en la técnica para determinar la expresión detectable, la expresión baja o la falta de la misma de los diversos marcadores analizados anteriormente (y a continuación). Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, inmunocitoquímica, inmunoensayos, citometría de flujo, tal como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), tal como PCR de transcripción inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Los inmunoensayos adecuados incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western, inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ensayos ELISPOT, por sus siglas en inglés), técnicas de inmunoensayo enzimático multiplicado, ensayos radioalergosorbentes (RAST), radioinmunoensayos, ensayos de radioenlace e inmunofluorescencia. La transferencia Western, ELISA y RT-PCR son todos cuantitativos y, por tanto, pueden usarse para medir el nivel de expresión de los diversos marcadores, si están presentes. El uso de FACS se desvela en el Ejemplo. Los anticuerpos y anticuerpos marcados fluorescentemente para todos los diversos marcadores analizados en el presente documento están disponibles en el mercado.

Las PLM de la invención son preferentemente capaces de migrar a un tejido dañado específico en un paciente. En otras palabras, cuando las células se administran a un paciente que tiene un tejido dañado, las células son capaces de migrar (o migrar de forma dirigida) al tejido dañado. Esto es ventajoso porque significa que las células pueden infundirse a través de vías convencionales, por ejemplo, por vía intravenosa, y después se dirigirán al sitio del daño. No es necesario entregar las células al tejido dañado. El daño puede deberse a una lesión o enfermedad, como se analiza con más detalle a continuación.

La capacidad de las PLM de la invención para migrar a tejido dañado puede medirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa genómica (RT-PCR con o sin genes indicadores) y técnicas de marcaje.

La RT-PCR es el medio más directo y sencillo para rastrear las PLM de la invención dentro de un paciente. Para este propósito puede usarse un transgén transducido o marcadores de donante individuales y se han obtenido señales específicas de células trasplantadas en varios estudios de pacientes. Los resultados son generalmente semicuantitativos.

Como alternativa, las PLM de la invención pueden teñirse con un colorante de interés, tal como un colorante fluorescente, y pueden controlarse en el paciente a través de la señal del colorante. Un método específico de dicho marcaje se desvela en el Ejemplo.

La migración (o migración dirigida) normalmente se determina mediante la medición del número de células que llegan al tejido dañado. También puede medirse indirectamente mediante la observación del número de células que se han acumulado en los pulmones (en lugar del tejido dañado).

Las PLM de la invención que son capaces de migrar a un tejido dañado específico en un paciente preferentemente (a) expresan niveles detectables de, o sobreexpresan, receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 1 (CXCR1) y/o (b) expresan niveles detectables de, o sobreexpresan, CXCR2. Las PLM de la invención expresan más preferentemente niveles detectables de, o sobreexpresan, CXCR1 y CXCR2. Los tejidos dañados liberan una diversidad de factores inflamatorios solubles, tales como el factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) e interleucina-8, y estos factores pueden atraer las PLM de la invención (y otras células inflamatorias) al tejido dañado a través de la unión a CXCR1 y/o CXCR2.

Las PLM de la invención sobreexpresan CXCR1 y/o CXCR2 si producen más CXCR1 y/o CXCR2 que otras PLM y/o CMM. La expresión de CXCR1 y/o CXCR2 puede medirse como se ha analizado anteriormente. Las células que migran de forma dirigida a la retina de la invención no expresan niveles detectables de CXCR1 y CXCR2. Esto se analiza con más detalle a continuación.

El tejido dañado específico al que las PLM de la invención son capaces de migrar es preferentemente tejido cardíaco, tejido retiniano o tejido óseo. El tejido retiniano es preferentemente la mácula.

Si el tejido dañado específico es tejido cardíaco o tejido óseo, las PLM de la invención expresan preferentemente niveles detectables de, o sobreexpresan, receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4 (CXCR4). Las PLM de la invención sobreexpresan CXCR4 si expresan más CXCR4 que otras PLM y/o CMM. Si el tejido dañado específico es tejido cardíaco o tejido óseo, las PLM de la invención expresan más preferentemente niveles detectables de, o sobreexpresan, (a) CXCR1 y CXCR4; (b) CXCR2 y CXCR4; o (c) CXCR1, CXCR2 y CXCR4. La expresión de CXCR4 puede medirse como se ha analizado anteriormente.

El tejido cardíaco dañado libera quimiocinas y citocinas inflamatorias, tales como factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Además, el infarto de miocardio aumenta los niveles de VEGF y eritropoyetina (EPO). CXCR4 se une a su ligando SDF-1 y, de este modo, las PLM de la invención que expresan CXCR4 migrarán hacia el gradiente de SDF-1

generado por el tejido cardíaco dañado. Otros tejidos dañados, tales como el hueso, también liberan SDF-1.

Si el tejido dañado específico es tejido retiniano, tal como la mácula, las PLM de la invención expresan preferentemente niveles detectables de CXCR4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), CXCL12, CD109, CD119, factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NFkappa B), CD140a, CD140b, CD221, CD222, CD304, CD309 y CD325. Las PLM de migración dirigida a la retina de la invención preferentemente sobreexpresan uno o más de estos factores, o incluso todos. Las PLM sobreexpresan estos factores si expresan más factores que otras PLM y/o CMM. Se han descrito ensayos cuantitativos para marcadores celulares anteriormente.

Las PLM de migración dirigida a la retina de la invención preferentemente también expresan niveles detectables de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) o sobreexpresan PEDF. La expresión detectable de estos marcadores puede medirse como se ha analizado anteriormente. Las PLM de la invención sobreexpresan PEDF si expresan más PEDF que otras PLM y/o células madre mesenquimatosas (CMM).

Si el tejido dañado específico es tejido óseo, las PLM de la invención preferentemente expresan niveles detectables de TGF-beta 3, proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno 2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina 8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB. Las PLM de migración dirigida al hueso de la invención preferentemente sobreexpresan uno o más de estos factores, o incluso todos. Las PLM sobreexpresan estos factores si expresan más factores que otras PLM y/o CMM. La expresión detectable de estos marcadores puede medirse como se ha analizado anteriormente.

Las PLM de la invención son preferentemente capaces de tener efectos antiinflamatorios en un tejido dañado de un paciente. La capacidad de las PLM de la invención de tener efectos antiinflamatorios también puede medirse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para la secreción de citocinas, reacciones potenciadas de leucocitos mixtos y regulación positiva de moléculas coestimuladoras y marcadores de maduración, medidos por citometría de flujo. Se desvelan métodos específicos que pueden usarse en el Ejemplo. Las citocinas medidas son normalmente interleucinas, tales como interleucina 8 (IL-8), selectinas, moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y proteínas quimiotácticas, tales como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa). Los ensayos para estas citocinas están disponibles en el mercado.

Las PLM de la invención expresan niveles detectables de CD120a (receptor 1 de factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (receptor 2 de TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno-1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Las PLM antiinflamatorias preferentemente sobreexpresan uno o más de estos factores, o incluso todos. Las PLM sobreexpresan estos factores si expresan más de los uno o más factores que otras PLM y/o CMM. La expresión detectable de estos marcadores puede medirse como se ha analizado anteriormente.

Las PLM de la invención son más preferentemente capaces de migrar a un tejido dañado en un paciente y de tener efectos antiinflamatorios en el tejido dañado. Esto permite reparar eficazmente el daño y reduce la cantidad de células que deben administrarse.

Las PLM de la invención expresarán una diversidad de otros marcadores diferentes además y aparte de los mencionados anteriormente. Algunos de éstos ayudarán a las PLM con su capacidad de migrar a un tejido dañado y tener efectos antiinflamatorios una vez allí. Cualquiera de las PLM de la invención puede expresar adicionalmente niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), (ii) receptor de IGF-1; (iii) receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), (iv) factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), (v) factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 alfa), (vi) Akt1 y (vii) factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Los receptores de IGF-1 promueven la capacidad de migración hacia un gradiente de IGF-1. Uno de los mecanismos por los cuales IGF-1 aumenta la migración es mediante la regulación positiva de CXCR4 en la superficie de las células, lo que las hace más sensibles a la señalización de SDF-1. Esto se ha analizado anteriormente.

también expresan niveles detectables de, o sobreexpresan, LIF y/o receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Los receptores de PDGF son preferentemente receptores de PDGF-A y/o receptores de PSDGF-B. Las CMM que tienen una alta expresión de estos receptores pueden migrar eficazmente a áreas en las que se han activado las plaquetas, tales como heridas y vasos trombóticos. Lo mismo será cierto para las PLM que expresan o sobreexpresan los receptores.

Las PLM de la invención son preferentemente autólogas. En otras palabras, las células derivan preferentemente del paciente en el que se administrarán las células. Como alternativa, las PLM son preferentemente alogénicas. En otras palabras, las células derivan preferentemente de un paciente que es inmunológicamente compatible con el paciente en el que se administrarán las células.

Una PLM de la invención puede aislarse, aislarse sustancialmente, purificarse o purificarse sustancialmente. La PLM se aísla o se purifica si está completamente libre de otros componentes, tales como medio de cultivo, otras células de la invención u otros tipos celulares. La PLM está sustancialmente aislada si se mezcla con vehículos o diluyentes, tales como el medio de cultivo, lo que no interferirá con su uso previsto. Como alternativa, la PLM de la invención puede estar presente en una matriz de crecimiento o inmovilizada en una superficie como se describe a continuación.

Las PLM de la invención pueden aislarse usando una diversidad de técnicas incluyendo técnicas basadas en anticuerpos. Las células pueden aislarse usando técnicas de selección negativas y positivas basadas en la unión de anticuerpos monoclonales a los marcadores de superficie que están presentes en la PLM (véase anteriormente). Por tanto, las PLM pueden separarse usando cualquier técnica basada en anticuerpos, incluyendo la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la separación de perlas magnéticas.

Como se analiza con más detalle a continuación, las PLM pueden tratarse *ex vivo*. De este modo, las células pueden cargarse o transfectarse con un agente terapéutico o de diagnóstico y después pueden usarse terapéuticamente en los métodos de la invención.

Población de la invención

La invención también proporciona una población de dos o más PLM de la invención. Puede haber presente cualquier número de células en la población. La población de la invención preferentemente comprende al menos aproximadamente 5×10^5 PLM de la invención. La población más preferentemente comprende al menos aproximadamente 1×10^6 , al menos aproximadamente 2×10^6 , al menos aproximadamente 5×10^6 , al menos aproximadamente 1×10^7 , al menos aproximadamente 2×10^7 , al menos aproximadamente 5×10^7 , al menos aproximadamente 1×10^8 o al menos aproximadamente 2×10^8 PLM de la invención. En algunos casos, la población puede comprender al menos aproximadamente $1,0 \times 10^7$, al menos aproximadamente $1,0 \times 10^8$, al menos aproximadamente $1,0 \times 10^9$, al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{10}$, al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{11}$ o al menos $1,0 \times 10^{12}$ PLM de la invención o incluso más.

Las poblaciones de la invención son ventajosas para la terapia como se describe a continuación. Esta capacidad de producir poblaciones que comprenden grandes cantidades de PLM de la invención es una de las ventajas clave de la invención. La invención permite el tratamiento de pacientes con una población de células de las cuales la mayoría, si no todas, migran eficientemente al tejido de interés y tienen efectos antiinflamatorios una vez allí. Esto permite el uso de una baja dosis de células y evita efectos secundarios colaterales y efectos secundarios relacionados con el volumen.

La población de la invención puede comprender otras células además de las PLM de la invención. Sin embargo, al menos el 70 % de las células de la población son preferentemente PLM de la invención. Más preferentemente, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 % de las células de la población son PLM de la invención.

La población de la invención es preferentemente homóloga. En otras palabras, todas las PLM en la población son preferentemente genótipicamente y fenotípicamente idénticas. La población es preferentemente autóloga o alogéna como se ha definido anteriormente.

Sin embargo, la población también puede ser semi-alógena. Las poblaciones semi-alógenas se producen normalmente a partir de células mononucleares de dos o más pacientes que son inmunológicamente compatibles con el paciente al que se administrará la población. En otras palabras, todas las células de la población son preferentemente genéticamente idénticas o suficientemente genéticamente idénticas para que la población sea inmunológicamente compatible con el paciente al que se administrará la población. Puesto que las PLM de la invención pueden derivar de un paciente, pueden ser autólogas con el paciente que se trata (es decir, genéticamente idénticas para el paciente o suficientemente genéticamente idénticas para que sean compatibles para su administración al paciente).

La población de la invención puede aislarse, aislarse sustancialmente, purificarse o purificarse sustancialmente. Una población se aísla o se purifica si está completamente libre de otros componentes, tales como medio de cultivo y otras células. Una población está sustancialmente aislada si se mezcla con vehículos o diluyentes, tales como medio de cultivo, que no interferirán con su uso previsto. Otros vehículos y diluyentes se analizan con más detalle a continuación. Una población sustancialmente aislada o sustancialmente purificada no comprende células distintas de las PLM de la invención. En algunas realizaciones, la población de la invención puede estar presente en una matriz de crecimiento o inmovilizada en una superficie como se analiza a continuación.

La población generalmente se cultiva *in vitro*. Las técnicas para cultivar células son bien conocidas por los expertos en la materia. Las células pueden cultivarse en condiciones convencionales de 37 °C, CO₂ al 5 % en medio sin suero. Las células se cultivan preferentemente en condiciones de oxígeno bajo como se analiza con más detalle a continuación. Las células pueden cultivarse en cualquier matraz o vaso adecuado, incluyendo pocillos de una placa plana tal como una placa convencional de 6 pocillos. Dichas placas están disponibles en el mercado de Fisher Scientific, proveedores de VWR, Nunc, Starstedt o Falcon. Los pocillos normalmente tienen una capacidad de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 4 ml.

El matraz, vaso o los pocillos dentro de los cuales está contenida o se cultiva la población pueden modificarse para facilitar la manipulación de las PLM. Por ejemplo, el matraz, vaso o los pocillos pueden modificarse para facilitar el cultivo de las células, por ejemplo, incluyendo una matriz de crecimiento. El matraz, vaso o los pocillos pueden modificarse para permitir la fijación de las PLM o para permitir la inmovilización de las PLM sobre una superficie. Pueden recubrirse una o más superficies con proteínas de matriz extracelular tales como laminina o colágeno o cualquier otra molécula de captura que se una a las células y las inmovilice o las capture en la superficie o las superficies.

La población puede modificarse *ex vivo* usando cualquiera de las técnicas que se describen en el presente documento. Por ejemplo, la población puede transfectarse o cargarse con agentes terapéuticos o de diagnóstico. Después, la población puede usarse en los métodos de tratamiento que se analizan con más detalle a continuación.

Método de producción de una PLM de la invención

La invención también proporciona un método de producción de una población de la invención, es decir, una población de dos o más PLM de la invención. El método implica cultivar células mononucleares (CM) en condiciones que inducen a las CM a diferenciarse en PLM. Después, el método implica recoger y cultivar las PLM que:

(a) expresan niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD123 (receptor de interleucina 3), CD124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD 127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45;

(b) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables de CXCR1;

(c) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables de CXCR2

(d) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables de CXCR1 y CXCR2;

(e) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables CXCR1 y CXCR4 (estas células son PLM de migración dirigida al corazón y de migración dirigida al hueso);

(f) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables de CXCR2 y CXCR4 (estas células son PLM de migración dirigida al corazón y de migración dirigida al hueso);

(g) tienen el patrón de expresión de marcadores de (a) y expresan niveles detectables de CXCR1, CXCR2 y CXCR4 (estas células son PLM de migración dirigida al corazón y de migración dirigida al hueso);

(h) expresan niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD123 (receptor de interleucina 3), CD124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD 127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), CXCR4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), factor de

crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), CXCL12, CD109, CD119, factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NFkappa B), CD140a, CD140b, CD221, CD222, CD304, CD309 y CD325 y no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45 (estas células son PLM de migración dirigida a la retina); o

(i) expresan niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD123 (receptor de interleucina 3), CD124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD 127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), TGF-beta 3, proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno 2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina 8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB y no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45 (estas células son PLM de migración dirigida al hueso).

Las células recogidas pueden sobreexpresar cualquiera de los factores que se han descrito anteriormente con referencia a las células de la invención. Además de cualquiera de (a) a (i) anteriores, el método preferentemente implica recoger y cultivar PLM que:

(j) expresan niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), (ii) receptor de IGF-1; (iii) receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), (iv) factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), (v) factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 alfa), (vi) Akt1 y (vii) factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF);

(k) sobreexpresan uno o más de (i) a (vii) en (j);

(l) expresar niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), (ii) factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), (iii) factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), (iv) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), (v) factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), (vi) interferón gamma (IFN-gamma) e (vii) interleucina 1 alfa (IL-1 alfa)

(m) sobreexpresan uno o más de (i) a (vii) en (l).

Las células mononucleares (CM) y los métodos de aislamiento de las mismas se conocen en la técnica. Las CM pueden ser CM principales aislados de la médula ósea. Las CM son preferentemente CM de sangre periférica (CMSP), tales como linfocitos, monocitos y/o macrófagos. Las CMSP pueden aislarse de la sangre usando un polisacárido hidrófilo, tal como Ficoll®. Por ejemplo, las CMSP pueden aislarse de la sangre usando Ficoll-Paque® (un medio de densidad disponible en el mercado) como se describe en el Ejemplo.

Antes de cultivarlas, las CM pueden exponerse a un cóctel de enriquecimiento de células madre mesenquimatosas. El cóctel preferentemente comprende anticuerpos que reconocen CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b (que están presentes en células no deseadas) y un componente de glóbulos rojos. Un cóctel de este tipo une células no deseadas con glóbulos rojos que forman rosetas inmunitarias que pueden retirarse de las CM deseadas. Un cóctel preferido es RosetteSep®.

Se conocen en la técnica condiciones adecuadas para la inducción de las CM a diferenciarse en células mesenquimatosas (tejido derivado principalmente del mesoderma). Por ejemplo, se desvelan condiciones adecuadas en Capelli, C., et al. (*Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplantation*, 2007. 40: páginas 785-791). Estas condiciones también pueden usarse para inducir a las CM a diferenciarse en PLM de acuerdo con la invención.

El método comprende cultivar CM con lisado de plasma para inducir a las CM a diferenciarse en PLM. Lisado de plaquetas se refiere a la combinación de factores de crecimiento naturales contenidos en plaquetas que se ha liberado mediante la lisis de esas plaquetas. La lisis puede conseguirse a través de medios químicos (es decir, CaCl₂), medios osmóticos (uso de H₂O destilada) o mediante procedimientos de congelación/descongelación. El lisado de plaquetas puede derivar de sangre entera como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 5.198.357. El lisado de plaquetas se prepara preferentemente como se describe en el Ejemplo. El lisado de plasma es preferentemente lisado de plasma humano.

En una realización preferida, la etapa (a) del método de la invención comprende cultivar CM en un medio que

- comprende lisado de plaquetas durante un tiempo suficiente para inducir a las CM a diferenciarse en células progenitoras de linaje mesodérmico. El tiempo suficiente es normalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 días, preferentemente aproximadamente 22 días. El medio comprende preferentemente aproximadamente el 20 % o menos de lisado de plaquetas en volumen, tal como aproximadamente el 15 % o menos
- 5 en volumen o aproximadamente el 10 % o menos en volumen. El medio comprende preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de lisado de plaquetas en volumen, tal como de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 15 % en volumen. El medio comprende preferentemente aproximadamente el 10 % de lisado de plaquetas en volumen.
- 10 En otra realización preferida, la etapa (a) del método de la invención comprende exponer CM a un cóctel de enriquecimiento mesenquimatoso y después cultivar las CM en un medio que comprende lisado de plaquetas durante un tiempo suficiente para inducir a las CM a diferenciarse en células progenitoras de linaje mesodérmico. El tiempo suficiente es normalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 días, preferentemente aproximadamente 22 días.
- 15 En la etapa (a), el medio es preferentemente Medio Mínimo Esencial (MEM). MEM está disponible en el mercado de diversas fuentes incluyendo Sigma-Aldrich. El medio preferentemente comprende adicionalmente uno o más de heparina, L-glutamina y penicilina/estreptavidina (P/E). La L-glutamina puede reemplazarse con GlutaMAX® (que está disponible en el mercado de Life Technologies).
- 20 Como se ha analizado anteriormente, algunas de las PLM de la invención expresan niveles detectables de CXCR4. La expresión de CXCR4 es dependiente de citocinas y aumenta cuando las células se exponen al factor de células madre (SCF), interleucina 6 (IL-6), ligando de Flt-3, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) e IL-3. El medio puede comprender uno o más de (i) SCF, (ii) IL-6, (iii) ligando de Flt-3, (iv) factor de crecimiento de hepatocitos y (v)
- 25 IL-3, tal como (i); (ii); (iii); (iv); (v); (i) y (ii); (i) y (iii); (i) y (iv); (i) y (v); (ii) y (iii); (ii) y (iv); (ii) y (v); (iii) y (iv); (iii) y (v); (iv) y (v); (i), (ii) y (iii); (i), (ii) y (iv); (i), (ii) y (v); (i), (iii) y (iv); (i), (iii) y (v); (i), (iv) y (v); (ii), (iii) y (iv); (ii), (iii) y (v); (ii), (iv) y (v); (iii), (iv) y (v); o (i), (ii), (iii), (iv) y (v). Cualquiera de (i) a (v) puede estar presente a de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 ng/ml.
- 30 La etapa (a) comprende cultivar las CM en condiciones que permiten que las PLM se adhieran. Se han analizado condiciones adecuadas con más detalle anteriormente.
- En la etapa (a), las CM se cultivan a menos de aproximadamente el 20 % de oxígeno (O₂), tal como menos de aproximadamente el 19 %, menos de aproximadamente el 18 %, menos de aproximadamente el 17 %, menos de aproximadamente el 16 %, menos de aproximadamente el 15 %, menos de aproximadamente el 14 %, menos de aproximadamente el 13 %, menos de aproximadamente el 12 %, menos de aproximadamente el 11 %, menos de aproximadamente el 10 %, menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 6 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 % o menos de aproximadamente el 1 % de oxígeno (O₂). Las CM se cultivan preferentemente a de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 19 % de O₂, tal como de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 15 % de O₂, de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 10 % de O₂ o de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 8 % de O₂. Las CM se cultivan más preferentemente a aproximadamente el 0 % de O₂. Las cifras de % de oxígeno (o % de O₂) citadas anteriormente se refieren al % en volumen de oxígeno en el gas suministrado a las células durante el cultivo, por ejemplo, mediante la incubadora de células. Es posible que se filtre algo de oxígeno en la incubadora o entre cuando se abra la puerta.
- 35 En la etapa (a), las CM se cultivan en presencia de lisado de plaquetas y en condiciones de oxígeno bajo. Esta combinación imita las condiciones naturales del tejido dañado y, de este modo, da como resultado células más saludables y terapéuticamente más potentes. El cultivo celular convencional se realiza en el 20 % o el 21 % de oxígeno (aproximadamente el contenido atmosférico) pero no hay ningún lugar en el cuerpo humano que tenga este nivel de oxígeno. Las células epiteliales en los pulmones "ven" este nivel de oxígeno, pero una vez que el oxígeno se disuelve y abandona los pulmones, disminuye a aproximadamente el 17 %. A partir de ahí, disminuye aún más a aproximadamente el 1-2 % en la mayoría de los tejidos, pero es tan bajo como el 0,1 % en tejidos avasculares tales como el cartílago en las articulaciones.
- 40 En la etapa (a), las CM se cultivan en presencia de lisado de plaquetas y en condiciones de oxígeno bajo. Esta combinación imita las condiciones naturales del tejido dañado y, de este modo, da como resultado células más saludables y terapéuticamente más potentes. El cultivo celular convencional se realiza en el 20 % o el 21 % de oxígeno (aproximadamente el contenido atmosférico) pero no hay ningún lugar en el cuerpo humano que tenga este nivel de oxígeno. Las células epiteliales en los pulmones "ven" este nivel de oxígeno, pero una vez que el oxígeno se disuelve y abandona los pulmones, disminuye a aproximadamente el 17 %. A partir de ahí, disminuye aún más a aproximadamente el 1-2 % en la mayoría de los tejidos, pero es tan bajo como el 0,1 % en tejidos avasculares tales como el cartílago en las articulaciones.
- 45 En la etapa (a), las CM se cultivan en presencia de lisado de plaquetas y en condiciones de oxígeno bajo. Esta combinación imita las condiciones naturales del tejido dañado y, de este modo, da como resultado células más saludables y terapéuticamente más potentes. El cultivo celular convencional se realiza en el 20 % o el 21 % de oxígeno (aproximadamente el contenido atmosférico) pero no hay ningún lugar en el cuerpo humano que tenga este nivel de oxígeno. Las células epiteliales en los pulmones "ven" este nivel de oxígeno, pero una vez que el oxígeno se disuelve y abandona los pulmones, disminuye a aproximadamente el 17 %. A partir de ahí, disminuye aún más a aproximadamente el 1-2 % en la mayoría de los tejidos, pero es tan bajo como el 0,1 % en tejidos avasculares tales como el cartílago en las articulaciones.
- 50 En la etapa (b), el método comprende adicionalmente recoger y cultivar PLM que tienen el patrón de expresión de marcadores necesario como se ha analizado anteriormente. Las PLM que tienen el patrón de expresión de marcadores necesario pueden recogerse usando cualquier técnica a base de anticuerpos, incluyendo la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y la separación de perlas magnéticas. Se prefiere la FACS.
- 55 Cualquiera de los métodos para cultivar PLM divulgados en relación con la etapa (a) se aplica igualmente a la etapa (b). En particular, las células se cultivan en la etapa (b) en presencia de lisado de plaquetas y en condiciones de oxígeno bajo como se ha analizado anteriormente en relación con la etapa (a).
- 60 Como quedará claro a partir del análisis anterior, el método de la invención se realiza en condiciones clínicamente
- 65

pertinentes, es decir, en ausencia de cantidades traza de endotoxinas y otros contaminantes ambientales, tales como lipopolisacáridos, lipopéptidos y peptidoglicanos, etc. Esto hace a las PLM de la invención particularmente adecuadas para su administración a pacientes.

5 Las CM se obtienen preferentemente a partir de un paciente o un donante alógeno. La invención también proporciona un método para producir una población de la invención que es adecuada para la administración a un paciente, en el que el método comprende cultivar CM obtenidas del paciente en condiciones que inducen a las CM a diferenciarse en células progenitoras de linaje mesodérmico y (b) recoger y cultivar las células progenitoras que tienen un patrón de expresión como se ha definido anteriormente y producir, de este modo, una población de la invención que es adecuada para la administración al paciente. La población será autóloga con el paciente y, por tanto, no será rechazada tras la implantación. La invención también proporciona una población de la invención que es adecuada para la administración a un paciente y se produce de esta manera.

10 Como alternativa, la invención proporciona un método para producir una población de la invención que es adecuada para la administración a un paciente, en el que el método comprende cultivar CM obtenidas de un paciente diferente que es inmunológicamente compatible con el paciente al que las células se administrarán en condiciones que inducen a las CM a diferenciarse en células progenitoras de linaje mesodérmico y (b) recoger y cultivar aquellas células progenitoras que tienen un patrón de expresión como se ha definido anteriormente y producir, de este modo, una población de la invención que es adecuada para la administración al paciente. La población será alógena con el paciente y, por tanto, reducirá las posibilidades de rechazo tras la implantación. La invención también proporciona una población de la invención que es adecuada para administración a un paciente y se produce de esta manera.

Medicamentos, métodos y uso terapéutico

25 Las PLM de la invención pueden usarse en un método de terapia del cuerpo humano o animal. Por tanto, la invención proporciona una PLM de la invención o una población de la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. En particular, la invención se refiere al uso de las PLM de la invención para la reparación de un tejido dañado en un paciente. La invención también se refiere al uso de las PLM de la invención para tratar una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en el paciente.

30 La invención también proporciona una población de la invención para su uso en la reparación de un tejido dañado en el paciente. La invención también proporciona el uso de una población de la invención en la fabricación de un medicamento para la reparación de un tejido dañado en un paciente.

35 El tejido deriva preferentemente del mesodermo. El tejido es más preferentemente tejido cardíaco, tejido retiniano o tejido óseo.

40 El daño al tejido puede ser causado por una lesión o enfermedad. La lesión o enfermedad es preferentemente una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o una lesión o enfermedad ósea en un paciente. La invención proporciona, por tanto, un método de tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en un paciente, que comprende administrar al paciente una población de la invención, en el que la población comprende un número terapéuticamente eficaz de células y, de este modo, tratar la lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o la lesión o enfermedad ósea en el paciente. La invención también proporciona una población de la invención para su uso en el tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en un paciente. La invención también proporciona el uso de una población de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en un paciente.

50 La lesión o enfermedad cardíaca se selecciona preferentemente entre infarto de miocardio (IM), hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia ventricular derecha, embolia, insuficiencia cardíaca, déficit cardíaco congénito, valvulopatía cardíaca, arritmia y miocarditis.

55 El IM aumenta los niveles de VEGF y EPO liberados por el miocardio. Además, el IM se asocia a una reacción inflamatoria y el tejido infartado también libera factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), interleucina (IL-6) y KC/Gro-alfa. CCL7 (anteriormente conocido como MCP3), CXCL1, CXCL2 están significativamente regulados positivamente en el corazón después del infarto de miocardio (IM) y podrían estar implicados en la regulación del injerto y la migración dirigida de las CMM al miocardio infartado.

60 En un modelo de ratones con infarto de miocardio, se demostró que IL-8 regulaba positivamente la expresión génica principalmente en los primeros 2 días después del infarto de miocardio. Sorprendentemente, el aumento de la expresión de IL-8 se localizó predominantemente en el área infartada y en la zona del borde, y solo en un grado mucho menor en el miocardio conservado. Mediante la activación de CXCR2, MIF muestra funciones similares a las de las quimiocinas y actúa como un regulador importante del reclutamiento de células inflamatorias y de la aterogénesis.

La DMAE puede ser DMAE seca o DMAE húmeda. La DMAE seca es resultado de la atrofia de la capa epitelial del pigmento retiniano por debajo de la retina que provoca pérdida de la visión a través de la pérdida de fotorreceptores (bastones y conos) en la parte central del ojo. La DMAE húmeda provoca pérdida de la visión debido a un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos (neovascularización coroidea) en la coriocapilar, a través de la membrana de Bruch, que en última instancia conduce a la fuga de sangre y proteína por debajo de la mácula. La DMAE húmeda se asocia a una disminución en los niveles del factor derivado del epitelio pigmentario (PDEF) en la mácula. Las PLM utilizadas en el tratamiento de la DMAE húmeda preferentemente expresan niveles detectables de PEDF o sobreexpresan PEDF.

La enfermedad o lesión ósea se selecciona preferentemente entre fractura, fractura de Salter-Harris, fractura en tallo verde, espolón óseo, craneosinostosis, síndrome de Coffin-Lowry, fibrodisplasia osificante progresiva, displasia fibrosa, enfermedad de Fong (o síndrome onicorrotuliano), hipofosfatasa, síndrome de Klippel-Feil, enfermedad ósea metabólica, síndrome onicorrotuliano, osteoartritis, osteítis deformante (o enfermedad ósea de Paget), osteítis fibrosa quística (u osteítis fibrosa o enfermedad ósea de Von Recklinghausen), osteítis pubiana, osteítis condensante (u osteítis condensada), osteítis condensada iliaca, osteocondritis disecante, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteopenia, osteopetrosis, osteoporosis, osteonecrosis, hiperostosis porótica, hiperparatiroidismo primario, osteodistrofia renal, cáncer óseo, una lesión ósea asociada al cáncer metastásico, enfermedad de Gorham Stout, hiperparatiroidismo primario, enfermedad periodontal y aflojamiento aséptico de los reemplazos de articulaciones. El cáncer óseo puede ser sarcoma de Ewing, mieloma múltiple, osteosarcoma (tumor gigante del hueso), osteocondroma u osteoclastoma. El cáncer metastásico que produce una lesión ósea puede ser cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y/o leucemia de linfocitos T en adultos.

Si el tejido dañado es tejido cardíaco o tejido óseo, las PLM en la población expresan preferentemente niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), CXCR1, CXCR2 y CXCR4 y no expresan niveles de CD14, CD34 y CD45. Si el tejido dañado es tejido óseo, las PLM en la población expresan más preferentemente niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), TGF-beta 3, proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno 2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina 8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB y no expresan niveles detectables de CD 14, CD34 y CD45.

Si el tejido dañado es tejido retiniano, las PLM en la población expresan preferentemente niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), CXCR4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), CXCL12, CD109, CD119, factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NFkappa B), CD140a, CD140b, CD221, CD222, CD304, CD309 y CD325 y no expresan niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.

En todos los casos, las PLM de la invención derivan preferentemente del paciente o un donante alógeno. Derivar las PLM de la invención del paciente debería garantizar que las propias PLM no sean rechazadas por el sistema inmunitario del paciente. Cualquier diferencia entre el donante y el receptor provocará en última instancia la eliminación de las PLM, pero no antes de que hayan reparado al menos una parte del tejido dañado.

La invención se refiere a administrar al paciente un número terapéuticamente eficaz de PLM de la invención al paciente. Un número terapéuticamente eficaz es un número que mejora uno o más síntomas del daño, enfermedad o lesión. Un número terapéuticamente eficaz es preferentemente un número que repara el tejido dañado o trata la

enfermedad o lesión. Los números adecuados se analizan con más detalle a continuación.

Las PLM de la invención pueden administrarse a cualquier paciente adecuado. El paciente es generalmente un paciente humano. El paciente puede ser un lactante, un niño o un adulto. Puede saberse que el paciente tiene un tejido dañado o se sospecha que tiene un tejido dañado. El paciente puede ser susceptible o estar en riesgo de la enfermedad o lesión pertinente. Por ejemplo, el paciente puede estar genéticamente predispuesto a la insuficiencia cardíaca.

La invención puede usarse en combinación con otros medios y sustancias para reparar tejido dañado o proporcionar alivio del dolor. En algunos casos, las PLM de la invención pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado con otras sustancias que tienen por objeto reparar el tejido dañado o proporcionar alivio del dolor. Las PLM pueden usarse en combinación con tratamientos existentes para tejido dañado y pueden, por ejemplo, mezclarse simplemente con dichos tratamientos. Por tanto, la invención puede usarse para aumentar la eficacia de tratamientos existentes de tejido dañado.

La invención se refiere preferentemente al uso de PLM cargadas o transfectadas con un agente terapéutico y/o de diagnóstico. Un agente terapéutico puede ayudar a reparar el tejido dañado. Un agente de diagnóstico, tal como una molécula fluorescente, puede ayudar a identificar la ubicación de las PLM en el paciente. Las PLM pueden cargarse o transfectarse usando cualquier método conocido en la técnica. La carga de PLM puede realizarse *in vitro* o *ex vivo*. En cada caso, las PLM pueden estar simplemente en contacto con el agente en cultivo. Como alternativa, las PLM pueden cargarse con un agente que usa un vehículo de entrega, tal como liposomas. Dichos vehículos son conocidos en la técnica.

La transfección de PLM puede realizarse *in vitro* o *ex vivo*. Como alternativa, la transfección estable puede realizarse en la etapa de CM permitiendo que las PLM que expresan el transgén se diferencien de ellas. Las PLM se transfectan con un ácido nucleico que codifica el agente. Por ejemplo, pueden emplearse partículas víricas u otros vectores que codifiquen el agente. Los métodos para hacer esto son conocidos en la técnica.

El ácido nucleico da lugar a la expresión del agente en las PLM. La molécula de ácido nucleico comprenderá preferentemente un promotor que se une operativamente a las secuencias que codifican el agente y que es activo en las PLM o que puede inducirse en las PLM.

En una realización particularmente preferida, el ácido nucleico que codifica el agente puede administrarse a través de una partícula vírica. La partícula vírica puede comprender una molécula de dirección para garantizar una transfección eficiente. La molécula de dirección normalmente se proporcionará total o parcialmente en la superficie del virus para que la molécula pueda dirigir el virus a las PLM.

Puede usarse cualquier virus adecuado en dichas realizaciones. El virus puede ser, por ejemplo, un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus, un virus adeno-asociado, un virus de la variolovacuna o un virus del herpes simple. En una realización particularmente preferida, el virus puede ser un lentivirus. El lentivirus puede ser un virus del VIH modificado adecuado para su uso en la entrega de genes. El lentivirus puede ser un vector basado en el virus de la anemia infecciosa equina (AIEQ), SIV o FIV. El virus puede ser un virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM). Los virus utilizados en la invención son preferentemente deficientes en replicación.

No tienen que usarse partículas víricas. Puede usarse cualquier vector capaz de transfectar las PLM de la invención, tal como la transfección de ADN o ARN de plásmido convencional.

La captación de construcciones de ácido nucleico puede potenciarse mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectAmina, fugeno y transfectama.

La célula puede cargarse o transfectarse en condiciones adecuadas. La célula y el agente o vector pueden, por ejemplo, ponerse en contacto durante entre cinco minutos y diez días, preferentemente entre una hora y cinco días, más preferentemente entre cinco horas y dos días, e incluso más preferentemente entre doce horas y un día.

La invención también proporciona PLM que se han cargado o transfectado con un agente como se ha analizado anteriormente. Dichas PLM pueden usarse en las realizaciones terapéuticas de la invención.

En algunas realizaciones, las CM pueden recuperarse de un paciente, convertirse en PLM usando la invención, cargarse o transfectarse *in vitro* y después devolverse al mismo paciente. En dichos casos, las PLM empleadas en la invención, serán células autólogas y completamente compatibilizadas con el paciente. En un caso preferido, las células empleadas en la invención se recuperan de un paciente y se utilizan *ex vivo* y posteriormente se devuelven al mismo paciente.

Composiciones farmacéuticas y administración

La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende (a) una PLM de la invención o una población de la invención y (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender cualquiera de las PLM o poblaciones mencionadas en el presente documento y, en algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico, vectores o virus que se describen en el presente documento. La invención proporciona un método para la reparación de un tejido dañado en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención. Cualquiera de las realizaciones terapéuticas analizadas anteriormente se aplica igualmente a esta realización.

Las diversas composiciones de la invención pueden formularse usando cualquier método adecuado. La formulación de células con vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales puede realizarse usando métodos habituales en la técnica farmacéutica. La naturaleza exacta de una formulación dependerá de varios factores incluyendo las células que se han de administrar y la vía de administración deseada. Se describen con todo detalle tipos adecuados de formulación en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, EE.UU.

Las células pueden administrarse por cualquier vía. Las vías adecuadas incluyen, pero no se limitan a, vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal u otras vías de administración apropiadas. Si el tejido dañado es tejido retiniano, las células pueden administrarse al ojo. Si el tejido dañado es tejido cardíaco, las células pueden administrarse a través de una vía endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, intracoronaria, en el seno coronario retrógrado, intraarterial, intrapericárdica o intravenosa. Si el tejido dañado es hueso, las células pueden administrarse a través de una vía intraósea o al sitio de la lesión, tal como una fractura o enfermedad. Las células se administran preferentemente por vía intravenosa.

Pueden prepararse composiciones junto con un vehículo o diluyente fisiológicamente aceptable. Normalmente, dichas composiciones se preparan en forma de suspensiones líquidas de células. Las células pueden mezclarse con un excipiente que sea farmacéuticamente aceptable y compatible con el principio activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol y similares y combinaciones de los mismos.

Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener cantidades menores de sustancias coadyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y/o adyuvantes que potencian la eficacia. La composición preferentemente comprende albúmina de suero humano.

Un vehículo o diluyente adecuado es Plasma-Lyte A®. Esta es una solución isotónica apirógena estéril para la administración intravenosa. Cada 100 ml contiene 526 mg de cloruro de sodio, USP (NaCl); 502 mg de Gluconato de Sodio (C₆H₁₁NaO₇); 368 mg de Trihidrato de Acetato de Sodio, USP (C₂H₃NaO₂ • 3H₂O); 37 mg de Cloruro de Potasio, USP (KCl); y 30 mg de Cloruro de Magnesio, USP (MgCl₂ • 6H₂O). No contiene ningún agente antimicrobiano. El pH se ajusta con hidróxido de sodio. El pH es 7,4 (6,5 a 8,0).

Las PLM se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. La cantidad que se ha de administrar depende del sujeto que se ha de tratar, de la capacidad del sistema inmunitario del sujeto y del grado de reparación deseado. Las cantidades precisas de PLM que es necesario administrar pueden depender del criterio del profesional y pueden ser peculiares para cada sujeto.

Puede administrarse cualquier número adecuado de células a un sujeto. Por ejemplo, pueden administrarse, al menos, o aproximadamente, 0,5 x 10⁶, 1,5 x 10⁶, 4,0 x 10⁶ o 5,0 x 10⁶ células por kg de paciente. Por ejemplo, pueden administrarse, al menos, o aproximadamente, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ células. Como guía, el número de células de la invención que se ha de administrar puede ser de 10⁵ a 10⁹, preferentemente de 10⁶ a 10⁸. Normalmente, se administran hasta 2 x 10⁸ PLM a cada paciente. Puede administrarse cualquiera de los números específicos analizados anteriormente con referencia a las poblaciones de la invención. En dichos casos en los que las células se administran o están presentes, puede haber medio de cultivo presente para facilitar la supervivencia de las células. En algunos casos, las células de la invención pueden proporcionarse en alícuotas congeladas y puede haber presentes sustancias tales como DMSO para facilitar la supervivencia durante la congelación. Dichas células congeladas normalmente se descongelarán y después se colocarán en un tampón o medio ya sea para el mantenimiento o para la administración.

El siguiente ejemplo ilustra la invención.

EjemploMateriales y métodos

Una vez que se extrajo sangre de los pacientes, se prepararon células progenitoras de origen mesodérmico en un laboratorio de células madre en condiciones higiénicas; se manipularon contenedores abiertos con células u otro material bajo una campana de flujo laminar. En cada etapa de preparación, se extrajeron muestras y se determinó el

número y la viabilidad de las células madre.

5 Se aislaron células mononucleares de sangre entera mediante centrifugación de densidad 1,073 Ficoll-Paque® y se cultivaron en α -MEM-PL durante 5 días. Se recogieron células adherentes y se determinaron sus inmunofenotipos mediante tinción de inmunofluorescencia para una serie de marcadores celulares (véase más adelante) mediante análisis de citometría de flujo. Se usaron controles de isotipo apropiados para cada procedimiento de tinción.

10 La viabilidad celular se evaluó con solución de azul de tripano al 1 %. Las células se enumerarán por FACS (FACSCalibur, Beckton Dickinson). Las células también se sometieron a ensayo para determinar micoplasmas, esterilidad (evaluada por tinción de Gram), endotoxina, identidad, pureza y viabilidad y cariotipo para excluir anomalías cromosómicas.

A continuación, se resume cómo se derivaron realmente las células.

- 15 1. Se tomaron 20 ml de sangre periférica del paciente.
 2. Después, se pasaron 11,5 ml de sangre restante a través del Ficoll Paque® 1,073.
 3. Esto se centrifugó para proporcionar células mononucleares, después, éstas ya sea:
- 20 4a. Se hicieron crecer en cultivo durante 8 días en un 0 % de oxígeno o
 4b. Se sometieron a Separación de Rosetas y después se hicieron crecer en cultivo durante 8 días en un 0 % de oxígeno.
5. Se cambió el medio y las células estuvieron en cultivo durante 14 días en un 0 % de oxígeno.
 6. Las células se recogieron y después se procesaron a través de FACS.

25 Se investigó una diversidad de marcadores usando RT-PCR y análisis por FACS. Los principales marcadores investigados fueron CD14, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD271, CD181, CD182 y CD184.

30 El siguiente es el protocolo de trabajo que se usó.

Preparación de plasma rico en plaquetas (PRP)

- 35 1. La muestra de sangre se dividió en dos tubos Falcon de 15 ml, > 8 ml en cada uno.
 2. Se centrifugó a 120 x g, 15 min, sin freno, temperatura ambiente (TA).
 3. El sobrenadante de plasma rico en plaquetas (PRP) se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 15 ml.
 4. Se tomó nota del volumen de PRP transferido.
 5. El volumen de PRP se reemplazó con solución salina equilibrada de Hank (HBSS)

Preparación de medios de cultivo

- 40 1. Se transfirieron 0,3 ml de PRP a un tubo Eppendorf para el análisis automático de hematología usando el instrumento Cell-Dyn.
 Se calculó el número máximo teórico de plaquetas.
 Número máximo teórico de plaquetas = concentración de plaquetas x volumen de PRP
- 45 2. Se transfirieron 0,25 ml de PRP a un tubo Eppendorf para la criopreservación (-80 °C).
 3. El PRP restante se centrifugó a 1610 x g, 10 min, TA, con freno.
 4. El sobrenadante de plasma sin plaquetas (PSP) se retiró en un tubo Falcon por separado y el sedimento de plaquetas se resuspendió con un volumen de PSP que proporciona una concentración de 1×10^9 células/ml (usando el número máximo teórico de plaquetas – apuntar a $1,5 \times 10^9$ para conseguir 1×10^9).
- 50 5. El PSP restante se transfirió a tubos Eppendorf en alícuotas de 0,25 ml para la criopreservación (-80 °C).
 6. La tapa del tubo halcón PRP estaba envuelta en parafilm.
 7. El tubo Falcon se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 minutos.
 8. El tubo Falcon se sumergió en un baño de agua a 37 °C hasta que se descongeló.
 9. Las etapas 7 y 8 se repitieron 3 veces más.
- 55 10. Los medios de cultivo se completaron añadiendo el PL al 10 % a α MEM, Heparina 5 U/ml, glutamax 2 mM, P/E al 1 % (es decir, se añadieron 1,5 ml de PL a 13,5 ml de medio).

Aislamiento de CMN

- 60 1. El volumen de muestra de sangre diluida (16,5 ml) se combinó en un nuevo tubo Falcon de 50 ml.
 2. La muestra de sangre se diluyó adicionalmente 1:2 con HBSS a ~33 ml.
 3. Se añadieron 15 ml de Ficoll-Paque PREMIUM 1,073 a dos nuevos tubos Falcon de 50 ml.
 4. La muestra de sangre diluida se depositó cuidadosamente en capas en la parte superior del Ficoll-Paque inclinando el tubo y eyectando la muestra lentamente contra la pared del tubo.
- 65 5. Esto se centrifugó a 400 x g, 35 min, sin freno, TA.
 6. Se descartó la mayor cantidad posible del sobrenadante (el HBSS) sin alterar la capa turbia de células

mononucleares con la ayuda de una pipeta Pasteur blanda.

7. La capa turbia de células mononucleares que descansa en la parte superior del Ficoll-Paque transparente se aspiró a un nuevo tubo de 50 ml, agrupado.
8. Se tomó nota del volumen de CMN transferidas aspirándolo en una pipeta de 10 ml.
- 5 9. La mitad del volumen se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml.
10. Las CMN se diluyeron en ambos tubos con al menos 3 veces el volumen de muestra con HBSS, aproximadamente 13 ml.
11. Ambos tubos se centrifugaron a 500 x g, 15 min, con freno, TA.
12. El sobrenadante se descartó.
- 10 13. Uno de los tubos se resuspendió a aproximadamente 1 millón de CMN/ml, aproximadamente 5 ml.

Enriquecimiento con Rosette-Sep

1. El segundo sedimento de CMN se resuspendió con 660 µl de sangre entera de la alícuota inicial de 0,75 ml.
- 15 2. Se añadieron 33 µl de Rosette-Sep y se mezclaron pipeteando.
3. Esto se incubó durante 20 minutos, temperatura ambiente.
4. La muestra se diluyó 1:2 añadiendo 700 µl de HBSS, hasta un volumen total de muestra de ~1,4 ml.
5. Se añadió 1 ml de Ficoll-Paque a un nuevo tubo Falcon de 15 ml.
- 20 6. La muestra de sangre diluida se depositó en capas cuidadosamente en la parte superior del Ficoll-Paque.
7. Esto se centrifugó a 400 x g, 35 min, sin freno, TA.
8. El sobrenadante se descartó aspirándolo con una pipeta de 1 ml de un solo canal.
9. La capa turbia de células en la parte superior del Ficoll se transfirió a un nuevo tubo Falcon de 15 ml.
10. Se tomó nota del volumen de células enriquecidas y se diluyeron con al menos 3 veces el volumen de muestra con HBSS, aproximadamente 3 ml.
- 25 11. Las células se centrifugaron a 500 x g, 15 min, con freno, TA.
12. El sobrenadante se descartó.
13. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml.

Cultivo celular

- 30 1. Las células se sembraron a una densidad de siembra de $1,0 \times 10^5$ células en medio de lisado de plaquetas ya sea autólogo o alógeno.
2. Esto se completó con un volumen de medio adecuado.
3. Las células se incubaron en 37 °C, 0 % de O₂, 5 % de CO₂ durante 8 días.
- 35 4. Los medios se cambiaron el día 8 y las células se incubaron hasta el día 14.
5. Las colonias se recogieron y se transfirieron a nuevos vasos de cultivo. Se añadió medio de lisado de plaquetas alógeno.
6. El cultivo y los pases de las células continuaron hasta que se obtuvieron aproximadamente $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ células.
- 40 7. Las células se recogieron y se analizaron mediante citometría de flujo y, en caso necesario, las células se crioconservaron.

Ensayos de migración dirigida y antiinflamatorios

- 45 Las células producidas de acuerdo con la invención se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de migrar de forma dirigida a tejidos específicos dañados en ratones y de inducir efectos antiinflamatorios una vez allí. Para la migración dirigida, las células se marcaron con agente fluorescente y se determinó su ubicación en el cuerpo del ratón usando bioluminiscencia.
- 50 Para los efectos antiinflamatorios, se realizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para diversos marcadores inflamatorios, incluyendo interleucinas (tales como IL-8), selectinas, moléculas de adhesión (tales como ICAM-1) y proteínas quimioatrayentes (tales como MCP-1 y TNF-α).

Resultados

55 *Todas las células*

60 Todas las células progenitoras de linaje mesodérmico producidas de acuerdo con la invención expresaron CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD271, pero no expresaron CD 14, CD34 y CD45. En la Fig. 1 se muestra un gel de RT-PCR de ejemplo que muestra la presencia de CD44 y la ausencia de CD34.

Se muestran grupos de ejemplo de resultados de FACS en las Fig. 2 a 4. Éstos confirman que las células son positivas para al menos CD73 y CD90 y negativas para CD14, CD34 y CD45.

65 Las células normalmente tienen de 10 a 20 µm de diámetro. Las células normalmente tienen una morfología en forma de huso y son similares a fibroblastos (es decir, tienen un cuerpo celular pequeño con unos pocos procesos

celulares que son largos y delgados).

Células de migración dirigida

5 Se demostró que las células capaces de migrar de forma dirigida a tejidos dañados específicos expresan receptores de quimiocinas de tipos 1 y 2 (CXCR1 y CXCR2).

Se demostró que las células capaces de migrar de forma dirigida al tejido cardíaco dañado y a los tejidos óseos dañados expresan CXCR4. La Fig. 5 muestra que las células positivas para CXCR4 son capaces de migrar de forma dirigida al hueso dañado. Los resultados del experimento que se muestra en la Fig. 5 se resumen a continuación.

10

	PLM	CXCR4+	CXCR4	Valor de P (ANOVA)
Día 3 después de la fractura	5317 ± 3468 ^a n = 14	6464 ± 4814 ^b n = 8	546 ± 433 n = 8	0,0037
Día 7 después de la fractura	7093 ± 2041 ^a n = 6	8526 ± 4202 ^b n = 4	133 ± 745 n = 3	0,0057
Día 14 después de la fractura	6508 ± 5350 n = 5	18149 ± 6100 ^{a,c} n = 3	2440 ± 806 n = 3	0,0109

La tabla anterior muestra el análisis semicuantitativo de la señal de BLI. La señal en la región de interés del sitio de la tibia de la fractura (RDI), medida como fotones/segundos/cm²/sr, se normalizó restando la señal de fondo encontrada en una RDI igual en la tibia contralateral no fracturada. a, p < 0,05 frente al grupo de CXCR4; b, p < 0,01 frente al grupo de CXCR4; c, p < 0,05 frente a PLM por post-ensayo de Tukey. Abreviaturas: ANOVA, análisis de varianza; PLM, célula progenitora del linaje mesodérmico.

15

Se demostró que las células capaces de migrar de forma dirigida al tejido retiniano dañado expresan CXCR4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), CXCL12, CD109, CD119, factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NFkappa B), CD140a, CD140b, CD221, CD222, CD304, CD309 y CD325.

20

25

Las células son capaces de migrar de forma dirigida al tejido óseo dañado y la célula expresa niveles detectables de TGF-beta 3, proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno 2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina 8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-Rα, PDGF-Rβ, CXCR4, receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB.

30

Efectos antiinflamatorios

Se demostró que las células producidas de acuerdo con la invención expresan los siguientes marcadores antiinflamatorios: CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

35

40

REIVINDICACIONES

1. Una célula progenitora del linaje mesodérmico, en la que la célula (a) expresa niveles detectables de CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD271, CD120a (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa), CD120b (Receptor 2 del TNF-alfa), CD50 (molécula de adhesión intercelular 3, ICAM-3), CD54 (ICAM-1), CD58 (antígeno 1 asociado a la función de linfocitos, LFA-1), CD62E (selectina E), CD62L (selectina L), CD62P (selectina P), CD106 (proteína de adhesión celular vascular, VCAM-1), CD102 (ICAM-2), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados), CD104 (integrina Beta 4), CD 123 (receptor de interleucina 3), CD 124 (receptor de interleucina 4), CD 126 (receptor de interleucina 6), CD127 (receptor de interleucina 7) y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y (b) no expresa niveles detectables de CD14, CD34 y CD45.
2. Una célula progenitora de acuerdo con la reivindicación 1, en la que:
- (a) la célula es capaz de migrar a un tejido dañado específico en un paciente;
 - (b) la célula expresa niveles detectables de receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 1 (CXCR1);
 - (c) la célula expresa niveles detectables de receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 2 (CXCR2); y/o
 - (d) la célula es capaz de migrar a un tejido dañado específico en un paciente y el tejido específico es tejido cardíaco, tejido retiniano o tejido óseo.
3. Una célula progenitora de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el tejido específico es:
- (a) tejido cardíaco o tejido óseo y la célula expresa niveles detectables de receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4 (CXCR4);
 - (b) tejido retiniano y la célula expresa niveles detectables de CXCR4, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento 1 similar a insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), CXCL12, CD109, CD119, factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NFkappa B), CD140a, CD140b, CD221, CD222, CD304, CD309 y CD325; o
 - (c) tejido óseo y la célula expresa niveles detectables de TGF-beta 3, proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), SOX-9, Colágeno 2, CD117 (c-kit), ligando 12 de quimiocina (motivo C-C) (CCL12), CCL7, interleucina 8 (IL-8), factor A de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), IGF-1, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), PDGF-R α , PDGF-R β , CXCR4, receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), receptor de IGF-1 (IGF-1R), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR), CXCL12 y NFkappaB.
4. Una célula progenitora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la célula:
- (a) es capaz de tener efectos antiinflamatorios en un tejido dañado en un paciente;
 - (b) expresa niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), (ii) receptor de IGF-1; (iii) receptor de quimiocinas C-C de tipo 1 (CCR1), (iv) factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), (v) factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF-1 alfa), (vi) Akt1 y (vii) factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y/o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o sobreexpresa uno o más de (i) a (vii); y/o
 - (c) expresa niveles detectables de uno o más de (i) factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), (ii) factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), (iii) factor 1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1), (iv) factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), (v) factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), (vi) interferón gamma (IFN-gamma) y (vii) interleucina 1 alfa (IL-1 alfa), o sobreexpresa uno o más de (i) a (vii).
5. Una célula progenitora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que:
- (a) la célula es autóloga con respecto a un paciente en el que se ha de administrar; o
 - (b) la célula es alógena con respecto a un paciente en el que se ha de administrar.
6. Una población que comprende:
- (a) dos o más células progenitoras de linaje mesodérmico como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores; o
 - (b) al menos aproximadamente 5×10^5 células como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Una composición farmacéutica que comprende (a) una célula progenitora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una población de acuerdo con la reivindicación 6 y (b) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
8. Un método de producción de una población de células progenitoras de linaje mesodérmico de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende (a) cultivar células mononucleares (CM) con lisado de plaquetas en condiciones de

oxígeno de menos del 20 % de oxígeno (O₂) y en condiciones que permiten a las células progenitoras adherirse de manera que las CM se diferencien en células progenitoras de linaje mesodérmico y (b) cosechar y cultivar las células progenitoras que tengan un patrón de expresión como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 y producir, de este modo, una población de acuerdo con la reivindicación 6.

- 5
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que:
- (a) las CM son células mononucleares de sangre periférica (CMSP); y/o
- (b) las CM se obtienen de un paciente o un donante alógeno.
- 10
10. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en un método de reparación de un tejido dañado en un paciente.
- 15
11. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que:
- (a) el tejido deriva del mesodermo;
- (b) el tejido es tejido cardíaco, tejido retiniano o tejido óseo;
- (c) el método es (a) para la reparación de tejido cardíaco dañado y la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la reivindicación 3, (b) para la reparación de tejido retiniano dañado y la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la
- 20
- reivindicación 3 o (c) para la reparación de tejido óseo dañado y la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la reivindicación 3; y/o
- (d) el tejido se daña por una lesión o enfermedad.
- 25
12. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en un método de tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca, la degeneración macular asociada a la edad o una lesión o enfermedad ósea en un paciente que lo necesite.
- 30
13. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que:
- (a) la lesión o enfermedad cardíaca se selecciona entre infarto de miocardio, hipertrofia ventricular izquierda, hipertrofia ventricular derecha, embolia, insuficiencia cardíaca, déficit cardíaco congénito, valvulopatía cardíaca, arritmia y miocarditis; o
- (b) la lesión o enfermedad ósea se selecciona entre fractura, fractura de Salter-Harris, fractura en tallo verde, espolón óseo, craneosinostosis, síndrome de Coffin-Lowry, fibrodisplasia osificante progresiva, displasia fibrosa, enfermedad de Fong (o síndrome onicorrotuliano), hipofosfatasa, síndrome de Klippel-Feil, enfermedad ósea
- 35
- metabólica, síndrome onicorrotuliano, osteoartritis, osteítis deformante (o enfermedad ósea de Paget), osteítis fibrosa quística (u osteítis fibrosa o enfermedad ósea de Von Recklinghausen), osteítis pubiana, osteítis condensante (u osteítis condensada), osteítis condensada ilíaca, osteocondritis disecante, osteogénesis imperfecta, osteomalacia, osteomielitis, osteopenia, osteopetrosis, osteoporosis, osteonecrosis, hiperostosis porótica, hiperparatiroidismo primario, osteodistrofia renal, cáncer óseo, una lesión ósea asociada al cáncer metastásico, enfermedad de Gorham Stout, hiperparatiroidismo primario, enfermedad periodontal y aflojamiento aséptico de los reemplazos de articulaciones.
- 40
14. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en la que el método es (a) para el tratamiento de una lesión o enfermedad cardíaca y la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la reivindicación 3, (b) para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad y la población comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la reivindicación 3 o (c) para el tratamiento de una lesión o enfermedad ósea y la población comprende
- 50
- una cantidad terapéuticamente eficaz de células como se define en la reivindicación 3.
15. Una población de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que la población se produce usando CM obtenidas del paciente o un donante alógeno.
- 55

Fig. 1

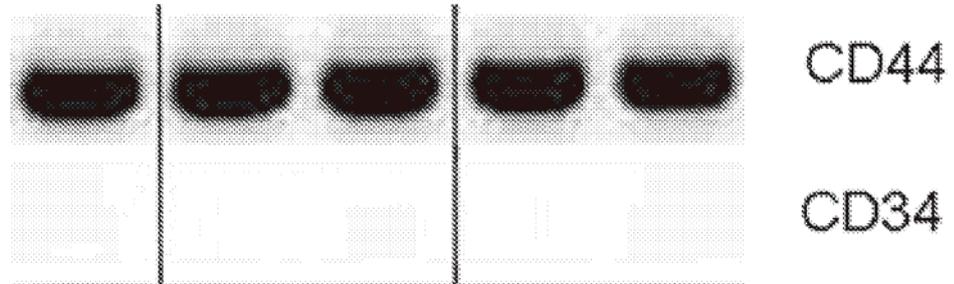


Fig. 2

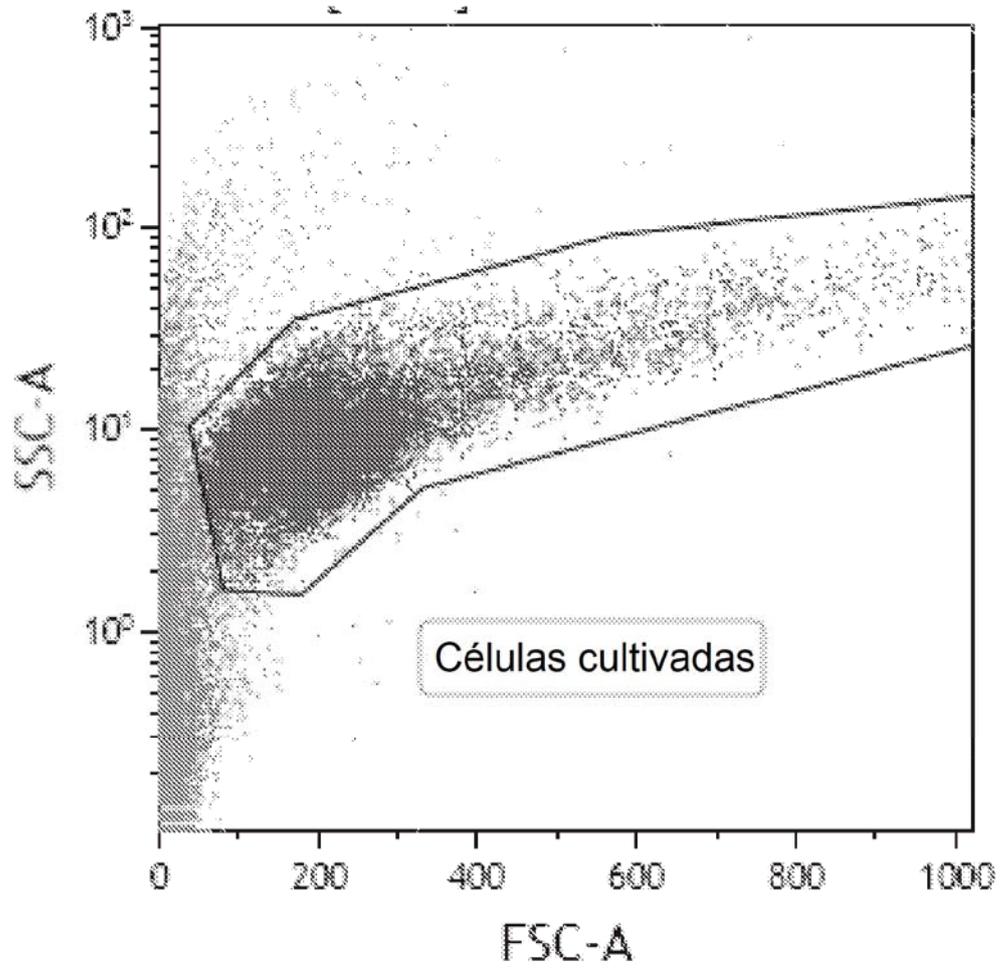


Fig. 3

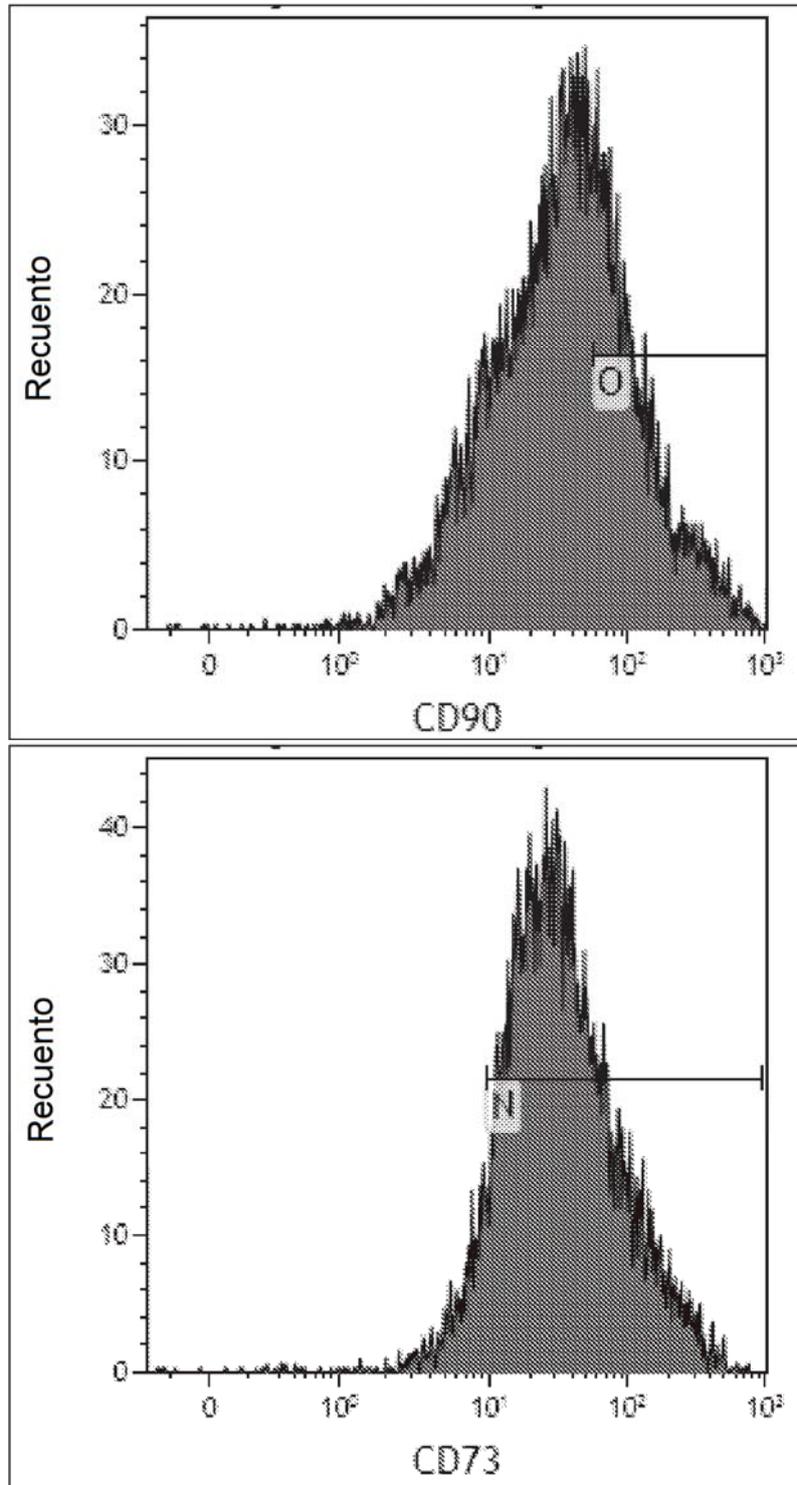


Fig. 4a

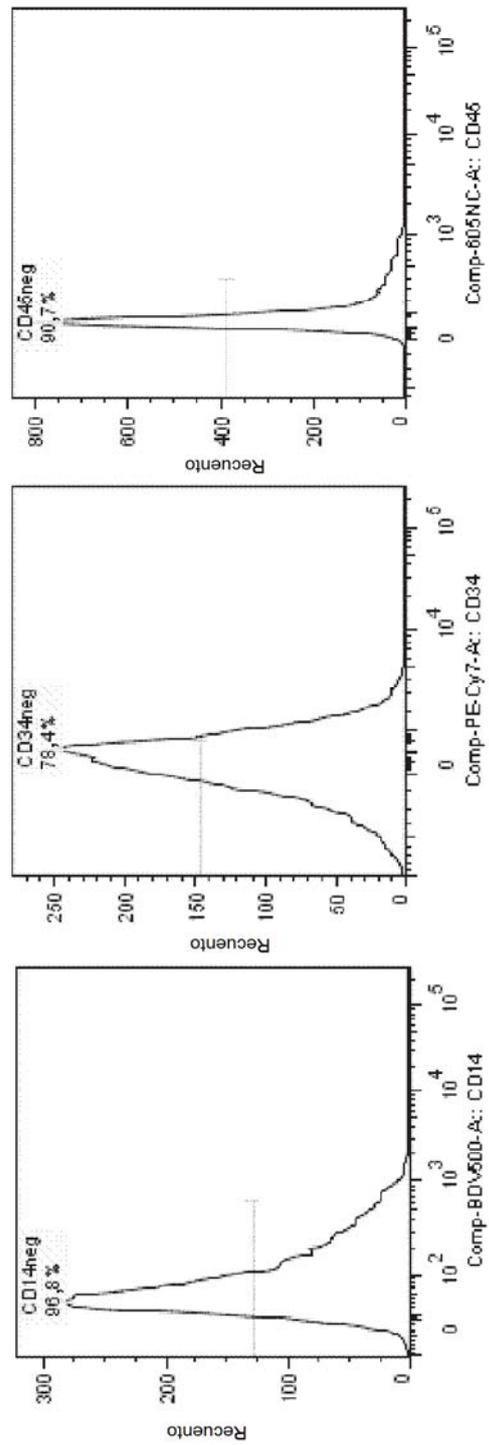


Fig. 4b

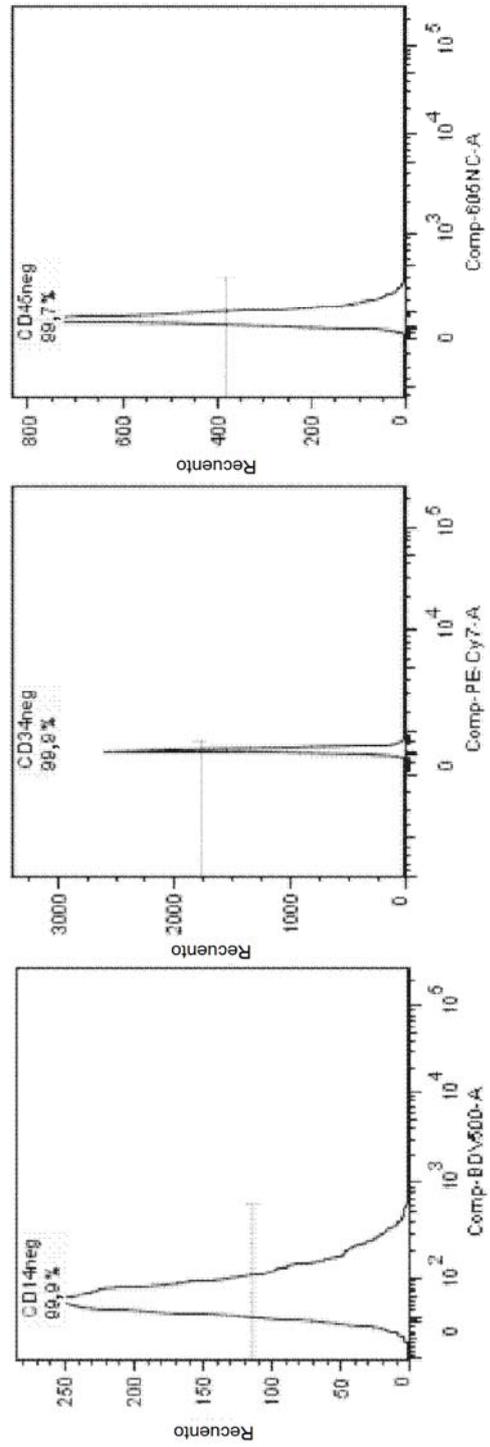


Fig. 5

