

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 886**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28	(2015.01)
A61K 35/12	(2015.01)
A61P 19/10	(2006.01)
A61P 19/08	(2006.01)
C12N 5/077	(2010.01)
C12N 5/0789	(2010.01)
C12N 5/071	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/AU2012/001062**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13033777**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12829951 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2753342**

54 Título: **Método para aumentar la función osteoblástica**

30 Prioridad:

09.09.2011 US 201161532772 P
16.09.2011 US 201161535441 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2018

73 Titular/es:

MESOBLAST, INC. (100.0%)
505 Fifth Avenue, Third Floor
New York, NY 10017, US

72 Inventor/es:

ITESCU, SILVIU y
KRISHNAN, RAVI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 676 886 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

Método para aumentar la función osteoblástica

Datos de solicitud relacionados

5 La presente divulgación reivindica prioridad de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 61/532,772 titulada "Métodos para aumentar la función osteoblástica" presentada el 9 de septiembre de 2011 y de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 61/535,441 titulada "Métodos para aumentar la función osteoblástica 2" presentada el 16 de septiembre 2011.

Campo

10 La presente divulgación se refiere a métodos para aumentar la función osteoblástica en un sujeto que lo necesite. Estos métodos son útiles para tratar o prevenir trastornos mediados por la función osteoblástica, tales como trastornos óseos e infertilidad masculina.

Antecedentes

15 Los osteoblastos son células responsables de la formación de hueso. Estas células producen una matriz de osteoide, que se compone principalmente de colágeno tipo 1, sulfato de condroitina y osteocalcina. Los osteoblastos también mineralizan esta matriz, por ejemplo, haciendo uso de zinc, cobre y sodio.

20 Los osteoblastos surgen de células osteoprogenitoras localizadas en el periostio del hueso y la médula ósea. Los osteoprogenitores son células progenitoras inmaduras que expresan el factor de transcripción principal regulador Cbfa1/Runx2. Los osteoprogenizadores son inducidos a diferenciarse en osteoblastos por diversos factores de crecimiento, incluyendo las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Una vez que los osteoprogenitores comienzan a diferenciarse en osteoblastos, comienzan a expresar una variedad de marcadores genéticos que incluyen Osterix, Coll, BSP, M-CSF, ALP y osteocalcina, osteopontina y osteonectina.

25 La osteocalcina (Proteína Gla Ósea: BGP) es una pequeña proteína de unión a calcio dependiente de vitamina K que fue descubierta por primera vez por Price et al. ((1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73 :3373-5). Esta proteína se sintetiza principalmente por los osteoblastos y los odontoblastos y comprende del 15 al 20% de la proteína ósea no colágena. Posner et al. ((1980) J. Biol. Chem. 255: 8685-91) han demostrado que la osteocalcina madura contiene tres residuos de ácido carboxiglutámico que se forman por la modificación de los residuos de ácido glutámico dependiente de la vitamina K postraducciona. Se ha demostrado además que estos residuos están implicados en la capacidad de la osteocalcina para unir iones calcio (Brozovic et al. (1976) Brit. J Haematol. 32:9).

30 La osteocalcina es la principal proteína de la matriz extracelular en el hueso requerida para la mineralización ósea normal. La densidad mineral ósea normal es el resultado de cristales de hidroxiapatita que contienen calcio y fosfato extracelular dentro de una matriz proteica. La deposición de calcio dentro de la matriz de proteína implica la osteocalcina producida por los osteoblastos. La deposición de fosfato dentro de la matriz proteica involucra la fosfatasa alcalina no específica del tejido (TNAP) que regula las concentraciones extracelulares de pirofosfato inorgánico (ppi), un inhibidor natural de los cristales de hidroxiapatita. Las mutaciones en el gen TNAP producen hipofosfatasa, caracterizada por elevadas concentraciones extracelulares de pirofosfato inorgánico, huesos poco mineralizados, fracturas espontáneas

35 Ahora se sabe que la osteocalcina activa de forma sinérgica el receptor 2 sensor de calcio (CaR2) en presencia de calcio. Por consiguiente, las alteraciones en la expresión o actividad de la osteocalcina cumplen una función clave en los trastornos relacionados con la función de CaR2. Por ejemplo, los trastornos en los que la interacción de la osteocalcina y el CaR2 desempeñan un papel incluyen, pero no se limitan a, la movilidad y viabilidad de los espermatozoides, y trastornos óseos metabólicos tales como la osteoporosis.

45 La osteoporosis es un trastorno esquelético sistémico que se caracteriza por una densidad mineral ósea reducida y un mayor riesgo de fractura. Las dos etiologías principales de la osteoporosis son una mayor actividad de los osteoclastos que se descompone y reduce la actividad de los osteoblastos. Estas características ocurren en el estado posmenopáusico y después del uso crónico de corticosteroides, así como en casos idiopáticos. La mayoría de las estrategias de tratamiento actuales para la osteoporosis se centran en los agentes antirresortivos, como los bisfosfonatos, que inhiben la actividad de resorción ósea de los osteoclastos. Ciertas estrategias, como el uso de la hormona paratiroidea (PTH), se centran en aumentar la actividad de los osteoblastos, que se mide utilizando biomarcadores para una mayor actividad de los osteoblastos, como la osteocalcina y la fosfatasa alcalina específica de los huesos.

50 La publicación de la solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2008/0260694 A1 se refiere a progenies de células multipotenciales mesenquimáticas expandidas precursoras (MEMP) caracterizado por marcadores de desarrollo temprano STRO-1^{bri} y ALP, así como a métodos para producir MEMP y a los usos de MEMP para aplicaciones terapéuticas.

55

La publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 2006/108229 A1 se refiere a la utilización de tejido de la fosfatasa alcalina no específica (TNAP) como marcador para identificar y/o aislar células multipotenciales de adultos, así como a las poblaciones de células enriquecidas por métodos divulgados allí y usos terapéuticos de estas células.

5 La publicación de la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2006/032075 A1 se refiere a métodos para potenciar la proliferación y/o supervivencia de células mesenquimales precursoras (MPC) y/o de la progenie derivada de las mismas in vitro o in vivo que comprende exponer las MPC o progenie a SDF -1 o análogos de la misma, así como a composiciones que comprenden MPC aisladas o progenie derivadas de las mismas y SDF-1 o análogos de los mismos y el uso de dichos métodos y composiciones para ex vivo o formación de hueso in vivo en mamíferos.

Resumen

10 La presente invención se dirige a la materia objeto establecida en las reivindicaciones adjuntas.

Los presentes inventores han descubierto que la administración sistémica de preparaciones de células multipotenciales a primates no humanos da como resultado un aumento espectacular de la actividad de los osteoblastos, por ejemplo, como se indica por los niveles aumentados de osteocalcina circulante y/o fosfatasa alcalina en los primates. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la administración sistémica de preparaciones de células multipotenciales a los primates dio como resultado un aumento de aproximadamente el veinte veces en los niveles de osteocalcina en plasma dentro de las 2 semanas de administración. Los inventores también han descubierto que la administración sistémica de preparaciones de células multipotenciales a los primates daba como resultado un aumento detectable, por ejemplo, un aumento del 5% o del 10% en los niveles de fosfatasa alcalina en plasma dentro de las 6 semanas de administración. Esto indica que la administración sistémica de preparaciones celulares multipotenciales será útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas o causadas por niveles bajos de actividad osteoblástica y/o osteocalcina sistémica y/o fosfatasa alcalina, como trastornos óseos metabólicos y baja fertilidad en sujetos masculinos.

20 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la función osteoblástica en un sujeto, el método comprende administrar sistémicamente al sujeto una población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, el sujeto padece un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos y/o asociado con bajos niveles o actividad de osteocalcina.

El trastorno puede ser un trastorno óseo metabólico o infertilidad masculina.

30 El trastorno óseo metabólico se puede seleccionar del grupo que consiste en osteomalacia, osteoporosis, osteopetrosis, enfermedad de Paget y raquitismo hipofosfatémico ligado a X, osteodistrofia asociada a insuficiencia renal, enfermedad de hueso de mármol, osteítis fibrosa quística y pérdida ósea inducida por glucocorticoides.

En un ejemplo, el sujeto sufre de osteoporosis. En un ejemplo, el método evita o reduce el riesgo de una fractura en el sujeto que padece osteoporosis.

35 En un ejemplo, el sujeto sufre una fractura ósea. En un ejemplo, el método acelera la cicatrización de la fractura ósea y/o evita la unión retardada de la fractura ósea y/o evita la no unión de la fractura ósea. En este sentido, el sujeto puede sufrir un trastorno óseo metabólico o infertilidad masculina. Alternativamente, el sujeto puede ser un sujeto normal, es decir, no sufrir un trastorno óseo metabólico o infertilidad masculina. Por lo tanto, el sujeto puede ser cualquier sujeto que sufra una fractura.

40 En un ejemplo, la administración de la población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas da como resultado un aumento en los niveles de osteocalcina en plasma en el sujeto.

En un ejemplo, la administración de las células madre estimula la producción de osteocalcina por los osteoblastos en el sujeto.

45 En un ejemplo, la administración de la población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas da como resultado un aumento de plasma de al menos cinco veces, o al menos diez veces, o al menos veinte veces en los niveles de osteocalcina dentro de las 2 semanas (o 4 semanas o 6 semanas) de administración.

En un ejemplo, la administración de la población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas da como resultado un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina en plasma en el sujeto.

50 En un ejemplo, la administración de las células madre estimula la producción de fosfatasa alcalina por los osteoblastos en el sujeto.

En un ejemplo, la administración de la población de células madre y/o progenie de la misma y/o factores solubles derivados resulta en al menos un aumento de cinco, diez o veinte o treinta o cuarenta o cincuenta o sesenta por ciento

en los niveles de fosfatasa alcalina en plasma dentro de las 6 semanas de administración en comparación con el nivel de fosfatasa alcalina plasmática antes de la administración.

5 En un ejemplo, las células madre son células multipotenciales. En otro ejemplo, las células multipotenciales son células STRO-1⁺. En otro ejemplo más, las células multipotenciales son células STRO-1^{brillante}. En otro ejemplo más, las células STRO-1⁺ coexpresan el marcador TNAP.

En un ejemplo, un método como se describe en el presente documento comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1^{brillante} y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

10 En un ejemplo, un método como se describe en este documento comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y fosfatasa⁺ alcalina no específica de tejido (TNAP)⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, la población de células madre y/o progenie y/o factores solubles se administran por vía intravenosa.

En un ejemplo, la población de células madre y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una pluralidad de veces.

15 Por ejemplo, la población de células madre y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada cuatro o más semanas.

Por ejemplo, la población de células madre y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada ocho o más semanas.

20 Por ejemplo, la población de células madre y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada doce o más semanas.

En un ejemplo, un método descrito en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende administrar entre 0.1×10^6 a 5×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg.

25 En un ejemplo, un método descrito en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende administrar entre 0.3×10^6 a 2×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg. Por ejemplo, el método comprende administrar aproximadamente 1×10^6 o 2×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg.

30 En un ejemplo, un método descrito en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende administrar una dosis baja de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas. Por ejemplo, una dosis baja de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas comprende entre 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg. Por ejemplo, la baja dosis de células STRO-1 y/o su progenie comprende aproximadamente 0.3×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg.

En un ejemplo, un método descrito en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende administrar una alta dosis de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas.

35 En un ejemplo, la población de células madre y/o las células de progenie son autógenas o alogénicas y/o los factores solubles pueden derivarse de células autogeneicas o alogénicas. En un ejemplo, la población y/o la progenie son alogénicos y/o los factores solubles provienen de células alogénicas.

De acuerdo con el ejemplo anterior, el método puede comprender adicionalmente obtener la población de células madre y/o células de progenie y/o factores solubles o puede comprender adicionalmente aislar la población de células madre y/o células de progenie y/o factores solubles. En un ejemplo, el aislamiento de la población de células madre y/o células de progenie se basa en la expresión de STRO-1 y/o TNAP.

40 En un ejemplo, la población de células madre y/o células de progenie y/o factores solubles se obtiene del sujeto que se está tratando. En otro ejemplo, la población de células madre y/o células de progenie y/o factores solubles se obtiene de un sujeto diferente de la misma especie.

En un ejemplo, la población de células madre y/o células de progenie se ha expandido en cultivo antes de la administración y/o antes de obtener los factores solubles.

45 De acuerdo con el ejemplo anterior, un método como se describe en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo puede comprender adicionalmente cultivar la población de células madre y/o células de progenie.

En un ejemplo, las células madre y/o sus células progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en forma de una composición que comprende dichas células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de ellas y un transportador y/o excipiente.

- De acuerdo con el ejemplo anterior, un método como se describe aquí de acuerdo con cualquier ejemplo puede comprender adicionalmente formular la población y/o la progenie y/o factores solubles en una composición.
- 5 La presente divulgación también proporciona un kit que comprende una población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas empaquetadas con instrucciones para su uso en un método descrito en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo.
- Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un kit que comprende una composición que comprende la población y/o la progenie y/o los factores solubles empaquetados con información del producto que indica el uso de la composición en un método descrito en la presente de acuerdo con cualquier ejemplo.
- 10 La presente divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.
- En un ejemplo, el sujeto sufre de osteoporosis. En un ejemplo, el método evita o reduce el riesgo de una fractura en el sujeto que padece osteoporosis.
- 15 En un ejemplo, el sujeto sufre una fractura ósea. En un ejemplo, el método acelera la cicatrización de la fractura ósea y/o evita la unión retardada de la fractura ósea y/o evita la no unión de la fractura ósea.
- La presente divulgación también proporciona un método para aumentar los niveles de osteocalcina (por ejemplo, niveles de osteocalcina en plasma) en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar (por ejemplo, administrar sistémicamente) al sujeto una población de células madre como se describe en la presente y/o progenie de la misma como se describe en la presente y/o factores solubles derivados de la misma como se describe aquí.
- 20 En un ejemplo, las células o factores se administran en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de osteocalcina (por ejemplo, niveles de osteocalcina en plasma) en el sujeto.
- En un ejemplo, el sujeto que lo necesita tiene niveles reducidos de osteocalcina, por ejemplo, osteocalcina en plasma, por ejemplo, en comparación con el nivel en una población normal y/o sana.
- 25 La presente divulgación también proporciona un método para aumentar los niveles de fosfatasa alcalina (por ejemplo, niveles de fosfatasa alcalina en plasma) en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar (por ejemplo, administrar sistémicamente) al sujeto una población de células madre como se describe aquí y/o progenie de los mismos como se describe en este documento y/o factores solubles derivados de los mismos como se describe en el presente documento.
- 30 En un ejemplo, las células o factores se administran en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de fosfatasa alcalina (por ejemplo, niveles de fosfatasa alcalina en plasma) en el sujeto.
- En un ejemplo, el sujeto que lo necesita tiene niveles reducidos de fosfatasa alcalina, por ejemplo, fosfatasa alcalina de plasma, por ejemplo, en comparación con el nivel en una población normal y/o sana.
- 35 La presente divulgación también proporciona una población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para su uso en el tratamiento o la prevención de la infertilidad masculina o un trastorno óseo metabólico.
- La presente divulgación también proporciona el uso de una población de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la infertilidad masculina o un trastorno óseo metabólico en un sujeto.
- Breve descripción de los dibujos
- 40 Figura 1. Coexpresión de TNAP (STRO-3) y el marcador celular precursor mesenquimal, STRO-1^{brillo} por células morfonucleares de médula ósea humana adulta (BMMNC). La inmunofluorescencia de doble color y la citometría de flujo se realizaron mediante incubación de BMMNC seleccionado para MACS STRO-1 y marcado indirectamente con un anticuerpo IgM murino anti-ratón acoplado a FITC (eje x) y STRO-3 mAb (IgG murino) marcado indirectamente con una IgG de cabra anti-murina acoplada a PE (eje y). El histograma del gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recopilados como datos del modo lista. Las líneas verticales y horizontales se ajustaron a los niveles de reactividad de < 1.0% de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1^{brillo} expresaba conjuntamente TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células restantes STRO-1⁺ no podían reaccionar con el mAb STRO-3.
- 45
- 50 Figura 2. Representaciones gráficas que muestran histogramas de citometría de flujo representativos producidos utilizando suspensiones de células individuales de cultivos de CPM de cynomolgus derivados de médula ósea expandidos con expresión de superficie celular positiva de los marcadores de células madre mesenquimales, STRO-1, STRO-4 y CD 146 (sólido) con respecto al isotipo (Controles negativos de IgM, IgG2a e IgG1) (con algoritmo hash)

- 5 detectados utilizando anticuerpos secundarios de cabra anti-IgM murina o IgG conjugados-FITC. Los histogramas representativos también muestran que los MPCs cynomolgus carecen de la expresión de la superficie celular para los marcadores de monocitos/macrófagos (CD 14), células madre/progenitoras hematopoyéticas (CD34) y leucocitos maduros (CD45). Los niveles de fluorescencia superior al 1% en comparación con el control de isotipo significan positividad.
- Figura 3. Representación gráfica del perfil de ayuno para la osteocalcina en sangre (ng/ml) monitoreados durante un período de 6 meses después de la inyección IV de MPC alogénico para animales individuales. Las flechas indican el momento de la administración de una dosis única de MPC.
- 10 Figura 4. Representación gráfica de los perfiles medios para los niveles de osteocalcina en plasma después de dos dosis únicas de MPC administradas por vía intravenosa a Monos Cynomolgous mauricianos obesos.
- Figura 5. Representación gráfica que muestra los cambios porcentuales en los niveles de osteocalcina después del tratamiento con MPC en comparación con los niveles iniciales antes del tratamiento.
- Figura 6. Representación gráfica que muestra los cambios porcentuales medios en los niveles de osteocalcina después del tratamiento con MPC en comparación con los niveles iniciales antes del tratamiento.
- 15 Figura 7. La representación gráfica que muestra 4/5 animales demuestran un aumento progresivo en la fosfatasa alcalina total plasmática durante 6 meses de tratamiento con MPC (según se midió mediante el análisis de área bajo la curva).
- Figura 8. Representación gráfica que muestra 4/5 animales demuestran un aumento progresivo en la fosfatasa alcalina total plasmática durante 6 meses de tratamiento con MPC (según lo medido por el % de aumento en el análisis del área bajo la curva entre 18-24 semanas frente a 0-6 semanas).
- 20 Figura 9. Representación gráfica que muestra los cambios porcentuales en los niveles de fosfatasa alcalina después del tratamiento con MPC en comparación con los niveles iniciales antes del tratamiento en animales individuales
- Descripción detallada
- Técnicas generales y definiciones seleccionadas
- 25 A lo largo de esta especificación, a menos que se especifique lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una sola etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se tomará para abarcar uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de aquellas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.
- 30 Cada realización o ejemplo descrito en el documento actual debe aplicarse mutatis mutandis a todas y cada una de las otras realizaciones a menos que se indique específicamente lo contrario.
- 35 Los expertos en la técnica apreciarán que la divulgación descrita en este documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las específicamente descritas. Debe entenderse que la divulgación incluye todas tales variaciones y modificaciones. La divulgación también incluye todos los pasos, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de dichas etapas o características.
- La presente divulgación no tiene un alcance limitado por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que están destinadas solo a fines de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la divulgación, como se describe en este documento.
- 40 La presente divulgación se realiza sin experimentación excesiva utilizando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en solución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda Edición (1989), conjunto de Vols I, II y III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, vols. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, todo el texto, y en particular los trabajos publicados por Gait, pp1-22; Atkinson et al, pp35-81; Sproat y col., Pp 83-115; y Wu y col., pp 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, todo el texto; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), serie completa; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" en: Base de datos de conocimientos de Acceso al sitio web del laboratorio virtual (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *Mermelada. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), Vol. 2, pp. 1 -284, Academic Press, Nueva York. 12. Wunsch,

E., ed. (1974) *Synthese von Peptiden en Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie* (Muler, E., ed.), Vol. 15, 4th edn., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. y Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, Tercera edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo.

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implica la inclusión de una etapa o elemento indicado o entero o grupo de etapas o elementos o enteros, pero no la exclusión de ningún otra etapa o elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Como se usa en el presente documento, el término “derivado de” se tomará para indicar que se puede obtener un número entero especificado de una fuente particular, aunque no necesariamente directamente de esa fuente. En el contexto de factores solubles derivados de células madre y/o células de progenie de los mismos, se debe entender que este término significa uno o más factores, por ejemplo, proteínas, péptidos, carbohidratos, etc., producidos durante el cultivo in vitro de células madre y/o células progenie de los mismos.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el término “función osteoblástica” abarca la capacidad de un osteoblasto para producir y/o secretar una matriz extracelular, por ejemplo, osteoide. Osteoide es una matriz ósea no mineralizada que comprende colágeno tipo 1, sulfato de condroitina y osteocalcina. El término “función osteoblástica” adicional o alternativamente significa la capacidad de una célula para mineralizar una matriz extracelular, por ejemplo, osteoide. En un ejemplo, se entenderá que el término “función osteoblástica” abarca el aumento de la formación de hueso en un sujeto.

El aumento de la “función osteoblástica” en un sujeto se puede lograr aumentando la capacidad de los osteoblastos para producir y/o secretar matriz extracelular y/o mineralizar la matriz extracelular y/o aumentar la proliferación de osteoprogenitores y/o diferenciación u osteoprogenitores en osteoblastos. Por ejemplo, puede conseguirse aumentar la función osteoblástica en un sujeto aumentando el número de osteoblastos en un sujeto o en un hueso del mismo.

Como se usa en el presente documento, el término “cantidad efectiva” se tomará para significar una cantidad suficiente de células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de ellas para lograr un aumento significativo en la función osteoblástica y/o niveles o actividad de osteoblastos y/o niveles sistémicos de osteocalcina y/o niveles de fosfatasa alcalina en el sujeto. Un aumento significativo en la función osteoblástica y/o niveles de osteoblastos o niveles de actividad y/o osteocalcina sistémica y/o niveles de fosfatasa alcalina puede ser, por ejemplo, al menos un aumento de dos veces, o al menos un aumento de cinco veces, o en al menos un aumento de diez veces, al menos un aumento de veinte veces, o al menos un aumento de veinticinco veces.

Como se usa en este documento, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se tomará para significar una cantidad suficiente de células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para tratar un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “cantidad profilácticamente eficaz” se tomará para significar una cantidad suficiente de células madre y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de ellas para prevenir o inhibir o retrasar la aparición de un trastorno asociado con osteoblasto bajo. niveles o actividad

Como se usa en el presente documento, el término “dosis baja” debe entenderse como una cantidad de células madre y/o progenie de la misma menor que 1×10^6 , aún suficiente para ser una “cantidad efectiva” como se define aquí y/o una “cantidad terapéuticamente efectiva” y/o una “cantidad profilácticamente efectiva” como se define en este documento. Por ejemplo, una dosis baja comprende 0.5×10^6 o menos células, o 0.4×10^6 o menos células o 0.3×10^6 o menos células o 0.1×10^6 o menos células.

Tal como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término “dosis alta” es más de 1.5×10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis comprende entre aproximadamente 1.5×10^6 y aproximadamente 4×10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende aproximadamente 1.5×10^6 o aproximadamente 2×10^6 /kg.

Como se usa en este documento, el término “tratar” o “tratamiento” o “tratar” debe entenderse como administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de factores solubles y/o células y reducir o inhibir los síntomas de un trastorno asociado con bajos niveles de osteoblastos o actividad tal que el sujeto ya no sea clínicamente diagnosticado con el trastorno.

Como se usa en este documento, el término “previene” o “prevenir” o “prevención” se debe entender cómo administrar una cantidad profilácticamente eficaz de factores solubles y/o células y detener, obstaculizar o retrasar el desarrollo o progresión de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos.

Como se usa en el presente documento, el término “factores solubles” se tomará para significar cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido, glicoproteína, glucopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc. producidos por células madre y/o progenie de las mismas que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser

- 5 intracelulares y/o secretados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (por ejemplo, sobrenadante) y/o una fracción de los mismos y/o pueden ser un factor purificado. En un ejemplo de la presente divulgación, los factores solubles están o están contenidos en el sobrenadante. De acuerdo con esto, se tomará cualquier ejemplo aquí dirigido a la administración de uno o más factores solubles para aplicar mutatis mutandis a la administración de sobrenadante.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término “sobrenadante” se refiere al material no celular producido después del cultivo in vitro de células madre y/o progenie de las mismas en un medio adecuado, por ejemplo, medio líquido. Típicamente, el sobrenadante se produce cultivando las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, seguido de eliminación del material celular mediante un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede o no haber sido sometido a otras etapas de purificación antes de la administración. En un ejemplo, el sobrenadante comprende menos de 10^5 , por ejemplo, menos de 10^4 , tal como menos de 10^3 , por ejemplo, sin células vivas.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión “individuo normal o sano” se tomará para referirse a un sujeto que no tiene baja actividad osteoblástica según se evalúa mediante cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en este documento. En un ejemplo, un “individuo normal o sano” no sufre ninguno de los síntomas de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos y/o no sufre un trastorno asociado con niveles o actividad de osteoblastos bajos.
- Células madre o células de progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles derivados de ellas
- 20 Como se usa en este documento, el término “célula madre” se refiere a células autorrenovadoras que son capaces de dar lugar a hijas fenotípicamente y genotípicamente idénticas, así como al menos otro tipo de célula final (por ejemplo, células diferenciadas terminalmente). El término “células madre” incluye células totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales, así como células progenitoras y/o precursoras derivadas de la diferenciación de las mismas. La célula madre puede ser una célula madre adulta o embrionaria o puede ser un tallo pluripotente inducido (iPS).
- 25 Como se usa en este documento, el término “célula totipotente” o “célula totipotencial” se refiere a una célula que puede formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocito).
- 30 Como se usa en este documento, el término “célula pluripotente” o “célula pluripotencial” se refiere a una célula que tiene versatilidad de diferenciación completa, es decir, la capacidad de crecer en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células del cuerpo de mamífero. Una célula pluripotente puede ser autorenovable y puede permanecer inactiva o inactiva dentro de un tejido.
- 35 Por “célula multipotencial” o “célula multipotente” nos referimos a una célula que es capaz de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. Como se usa en el presente documento, esta frase engloba células madre adultas o embrionarias y células progenitoras, tales como células precursoras mesenquimales (MPC) y progenie multipotencial de estas células. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no tiene la capacidad de formar todos los tipos de células.
- 40 Como se usa en el presente documento, el término “célula progenitora” se refiere a una célula que se compromete a diferenciarse en un tipo específico de célula o a formar un tipo específico de tejido.
- 45 Como se usa en el presente documento, la frase “células multipotenciales STRO-1⁺” se tomará para significar células progenitoras STRO-1⁺ y TNAP⁺ capaces de formar colonias de células multipotenciales.
- 50 Células multipotenciales STRO-1⁺ son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, células de pulpa dental, tejido adiposo, piel, bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, folículos capilares, intestino, pulmón, ganglio linfático, timo, hueso, ligamento, tendón, músculo esquelético, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en estirpes germinales tales como mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo. Por lo tanto, las células multipotenciales STRO-1⁺ son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos de células que incluyen, pero no se limitan a, tejidos conjuntivos adiposos, óseos, cartilaginosos, elásticos, musculares y fibrosos. La vía específica de compromiso y diferenciación de linaje en la que entran estas células depende de varias influencias de influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citocinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos del huésped. En una realización, las células multipotenciales STRO-1⁺ son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son células madre o son células precursoras que con el tiempo se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.
- 55 En un ejemplo, las células STRO-1⁺ se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un sujeto a tratar o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o diferente). Los términos “enriquecido”, “enriquecimiento” o variaciones de los mismos se utilizan en el documento actual para describir una población de células en la que la proporción de un tipo de célula particular o la proporción de un número de tipos de células particulares aumenta en comparación con una población no tratada de células (por ejemplo, células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida para células STRO-1⁺ comprende al menos aproximadamente 0.1% o 0.5% o 1% o 2% o 5% o 10% o 15% o 20% o 25% o 30% o 50 % o 75% de células STRO-1⁺. En este sentido, el término “población de células enriquecidas para células STRO-1⁺” se tomará para proporcionar

apoyo explícito para el término “población de células que comprende X% STRO-1⁺ células”, en donde X% es un porcentaje como se menciona aquí. Las células STRO-1⁺ pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, por ejemplo, CFU-F (fibroblastos) o un subconjunto de los mismos (por ejemplo, 50% o 60% o 70% o 70% o 90% o 95%) pueden tener esta actividad.

- 5 En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación celular que comprende células STRO-1⁺ en una forma seleccionable. A este respecto, se entenderá que el término “forma seleccionable” significa que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de las células STRO-1⁺. El marcador puede ser STRO-1, pero no es necesario. Por ejemplo, como se describe y/o ejemplifica aquí, células (por ejemplo, MPCs) que expresan STRO-2 y/o STRO-3 (TNAP) y/o STRO-4 y/o VCAM-1 y/o CD146 y/o 3G5 también expresa STRO-1 (y puede ser STRO-1^{brillo}). En consecuencia, una indicación de que las células son STRO-1⁺ no significa que las células se seleccionan por expresión de STRO-1. En un ejemplo, las células se seleccionan basándose en al menos expresión de STRO-3, por ejemplo, son STRO-3⁺ (TNAP⁺).

- 15 La referencia a la selección de una célula o población de la misma no requiere selección de una fuente de tejido específica. Como se describe aquí, las células STRO-1⁺ se pueden seleccionar de o se pueden aislar o enriquecer de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos proporcionan soporte para la selección de cualquier tejido que comprende células STRO-1⁺ (por ejemplo, MPCs) o tejido o tejido vascularizado que comprende pericitos (por ejemplo, pericitos STRO-1⁺) o uno cualquiera o más de los tejidos mencionados aquí.

- 20 En un ejemplo, las células usadas en la presente divulgación expresan uno o más marcadores individualmente o colectivamente seleccionados del grupo que consiste en TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, STRO-4⁺ (HSP-90β), CD45⁺, CD146⁺, 3G5⁺ o cualquier combinación de los mismos.

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

- 25 Por “colectivamente” se entiende que la divulgación abarca cualquier número o combinación de los marcadores enumerados o grupos de péptidos, y que, a pesar de que dichos números o combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no enumerarse específicamente en este documento, las reivindicaciones adjuntas pueden definir tales combinaciones o subcombinaciones separadas y divisibles de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

- 30 Por ejemplo, las células STRO-1⁺ son STRO-1^{brillo} (syn. STRO-1^{bri}). En un ejemplo, las células STRO-1^{bri} se enriquecen preferentemente con respecto a las células STRO-1^{dim} o STRO-1^{intermedio}.

- 35 Por ejemplo, las células STRO-1^{brillo} son, además, una o más de TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, STRO-4⁺ (HSP-90β) y/o CD146⁺. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o se muestran para expresar uno o más de los marcadores anteriores. A este respecto, una célula que se muestra para expresar un marcador no necesita ser probada específicamente, sino que las células previamente enriquecidas o aisladas pueden ser probadas y posteriormente se puede suponer que las células aisladas o enriquecidas pueden suponer también que expresan el mismo marcador.

- 40 En un ejemplo, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en el documento WO 2004/85630. Por ejemplo, las células precursoras mesenquimales expresan un marcador de una célula perivascular, por ejemplo, las células son STRO-1⁺ o STRO-1^{brillo} y/o 3G5⁺. En un ejemplo, las células son o fueron previamente o son progenie de células que se aislaron de tejidos u órganos vascularizados o partes de los mismos.

- 45 Una célula a la que se hace referencia como “positiva” para un marcador dado, puede expresar un nivel bajo (lo o tenue) o alto (brillante, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente en la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de la fluorescencia u otro marcador utilizado en el proceso de clasificación de las células. La distinción de lo (o tenue o apagado) y bri se entenderá en el contexto del marcador utilizado en una población celular particular que se está ordenando. Una célula que se conoce como “negativa” para un marcador dado no está necesariamente ausente por completo de esa celda. Este término significa que el marcador se expresa en un nivel relativamente muy bajo por esa célula, y que genera una señal muy baja cuando se detecta de forma detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, niveles detectados demandando un anticuerpo de control de isotipo.

- 55 El término “brillante”, cuando se usa en el presente documento, se refiere a un marcador en una superficie de la célula que genera una señal relativamente alta cuando se etiqueta de forma detectable. Sin desear estar limitado por la teoría, se propone que las células “brillantes” expresen más proteína marcadora objetivo (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una señal fluorescente mayor, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC determinado por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), que las células no brillantes (STRO-1^{opacas/dim}). En un ejemplo, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente el 0.1% de las células mononucleares de

médula ósea marcadas más brillantes contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente 0.1%, al menos aproximadamente 0.5%, al menos aproximadamente 1%, al menos aproximadamente 1.5%, o al menos aproximadamente 2%, de las células mononucleares de médula ósea marcadas más brillantes contenidas en la muestra inicial. En un ejemplo, las células STRO-1^{brillo} tienen una expresión de 2 log de magnitud mayor de expresión de superficie STRO-1 relativa a “fondo”, es decir, células que son STRO-1^{brillo}. En comparación, las células STRO-1^{dim} y/o STRO-1^{intermedio} tienen una expresión de superficie de STRO-1 inferior a 2 log como máximo, típicamente alrededor de 1 log o menos que el “fondo”.

Como se usa en el presente documento, el término “TNAP” pretende abarcar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En un ejemplo, el TNAP es BAP. En un ejemplo, TNAP como se usa aquí se refiere a una molécula que puede unir el anticuerpo STRO-3 producido por la estirpe celular de hibridoma depositada en ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest bajo el número de acceso de depósito PTA-7282.

Además, en un ejemplo, las células STRO-1⁺ son capaces de dar lugar a CFU-F clonogénica.

En un ejemplo, una proporción significativa de las células multipotenciales STRO-1⁺ son capaces de diferenciarse en al menos dos estirpes germinales diferentes. Los ejemplos no limitantes de los linajes a los que pueden comprometerse las células multipotenciales incluyen células precursoras de huesos; progenitores de hepatocitos, que son multipotentes para células epiteliales de los conductos biliares y hepatocitos; células restringidas neuronales, que pueden generar precursores de células gliales que progresan a oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que progresan a neuronas; precursores de músculo cardíaco y cardiomiocitos, estirpes celulares beta pancreáticas secretoras de insulina que responden a la glucosa. Otros linajes incluyen, entre otros, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos, y células precursoras de los siguientes: células epiteliales del pigmento de la retina, fibroblastos, células de la piel como queratinocitos, células dendríticas, células del folículo piloso, células epiteliales de los conductos renales, células del músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblastos, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocitos y oligodendrocitos.

En otro ejemplo, las células STRO-1⁺ no son capaces de dar lugar, tras el cultivo, a células hematopoyéticas.

En un ejemplo, las células se toman del sujeto a tratar, se cultivan in vitro utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener factores sobrenadantes o solubles o células expandidas para administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan células de una o más de las estirpes celulares humanas establecidas. En otro ejemplo útil de la divulgación, se utilizan células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie).

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

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

En un ejemplo, las células de progenie útiles para los métodos de la divulgación se obtienen aislando células TNAP⁺ STRO-1⁺ de la médula ósea utilizando cuentas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y luego cultivo expandiendo las células aisladas (véase Gronthos et al. Blood 85: 929-940, 1995 para un ejemplo de condiciones de cultivo adecuadas).

En un ejemplo, tales células expandidas (progenie) (por ejemplo, después de al menos 5 pasajes) pueden ser TNAP⁺, CC9⁺, HLA clase I⁺, HLA clase II⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD3⁺, CD11a⁺c, CD31⁺, CD86⁺, CD34⁺ y/o CD80⁺. Sin embargo, es posible que, bajo diferentes condiciones de cultivo a las descritas aquí, la expresión de diferentes marcadores puede

variar. Además, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de células gastadas, no significa que hay una proporción menor de las células que no tienen este fenotipo(s) (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9⁻). En un ejemplo, las células expandidas todavía tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

5 En un ejemplo, una población celular utilizada para obtener factores flotantes o solubles, o células en sí, comprende células en las que al menos el 25%, por ejemplo, al menos el 50%, de las células son CC9⁺.

En otro ejemplo, una población de células expandidas usada para obtener factores sobrenadantes o solubles, o células en sí mismas, comprende células en las que al menos el 40%, por ejemplo al menos el 45%, de las células son STRO-1⁺.

10 En un ejemplo adicional, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectivamente o individualmente del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombosmodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R (STRO-2 = leptina-R), RANKL, STRO-4 (HSP-90), STRO-1^{brillo} y CD 146 o cualquier combinación de estos marcadores

15 En un ejemplo, las células de la progenie son Progenie de células multipotenciales STRO-1⁺ Expandidas multipotenciales (MEMPS) como se define y/o describe en WO 2006/032092. Los métodos para preparar poblaciones enriquecidas de células multipotenciales STRO-1 a partir de las cuales se puede derivar la descendencia se describen en los documentos WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto in vitro, las células multipotenciales STRO-1⁺ raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y generalmente estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC). El documento WO 01/04268 se refiere a cosechar dichas células de la médula ósea a niveles de pureza de aproximadamente 0.1% a 90%. La población que comprende MPCs de los que se deriva la progenie se puede cosechar directamente de una fuente de tejido, o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido ex vivo.

20 Por ejemplo, la progenie se puede obtener a partir de una población cosechada, no expandida, de células multipotenciales STRO-1⁺ sustancialmente purificadas, que comprende al menos aproximadamente 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95% de las células totales de la población en la que están presentes. Este nivel puede lograrse, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado individual o colectivamente del grupo que consiste en TNAP, STRO-4 (HSP-90 β), STRO-1^{brillo}, 3G5⁺, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

30 Las MEMPS se pueden distinguir de las células multipotenciales STRO-1⁺ recién cosechadas porque son positivas para el marcador STRO-1^{br} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). Por el contrario, las células multipotenciales STRO-1⁺ recién aisladas son positivas tanto para STRO-1^{br} como para ALP. En un ejemplo de la presente divulgación, al menos 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{br}, ALP⁺. En un ejemplo adicional, las MEMPS son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α 3 β 1. En otro ejemplo más, los MEMPS no muestran actividad TERT y/o son negativos para el marcador CD18.

35 La población de partida de células STRO-1⁺ puede derivarse de uno o más tipos de tejidos expuestos en WO 01/04268 o WO 2004/085630, a saber, médula ósea, células de pulpa dental, tejido adiposo y piel, o quizás de manera más amplia. desde tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos capilares, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

40 Se entenderá que al realizar los métodos descritos en la presente divulgación, la separación de células que portan cualquier marcador de superficie celular dado puede efectuarse mediante una serie de métodos diferentes, sin embargo, algunos métodos ejemplares se basan en la unión a un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) al marcador en cuestión, seguido de una separación de aquellos que muestran unión, ya sea de unión de alto nivel, o de unión de bajo nivel o sin unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales (por ejemplo, proteínas que comprenden fragmentos de unión a antígeno de los mismos) debido a la especificidad de estos últimos agentes. Los anticuerpos pueden usarse en ambos pasos, sin embargo, 45 también se pueden usar otros agentes, por lo que los ligandos para estos marcadores también se pueden emplear para enriquecer las células que los portan, o que carecen de ellos.

50 Los anticuerpos o ligandos se pueden unir a un soporte sólido para permitir una separación cruda. En algunos ejemplos, las técnicas de separación maximizan la retención de la viabilidad de la fracción que se recogerá. Se pueden emplear diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente crudas. La técnica particular empleada dependerá de la eficacia de la separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y la velocidad de rendimiento, y la necesidad de equipos sofisticados y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación a, separación magnética, uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, 55 cromatografía de afinidad y "paneo" con anticuerpo unido a una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una

separación precisa incluyen, pero no se limitan a, FACS. Los métodos para realizar FACS serán evidentes para el experto en la técnica.

5 Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos aquí están disponibles comercialmente (por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra STO-1 comercializados por R & D Systems, EE. UU.), Disponibles en ATCC u otra organización depositaria y/o pueden producirse utilizando técnicas reconocidas en la técnica.

10 En un ejemplo, el método para aislar células STRO-1⁺ comprende una primera etapa que es una etapa de clasificación en fase sólida que utiliza, por ejemplo, clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) que reconoce la expresión de alto nivel de STRO-1. A continuación, puede seguir una segunda etapa de clasificación, si se desea, para dar como resultado un nivel superior de expresión de células precursoras como se describe en la especificación de patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría implicar el uso de dos o más marcadores.

El método que obtiene las células STRO-1⁺ también puede incluir la recolección de una fuente de las células antes del primer paso de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. Por lo tanto, el tejido se eliminará quirúrgicamente. Las células que comprenden el tejido de origen se separarán luego en una denominada suspensión de células individuales. Esta separación se puede lograr por medios físicos o enzimáticos.

15 Una vez que se ha obtenido una población de células STRO-1⁺ adecuadas, se puede cultivar o expandir por cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

20 En un ejemplo, las células se toman del sujeto a tratar, se cultivan in vitro utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener factores sobrenadantes o solubles o células expandidas para administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, las células de una o más de las estirpes celulares humanas establecidas se utilizan para obtener los factores sobrenadantes o solubles. En otro ejemplo útil de la divulgación, las células de un animal no humano (o si el paciente no es un ser humano, de otra especie) se utilizan para obtener factores sobrenadantes o solubles.

25 Los métodos y usos de la presente divulgación pueden practicarse utilizando células de cualquier especie animal no humana, que incluyen, pero no se limitan a, células de primate no humano, células de ungulados, caninos, felinos, lagomorfos, roedores, aves y peces. Las células de primates con las que se puede realizar la divulgación incluyen, pero no están limitadas a, células de chimpancés, mandriles, monos cynomolgus y cualquier otro mono nuevo o del viejo mundo. Las células unguladas con las que puede realizarse la divulgación incluyen, pero no están limitadas a, células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedor con las que puede realizarse la descripción incluyen, pero no se limitan a, células de ratón, rata, cobaya, hámster y jerbo. Los ejemplos de especies de lagomorfos con los que se puede realizar la revelación incluyen conejos domesticados, conejos, liebres, conejillos de Indias, liebres y pikas. Los pollos (*Gallus gallus*) son un ejemplo de una especie aviar con la cual se puede realizar la divulgación.

En un ejemplo, las células son células humanas.

35 Las células útiles para los métodos de la divulgación se pueden almacenar antes del uso, o antes de obtener el sobrenadante o factores solubles. Los métodos y protocolos para preservar y almacenar células eucarióticas, y en particular células de mamífero, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pollard, J.W. y Walker, J.M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, Segunda Edición, Humana Press, Totowa, N.J., Freshney, RI (2000) Culture of Animal Cells, Cuarta Edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). Se puede utilizar cualquier método que mantenga la actividad biológica de las células madre aisladas tales como las células madre/progenitoras mesenquimatosas, o la progenie de las mismas, en relación con la presente divulgación. En un ejemplo, las células se mantienen y se almacenan utilizando criopreservación.

Células genéticamente modificadas

45 En un ejemplo, las células madre y/o células de progenie de las mismas están genéticamente modificadas, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés. Por ejemplo, las células están diseñadas para expresar una proteína útil en el tratamiento de un trastorno óseo metabólico o infertilidad masculina.

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

55 En un ejemplo, el ácido nucleico se proporciona en forma de una construcción de expresión. Como se usa en el presente documento, el término "construcción de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de conferir expresión en un ácido nucleico (por ejemplo, un gen indicador y/o un gen indicador contraseleccionable) al que está operativamente conectado, en una celda. Dentro del contexto de la presente divulgación, debe entenderse que una construcción de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento

subgenómico de virus o fragmento genómico, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

5 Los métodos para la construcción de una construcción de expresión adecuada para la realización de la divulgación serán evidentes para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Ausubel y col. (En: *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook et al (en: *Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, tercera edición 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes de la construcción de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico plantilla adecuado utilizando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en una construcción de expresión adecuada, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

10 Los vectores adecuados para tal construcción de expresión son conocidos en la técnica y/o se describen en este documento. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el método de la presente divulgación en una célula de mamífero es, por ejemplo, un vector del conjunto de vectores pcDNA suministrado por Invitrogen, un vector del conjunto de vectores pCI (Promega), un vector del pCMV vector suite (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector del conjunto de vectores pcDNA (Invitrogen).

15 El experto en la materia conocerá vectores y fuentes adicionales de tales vectores, tales como, por ejemplo, Life Technologies Corporation, Clontech o Promega.

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

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

30 Por ejemplo, un vector retroviral generalmente comprende repeticiones terminales largas (LTRs) que actúan en cis con capacidad de empaquetamiento para hasta 6-10 kb de secuencia extraña. Los mínimos LTR que actúan en cis son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de un vector, que luego se usa para integrar la construcción de expresión en la célula objetivo para proporcionar una expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales ampliamente usados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (MuLV), virus de la leucemia gibbonica del chimpancé (GaLV), virus de la inmunodeficiencia simia (SrV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al, *J Virol* 56:2731-2739 (1992); Johann y col., *J. Virol* 65: 1635 - 1640 (1992); Sommerfelt y col., *Virol* 76: 58 - 59 (1990); Wilson y col., *J. Virol* 63: 274 - 2318 (1989); Miller y col., *J. Virol* 65: 2220-2224 (1991); PCT/US94/0 700; Miller y Rosman *BioTechniques* 7: 980- 990, 1989; Miller, A. D. *Human Gene Therapy* 7: 5-14, 1990; Scarpa et al *Virology* 75: 849-852, 1991; Burns et al. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 90: 8033-8037, 1993).

35 Varios sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV) también se han desarrollado para la administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Números 5,173,414 y 5,139,941; Publicaciones internacionales Nos. WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski y otros *Molec. Cell Biol* 5:3988 - 3996, 1988; Vincent et al. (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5: 533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol, and Immunol.* 755:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5: 793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7: 165-169, 1994; y Zhou et al *J Exp. Medicina.* 779: 1867-1875, 1994.

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

Ensayo de potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles

45 Los métodos para determinar la capacidad de las células o los factores solubles para tratar o prevenir o retrasar el inicio o la progresión de trastornos asociados con niveles o actividad de osteoblastos bajos serán evidentes para el experto en la técnica.

Por ejemplo, las células o factores solubles se evalúan por su capacidad para aumentar la función osteoblástica.

En un ejemplo, las células osteoprogenitoras (por ejemplo, que expresan Cbfa1/RunX2) se ponen en contacto con las células y/o los factores solubles y se evalúa su capacidad para diferenciarse en osteoblastos. Por ejemplo, las células se evalúan para el desarrollo de expresión de osterix y/o Coll y/o BSP y/o M-CSF y/o fosfatasa alcalina.

5 En un ejemplo, las células y/o los factores solubles se ponen en contacto con los osteoblastos y se evalúa su efecto sobre la producción de colágeno y/u osteocalcina de tipo 1, por ejemplo, utilizando un inmunoensayo y/o inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

En un ejemplo adicional, las células y/o factores solubles se ponen en contacto con los osteoblastos cultivados en una matriz extracelular y se evalúa su capacidad para aumentar la mineralización de la matriz, por ejemplo, mediante tinción con rojo de Alizarin o tinción de von Kossa.

10 Las células y/o los factores solubles también se pueden evaluar por su efecto sobre la actividad de osteoblastos in vivo utilizando un ensayo tal como formación de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano, por ejemplo, como se describe en Zaheer y col., Nat. Biotechnol, 19: 1148-1154, 2001.

15 Las células y/o los factores solubles también pueden evaluarse por su efecto sobre la actividad de osteoblastos in vivo al detectar su efecto sobre la formación ósea, por ejemplo, utilizando rayos X y/o absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA).

20 Por ejemplo, células o factores solubles (por ejemplo, una mezcla de factores o un factor único o una fracción de factores (por ejemplo, derivados por purificación de afinidad o cromatografía) se administran a un modelo de un trastorno óseo metabólico y el efecto sobre uno o más los síntomas son evaluados. Los ejemplos de modelos de animales no humanos incluyen roedores ovariectomizados (por ejemplo, ratas), modelos de pérdida ósea inducida por inmovilización y/o modelos revisados en Turner European Cells and Materials, 1: 66-91, 2001.

Será evidente para los expertos en la materia a partir de lo anterior que la presente divulgación también proporciona un método para identificar o aislar una célula o un factor soluble para el tratamiento, prevención o retraso de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos, el método comprende:

25 (i) administrar una célula o un factor soluble a un sujeto de prueba que padece un trastorno asociado con niveles o actividad de osteoblastos bajos y evaluar un síntoma del trastorno en el sujeto;

(ii) comparar el síntoma de un trastorno asociado con bajos niveles de osteoblastos o la actividad del sujeto en (i) con el síntoma del trastorno asociado con bajos niveles de osteoblastos o la actividad de un sujeto de control que padece el trastorno al que la célula o soluble factor no ha sido administrado,

30 en el que una mejora en el síntoma en el sujeto de prueba en comparación con el sujeto de control indica que la célula o el factor soluble trata el trastorno.

La célula puede ser cualquier célula descrita aquí según cualquier ejemplo.

Composiciones celulares

35 En un ejemplo de la presente divulgación, las células madre y/o las células de su progenie se administran en forma de una composición. En un ejemplo, dicha composición comprende un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

Los portadores y excipientes ejemplares no afectan adversamente la viabilidad de una célula y/o la capacidad de una célula para reducir, prevenir o retrasar el síndrome metabólico y/o la obesidad.

- 5 En un ejemplo, el portador o excipiente proporciona una actividad amortiguadora para mantener las células y/o los factores solubles a un pH adecuado para ejercer de ese modo una actividad biológica, por ejemplo, el portador o excipiente es solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS representa un portador o excipiente atractivo porque interacciona mínimamente con células y factores y permite la liberación rápida de las células y factores, en tal caso, la composición de la divulgación puede producirse como un líquido para la aplicación directa al torrente sanguíneo o en un tejido o una región que rodea o adyacente a un tejido, por ejemplo, mediante inyección.
- 10 Las células madre y/o las células de su progenie también se pueden incorporar o incrustar dentro de andamios que son compatibles con el receptor y que se degradan en productos que no son perjudiciales para el receptor. Estos andamios proporcionan soporte y protección para las células que se van a trasplantar a los sujetos receptores. Los andamios biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de tales andamios.
- 15 Una variedad de diferentes andamios se puede usar con éxito en la práctica de la divulgación. Los andamios ejemplares incluyen, pero no se limitan a, andamios biológicos y degradables. Los andamios biodegradables naturales incluyen andamios de colágeno, fibronectina y laminina. El material sintético adecuado para un andamio de trasplante celular debería ser capaz de soportar un crecimiento celular y un funcionamiento celular extensos. Tales andamios también pueden ser reabsorbibles. Los andamios adecuados incluyen andamios de ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe por Vacanti, et al. J. Fed. Surg. 23:3-9 1988; Cima, et al. Biotechnol. Bioeng. 35: 145 1991; Vacanti, et al. Plast. Reconstr. Surg. 88: 153 - 9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.
- 20 En otro ejemplo, las células pueden administrarse en un armazón de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).
- 25 Las composiciones celulares útiles para los métodos descritos en este documento se pueden administrar solos o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre, o células de médula ósea. Las células de diferentes tipos pueden mezclarse con una composición de la divulgación inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse juntas durante un período de tiempo antes de la administración.
- 30 En un ejemplo, la composición comprende una cantidad efectiva o una cantidad de células terapéutica o profilácticamente efectiva. Por ejemplo, la composición comprende aproximadamente 1×10^5 células madre (tales como células STRO-1⁺)/kg a aproximadamente 1×10^7 células madre (tales como células STRO)/kg o aproximadamente 1×10^6 célula madre (tales como células STRO-1⁺)/kg a aproximadamente 5×10^6 células madre (tales como células STRO-1⁺)/kg. La cantidad exacta de células a administrar depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y la extensión y gravedad del trastorno asociado con niveles o actividad bajos de osteoblastos.
- 35 En un ejemplo, se administra una baja dosis de células al sujeto. Las dosificaciones a modo de ejemplo incluyen entre aproximadamente 0.1×10^4 y 0.5×10^6 células por kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células por kg, tal como, entre aproximadamente 0.5×10^5 y 0.5×10^6 células por kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0.1×10^6 y 0.5×10^6 células por kg, por ejemplo, aproximadamente 0.2×10^6 o 0.3×10^6 o 0.4×10^6 células por kg.
- 40 En algunos ejemplos, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación de un sujeto, sin embargo, eso permite que los factores secretados por las células entren en la circulación. De esta manera, los factores solubles se pueden administrar a un sujeto permitiendo que las células secreten los factores en la circulación del sujeto. Dicha cámara puede implantarse igualmente en un sitio en un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, por ejemplo, implantados en o cerca de un páncreas.
- 45 En algunos ejemplos de la divulgación, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir a un paciente antes del inicio de la terapia con composiciones celulares. En consecuencia, el trasplante con células madre alogénicas, o incluso xenogénicas, o la progenie de las mismas se puede tolerar en algunos casos.
- 50 Sin embargo, en otros casos puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar la terapia celular y/o reducir una respuesta inmune de un sujeto contra la composición celular. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o se puede lograr administrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden estar encapsuladas en una cápsula que es permeable a los nutrientes y el oxígeno requerido por la célula y los factores terapéuticos que la célula aún es impermeable a los factores y células inmunes humorales. En un ejemplo, el encapsulante es hipoalérgico, está situado de manera fácil y estable en un tejido objetivo, y proporciona una protección adicional a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, las células pueden modificarse genéticamente para reducir su inmunogenicidad.
- 55 **Composiciones de factores solubles**
- En un ejemplo de la presente divulgación, los factores sobrenadantes o solubles derivados de células madre y/o de células progenies se administran en forma de una composición, por ejemplo, que comprende un portador y/o excipiente

adecuado. En un ejemplo, el portador o excipiente no afecta negativamente al efecto biológico de los factores solubles o sobrenadante.

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

10 Las composiciones que comprenden sobrenadantes o factores solubles derivados de células madre y/o progeñe pueden prepararse como suspensiones líquidas apropiadas, por ejemplo, en medio de cultivo o en un portador estable o una solución tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Los portadores adecuados se describen en el presente documento anteriormente. En otro ejemplo, las suspensiones que comprenden sobrenadante o factores
15 solubles derivados de células madre y/o progeñe son suspensiones oleosas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se utilizarán para inyección también pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes
20 adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

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

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

30 Otros portadores o excipientes ejemplares se describen, por ejemplo, en Hardman, et al. (2001) Goodman y Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Formas farmacéuticas de dosificación: medicamentos parenterales, Marcel Dekker, N.Y.; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Formas farmacéuticas de dosificación: Dispersa Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y.

35 Las composiciones terapéuticas normalmente deberían ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En
40 algunos casos, se incluyen agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los factores solubles se pueden administrar en una formulación de liberación temporal, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores
45 que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y poliláctico, copolímeros poliglicólicos (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los expertos en la técnica.

50 Los factores sobrenadantes o solubles pueden administrarse en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar una liberación lenta de los factores solubles.

Componentes adicionales de las composiciones

55 El sobrenadante derivado de las células madre o los factores solubles, las células madre o la progeñe de las mismas se pueden administrar con otros fármacos beneficiosos o moléculas biológicas (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran con otros agentes, se pueden administrar juntos en una única composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden administrarse conjuntamente incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpo de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF,

5 inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo inhibidores de MAP p38, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMUS y NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETIN, SUPROFEN); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina, tales como ciclosporina; tacrolimus, inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMUS, EVEROLIMUS), antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato mofetilo), corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-células T (por ejemplo, globulina antitimocito (ATG), globulina anti-linfocito (ALG), células monoclonales anti-T anticuerpo OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, uroquinasa, PPACK (dextrophenylalanine proline arginine chloromethylketone), compuestos antitrombina, antagonistas del receptor plaquetario, anticuerpos antitrombina, antiagregante antiagregante plaquetario ibodies, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandinas e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutatión, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales.

15 En un ejemplo, una composición como se describe en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende un factor adicional para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos.

20 Alternativamente, o además, las células, los factores secretados y/o una composición como se describe aquí de acuerdo con cualquier ejemplo se combinan con un tratamiento conocido de un trastorno asociado con niveles o actividad de osteoblastos bajos.

25 En un ejemplo, una composición farmacéutica como se describe en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende un compuesto utilizado para un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos. Alternativamente, un método de tratamiento/profilaxis como se describe aquí de acuerdo con cualquier realización comprende adicionalmente administrar un compuesto usado para tratar un trastorno asociado con niveles o actividad de osteoblastos bajos. Los ejemplos de compuestos se describen en el documento actual y se debe considerar que se aplican mutatis mutandis a estos ejemplos de la presente divulgación.

30 En otro ejemplo, una composición como se describe en el documento actual de acuerdo con cualquier ejemplo comprende adicionalmente un factor que induce o potencia la diferenciación de una célula progenitora en una célula vascular. Los ejemplos de factores incluyen, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por ejemplo, PDGF-BB) y FGF.

35 En otro ejemplo, una composición como se describe en este documento de acuerdo con cualquier ejemplo comprende adicionalmente una célula comprometida específica de tejido (TSCC). A este respecto, la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/AU2005/001445 demuestra que la administración de un TSCC y una célula STRO-1+ puede conducir a una proliferación mejorada del TSCC. En un ejemplo, el TSCC es una célula vascular. La administración de tal composición a un sujeto puede conducir a una producción incrementada de vasculatura, por ejemplo, conduciendo a que se suministren nutrientes incrementados al tejido afectado.

Dispositivos médicos

40 La presente divulgación también proporciona dispositivos médicos para su uso o cuando se usa en un método como se describe en este documento de acuerdo con cualquier ejemplo. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona una jeringa o catéter u otro dispositivo de administración adecuado que comprende células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles a partir de las mismas y/o una composición como se describe aquí de acuerdo con cualquier ejemplo. Opcionalmente, la jeringa o el catéter se empaqueta con instrucciones de uso en un método como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo.

45 En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un implante que comprende células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles a partir del mismo y/o una composición como se describe en el documento actual según cualquier ejemplo. Opcionalmente, el implante se empaqueta con instrucciones para su uso en un método como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier ejemplo. Se pueden formar implantes adecuados con un armazón, por ejemplo, como se describe anteriormente en el presente documento y células madre y/o células de progenie de los mismos y/o factores solubles del mismo.

50 Modos de administración

55 En, por ejemplo, el sobrenadante derivado de las células madre o los factores solubles, las células madre o la progenie de las mismas se administran al torrente sanguíneo de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante derivado de las células madre o los factores solubles, las células madre o la progenie de las mismas se administran por vía parenteral. Las rutas ejemplares de administración parenteral incluyen, pero no están limitadas a, intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal o intravenosa. En un ejemplo, los factores sobrenadantes o solubles derivados de células madre, células madre o progenie de los mismos se administran intraarterialmente, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo, por ejemplo, por vía intravenosa.

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

5 En un ejemplo, el sobrenadante derivado de las células madre o los factores solubles, las células madre o la progenie de las mismas se administran por vía intravenosa.

En un ejemplo, los factores sobrenadantes o solubles derivados de células madre, células madre o su progenie se inyectan en el sitio de administración, por ejemplo, utilizando una jeringa o a través de un catéter o una línea central.

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

15 En un ejemplo, los factores sobrenadantes o solubles derivados de células madre, las células madre o la progenie de las mismas se administran como una única dosis en bolo. Alternativamente, los factores sobrenadantes o solubles derivados de células madre, células madre o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis ejemplar es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y la actividad del compuesto/célula que se usa. La determinación de la dosis apropiada la realiza un médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan el tratamiento o se predice que afectarán el tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se incrementa en pequeños incrementos a partir de entonces hasta que se alcanza el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo.

20 Los presentes inventores han mostrado beneficios terapéuticos proporcionados por células madre y/o progenie de las mismas y/o se observan factores solubles derivados de las mismas durante al menos cuatro semanas en un sujeto. Por consiguiente, en algunos ejemplos, las células se administran semanalmente, quincenalmente, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

30 De acuerdo con ejemplos de la divulgación dirigida a tratar o retrasar la progresión de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos, las células madre y/o las células de su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran después del diagnóstico del trastorno, por ejemplo, utilizando métodos estándar conocidos en la técnica y/o descritos en este documento.

Para los ejemplos dirigidos a prevenir o retrasar la aparición de un trastorno asociado con bajos niveles o actividad de osteoblastos, las células madre y/o células progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas pueden administrarse antes del diagnóstico clínico del trastorno.

La presente divulgación incluye los siguientes ejemplos no limitantes.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunoselección de MPCs mediante selección de células STRO-3⁺

La médula ósea (BM) se obtiene de voluntarios adultos sanos y normales (20-35 años). Brevemente, se aspiran 40 ml de BM de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de heparina de litio.

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

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

Cien µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) se agregan a la suspensión celular y se incuban en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se resuspende en 0.5 ml de tampón MACS y posteriormente se carga en una columna mini MACS (MS Columns, Miltenyi Biotec) y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón MACS para recuperar las células que no se unen a la STRO-3 mAb (depositado el 19 de diciembre de 2005 con American Type Culture Collection (ATCC) con el número de acceso PTA-7282 - véase la Publicación Internacional No. WO 2006/108229). Después de la adición de otro 1 ml de tampón MACS, la columna se retira del imán y las células TNAP⁺ se aíslan por presión positiva. Se puede teñir una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y se puede determinar la pureza mediante citometría de flujo.

Ejemplo 2: Células seleccionadas por STRO-3 mAb son células STRO-1^{brillo}

10 Los experimentos se diseñaron para confirmar el potencial de uso del mAb STRO-3 como un único reactivo para aislar las células STRO-1^{brillo}.

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

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

Fracción de Médula Ósea	Frecuencia de células CFU-F/10 ⁵	Enriquecimiento (veces de aumento)
BMMNC no fraccionado	11.0 ± 2.2	1.0
TNAP+/STRO-1 ^{brillo}	4.511 ± 185	410
TNAP+/STRO-1 ^{dull}	0.0	0.0

Ejemplo 3: Caracterización de Monos Cynomolgus STRO-3⁺ MPCs

30 Se aislaron células progenitoras de médula de simio (de monos cynomolgus, cyno-MPC) a partir de ~15 ml de aspirado de médula ósea recogido de una Macaca fascicularis hembra. La suspensión de aspirado de médula se separó utilizando un gradiente de Ficoll y se lavó para eliminar las células no nucleadas (glóbulos rojos). Las células nucleadas se contaron luego se separaron mediante la unión de anticuerpo CA12 (anti-STRO-3) y Dynalbeads. Las células con anticuerpo y perlas unidas se seleccionaron positivamente por el campo magnético de un imán MPC-1. Las células seleccionadas positivas se contaron y se sembraron en matraces T en la etapa (p) 0 en medio de crecimiento. Se usaron células de preselección, positivas y negativas en un ensayo de formación de colonias (CFU-F).

35 Las células cyno-MPC se alimentaron con medio de crecimiento. Todos los cultivos (p.0 - p.5) se alimentaron cada 2 a 4 días hasta que alcanzaron la confluencia deseada. Las células se pasaron o recogieron utilizando lavado con HBSS y luego colagenasa seguido de tripsina/Versene. Las células p.1 se contaron y se sembraron en matraces en T. Cuando el p.1 cyno-MPC alcanzó la confluencia deseada, las células se recogieron y se crioconservaron utilizando un congelador de velocidad controlada.

40 El pasaje 1 cyno-MPC crioconservado se descongeló y se sembró en matraces T (p.2). Las células p.2 se pasaron a Cell Factory en p.3. Las células p.3 se recogieron y pasaron a p.4 en una fábrica de células. Se crioconservaron células adicionales p.3. Las células p.4 se pasaron a 6 x Cell Factories en p.5. Cuando el p.5 cyno-MPC alcanzó la confluencia deseada, las células se recogieron y se crioconservaron utilizando un congelador de velocidad controlada. Las células se crioconservaron en 50% de AlphaMEM, 42.5% de Profreeze y 7,5% de DMSO. Las muestras se analizaron para el ensayo CFU-F, FACS, esterilidad, micoplasma y endotoxina.

45 Los resultados del análisis de citometría de flujo representativa del inmunofenotipo de cyno-MPCs cultivados se muestran en la Figura 2. Como se muestra, estas células son STRO-1⁺, STRO-4⁺ y CD146⁺.

Cyno MPC en p5 se descongeló y se usó para la inyección intravenosa de monos cynomolgus diabéticos y no diabéticos como se describe en el Ejemplo 4.

Ejemplo 4: Efecto de la administración sistémica de MPCs en los niveles de osteocalcina en sangre en monos obesos

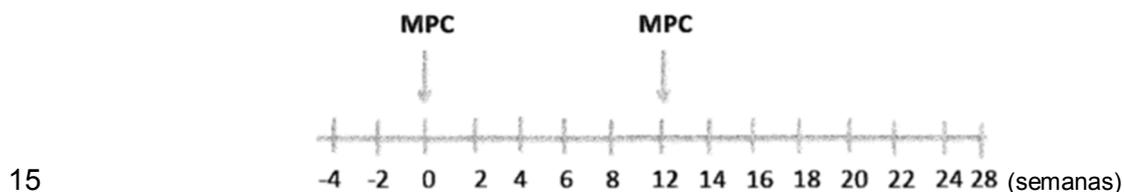
5 Se seleccionaron cinco (5) monos cynomolgus para el tratamiento según los siguientes criterios: (i) edad > 14 años, (ii) glucosa en sangre alta en ayunas (> 105 mg/dL), nivel de insulina en sangre en ayunas (<60 mU/L) (iii) alto IMC (> 46 varones > 24 mujeres), (iv) más de 8 kg de peso corporal masculino y > 3.5 kg de peso corporal para las mujeres, (v) alto nivel de triglicéridos en ayunas; y (vi) respuesta de insulina de fase 1 atenuada basada en IVGTT.

10 Los monos fueron asignados a los Grupos 1, 2 o 3. Los animales recibieron una sola infusión intravenosa (IV) lenta de MPC alogénico (aislada como se describe en el Ejemplo 2) en la vena cefálica o una vena periférica adecuada en una dosis como sigue (la dosis se ajustó al último peso corporal registrado):

Tabla 3. Resumen de grupos de tratamiento.

Grupo	Nivel de dosis	Dosis MPC/kg	Ruta
1 (#2875, #1880)	Bajo	0.3 x 10 ⁶	IV
2 (#1624, #3351)	Medio	1 x 10 ⁶	IV
3 (#7581)	alto	2 x 10 ⁶	IV

Cada mono recibió una primera infusión de MPC en la semana 0 y una segunda infusión en la semana 12 como se muestra a continuación:



El muestreo de osteocalcina ocurrió en semanas: -4, -2, 0, 2, 4, 8, 12, 20, 24

El muestreo de fosfatasa alcalina se produjo a las semanas: -2, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24.

Resultados

20 El perfil de ayuno para la osteocalcina en sangre (ng/ml) se controló durante un período de 6 meses después de la inyección IV de MPC alogénico para animales individuales. Los resultados se muestran en la Figura 3 donde las flechas indican el momento de administración de una dosis única de MPC.

Los 5 animales mostraron bajos niveles plasmáticos de osteocalcina antes del tratamiento con MPC con un valor inicial promedio de 1.4 (+/- 1.5, EEM) ng/ml.

25 Los datos muestran que la respuesta a la osteocalcina ocurre dentro de las 2 semanas posteriores a cada inyección, y el efecto tiene una duración de 12 semanas. Los datos también muestran que las inyecciones repetidas de MPCs son al menos tan efectivas como las inyecciones iniciales. Los valores pico de osteocalcina oscilaron entre 10 y 30 ng/ml. La máxima inducción de osteocalcina se observó en las dosis celulares más bajas probadas

30 La Figura 4 muestra que la respuesta a la osteocalcina se observa dentro de las 2 semanas posteriores a la primera inyección de MPC en monos cynomolgus mauricianos obesos. Después de una respuesta máxima a las 2-8 semanas, los valores vuelven a la línea base a las 12 semanas. Curiosamente, la segunda inyección de MPC demuestra una cinética similar a la de la primera inyección manteniendo el mismo nivel de respuesta a la osteocalcina.

35 La Figura 5 demuestra el cambio porcentual en la respuesta a la osteocalcina durante un período de 6 meses con respecto a la línea base en la semana 0. Las respuestas más profundas se observaron con la baja dosis de inyección de MPC (0.3 millones de MPC/kg).

La Figura 6 muestra los cambios porcentuales medios en los niveles de osteocalcina después del tratamiento con MPC en comparación con los niveles iniciales antes del tratamiento. El aumento medio porcentual en la osteocalcina desde el inicio del estudio alcanzó su punto máximo en la semana 2 con un valor de 1134% (+/- 202). La amplitud de las respuestas después de la segunda inyección parece ser similar a la de la primera inyección de MPC.

La Figura 7 muestra un aumento progresivo en la fosfatasa alcalina plasmática durante 6 meses de tratamiento con MPC (según se midió mediante el análisis del área bajo la curva).

La Figura 8 muestra un aumento progresivo en la fosfatasa alcalina total en plasma durante 6 meses de tratamiento con MPC (según se midió mediante el aumento porcentual en el análisis del área bajo la curva entre 18-24 semanas y 0-6 semanas).

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una población celular enriquecida para células multipotenciales STRO-1^{brillo} y/o su progenie para uso en un método para tratar un trastorno óseo metabólico asociado con niveles bajos de osteoblastos o actividad seleccionada del grupo que consiste en osteomalacia, osteoporosis, raquitismo hipofosfatémico ligado a X, osteodistrofia asociada a insuficiencia renal, osteítis fibrosa quística y pérdida ósea inducida por glucocorticoides, o fractura ósea, al aumentar la función osteoblástica en un sujeto, en el que el método consiste en administrar la composición sistémicamente.
- 10 2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno óseo metabólico es osteoporosis y la composición evita o reduce el riesgo de una fractura.
- 15 3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el sujeto acelera sufre de una fractura ósea y en el que la población de células madre y/o progenie de la misma acelera la curación de la fractura ósea y/o evita la unión retardada de la fractura ósea y/o evita la no unión de la fractura ósea.
4. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la administración de la población resulta en por lo menos un aumento de cinco veces en niveles de osteocalcina de plasma dentro de 2 semanas de administración.
- 20 5. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición resulta en por lo menos un aumento del 5 por ciento o en por lo menos un aumento del diez por ciento en niveles de fosfatasa alcalina en plasma dentro de las 6 semanas de administración en comparación con el nivel de fosfatasa alcalina en plasma antes de la administración.
6. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición se administra al sujeto una pluralidad de veces.
7. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición administrada comprende una población de células multipotenciales STRO-1^{brillo} y/o la progenie de estas en una dosis entre 0.1×10^6 a 5×10^6 células multipotenciales STRO-1^{brillo} y/o progenie de esta por kg.
- 25 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición administrada comprende una población de células madre y/o la progenie de estos en una dosis de entre 0.1×10^5 y 0.5×10^6 células STRO-1^{brillo} y/o progenie de las mismas por kg.
9. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición comprende una población alogénica de células multipotenciales STRO-1^{brillo} y/o células de progenie de las mismas.
- 30 10. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la administración sistémica es intravenosa o intraarterial.
11. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las células STRO-1^{brillo} no se modifican genéticamente.

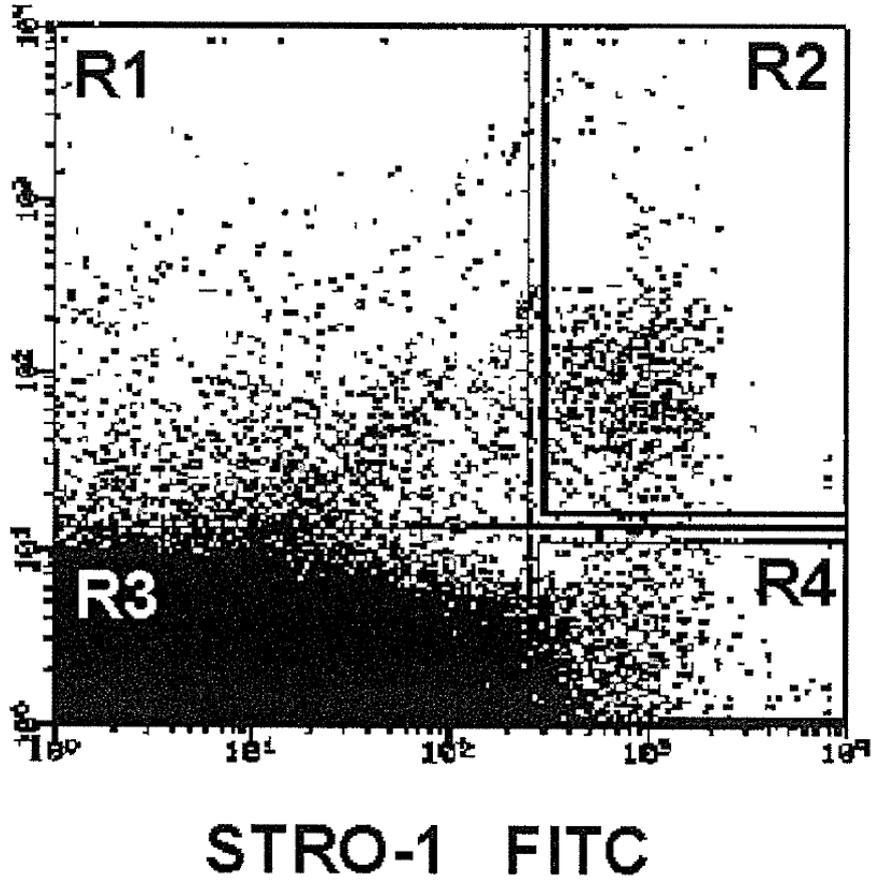


FIGURA 1

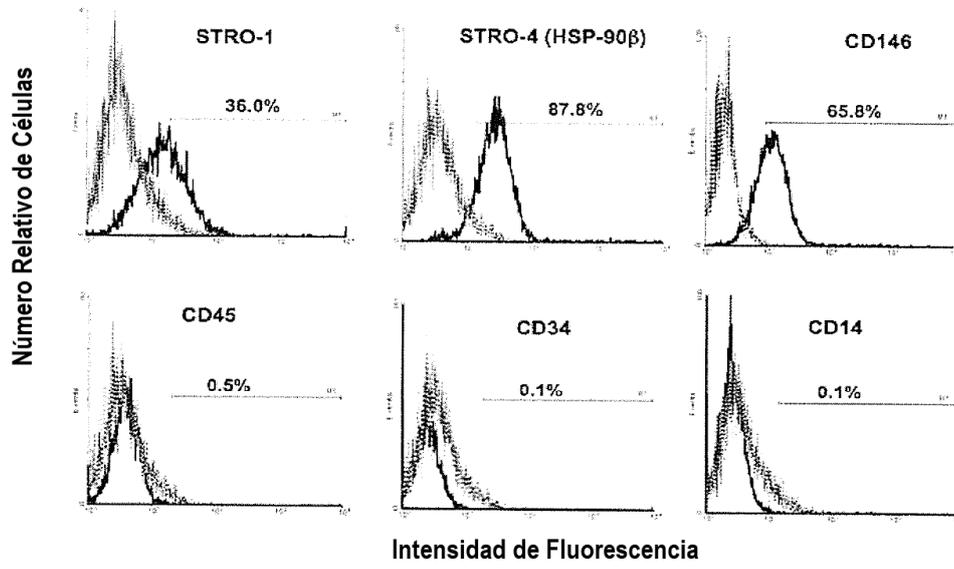


FIGURA 2

Aumento de niveles de Osteocalcina en Plasma después de cada una de las inyecciones de 10/10 MPC en dos semanas; aumento máximo visto en la dosis más baja de células

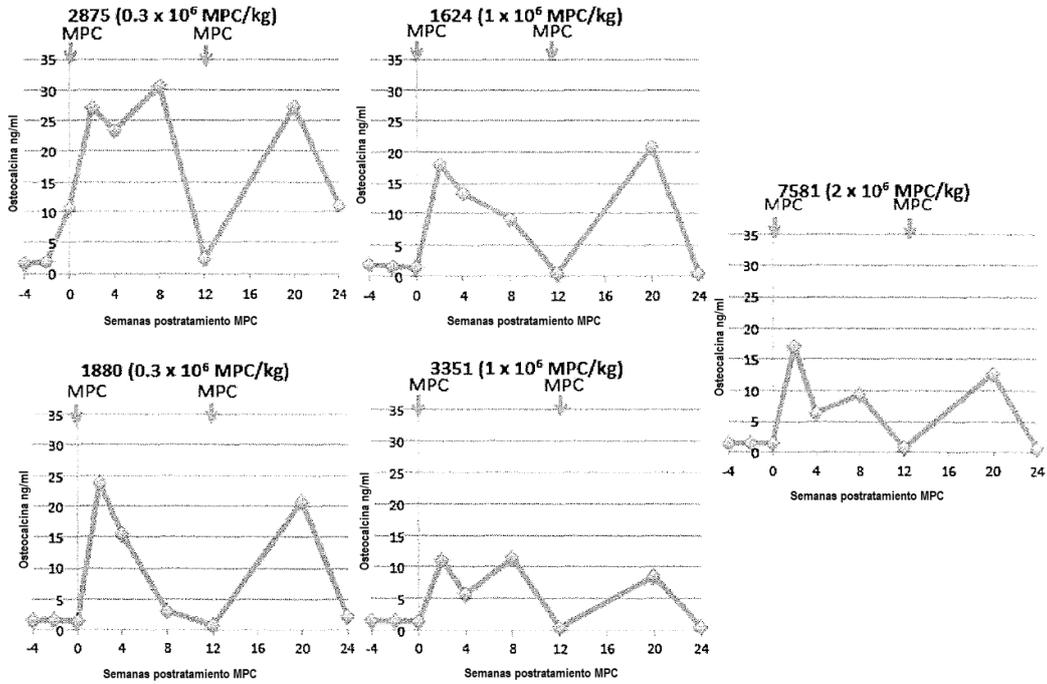


FIGURA 3

Perfiles medios de animal para niveles de osteocalcina en plasma después de dos dosis únicas de MPC administradas intravenosamente a Monos Cynomolgus de Mauricio obesos

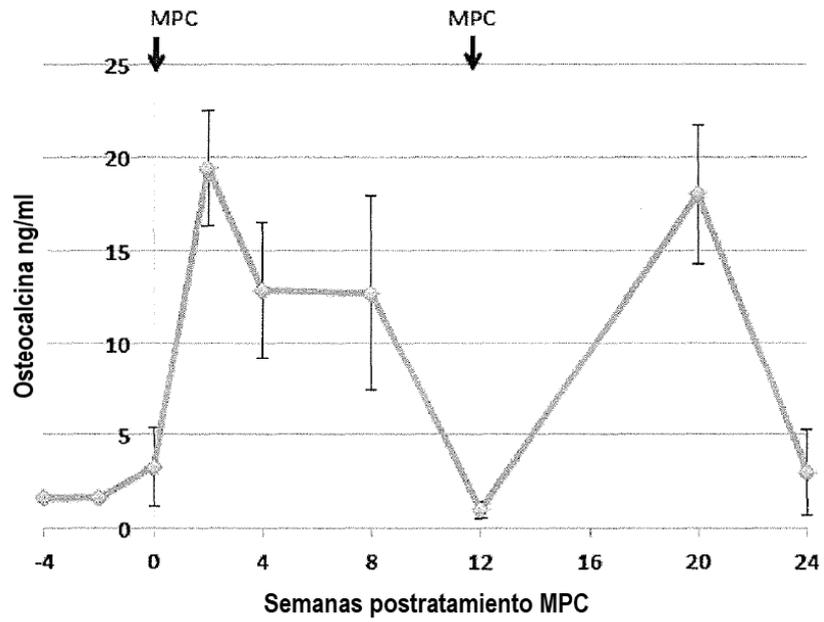


FIGURA 4

Cambios de porcentaje en niveles de osteocalcina después de tratamiento MPC comparado con niveles iniciales antes de tratamiento

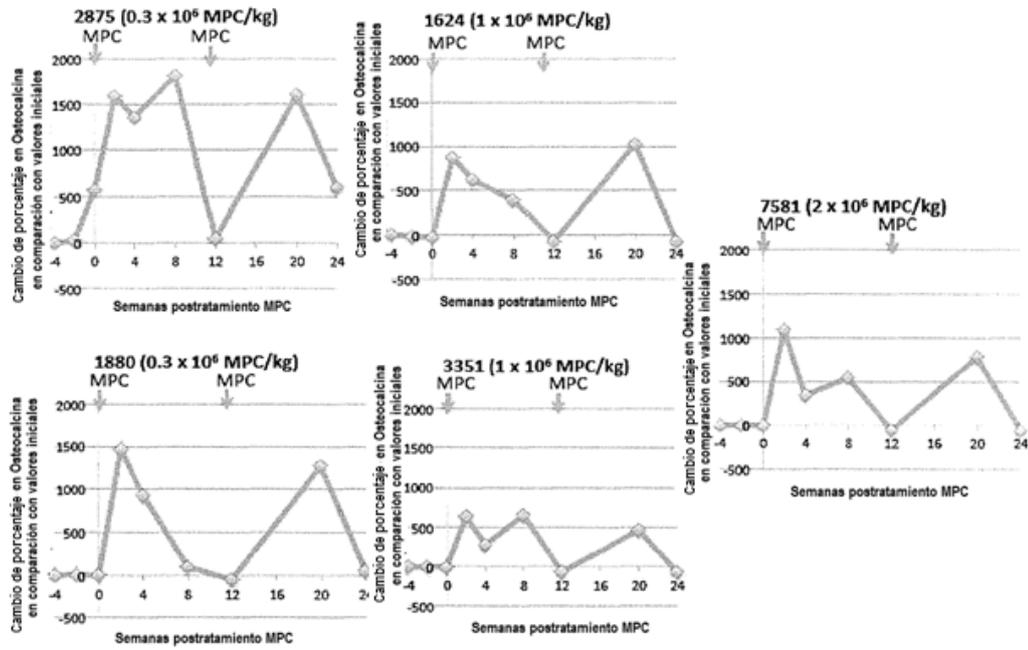


FIGURA 5

Cambios medios en porcentaje en niveles de osteocalcina después de tratamiento MPC en comparación con niveles iniciales antes de tratamiento

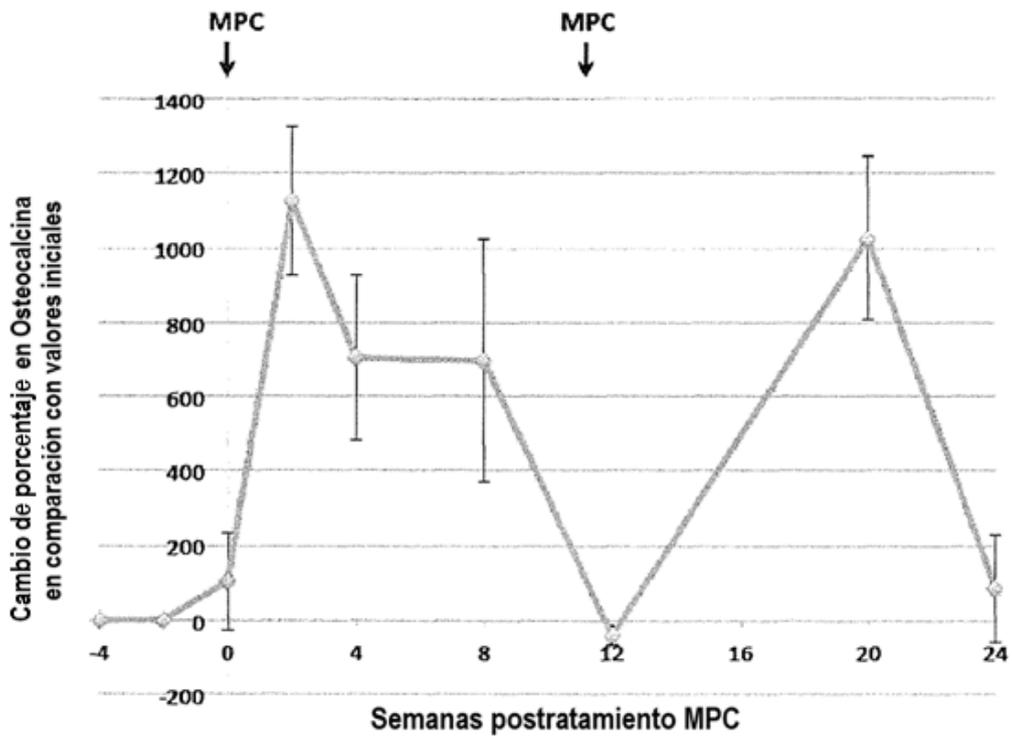


FIGURA 6

4/5 de animales muestran aumento progresivo en fosfatasa alcalina total en plasma durante 6 meses de tratamiento MPC (según se mide mediante análisis de área bajo la curva)

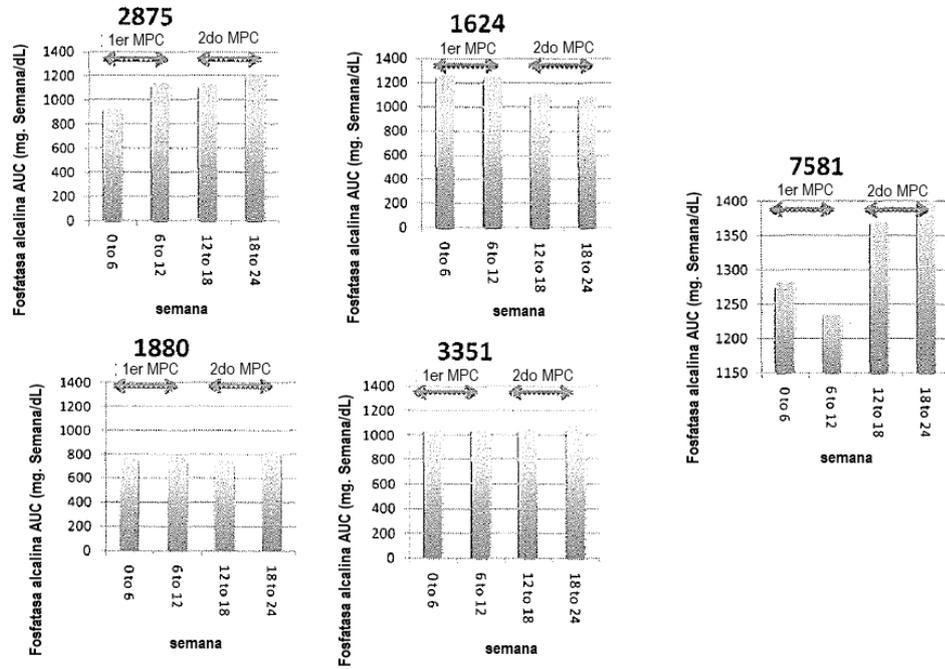


FIGURA 7

4/5 de animales muestran aumento progresivo en fosfatasa alcalina total en plasma durante 6 meses de tratamiento MPC (según se mide en % de aumento en análisis de área bajo la curva entre 18/24 semanas y 0-6 semanas)

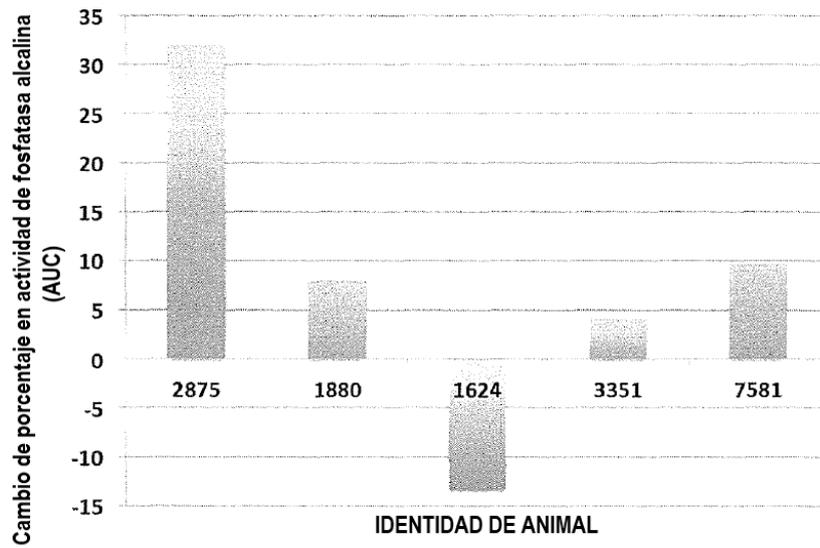


FIGURA 8

Cambios de porcentajes en niveles de fosfatasa alcalina total después de tratamiento MPC en comparación con niveles iniciales antes del tratamiento en animales individuales

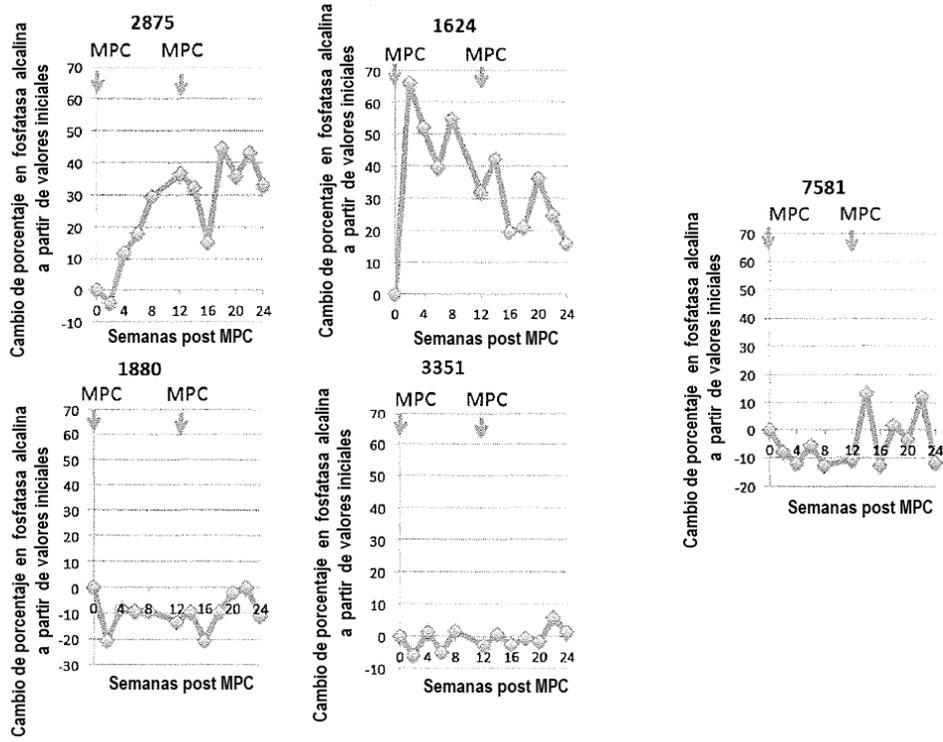


FIGURA 9