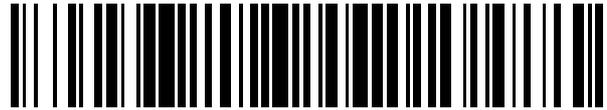


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 199**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2010 PCT/US2010/042690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11011477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2010 E 10802822 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2456860**

54 Título: **Uso de células madre para reducir la extravasación de leucocitos**

30 Prioridad:

**21.07.2009 US 227311 P**

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

**19.11.2018**

73 Titular/es:

**ABT HOLDING COMPANY (100.0%)  
3201 Carnegie Avenue  
Cleveland, OH 44115, US**

72 Inventor/es:

**VAN'T HOF, WOUTER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 690 199 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

Uso de células madre para reducir la extravasación de leucocitos

## 5 Campo de la invención

La divulgación se refiere, en general, a la reducción de la inflamación mediante células que secretan factores que reducen la extravasación de leucocitos. Específicamente, la divulgación se refiere a métodos que usan células que secretan factores que regulan negativamente la expresión de moléculas de adhesión celular en los leucocitos. La regulación negativa de la expresión de moléculas de adhesión celular reduce la adhesión de los leucocitos a células endoteliales, de tal forma que se reduce la extravasación. El resultado final es la reducción de la inflamación. Por lo tanto, en el presente documento se divulgan métodos para tratar afecciones patológicas asociadas con un componente inflamatorio no deseado, incluyendo la enfermedad cardiovascular. También se divulgan métodos de descubrimiento de fármacos para seleccionar agentes que modulan la capacidad de las células para regular negativamente la expresión de moléculas de adhesión celular en los leucocitos. También se divulgan bancos celulares que pueden usarse para proporcionar células para su administración a un sujeto, comprendiendo los bancos células que tienen una potencia deseada respecto de la regulación negativa de la expresión de moléculas de adhesión celular en los leucocitos y reducir la adhesión y extravasación de los leucocitos. También se divulgan composiciones que comprenden células con una potencia deseada especificada. También se divulgan métodos diagnósticos llevados a cabo antes de administrar las células, que incluyen ensayos para evaluar la potencia deseada de las células que se vayan a administrar. La divulgación se refiere además a ensayos diagnósticos después del tratamiento para evaluar el efecto de las células en un sujeto que se someta a tratamiento. También se divulgan células con una potencia deseada en composiciones farmacéuticas. Las células son células no germinales y no embriogénicas que tienen características pluripotenciales. Estas pueden incluir la expresión de marcadores pluripotenciales y un amplio potencial de diferenciación.

Antecedentes de la invención

Inflamación

El proceso de la inflamación aguda se inicia por los vasos sanguíneos locales del tejido lesionado, que se alteran para permitir la exudación de proteínas plasmáticas y leucocitos al tejido circundante. El flujo aumentado de fluido en el tejido provoca la inflamación característica asociada con la inflamación. Los vasos sanguíneos sufren cambios vasculares notables, incluyendo vasodilatación, permeabilidad aumentada y la ralentización del flujo sanguíneo, que se inducen por la acción de diversos mediadores inflamatorios. El aumento de la permeabilidad de los vasos da como resultado el movimiento del plasma a los tejidos, con la estasis resultante causada por el aumento en la concentración de las células en la sangre. La estasis permite que los leucocitos se marginen a lo largo del endotelio, un proceso crítico para su reclutamiento en los tejidos. El flujo normal de la sangre impide que esto suceda, ya que la fuerza de cizalladura a lo largo de la periferia de los vasos mueve las células de la sangre al centro del vaso. Los cambios permiten de este modo la extravasación de leucocitos a través del endotelio y la membrana basal que forman el vaso sanguíneo. Una vez se encuentran en el tejido, las células migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico hasta alcanzar el sitio de la lesión, donde pueden tratar de eliminar el estímulo y reparar el tejido.

El movimiento de los leucocitos de la sangre a los tejidos a través de los vasos sanguíneos se conoce como extravasación y puede dividirse en una serie de amplias etapas:

(1) Localización y reclutamiento de leucocitos al endotelio local al sitio de inflamación - que implica la marginación y adhesión a las células endoteliales: el reclutamiento de leucocitos está mediado por receptores. Los productos de la inflamación, tales como histamina, promueven la expresión inmediata de P-selectina en la superficie de las células endoteliales. Este receptor se une débilmente a ligandos de carbohidratos en la superficie de los leucocitos y hacen que "rueden" a lo largo de la superficie endotelial a medida que se forman y rompen enlaces. Las citocinas de las células lesionadas inducen la expresión de E-selectina en las células endoteliales, que funciona de un modo similar a la P-selectina. Las citocinas también inducen la expresión de ligandos de integrina en las células endoteliales, que además frenan a los leucocitos. Estos leucocitos débilmente unidos son libres para desprenderse si no se activan por medio de las citocinas producidas en el tejido lesionado. La activación aumenta la afinidad de los receptores de integrina unidos por los ligandos en la superficie de las células endoteliales, uniendo firmemente los leucocitos al endotelio.

(2) Migración a través del endotelio, conocida como transmigración, mediante el proceso de diapédesis: los gradientes de quimiocinas estimulan a los leucocitos adheridos para que se muevan entre las células endoteliales y atraviesen la membrana basal hasta los tejidos.

(3) Movimiento de leucocitos dentro del tejido mediante quimiotaxis: los leucocitos que alcanzan el intersticio del tejido se unen a las proteínas de la matriz extracelular mediante las integrinas expresadas y CD44 para impedir que se desplacen a otro sitio. Los quimioatrayentes hacen que los leucocitos se muevan a lo largo de un gradiente quimiotáctico hacia la fuente de inflamación.

La extravasación de leucocitos es el movimiento de los leucocitos fuera del sistema circulatorio, hacia el sitio de daño tisular o de infección. Este proceso forma parte de la respuesta inmunitaria innata, que implica el reclutamiento de leucocitos inespecíficos. También se emplean monocitos en este proceso en ausencia de infección o de daño tisular durante su desarrollo en macrófagos.

La extravasación de leucocitos se produce principalmente en las vénulas postcapilares, donde se minimizan las fuerzas de cizalladura hemodinámicas. Este proceso puede entenderse en varias etapas, indicadas a continuación como "quimioatracción", "adhesión rotativa", "adhesión estrecha" y "transmigración (endotelial)". Se ha demostrado que el reclutamiento de leucocitos se detiene en el momento en que se suprime cualquiera de estas etapas.

#### Quimioatracción

Tras el reconocimiento y la activación por patógenos, los macrófagos residentes en el tejido afectado liberan citocinas, tales como IL-1, TNF $\alpha$  y quimiocinas. IL-1 y TNF $\alpha$  hacen que las células endoteliales de los vasos sanguíneos próximos al sitio de infección expresen moléculas de adhesión celular, incluyendo selectinas. Los leucocitos circulantes se localizan en dirección al sitio de la lesión o infección debido a la presencia de quimiocinas.

#### Adhesión rotativa

Al igual que el velcro, los ligandos de carbohidratos en los leucocitos en circulación se unen a moléculas de selectina en la pared interna del vaso, con una afinidad marginal. Esto hace que los leucocitos se frenen y comiencen a rodar a lo largo de la superficie interna de la pared del vaso. Durante este movimiento rotativo, se forman y rompen enlaces transitorios entre las selectinas y sus ligandos.

#### Adhesión estrecha

Al mismo tiempo, las quimiocinas liberadas por los macrófagos activan a los leucocitos rodantes y hacen que las moléculas de integrina de la superficie conmuten de su estado por defecto de baja afinidad a un estado de alta afinidad. Esto se asigna mediante la activación yuxtacrina de las integrinas por quimiocinas y factores solubles liberados por las células endoteliales. En su estado activado, las integrinas se unen fuertemente a los receptores complementarios expresados en las células endoteliales, con alta afinidad. Esto provoca la inmovilización de los leucocitos, a pesar de las fuerzas de cizalladura del flujo sanguíneo continuo.

#### Transmigración

Los citoesqueletos de los leucocitos se reorganizan de tal modo que los leucocitos se dispersan sobre las células endoteliales. En esta forma, los leucocitos proyectan pseudópodos y pasan a través de huecos entre las células endoteliales. La transmigración de los leucocitos se produce a medida que las proteínas PECAM, encontradas en la superficie de los leucocitos y células endoteliales, interactúan y arrastran de manera eficaz a la célula a través del endotelio. Los leucocitos secretan proteasas que degradan la membrana basal, permitiéndoles escapar del vaso sanguíneo - un proceso conocido como diapédesis. Una vez se encuentran en el fluido intersticial, los leucocitos migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico hacia el sitio de lesión o infección.

#### Selectinas

Las selectinas se expresan poco después de la activación de las citocinas de las células endoteliales por los macrófagos en el tejido. Las células endoteliales activadas expresan inicialmente moléculas de P-selectina, pero transcurridas menos de dos horas tras la activación, se favorece la expresión de E-selectina. Las selectinas endoteliales se unen a los carbohidratos en las glicoproteínas transmembrana de los leucocitos, que incluyen sialil-Lewis<sup>x</sup>.

P-selectinas: La P-selectina se expresa en células endoteliales activadas y plaquetas. La síntesis de P-selectina puede inducirse mediante trombina, leucotrieno B<sub>4</sub>, el fragmento de complemento C5a, histamina, TNF $\alpha$  o LPS. Estas citocinas inducen la externalización de los cuerpos de Weibel-Palade en células endoteliales, presentando P-selectinas preformadas en la superficie de las células endoteliales. Las P-selectinas se unen a PSGL-1 como ligando.

El ligando P de selectina o el ligando de glicoproteína de P-selectina (PSGL1), es el contrarreceptor de alta afinidad para P-selectina en las células mieloides y los linfocitos T estimulados. Como tal, desempeña un papel crítico en el anclaje de estas células a plaquetas activadas o endotelios que expresan P-selectina.

Basándose en análisis por citometría de flujo, inmunotransferencia y de cámara de flujo, Fuhlbrigge et al., Nature 389: 978-981 (1997) propusieron que una modificación postraduccional diferencial de PSGL1, medida por fucosiltransferasa-7, regula la expresión del antígeno asociado con linfocitos cutáneos (CLA), que se une tanto a P-selectina como a E-selectina, en los linfocitos T. Los linfocitos T positivos a CLA son linfocitos T de memoria que se

alojan en la piel que se definen por su reactividad con el anticuerpo monoclonal HECA-452. Los linfocitos T positivos a CLA se infiltran en las lesiones cutáneas en una serie de trastornos inflamatorios de la piel, incluyendo la psoriasis.

E-selectinas: La molécula-1 de adhesión a leucocitos endoteliales se expresa por células endoteliales estimuladas con citocinas. Se cree que es responsable de la acumulación de leucocitos de la sangre en los sitios de inflamación, mediando la adhesión de las células al revestimiento vascular. Muestra características estructurales homólogas a las de LYAM1, incluyendo la presencia de dominios similares a lectina y EGF, seguidos de dominios de repetición consenso cortos (SCR) que contienen 6 restos de cisteína conservados. Estas proteínas forman parte de la familia de selectina de moléculas de adhesión celular (Watson et al., J. Exp. Med. 172: 263-272 (1990); Collins et al., J. Biol. Chem. 266: 2466-2473 (1991)). La síntesis de E-selectina se produce poco tiempo después de la síntesis de P-selectina, inducidas por citocinas, tales como IL-1 y TNF $\alpha$ . Las E-selectinas se unen a PSGL-1 y a ESL-1.

L-selectinas: Las L-selectinas se expresan de manera constitutiva en algunos leucocitos y se sabe que se unen a Gly-CAM-1, MadCAM-1 y CD34 como ligandos.

La supresión de la expresión de algunas selectinas da como resultado una respuesta inmunitaria más lenta. En caso de que no se produzca L-selectina, la respuesta inmunitaria puede ser diez veces más lenta, ya que las P-selectinas (que también pueden producirse por leucocitos) se unen entre sí. Las P-selectinas pueden unirse entre sí con alta afinidad, pero esto se produce con menor frecuencia ya que la densidad de sitios de receptor es menor que con las moléculas de E-selectina, más pequeñas. Esto aumenta la velocidad de rodadura inicial de los leucocitos, prolongando la fase de rodadura lenta.

#### Integrinas

Las integrinas implicadas en la adhesión celular se expresan principalmente en leucocitos. Las  $\beta$ 2 integrinas en los leucocitos rodantes se unen a las moléculas de adhesión celular endotelial, deteniendo el movimiento celular.

LFA-1 se encuentra en leucocitos circulantes y se une a ICAM-1 e ICAM-2 en las células endoteliales

Mac-1 se encuentra en leucocitos circulantes y se une a ICAM-1 en las células endoteliales

VLA-4 se encuentra en leucocitos y células endoteliales y facilita la quimiotaxis; también se une a VCAM-1

La activación celular mediada por quimiocinas extracelulares provoca la liberación de las  $\beta$ 2 integrinas preformadas de los almacenes celulares. Las moléculas de integrina migran a la superficie celular y se congregan en parches de alta avidéz. Los dominios intracelulares de integrina se asocian con el citoesqueleto de los leucocitos, mediando con factores citosólicos, tales como talina,  $\alpha$ -actinina y vinculina. Esta asociación provoca un cambio conformacional en la estructura terciaria de las integrinas, permitiendo el acceso del ligando al sitio de unión. También se necesitan cationes divalentes (por ejemplo, Mg<sup>2+</sup>) para la unión integrina-ligando.

Los ligandos de integrina, ICAM-1 y VCAM-1, se activan por citocinas inflamatorias, mientras que ICAM-2 se expresa de manera constitutiva por algunas células endoteliales pero se regula negativamente por citocinas inflamatorias. ICAM-1 e ICAM-2 comparten dos dominios N-terminales homólogos; ambos pueden unirse a LFA-1.

Durante la quimiotaxis, el movimiento celular se facilita por la unión de las  $\beta$ 1 integrinas a los componentes de la matriz extracelular: VLA-3, VLA-4 y VLA-5 a fibronectina y de VLA-2 y VLA-3 al colágeno y otros componentes de la matriz extracelular.

#### Citocinas

La extravasación está regulada por el ambiente de citocinas de fondo producido por la respuesta inflamatoria y es dependiente de antígenos celulares específicos. Las citocinas liberadas en la respuesta inmunitaria inicial inducen la vasodilatación y reducen la carga eléctrica a lo largo de la superficie de los vasos. El flujo sanguíneo se ralentiza, facilitando la unión intermolecular.

IL-1 activa a los linfocitos residentes y los endotelios vasculares

TNF $\alpha$  aumenta la permeabilidad vascular y activa los endotelios vasculares

CXCL8 (IL-8) forma un gradiente quimiotáctico que dirige a los leucocitos hacia el sitio de lesión tisular/infección (CCL2 tiene una función similar a la de CXCL8, induciendo la extravasación de monocitos y su desarrollo en macrófagos); también activa las integrinas de los leucocitos.

Hay disponibles artículos de revisión que resumen el proceso de extravasación en la inflamación. Véase Steeber, D. y Tedder, T., Immunologic Research, 22/2-3:299-317 (2000); Steeber et al., FASEB J, 9:866-873 (1995); y Wagner, D. y Frenette, P., Blood, 111:5271-5281 (2008).

CD15 (3-fucosil-N-acetil-lactosamina) es un antígeno del cúmulo de diferenciación - una molécula importante desde el punto de vista inmunológico. CD15 es una molécula de adhesión a carbohidratos (no una proteína) que puede expresarse sobre las glicoproteínas, glucolípidos y proteoglicanos.

5 CD15 media la fagocitosis y la quimiotaxis, encontrándose en los neutrófilos; se expresa en pacientes con enfermedad de Hodgkin, algunas leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B, leucemias linfoblásticas agudas y la mayoría de leucemias no linfocíticas agudas. También se denomina Lewis x y SSEA-1 (antígeno embrionario 1 específico de estadio) y representa un marcador para las células madre pluripotenciales murinas, en las que desempeña un papel importante en la adhesión y migración de las células en el embrión antes de su implantación.  
10 Se sintetiza por FUT4 (fucosiltransferasa 4) y FUT9.

### CD15s

15 El determinante de oligosacárido sialil Lewis x es un componente esencial de los contrarreceptores de leucocitos para las adhesiones de leucocitos mediadas por E-selectina y P-selectina. La molécula de oligosacárido se presenta sobre las superficies de granulocitos, monocitos y linfocitos citolíticos naturales. La formación de la adhesión de leucocitos a estas selectinas es una etapa temprana e importante en el proceso que en última instancia permite a los leucocitos abandonar el árbol vascular y ser reclutados en los tejidos linfoides y los sitios de inflamación. Natsuka et al., J. Biol. Chem. 269: 16789-16794 (1994) y Sasaki et al., J. Biol. Chem. 269: 16789-16794 (1994) aislaron ADNc  
20 que codifican una alfa-1,3-fucosiltransferasa de leucocitos humanos, FUT7, capaz de sintetizar el determinante de sialil Lewis x.

Natsuka et al. descubrieron que cuando FUT7 se expresaba en células de mamífero, el ADNc dirigía la síntesis de los restos de sialil Lewis x de la superficie celular, pero no de los determinantes Lewis x, Lewis A, sialil Lewis A o VIM-2. Sasaki et al. demostraron la capacidad *in vivo* de FUT7 para sintetizar el resto sialil Lewis x que se une a E-selectina y comunicaron la expresión restringida de FUT7 en leucocitos.  
25

Chen et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 103:16894-16899 (2006) observaron que los linfocitos T activados, en particular los linfocitos Th1, expresan sialil Lewis x, pero no así los linfocitos T quiescentes. Usando análisis con indicadores, demostraron que TBET promovía y GATA3 reprimía la transcripción de FUT7. TBET interfirió con la unión de GATA3 a su ADN diana, pero GATA3 también interfirió con la unión de TBET al promotor de FUT7. GATA3 regulaba la transcripción de FUT7 reclutando, de manera dependiente de la fosforilación, histona desacetilasa-3 y HDAC5 y compitiendo con CBP/p300 por la unión al extremo N-terminal de TBET. Se obtuvo una expresión máxima de FUT7 y sialil Lewis x en linfocitos T mediante la supresión mediada por ROG de GATA3. Chen et al. llegaron a la conclusión de que el complejo de factor de transcripción GATA3/TBET regula la expresión específica de linaje celular de receptores de migración dirigida de linfocitos y que los glucoconjugados se regulan mediante este complejo para obtener la expresión específica de linaje celular en los subconjuntos de linfocitos Th1 y Th2.  
30  
35

### Sumario de la invención

40 Los aspectos de la invención para los que se solicita protección se definen en las reivindicaciones.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona células (I) seleccionadas por que tienen una potencia deseada para uno o más de lo que se expone a continuación: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, siendo útiles estas células para su uso en el tratamiento de la inflamación en un sujeto, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en donde, antes de la administración de las células (I) al sujeto, las células (I) se evalúan y seleccionan por tener la potencia deseada.  
45  
50

Las células para el uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden ser alogénicas. El sujeto puede ser un ser humano.

55 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un método para construir un banco celular, comprendiendo el método expandir y almacenar, para su futura administración a un sujeto, células (I) que tienen una potencia deseada para uno o más de lo que se expone a continuación: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en donde las células (I) se evalúan por tener la potencia deseada.  
60

65 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención proporciona un método para el descubrimiento de fármacos, comprendiendo el método exponer, *in vitro*, células (I) que tienen una potencia deseada para uno o más de lo que se expone a continuación: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al

5 endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, a un agente para evaluar el efecto del agente en la capacidad de las células para llevar a cabo uno o más de (1)-(4) anteriores, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en donde las células (I) se evalúan por tener la potencia deseada.

10 Las células para el uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención o el método de acuerdo con los aspectos segundo o tercero de la invención pueden reducir la adhesión de E-selectina y/o P-selectina a CD15s. El leucocito puede ser un linfocito, opcionalmente, un linfocito CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. El leucocito puede ser un neutrófilo.

15 Las células (I) pueden expresar uno o más de oct4, telomerasa, rex 1 o rox 1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Las células (I) pueden diferenciarse en tipos celulares de las capas germinales ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Las células (I) pueden expresar telomerasa. Las células (I) pueden expresar oct4. Las células (I) pueden expresar oct4, telomerasa, rex-1 y rox-1. Las células (I) pueden proceder de médula ósea. Las células (I) pueden ser células humanas.

20 La divulgación se refiere, en términos generales, a un método para reducir la inflamación.

Más específicamente, la divulgación se refiere a un método para reducir la extravasación de leucocitos (neutrófilos, linfocitos y monocitos).

25 Más específicamente, la divulgación se refiere a un método para reducir la infiltración de leucocitos del sistema circulatorio a los tejidos circundantes.

La divulgación también se refiere a un método para reducir la adhesión de leucocitos a un vaso sanguíneo.

30 La divulgación también se refiere a un método para reducir la adhesión de leucocitos al endotelio vascular.

La divulgación también se refiere a un método para reducir la adhesión de leucocitos a células endoteliales en la pared de los vasos sanguíneos.

35 La divulgación también se refiere a un método para regular negativamente la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos.

40 La divulgación también se refiere a un método para reducir la capacidad de las células endoteliales en la pared de los vasos sanguíneos para unirse a un ligando de adhesión en un leucocito. Estos incluyen, pero sin limitación, PSGL-1 y ESL-1 y el resto asociado, CD15s. Estos se unen a P-selectina y E-selectina, respectivamente.

La divulgación se refiere específicamente a la regulación negativa de FUT-7, cuya expresión produce el determinante sialil Lewis x (CD15s), que es un componente esencial de los contrarreceptores de leucocitos para P- y E-selectina (es decir, un ligando de unión a P y E-selectina).

45 Los leucocitos incluyen, pero sin limitación, neutrófilos, monocitos y linfocitos. Los linfocitos incluyen linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos incluyen linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$ T y linfocitos citolíticos naturales.

50 La divulgación se refiere a la reducción de la expresión de moléculas de adhesión celular. La expresión puede ser tanto intracelular como extracelular, tal como en la superficie de células endoteliales. La expresión extracelular y en la superficie celular incluye reducir la expresión a nivel de proteína. La expresión intracelular incluye reducir tanto la transcripción como la traducción dentro de una célula.

55 De acuerdo con la divulgación, se logra la reducción de todos los efectos anteriores (es decir, inflamación, extravasación, adhesión de leucocitos a las células endoteliales, expresión de moléculas de adhesión, tales como Fut-7 y la producción de CD15s por Fut-7, etc.) exponiendo a los leucocitos y/o las células endoteliales a una célula no embrionaria no germinal que tiene algunas de las características pluripotenciales de una célula madre embrionaria, pero que procede de tejido no embrionario.

60 Para lograr los efectos descritos en la presente solicitud, las células pueden activarse, por ejemplo, mediante exposición a linfocitos T activados.

65 Ya que los efectos descritos en la presente solicitud pueden estar causados por factores secretados por las células, resulta útil para lograr estos efectos no solo las células, sino también el medio condicionado producido mediante el cultivo de las células. Dicho medio podría contener los factores secretados y, por lo tanto, podría usarse en lugar de las células o añadirse a las células. Por lo tanto, en los casos donde pueden usarse las células, cabe destacar que el medio también podría ser eficaz y podría usarse como sustituto o añadirse.

De acuerdo con la divulgación, todos los efectos anteriores pueden lograrse administrando las células o el medio condicionado por las células. Las células incluyen, pero sin limitación, células no embrionarias y no germinales que tienen características de las células madre embrionarias, pero que proceden de tejido no embrionario. Dichas células pueden ser pluripotentes y expresar marcadores de pluripotencia, tales como uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA-1 y SSEA-4. Otras características de la pluripotencia pueden incluir la capacidad para diferenciarse en tipos celulares de más de una capa germinal, tales como dos o tres de las capas germinales embrionarias ectodérmica, endodérmica y mesodérmica. Dichas células pueden o no haberse inmortalizado o transformado en cultivo. Dichas células pueden estar altamente expandidas sin transformarse y también mantener un cariotipo normal. Por ejemplo, en una realización, las células no embrionarias y no embriogénicas pueden haber sufrido hasta 10-40 duplicaciones celulares, tal como 50, 60 o más, en donde las células no se transforman y tienen un cariotipo normal. Las células pueden expresar actividad telomerasa para ser capaces de lograr más de 30 duplicaciones de la población (duplicaciones celulares), tal como 35, 40, 45, 50 o más. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, las células podrían expresar además uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1, sox-2, nanog, SSEA1 o SSEA4. Dichas células pueden diferenciarse en al menos un tipo celular de uno o dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico y pueden incluir diferenciación en los tres. Además, pueden ser o no tumorigénicas, tal como no productoras de teratomas. En caso de que las células se transformen en tumorigénicas y no sea deseable su uso para infusión, puede incapacitarse a dichas células, de tal forma que no puedan formar tumores *in vivo*, tal como mediante un tratamiento que prevenga la proliferación celular en tumores. Dichos tratamientos se conocen bien en la técnica. Dichas células pueden lograr de manera natural los efectos del presente documento (es decir, no se modifican genética o farmacéuticamente para que lo hagan). Sin embargo, las que tienen expresión natural, pueden modificarse genética o farmacéuticamente para aumentar su potencia.

En vista de las propiedades de estas células para lograr los efectos anteriores, las células pueden usarse en métodos de descubrimiento de fármacos para seleccionar un agente que module la capacidad de las células para lograr cualquiera de los efectos anteriores. Dichos agentes incluyen moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros de ARNpi ADN, péptidos, anticuerpos, proteínas distintas de anticuerpos, citocinas, quimiocinas, quimioatrayentes. Después, puede usarse el agente para aumentar la potencia de las células para lograr cualquiera de los efectos anteriores.

En vista de las propiedades de estas células para lograr los efectos anteriores, pueden establecerse bancos celulares que contienen células que se han seleccionado por tener una potencia deseada para lograr los efectos anteriores. Por consiguiente, la divulgación abarca evaluar dichas células respecto de su capacidad para lograr cualquiera de los efectos anteriores y seleccionar y elaborar bancos de células que tienen una potencia deseada. El banco proporciona una fuente para producir una composición farmacéutica para su administración a un sujeto. Las células pueden usarse directamente del banco o expandirse antes de su uso.

Por consiguiente, la divulgación también se refiere a procedimientos diagnósticos llevados a cabo antes de la administración de estas células a un sujeto, incluyendo dichos procedimientos previos al diagnóstico evaluar la potencia de las células para lograr uno o más de los efectos anteriores. Las células pueden tomarse de un banco celular y usarse directamente o expandirse antes de su administración. En cualquiera de los casos, se evaluaría en las células si tienen la potencia deseada. No obstante, las células pueden proceder del sujeto y expandirse antes de su administración. En este caso, asimismo, se evaluaría en las células si tienen la potencia deseada antes de su administración.

Aunque durante el proceso de selección es necesario que se ensaye la eficacia de las células, puede ser prudente y preferible ensayar nuevamente las células antes de su administración a un sujeto para su tratamiento a fin de asegurarse de que las células sigan siendo eficaces a los niveles deseados. Esto es particularmente preferible en los casos donde las células se han almacenado durante cualquier espacio de tiempo, tal como en un banco celular, donde lo más probable es que durante su almacenamiento, las células se encontrasen congeladas.

Con respecto a los métodos de tratamiento con las células, entre el aislamiento original de las células y su administración a un sujeto, puede haber múltiples ensayos (por ejemplo, secuenciales) de modulación. Esto sirve para garantizar que las células sigan pudiendo lograr el efecto, a los niveles deseados, tras las manipulaciones que se producen en este espacio de tiempo. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo tras cada expansión de las células. En caso de que las células se almacenen en un banco celular, pueden ensayarse tras extraerse del almacenamiento. En caso de que estén congeladas, pueden ensayarse tras su descongelación. En caso de que se expandan células procedentes de un banco celular, pueden ensayarse tras su expansión. Preferentemente, puede ensayarse una parte del producto celular final (que se administra físicamente al sujeto).

La divulgación también se refiere a un método para determinar la dosis de dichas células evaluando la potencia de las células para lograr uno o más de los efectos anteriores.

La divulgación incluye además ensayos diagnósticos después del tratamiento, después de la administración de las células. Los ensayos diagnósticos incluyen, pero sin limitación, un ensayo para CD15s en sangre, tejido, etc. del paciente y análisis de citocinas y quimiocinas inflamatorias en suero, sangre, tejido, etc. del paciente.

En este caso, se podrían monitorizar uno o más de los efectos anteriores para determinar y mantener una pauta posológica adecuada. Se podría monitorizar la función a varios niveles. Se pueden ensayar los leucocitos procedentes del paciente en ensayo *in vitro* de expresión génica o función. Por lo tanto, en una realización, la divulgación se refiere a la evaluación de la eficacia de la dosis en un paciente evaluando y/o monitorizando a los leucocitos *in vivo* (expresión de CD15s, adhesión a células endoteliales activadas y similares).

La divulgación también se refiere a composiciones que comprenden una población de las células que tienen una potencia deseada. Dichas poblaciones pueden encontrarse en forma de composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto y/o en bancos de células a partir de los que pueden usarse directamente para su administración a un sujeto o expandirse antes de la administración.

Los métodos y composiciones de la divulgación son útiles para tratar cualquier enfermedad que implique inflamación, donde un componente de dicha inflamación implica la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales vasculares por medio de moléculas de adhesión celular. Esto incluye afecciones cardiovasculares agudas y crónicas, por ejemplo, infarto agudo de miocardio; lesión en el sistema nervioso central, por ejemplo, ictus, traumatismo cerebral, lesión de la médula espinal; pulmonares, por ejemplo, asma, SRDA; autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus, esclerodermia; enfermedad vascular periférica; psoriasis; gastrointestinales, por ejemplo, enfermedad de Crohn y enfermedad de injerto contra hospedador.

Se entiende, sin embargo, que para el tratamiento de cualquiera de las afecciones anteriores, puede ser oportuno usar dichas células; es decir, una en la que se hayan evaluado uno o más de los efectos descritos en el presente documento y que se haya seleccionada por un nivel de eficacia deseado antes de su administración para el tratamiento de la afección.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1 - Múltiples etapas secuenciales que median el reclutamiento de leucocitos durante la inflamación. Los leucocitos son capturados y comienzan a rodar sobre las P- y E-selectinas y sus ligandos, ligando-1 de glucoproteína de P-selectina (PSGL-1) y ligando-1 de E-selectina (ESL-1). Algunos leucocitos, tales como los linfocitos o las células madre y progenitoras hematopoyéticas también ruedan sobre la  $\alpha 4$  integrina y su receptor endotelial, lamolécula-1 de adhesión a células vasculares (VCAM-1). La L-selectina es crítica para la rodadura de los linfocitos sobre HEV en los tejidos linfoides. A medida que progresa la inflamación, se reduce la velocidad de rodadura de los leucocitos, permitiendo la integración de las señales de activación de los ligandos de selectina y los receptores acoplados a proteína G (GPCR). Estas señales de activación provocan la polarización de los leucocitos que ruedan lentamente y la acumulación de L-selectina y PSGL-1 en un polo principal que permite un reclutamiento de leucocitos adicional mediante anclajes secundarios por medio de interacciones leucocito-leucocito. La activación de leucocitos potencia la afinidad y avidéz de la integrina, que ocasiona una firme adhesión a la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) expresada sobre las células endoteliales. Los leucocitos adherentes migran de manera continua en dirección lateral para explorar la microvasculatura y buscar posibles sitios de transmigración. Los leucocitos pueden transmigrar de un modo clásico a través de las vías de unión (paracelulares) mediante interacciones entre las moléculas de adhesión en las uniones (JAM), CD99 y la molécula-1 de adhesión a plaquetas/células endoteliales (PECAM-1), la molécula de adhesión selectiva para células endoteliales (ESAM) o como alternativa, a través de las células endoteliales (vía transcelular).

Figura 2: Tras la infusión intravenosa, MultiStem encontrará células inmunitarias circulantes, así como células endoteliales que revisten el sistema vascular.

Figura 3: Se evaluó la señalización cruzada entre MultiStem y células mononucleares de sangre periférica en placas Transwell permeables, para mantener a las dos poblaciones celulares físicamente separadas.

Figura 4: Usando análisis de micromatrices, se compararon los perfiles de expresión génica en PBMC activadas que o bien se cultivaron junto con MultiStem (condición n.º 5, figura 2) o se cultivaron en ausencia de MultiStem (condición n.º 2, figura 2). La gráfica representa los niveles de expresión de genes individuales y en rojo se resaltan los genes que tienen una expresión diferencial de más de factor 5 entre las dos poblaciones de ensayo. Uno de los genes que se encontraba más negativamente regulado (~15 veces) en los linfocitos T expuestos a MultiStem fue el gen para fucosiltransferasa 7 o alfa(1,3)fucosiltransferasa (Fut-7).

Figura 5: Se evaluó mediante qPCR la expresión de Fut-7 en PMC (véase la condición n.º 1, figura 2), en PBMC activadas (véase la condición n.º 2, figura 2) y en PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (véase la condición n.º 5, figura 2).

Figura 6: Se llevaron a cabo experimentos FACS para evaluar si la regulación del gen Fut-7 mediante MultiStem tiene influencia en la expresión en la superficie celular del producto de Fut-7, a saber, el antígeno Lewis X sialilado (CD15s). Las condiciones de ensayo incluyeron PBMC quiescentes (paneles izquierdos), PBMC quiescentes cultivadas junto con MultiStem (segunda columna de paneles, PBMC activadas (tercera columna) y PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (paneles derechos). La expresión de CD15s (eje x en cada

panel) se evaluó en linfocitos T CD4-positivos (paneles superiores) y en linfocitos T CD8-positivos (paneles inferiores). Los niveles de expresión de CD4 y CD8 se muestran en el eje y en cada panel. Se calculó el porcentaje de células CD4 o CD8 que expresaban CD15s midiendo la señal en el cuadrante superior derecho en cada panel.

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

Figura 7: Se llevaron a cabo experimentos para evaluar si MultiStem impide o reduce la expresión de CD15s mediante análisis FACS a las 24, 48 y 72 h después de iniciarse la activación de los linfocitos T. Las condiciones de ensayo incluyeron PBMC quiescentes (primeras tres barras), PBMC quiescentes cultivadas junto con MultiStem (segundo panel de tres barras), PBMC activadas (tercer panel de barras) y PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (panel derecho de barras). El nivel de células positivas a CD 15s es como se presenta en el eje y.

Figura 8: Se evaluó el impacto prolongado del efecto de MultiStem en la expresión de CD15s. En este experimento, se cultivaron en primer lugar PBMC activadas con MultiStem durante tres días (figura superior, panel izquierdo), a continuación, se recogieron las PBMC y se colocaron en Transwell nuevas que contenían anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28, pero en ausencia de MultiStem (figura superior, panel derecho). A continuación, se llevó a cabo el FACS a las 24, 48 y 72 h. Los resultados se muestran en la figura inferior y demuestran que los linfocitos T CD4 o CD8 positivos seguirán siendo negativos o expresarán poco CD15s durante hasta 72 h después de su retirada del cultivo junto con MultiStem, lo que indica un impacto de larga duración de MultiStem en los linfocitos T activados.

Figura 9: MultiStem inhibe la expresión de CD15s en linfocitos T activados y altera su capacidad para unirse a células endoteliales. Se cultivaron en primer lugar PBMC activadas con MultiStem durante tres días (figura superior, panel izquierdo). A continuación, se recogieron las PBMC y se marcaron con un colorante fluorescente y después se colocaron en los nuevos pocillos que contenían células endoteliales adherentes al fondo (figura superior, panel derecho). Las células endoteliales se encontraban quiescentes o activadas por tratamiento previo con TNF-alfa, para inducir la expresión de E-selectina, el receptor para CD15s. Las PBMC fluorescentes se incubaron con células endoteliales durante 15 min y las células no unidas se retiraron mediante varias etapas de lavado. Después, se analizó la unión de las PBMC midiendo la fluorescencia de las células adherentes. Los resultados de la unión se muestran en la parte inferior de la figura 9.

Figura 10: Esquema que resume los hallazgos que indican que MultiStem puede regular la capacidad de los linfocitos T para expresar ligandos de la superficie necesarios para la unión al endotelio y la extravasación a tejidos. MultiStem puede lograr esto mediante la secreción de factores solubles, sin necesidad de un contacto directo entre células. Específicamente, MultiStem inhibe la expresión de CD15s en linfocitos T activados, interfiriendo con su capacidad para unirse a células endoteliales activadas que expresan receptores para CD15s. Por lo tanto, *in vivo*, MultiStem puede proporcionar un beneficio en la reducción o prevención de afecciones inflamatorias excesivas, alterando la capacidad de las células inmunitarias o inflamatorias relevantes para moverse fuera del torrente sanguíneo y al interior del tejido inflamatorio subyacente.

Figura 11: MultiStem se asocia con la limitación de la expresión superficial de CD15s en células inflamatorias, inhibiendo de este modo la extravasación de leucocitos. La extravasación de leucocitos (1) contribuye a la inflamación y al daño tisular (por ejemplo, en regiones de isquemia); (2) se produce principalmente en las vénulas postcapilares (fuerzas de cizalladura hemodinámica minimizadas); (3) incluye varias etapas, incluyendo la quimioatracción, adhesión rotativa, adhesión estrecha, transmigración (endotelial); y (4) el proceso de detiene en el momento en que se suprime cualquiera de estas etapas.

#### Descripción detallada de la invención

Los métodos y técnicas de la presente solicitud se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992) y Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

#### Definiciones

"Uno/a" o "un" significa en el presente documento uno o más de uno; al menos uno. Cuando se usa la forma del plural en el presente documento, generalmente incluye el singular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "adhiere, adherencia, adhesión" y similares, hacen referencia, en un contexto *in vivo*, a una asociación de leucocitos y células endoteliales suficiente para dar como resultado la extravasación. La adherencia que se reduce o previene mediante los reactivos de la divulgación es aquella que se produce con dicha suficiencia. En aplicaciones *in vitro*, el grado (avidez) de la adherencia puede no

ser necesariamente a ese nivel. Por ejemplo, en el contexto del descubrimiento de fármacos, se puede desear detectar la adhesión (unión) con una avidez que es de un orden menor.

Un "banco celular" es la denominación en la industria para células que se han cultivado y almacenado para su uso futuro. Las células pueden almacenarse en alícuotas. Pueden usarse directamente tras su almacenamiento o pueden expandirse después del almacenamiento. Esto es conveniente, en tanto que se posibilita la administración de células "listas para usar". Las células pueden encontrarse previamente almacenadas en un excipiente farmacéuticamente aceptable, de tal forma que pueden administrarse directamente o pueden mezclarse con un excipiente adecuado cuando se extraen del almacenamiento. Las células pueden congelarse o de otro modo almacenarse en una forma que conserve su viabilidad. En una realización de la invención, se crean bancos de células en los que se han seleccionado células que tengan una potencia mejorada para lograr uno o más de los efectos, tales como reducir la expresión de Fut 7/CD15s. Tras sacarlas del almacenamiento y antes de su administración al sujeto, puede ser preferible ensayar nuevamente la potencia de dichas células. Esto puede efectuarse usando cualquiera de los ensayos, directos o indirectos, descritos en la presente solicitud o conocidos en la técnica. Después, pueden administrarse las células que tengan la potencia deseada al sujeto para su tratamiento.

"CD15s" se refiere al antígeno Lewis x sialilado.

"Administrar conjuntamente" significa administrar de manera conjunta con otro, conjuntamente, de manera coordinada, incluyendo administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

"Comprende" significa, sin otra limitación, que incluye el referente, necesariamente, sin clasificar o excluir cualquier otra cosa que pueda incluirse. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" abarca cualquier composición que contenga x e y, independientemente de que puedan estar presentes otros componentes en la composición. Análogamente, "un método que comprende la etapa de x" abarca cualquier método en el que se lleve a cabo x, ya sea x la única etapa en el método o solo una de las etapas, independientemente de cuántas etapas diferentes pueda haber e independientemente de la complejidad o simplicidad de x en comparación con estas. "Compuesto de" y frases similares que emplean la raíz de la palabra "comprender" se usan en el presente documento como sinónimos de "comprender" y tienen el mismo significado.

"Compuesto de" es un sinónimo de "comprende" (véase lo anterior).

"Medio de cultivo celular condicionado" es un término bien conocido en la técnica y se refiere al medio en el que se han cultivado las células. En el presente documento, significa que las células se cultivan durante un tiempo suficiente para secretar los factores que son eficaces para lograr cualquiera de los resultados descritos en la presente solicitud, incluyendo reducir la expresión de moléculas de adhesión celular; reducir la adhesión de leucocitos a las células endoteliales; reducir la extravasación, etc.

El medio de cultivo celular condicionado se refiere a un medio en el que se han cultivado las células a fin de que secreten factores en el medio. Las células pueden cultivarse durante un número suficiente de divisiones celulares a fin de producir cantidades eficaces de dichos factores, de tal forma que el medio reduce la expresión de moléculas de adhesión celular para reducir la adhesión de los leucocitos y, por lo tanto, reducir la extravasación, etc. Las células se retiran del medio mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, inmunorreducción (por ejemplo, mediante anticuerpos marcados y columnas magnéticas) y clasificación FACS.

"Disminuir" o "reducir" significa reducir el efecto o prevenirlo por completo, tal como reducir la extravasación o adhesión de leucocitos o la expresión de moléculas de adhesión en los leucocitos o cualquiera de los efectos descritos en el presente documento.

Las "células EC" se descubrieron mediante el análisis de un tipo de cáncer denominado teratocarcinoma. En 1964, los investigadores observaron que podía aislarse una célula individual en los teratocarcinomas y que permanecía sin diferenciar en cultivo. Este tipo de célula madre pasó a conocerse como célula embrionaria de carcinoma (célula EC).

"Cantidad eficaz" significa, generalmente, una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado, por ejemplo, eficaz para mejorar los efectos no deseados de la inflamación afectando a la adhesión que desemboca en la extravasación. Por ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para obtener un resultado clínico beneficioso o deseado. Las cantidades eficaces pueden proporcionarse de una vez en una sola administración o en cantidades divididas que proporcionan la cantidad eficaz en varias administraciones. La determinación precisa de lo que se consideraría una cantidad eficaz puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su tamaño, edad, lesión y/o enfermedad o daño que se esté tratando y el tiempo desde que se produjo la lesión o comenzó la enfermedad. Un experto en la materia será capaz de determinar la cantidad eficaz para un sujeto dado basándose en estas consideraciones, que son rutinarias en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, "dosis eficaz" tiene el mismo significado que "cantidad eficaz".

"Vía eficaz" significa, generalmente, una ruta que posibilita el suministro de un agente a un compartimento, sistema o ubicación deseado. Por ejemplo, una vía eficaz es una a través de la cual puede administrarse un agente para proporcionar, en el sitio de acción deseado, una cantidad del agente suficiente para obtener un resultado clínico beneficioso o deseado.

5 Se conocen en la técnica "células madre embrionarias (ESC)" y se han preparado a partir de diversas especies de mamífero diferentes. Las células madre embrionarias son células madre procedentes de la masa celular interna de un embrión en estadio temprano conocido como blastocisto. Son capaces de diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales principales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estas incluyen cada uno de los más de  
10 220 tipos celulares en el organismo adulto. Las células ES pueden convertirse en cualquier tejido dentro del organismo, excluyendo la placenta. Únicamente las células de la mórula son totipotentes, capaces de convertirse en todos los tejidos y en una placenta. Pueden producirse algunas células similares a las ESC mediante transferencia nuclear de un núcleo de célula somática en un óvulo fertilizado desnucleado.

15 La "extravasación" se refiere a la filtración de un fluido fuera de su recipiente. En el caso de la inflamación, se refiere al movimiento de los glóbulos blancos de la sangre desde los capilares hasta los tejidos que los rodean. Esto también se ha descrito en los antecedentes de la invención.

20 El uso del término "incluye" no pretende ser limitante.

"Aumentar" o "aumentando" significa inducir por completo en caso de que no hubiese un efecto preexistente o aumentar el grado del efecto, tal como la extravasación de leucocitos, la unión a células endoteliales, la expresión de moléculas de adhesión a leucocitos, etc.

25 Las "células madre pluripotentes inducidas (IPSC o células IPS)" son células somáticas que se han reprogramado, por ejemplo, introduciendo genes exógenos que confieren a la célula somática un fenotipo menos diferenciado. Después, estas células se pueden inducir para que se diferencien en una descendencia menos diferenciada. Se han obtenido células IPS usando modificaciones de una estrategia descubierta originariamente en el año 2006 (Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)). Por ejemplo, en un caso, para crear células IPS, los científicos  
30 partieron de células de la piel que después se modificaron mediante una técnica de laboratorio convencional usando retrovirus para insertar genes en el ADN celular. En un caso, los genes insertados fueron Oct4, Sox2, Lif4 y c-myc, que se sabe que actúan juntos como reguladores naturales para mantener las células en un estado similar al de una célula madre embrionaria. Estas células se han descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Wernig et al., PNAS, 105:5856-5861 (2008); Jaenisch et al., Cell, 132:567-582 (2008); Hanna et al., Cell, 133:250-264 (2008); y Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2:151-159 (2008). Estas referencias enseñan las IPSC y los métodos para producirlas. También es posible crear dichas células mediante condiciones de cultivo específicas (exposición a agentes  
35 específicos).

40 El término "aislado" se refiere a una célula o células que no están asociadas con una o más células o uno o más componentes celulares que se asocian con la célula o las células *in vivo*. Una "población enriquecida" significa un aumento relativo en el número de una célula deseada en relación con uno o más tipos celulares diferentes *in vivo* o en cultivo primario.

45 Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" no indica la presencia únicamente de células madre. En su lugar, el término "aislado" indica que las células se extraen de su ambiente tisular natural y se encuentran presentes a una mayor concentración en comparación con el ambiente tisular normal. Por consiguiente, una población celular "aislada" puede incluir además tipos celulares además de las células madre y puede incluir componentes tisulares adicionales. Esto también puede expresarse en términos de duplicaciones celulares, por ejemplo. Una célula puede haber sufrido 10, 20, 30, 40 o más duplicaciones *in vitro* o *ex vivo*, por lo que se  
50 encuentra enriquecida en comparación con sus números originales *in vivo* o en su ambiente tisular original (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica, el tejido adiposo, etc.).

"MAPC" es, por sus siglas en inglés, el acrónimo para "célula progenitora adulta multipotente". En la presente solicitud, el término se emplea para denominar un tipo celular, concretamente, una célula madre no embrionaria con características de una célula madre embrionaria. Puede dar lugar a linajes celulares de más de una capa germinal, tal como dos o las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) tras su diferenciación. Las MAPC pueden expresar uno o más de telomerasa, Oct 3/4 (es decir, Oct 3A), rex-1, rox-1 y sox-2 y SSEA-4. El término "adulto" en las MAPC no es restrictivo. Se refiere a una célula somática no embrionaria. Las MAPC son cariotípicamente normales y no forman teratomas *in vivo*. Este acrónimo se empleó por primera vez en el documento PCT/US2000/21387 para describir una célula pluripotente aislada de médula ósea. Sin embargo, después de aislar estas células de médula ósea, se han descubierto otras células con marcadores de pluripotencia y/o con potencial de diferenciación y pueden ser funcionalmente equivalentes, respecto de los efectos descritos en el presente documento, a las células denominadas originariamente "MAPC".

65 El término "MultiStem®" es el nombre comercial de una célula no embrionaria y no germinal que es altamente expansible, cariotípicamente normal y no forma teratomas *in vivo*. Puede diferenciarse en linajes celulares de más

de una capa germinal. Las células pueden expresar uno o más de telomerasa, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2 y SSEA4. MultiStem® se prepara siguiendo los métodos de cultivo celular divulgados en dicha solicitud de patente, en particular, menor concentración de oxígeno y mayor concentración de suero.

5 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" es cualquier medio farmacéuticamente aceptable para las células usadas en la presente divulgación. Dicho medio puede conservar la isotonicidad, el metabolismo celular, el pH y similares. Es compatible con la administración *in vivo* a un sujeto y puede usarse, por lo tanto, para el suministro de células y para tratamiento.

10 El término "potencia" se refiere a la capacidad de las células (o del medio condicionado de las células) para lograr los diversos efectos descritos en la presente solicitud. Por consiguiente, la potencia se refiere al efecto a varios niveles, incluyendo, pero sin limitación (1) reducir la inflamación; (2) reducir la infiltración de leucocitos (neutrófilos, linfocitos o monocitos); (3) reducir la adhesión, por ejemplo, de las selectinas al antígeno Lewis x sialilado sobre los leucocitos, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; y (4) reducir la expresión de Fut-7 y su producción de CD 15s.

Las "células germinales embrionarias primordiales" (células PG o EG) pueden cultivarse y estimularse para producir diversos tipos celulares menos diferenciados.

20 Las "células progenitoras" son células producidas durante la diferenciación de una célula madre que tiene algunas, pero no todas, de las características de su descendencia diferenciada de manera terminal. Las células progenitoras definidas, tales como "células progenitoras cardíacas", están vinculadas a un linaje, pero no a un tipo celular específico o diferenciado terminalmente. El término "progenitor", en el sentido usado en el acrónimo "MAPC", no limita a estas células a un linaje particular. Una célula progenitora puede formar una célula descendiente que está más altamente diferenciada que la célula progenitora.

El término "reducir", tal como se usa en el presente documento, significa prevenir, así como reducir. En el contexto de tratamiento, "reducir" significa tanto prevenir como mejorar uno o más síntomas clínicos. Un síntoma clínico es uno (o más) que tiene o que tendrá, si se deja sin tratar, un impacto negativo en la calidad de vida (salud) del sujeto.

30 Esto también se aplica a los efectos biológicos, tales como reducir la extravasación, regular negativamente las moléculas de adhesión en las células endoteliales, reducir la adhesión de leucocitos a células endoteliales, reducir la infiltración de leucocitos en el tejido circundante, reducir la unión de leucocitos, etc., cuyo resultado final sea mejorar los efectos perjudiciales de la inflamación.

35 "Seleccionar" una célula con un nivel de potencia deseado (por ejemplo, para reducir la expresión de una o más moléculas de adhesión) puede significar identificar (tal como mediante un ensayo), aislar y expandir una célula. Esto puede crear una población que tiene una potencia mayor que la población de células progenitoras a partir de la que se aisló la célula.

40 Seleccionar una célula incluye tanto un ensayo para determinar si se produce el efecto deseado como también, obtener esa célula. La célula puede tener de manera natural el efecto, en tanto que la célula no se incubó o se expuso a un agente que induce el efecto. Puede desconocerse si la célula tiene el efecto antes de llevar a cabo el ensayo. Ya que los efectos pueden depender de la expresión génica y/o la secreción, también se pueden seleccionar basándose en uno o más de los genes que provocan los efectos.

45 La selección puede ser a partir de células en un tejido. Por ejemplo, en este caso, podrían aislarse células de un tejido deseado, expandirse en cultivo, seleccionarse respecto de un efecto deseado y expandirse adicionalmente las células seleccionadas.

50 La selección también podría ser de células *ex vivo*, tal como células en cultivo. En este caso, podrían ensayarse una o más de las células en cultivo respecto de su efecto y las células obtenidas que tienen el efecto podrían expandirse adicionalmente.

55 También podrían seleccionarse células que tengan un efecto potenciado. En este caso, la población celular de la que se obtiene la célula potenciada tiene previamente el efecto. Una eficacia potenciada significa una mayor cantidad media del efecto por célula que en la población progenitora.

60 La población progenitora de la que se selecciona la célula potenciada puede ser sustancialmente homogénea (el mismo tipo celular). Una forma de obtener dicha célula potenciada a partir de esta población es crear células individuales o grupos de células y ensayar dichas células o grupos de células respecto del efecto para obtener clones que, de manera natural, tienen el efecto (en contraposición a tratar a las células con un modulador del efecto) y después, expandir aquellas células que están naturalmente potenciadas.

65 Sin embargo, puede tratarse a las células con uno o más agentes que potenciarán el efecto de las vías celulares endógenas. Por lo tanto, puede tratarse a poblaciones sustancialmente homogéneas para potenciar el efecto.

En caso de que la población no sea sustancialmente homogénea, es preferible que la población de células progenitoras que se vaya a tratar contenga al menos 100 del tipo celular eficaz en el que se persigue el efecto potenciado, más preferentemente, al menos 1.000 de estas células y aún más preferentemente, al menos 10.000 de estas células. Después del tratamiento, puede recuperarse esta subpoblación a partir de la población heterogénea mediante técnicas de selección celular conocidas y además, expandirse en caso deseado.

Por lo tanto, los niveles deseados del efecto pueden ser aquellos que sean mayores que los niveles en una población precedente dada. Por ejemplo, las células que se ponen en cultivo primario procedentes de un tejido y que se expanden y aíslan mediante condiciones de cultivo que no están diseñadas específicamente para que tengan el efecto pueden proporcionar una población progenitora. Dicha población progenitora puede tratarse para potenciar el efecto medio por célula o seleccionar una célula o células dentro de la población que expresa un mayor efecto. Después, pueden expandirse dichas células para proporcionar una población con un mayor efecto (deseado).

La "autorrenovación" se refiere a la capacidad para producir células madre hijas duplicadas que tienen potencial de diferenciación que es idéntico al de aquellas de las que surgieron. En este contexto, se usa un término similar "proliferación".

"Célula madre" significa una célula que puede sufrir autorrenovación (es decir, descendencia con el mismo potencial de diferenciación) y al mismo tiempo, producir células descendientes que tienen un potencial de diferenciación más restringido. Dentro del contexto de la divulgación, una célula madre también podría abarcar una célula más diferenciada que se ha desdiferenciado, por ejemplo, mediante transferencia nuclear, mediante fusión con una célula madre más primitiva, mediante introducción de factores de transcripción específicos o mediante cultivo en condiciones específicas. Véase, por ejemplo, Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997); Ying et al., *Nature*, 416:545-548 (2002); Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006); Takahashi et al., *Cell*, 126:663-676 (2006); Okita et al., *Nature*, 448:313-317 (2007); y Takahashi et al., *Cell*, 131:861-872 (2007).

La diferenciación también puede estar causada por la administración de ciertos compuestos o por exposición a un ambiente físico *in vitro* o *in vivo* que podría causar la desdiferenciación. Las células madre también pueden proceder de un tejido anormal, tal como un teratocarcinoma y algunas otras fuentes, tales como cuerpos embrioides (aunque estos pueden considerarse células madre embrionarias, en tanto que proceden de tejido embrionario, aunque no directamente de la masa celular interna). También pueden producirse células madre introduciendo genes asociados con la función de células madre en una célula no madre, tal como una célula madre pluripotente inducida.

"Sujeto" significa un vertebrado, tal como un mamífero, tal como se un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas y cerdos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente que se determina que produce cualquier respuesta terapéutica en un mamífero. Por ejemplo, los agentes terapéuticos antiinflamatorios eficaces pueden prolongar la supervivencia del paciente y/o inhibir los síntomas clínicos evidentes. Los tratamientos que son terapéuticamente eficaces dentro del significado del término empleado en el presente documento incluyen tratamientos que mejoran la calidad de vida de un sujeto, incluso si no mejoran el resultado de la enfermedad en sí. Dichas cantidades terapéuticamente eficaces se determinan fácilmente por un experto habitual en la materia. Por lo tanto, "tratar" significa administrar dicha cantidad. Por lo tanto, el tratamiento puede prevenir o mejorar cualquier síntoma patológico de la inflamación.

"Tratar", "tratando" o "tratamiento" se usan ampliamente en relación con la invención y cada uno de estos términos abarca, entre otros, prevenir, mejorar, inhibir o curar una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso perjudicial, incluyendo aquellos que interfieren y/o son el resultado de una terapia.

#### Células madre

La presente divulgación puede ponerse en práctica, preferentemente, usando células madre de especies de vertebrado, tales como seres humanos, primates no humanos, animales domésticos, animales de granja y otros mamíferos no humanos. Se describen en el presente documento.

#### Células madre embrionarias

La célula madre mejor estudiada es la célula madre embrionaria (ESC) ya que tiene un potencial ilimitado de autorrenovación y de diferenciación multipotente. Estas células proceden de la masa celular interna del blastocisto o pueden proceder de las células germinales primordiales de un embrión después de su implante (células germinales embrionarias o células EG). Las células ES y EG se han obtenido, primero en ratones y posteriormente, de diversos animales diferentes y más recientemente, también de primates no humanos y de seres humanos. Cuando se introducen en blastocistos de ratón o de blastocistos de otros animales, las ESC pueden contribuir a todos los tejidos del animal. Las células ES y EG pueden identificarse mediante tinción positiva con anticuerpos contra SSEA1 (ratón) y SSEA4 (ser humano). Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.453.357; 5.656.479; 5.670.372; 5.843.780; 5.874.301; 5.914.268; 6.110.739; 6.190.910; 6.200.806; 6.432.711; 6.436.701; 6.500.668;

6.703.279; 6.875.607; 7.029.913; 7.112.437; 7.145.057; 7.153.684; y 7.294.508, citadas solo por referencia, enseñando cada una de estas células madre embrionarias y métodos para producirlas y expandirlas. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica las ESC y los métodos para aislarlas y expandirlas.

5 Se ha identificado una serie de factores de transcripción y citocinas exógenas que tienen influencia en el estado de potencia de las células madre embrionarias *in vivo*. El primer factor de transcripción que se ha descrito que está implicado en la pluripotencia de las células madre es Oct4. Oct4 pertenece a la familia POU (Pit-Oct-Unc) de factores de transcripción y es una proteína de unión a ADN que es capaz de activar la transcripción de genes, que contiene una secuencia octamérica denominada "el motivo de octámero" dentro de la región promotora o  
10 potenciadora. Oct4 se expresa en el momento de la etapa de escisión del cigoto fertilizado hasta que se forma el cilindro embrionario. La función de Oct3/4 es reprimir a los genes inductores de la diferenciación (es decir, FoxaD3, hCG) y activar los genes que promueven la pluripotencia (FGF4, Uff1, Rex1). Sox2, un miembro de la caja del grupo de alta movilidad (HMG) de factores de transcripción, coopera con Oct4 para activar la transcripción de genes expresados en la masa celular interna. Es esencial que la expresión de Oct3/4 en células madre embrionarias dentro de unos niveles concretos. La sobreexpresión o la regulación negativa de >50% del nivel de expresión de Oct4 alterará el destino de las células madre embrionarias, con la formación del endodermo/mesodermo primitivo o trofotodermo, respectivamente. *In vivo*, los embriones deficientes para Oct4 se desarrollan hasta el estadio de blastocisto, pero las células de la masa celular interna no son pluripotentes. En cambio, se diferencian a lo largo del linaje trofoblástico extraembrionario. Sal14, un factor de transcripción Spalt de mamífero, es un regulador aguas  
20 arriba de Oct4 y por lo tanto, es importante para mantener los niveles adecuados de Oct4 durante las fases tempranas de la embriogénesis. Cuando los niveles de Sal14 caen por debajo de un cierto umbral, las células del trofotodermo se expandirán de manera ectópica hacia la masa celular interna. Otro factor de transcripción necesario para la pluripotencia es Nanog, nombrado en honor de la tribu celta "Tir Nan Og": la tierra de la juventud. *In vivo*, Nanog se expresa desde el estadio de la mórula compactada, posteriormente, se circunscribe a la masa celular interna y se regula negativamente al llegar la etapa de implantación. La regulación negativa de Nanog puede ser importante para evitar una expansión descontrolada de las células pluripotentes y para permitir la diferenciación multilinjaje durante la gastrulación. Los embriones nulos para Nanog, aislados en el día 5,5, consisten en un blastocisto desorganizado, que contiene principalmente endodermo extraembrionario y no tiene epiblasto discernible.

### 30 Células madre no embrionarias

Se han identificado células madre en la mayoría de tejidos. Posiblemente, la mejor caracterizada es la célula madre hematopoyética (HSC). Las HSC son células procedentes del mesodermo que pueden purificarse usando marcadores de la superficie celular y características funcionales. Se han aislado de médula ósea, sangre periférica,  
35 sangre del cordón, hígado fetal y saco vitelino. Inician la hematopoyesis y generan múltiples linajes hematopoyéticos. Cuando se trasplantan en animales letalmente irradiados, pueden repoblar la población de células eritroides de neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y hematopoyéticas linfoides. También pueden inducirse para que sufran cierto grado de división celular de autorrenovación. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.635.387; 5.460.964; 5.677.136; 5.750.397; 5.681.599; y 5.716.827. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.192.553 comunica métodos para aislar células madre o progenitoras neonatales o fetales hematopoyéticas humanas. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.716.827 comunica células hematopoyéticas humanas que son progenitores Thy-1<sup>+</sup> y medios de crecimiento adecuados para regenerarlas *in vitro*. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.635.387 comunica un método y dispositivo para cultivar células hematopoyéticas humanas y sus precursores. La Patente de los Estados Unidos n.º 6.015.554 describe un método para reconstituir células linfoides y dendríticas humanas. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica las HSC y los métodos para aislarlas y expandirlas.

Otra célula madre que se conoce bien en la técnica es la célula madre neural (NSC). Estas células pueden proliferar *in vivo* y regeneran de manera continua al menos algunas células neuronales. Cuando se cultivan *ex vivo*, puede inducirse la proliferación de las células madre neurales, así como su diferenciación en diferentes tipos de neuronas y células gliales. Cuando se trasplantan al cerebro, las células madre neurales pueden prender y generar células neurales y gliales. Véase, por ejemplo, Gage F.H., Science, 287:1433-1438 (2000), Svendsen S.N. et al, Brain Pathology, 9:499-513 (1999) y Okabe S. et al., Mech Development, 59:89-102 (1996). La Patente de los Estados Unidos n.º 5.851.832 comunica células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.766.948 comunica la producción de neuroblastos procedentes de hemisferios cerebrales de neonatos. Las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.564.183 y 5.849.553 comunican el uso de células madre de la cresta neural de mamíferos. La Patente de los Estados Unidos n.º 6.040.180 comunica la generación *in vitro* de neuronas diferenciadas procedentes de cultivos de células madre multipotenciales del SNC de mamíferos. Los documentos WO 98/50526 y WO 99/01159 comunican la generación y el aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocitos-astrocitos y precursores neuronales restringidos a un linaje. La Patente de los Estados Unidos n.º 5.968.829 comunica células madre neurales obtenidas del prosencéfalo. Por consiguiente, se conocen bien en la técnica células madre neurales y métodos para producirlas y expandirlas.

Otra célula madre que se ha estudiado exhaustivamente en la técnica es la célula madre mesenquimal (MSC). Las MSC proceden del mesodermo embrionario y pueden aislarse de diversas fuentes, incluyendo la médula ósea adulta, sangre periférica, grasa, placenta y sangre umbilical, entre otros. Las MSC pueden diferenciarse en diversos

tejidos mesodérmicos, incluyendo músculo, hueso, cartílago, grasa y tendón. Existe una cantidad considerable de referencias bibliográficas acerca de estas células. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.486.389; 5.827.735; 5.811.094; 5.736.396; 5.837.539; 5.837.670; y 5.827.740. Véase también Pittenger, M. et al, Science, 284:143-147 (1999).

Otro ejemplo de una célula madre adulta es las células madre adultas procedentes de tejido adiposo (ADSC) que se han aislado de grasa, normalmente mediante liposucción, seguido de la liberación de las ADSC usando colagenasa. Las ADSC son en muchos aspectos similares a las MSC procedentes de médula ósea, salvo por que es posible aislar muchas más células de la grasa. Se ha comunicado que estas células se diferencian en hueso, grasa, músculo, cartílago y neuronas. Se ha descrito un método de aislamiento en el documento U.S. 2005/0153442.

Otras células madre que se conocen en la técnica incluyen las células madre gastrointestinales, las células madre epidérmicas y las células madre hepáticas, que también se han denominado "ovalocitos" (Potten, C., et al., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:821-830 (1998), Watt, F., Trans R Soc Lond B Biol Sci, 353:831 (1997); Alison et al., Hepatology, 29:678-683 (1998).

Otras células no embrionarias de las que se ha informado que son capaces de diferenciarse en tipos celulares de más de una capa germinal embrionaria incluyen, pero sin limitación, células de la sangre del cordón umbilical (véase la Publicación de los Estados Unidos n.º 2002/0164794), placenta (véase la Publicación de los Estados Unidos n.º 2003/0181269, matriz del cordón umbilical (Mitchell, K.E. et al., Stem Cells, 21:50-60 (2003)), células madre similares a embrionarias pequeñas (Kucia, M. et al., J Physiol Pharmacol, 57 Supl 5:5-18 (2006)), células madre de fluido amniótico (Atala, A., J Tissue Regen Med, 1:83-96 (2007)), precursores procedentes de la piel (Toma et al., Nat Cell Biol, 3:778-784 (2001)) y médula ósea (véanse las Publicaciones de los Estados Unidos n.º 2003/0059414 y 2006/0147246).

#### Estrategias para reprogramar células somáticas, descritas en el presente documento exclusivamente para animales no humanos

Se han empleado varias estrategias diferentes, tales como trasplante nuclear, fusión celular y reprogramación inducida por cultivo para inducir la conversión de células diferenciadas a un estado embrionario. La transferencia nuclear implica la inyección de un núcleo somático en un ovocito desnucleado, que, tras transferirse a una madre subrogada, puede producir un clon ("clonación reproductiva") o, tras su explante en cultivo, puede dar lugar a células madre embrionarias (ES) genéticamente emparejadas ("transferencia nuclear de célula somática", SCNT). La fusión de células somáticas con células ES da como resultado la generación de híbridos que muestran todas las características de las células ES pluripotentes. El explante de células somáticas en cultivo permite seleccionar líneas celulares inmortales que pueden ser pluripotentes o multipotentes. En la actualidad, las células madre espermatozonales son la única fuente de células pluripotentes que pueden proceder de animales postnatales. La transducción de células somáticas con factores definidos puede iniciar la reprogramación en un estado pluripotente. Se han revisado exhaustivamente estas estrategias experimentales (Hochedlinger y Jaenisch, Nature, 441:1061-1067 (2006) y Yamanaka, S., Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)).

#### Transferencia nuclear, descrita en el presente documento exclusivamente para animales no humanos.

El trasplante nuclear (NT), también citado como transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), indica la introducción de un núcleo de una célula somática donante en un ovocito desnucleado para generar un animal clonado, tal como la oveja Dolly (Wilmut et al., Nature, 385:810-813 (1997). La generación de animales vivos mediante NT demostró que el estado epigenético de las células somáticas, incluyendo el de las células diferenciadas terminalmente, aunque es estable, no está fijado de manera irreversible, sino que puede reprogramarse en un estado embrionario que es capaz de dirigir el desarrollo de un nuevo organismo. Además de proporcionar una excitante estrategia experimental para aclarar los mecanismos epigenéticos básicos implicados en el desarrollo embrionario y las enfermedades, la tecnología de clonación nuclear tiene un interés potencial para la medicina de trasplantes específicos para un paciente.

#### Fusión de células somáticas y células madre embrionarias, descritas en el presente documento exclusivamente para animales no humanos

La reprogramación epigenética de un núcleo somático hasta un estado no diferenciado se ha demostrado en híbridos murinos producidos mediante la fusión de células embrionarias con células somáticas. Los híbridos entre diversas células somáticas y células de carcinoma embrionarias (Solter, D., Nat Rev Genet, 7:319-327 (2006), células germinales embrionarias (EG) o ES (Zwaka y Thomson, Development, 132:227-233 (2005)) comparten diversas características con las células embrionarias progenitoras, lo que indica que el fenotipo multipotente es dominante en dichos productos de fusión. Al igual que con ratones (Tada et al., Curr Biol, 11:1553-1558 (2001)), las células ES humanas tienen el potencial de reprogramar los núcleos somáticos tras la fusión (Cowan et al., Science, 309:1369-1373(2005)); Yu et al., Science, 318:1917-1920 (2006)). La activación de marcadores de pluripotencia silentes, tales como Oct4 o la reactivación del cromosoma somático X inactivo proporcionó pruebas moleculares para la reprogramación del genoma somático en las células híbridas. Se ha sugerido que la replicación del ADN es

esencial para la activación de marcadores de pluripotencia, que comienza a observarse 2 días después de la fusión (Do y Scholer, *Stem Cells*, 22:941-949 (2004)), y que la sobreexpresión forzada de Nanog en células ES promueve la pluripotencia cuando se fusionan con células madre neurales (Silva et al., *Nature*, 441:997-1001 (2006)).

#### 5 Reprogramación inducida por cultivo

Se describe en el presente documento solo a modo de referencia.

Se han obtenido células pluripotentes de fuentes embrionarias, tales como blastómeros y la masa celular interna (ICM) del blastocisto (células ES), el epiblasto (células EpiSC), células germinales primordiales (células EG) y células madre espermatogoniales postnatales (células "maGSCsm", "similares a ES"). Las siguientes células pluripotentes, junto con su célula/tejido donante es como sigue: las células ES patogénicas proceden de ovocitos murinos (Narashima et al., *Curr Biol*, 7:881-884 (1997)); se han obtenido células madre embrionarias de blastómeros (Wakayama et al., *Stem Cells*, 25:986-993 (2007)); células de la masa celular interna (fuente no aplicable) (Eggan et al., *Nature*, 428:44-49 (2004)); las células germinales embrionarias y de carcinoma embrionario se han obtenido de células germinales primordiales (Matsui et al., *Cell*, 70:841-847 (1992)); las GMCS, maSSC y MASC se han obtenido de células madre espermatogoniales (Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006); Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119:1001-1012 (2004); y Seandel et al., *Nature*, 449:346-350 (2007)); las células EpiSC proceden de epiblastos (Brons et al., *Nature*, 448:191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448:196-199(2007)); las células ES patogénicas se han obtenido de ovocitos humanos (Narashima et al., *Science*, 295L819 (2002); Revazova et al., *Cloning Stem Cells*, 9:432-449 (2007)); las células ES humanas se han obtenido de blastocistos humanos (Thomson et al., *Science*, 282:1145-1147 (1998)); las MAPC se han obtenido de médula ósea (Jiang et al., *Nature*, 418:41-49 (2002); Phinney y Prockop, *Stem Cells*, 25:2896-2902 (2007)); células de sangre del cordón (procedentes de sangre del cordón) (van de Ven et al., *Exp Hematol*, 35:1753-1765 (2007)); células procedentes de la neuroesfera procedentes de células neurales (Clarke et al., *Science*, 288:1660-1663 (2000)). Se sabe que las células donantes del linaje de células germinales, tales como PGC o células madre espermatogoniales son unipotentes *in vivo*, pero se ha demostrado que pueden aislarse células similares a ES pluripotentes (Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119:1001-1012 (2004) o maGSCs (Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006)), tras un cultivo prolongado *in vitro*. Aunque la mayoría de estos tipos celulares pluripotentes fueron capaces de diferenciarse *in vitro* y de formar teratomas, solo las ES, EG, EC y las maGCS procedentes de células madre espermatogoniales o las células similares a ES fueron pluripotentes según criterios más rigurosos, ya que fueron capaces de formar quimeras posnatales y contribuir a la línea germinal. Recientemente, se obtuvieron células madre espermatogoniales adultas (MASC) de células madre espermatogoniales testiculares de ratones adultos y estas células tenían un perfil de expresión al de las células ES (Seandel et al., *Nature*, 449:346-350 (2007)) pero similar al de las células EpiSC, que procedían del epiblasto de los embriones de ratón después de la implantación (Brons et al., *Nature*, 448:191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448:196-199 (2007)).

#### Reprogramación mediante factores de transcripción definidos

Takahashi y Yamanaka han comunicado la reprogramación de células somáticas de nuevo a un estado similar a ES (Takahashi y Yamanaka, *Cell*, 126:663-676 (2006)). Sucesivamente, han reprogramado fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y fibroblastos adultos en células similares a ES pluripotentes tras la transducción mediada por virus de los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-myc y Klf4 seguido de la selección respecto de la activación del gen diana de Oct4, Fbx15 (figura 2A). Se ha acuñado el término células iPS (madre pluripotente inducidas) para las células que tienen Fbx15 activado y se ha demostrado que son pluripotentes debido a su capacidad para formar teratomas, aunque fueron incapaces de generar quimeras vivas. Este estado pluripotente dependía de la expresión vírica continua de los genes transducidos, Oct4 y Sox2, mientras que los genes endógenos, Oct4 y Nanog o bien no se expresaban o se expresaban a un nivel menor que en las células ES y se observó que sus respectivos promotores estaban en gran medida metilados. Esto es coherente con la conclusión de que las células Fbx15-iPS no correspondían a células ES, sino que pueden haber representado un estado de reprogramación incompleto. Aunque se ha determinado mediante experimentos genéticos que Oct4 y Sox2 son esenciales para la pluripotencia (Chambers y Smith, *Oncogene*, 23:7150-7160 (2004); Ivanona et al., *Nature*, 442:5330538 (2006); Masui et al., *Nat Cell Biol*, 9:625-635 (2007)), no está del todo claro el papel de los dos oncogenes, c-myc y Klf4 en la reprogramación. De hecho, algunos de estos oncogenes pueden ser indispensables para la reprogramación, ya que se han obtenido células iPS tanto humanas como de ratón en ausencia de transducción de c-myc, aunque con una baja eficiencia (Nakagawa et al., *Nat Biotechnol*, 26:191-106 (2008); Werning et al., *Nature*, 448:318-324 (2008); Yu et al., *Science*, 318: 1917-1920 (2007)).

#### MAPC

MAPC es, por sus siglas en inglés, el acrónimo para "célula progenitora adulta multipotente" (no ES, no EG, non-germinales). Las MAPC tienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares de al menos dos, tal como las tres capas germinales primitivas (ectodermo, mesodermo y endodermo). Los genes hallados en las células ES también pueden encontrarse en MAPC (por ejemplo, telomerasa, Oct 3/4, rex-1, rox-1, sox-2). Oct 3/4 (Oct 3A en seres humanos) parece ser específico para células ES y germinales. MAPC representa una población de células progenitoras más primitivas que las MSC (Verfaillie, C.M., *Trends Cell Biol* 12:502-8 (2002), Jahagirdar, B.N., et al.,

Exp Hematol, 29:543-56 (2001); Reyes, M. y C.M. Verfaillie, Ann N Y Acad Sci, 938:231-233 (2001); Jiang, Y. et al., Exp Hematol, 30:896-904 (2002); y (Jiang, Y. et al., Nature, 418:41-9. (2002)).

Las MAPC humanas se describen en la Patente de los Estados Unidos 7.015.037 y en la Solicitud de los Estados Unidos n.º 10/467.963. Se han identificado MAPC en otros mamíferos. Las MAPC murinas, por ejemplo, también se describen en la Patente de los Estados Unidos 7.015.037 y en la Solicitud de los Estados Unidos n.º 10/467.963. También se describen MAPC de rata en la Solicitud de los Estados Unidos n.º 10/467.963.

#### Aislamiento y crecimiento de MAPC

Se conocen en la técnica métodos para el aislamiento de MAPC. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 7.015.037 y la Solicitud de los Estados Unidos n.º 10/467.963. Pueden aislarse MAPC de múltiples fuentes, incluyendo, pero sin limitación, médula ósea, placenta, cordón umbilical y sangre del cordón, músculo, cerebro, hígado, médula espinal, sangre o piel. Es posible, por lo tanto, obtener aspirados de médula ósea, cerebro o biopsias de hígado y otros órganos y aislar las células usando técnicas de selección positiva o negativa disponibles para los expertos en la materia, basándose en los genes que se expresan (o no se expresan) en estas células (por ejemplo, mediante ensayos funcionales o morfológicos, tales como los divulgados en las solicitudes anteriormente citadas).

#### MAPC de médula ósea humana, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos 7.015.037

Las MAPC no expresan el antígeno común de leucocitos, CD45 o la glucoforina A (Gly-A) específica de eritroblastos. La población mixta de células se sometió a una separación de Ficoll Hypaque. Después, se sometió a las células a selección negativa usando anticuerpos anti-CD45 y anti-Gly-A, agotando la población de células CD45<sup>+</sup> y Gly-A<sup>+</sup> y después se recuperó aproximadamente el 0,1% restante de células mononucleares de médula ósea. Las células también pueden sembrarse en pocillos recubiertos con fibronectina y se cultivaron como se describe más adelante durante 2-4 semanas para agotar la población de células CD45<sup>+</sup> y Gly-A<sup>+</sup>. En cultivos de células de médula ósea adherentes, muchas células estromales adherentes sufren senescencia replicativa aproximadamente en la duplicación 30 y continúa expandiéndose una población homogénea de células y mantiene largos telómeros.

Como alternativa, puede usarse selección positiva para aislar células mediante una combinación de marcadores específicos para células. Se encuentran disponibles técnicas de selección tanto positiva como negativa para los expertos en la materia y también se encuentran disponibles numerosos anticuerpos monoclonales y policlonales para selección negativa (véase, por ejemplo, Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., Eds. (1995) Oxford University Press) y se encuentran disponibles comercialmente de diversas fuentes.

También se han descrito técnicas para la separación de células de mamífero de una mezcla de poblaciones celulares por Schwartz et al., en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.759.793 (separación magnética), Basch et al., 1983 (cromatografía de inmunoafinidad) y Wysocki y Sato, 1978 (separación celular activada por fluorescencia).

#### Cultivo de MAPC como se describe en el documento U.S. 7.015.037

Las MAPC aisladas y descritas en el presente documento pueden cultivarse usando los métodos divulgados en el presente documento y en la Patente de los Estados Unidos 7.015.037.

Las células pueden cultivarse en medio de cultivo bajo en suero o asérico. El medio asérico usado para cultivar las MAPC se describe en la Patente de los Estados Unidos 7.015.037. Se han cultivado diversas células en medio asérico o bajo en suero. En este caso, el medio se complementa con uno o más factores de crecimiento. Los factores de crecimiento comúnmente usados incluyen, pero sin limitación, la proteína morfogenética ósea, el factor de crecimiento de fibroblastos básico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento epidérmico. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.169.610; 7.109.032; 7.037.721; 6.617.161; 6.617.159; 6.372.210; 6.224.860; 6.037.174; 5.908.782; 5.766.951; 5.397.706; y 4.657.866.

#### Métodos de cultivo adicionales

En experimentos adicionales, la densidad a la que se cultivan las MAPC puede variar de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> o aproximadamente 150 células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 10.000 células/cm<sup>2</sup>, incluyendo de aproximadamente 200 células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 1500 células/cm<sup>2</sup> o aproximadamente 2000 células/cm<sup>2</sup>. La densidad puede cambiar entre especies. Además, la densidad óptima puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y la fuente de las células. Se encuentra dentro de las capacidades de una persona normalmente versada en la materia la determinación de la densidad óptima para un conjunto dado de condiciones de cultivo y células.

También, pueden usarse en cualquier momento durante el aislamiento, el crecimiento y la diferenciación de las MAPC en cultivo concentraciones de oxígeno atmosférico de menos de aproximadamente el 10%, incluyendo aproximadamente un 1-5% y, especialmente un 3-5%.

Las células pueden cultivarse con diversas concentraciones de suero, por ejemplo, aproximadamente un 2-20%. Puede usarse suero bovino fetal. Puede usarse más suero en combinación con menores tensiones de oxígeno, por ejemplo, aproximadamente un 15-20%. No es necesario seleccionar las células antes de su adherencia a placas de cultivo. Por ejemplo, tras un gradiente de Ficoll, pueden sembrarse directamente las células, por ejemplo, 250.000-500.000/cm<sup>2</sup>. Las colonias adherentes pueden recogerse, posiblemente agruparse y expandirse.

En una realización, usada en los procedimientos experimentales en los ejemplos, se usaron condiciones altas en suero (aproximadamente un 15-20%) y bajas en oxígeno (aproximadamente un 3-5%) para el cultivo celular. Específicamente, se sembraron células adherentes de las colonias y se pasaron a densidades de aproximadamente 1700-2300 células/cm<sup>2</sup> en suero al 18% y oxígeno al 3% (con PDGF y EGF).

En una realización específica para MAPC, los suplementos son factores celulares o componentes que permiten a las MAPC conservar la capacidad para diferenciarse en los tres linajes. Esto puede estar indicado por la expresión de marcadores específicos del estado no diferenciado. Las MAPC, por ejemplo, expresan de manera constitutiva Oct 3/4 (Oct 3A) y conservan altos niveles de telomerasa.

#### Cultivo celular

Para todos los componentes listados a continuación, véase el documento U.S. 7.015.037.

En general, las células pueden mantenerse y expandirse en medio de cultivo que se encuentra disponible y se conoce bien en la técnica. También se contempla la complementación del medio de cultivo celular con suero de mamífero. También pueden usarse suplementos adicionales, ventajosamente, para suministrar las células con los oligoelementos necesarios para un crecimiento y una expansión óptimos. También pueden usarse ventajosamente hormonas en cultivo celular. También pueden usarse lípidos y vehículos lipídicos para complementar el medio de cultivo celular, dependiendo del tipo de célula y del destino de la célula diferenciada. También se contempla el uso de capas de células alimentadoras.

Las células también pueden cultivarse en cultivos en "3D" (agregadas). Un ejemplo es el documento PCT/US2009/31528, presentado el 21 de enero de 2009.

Una vez se han establecido en cultivo, las células pueden usarse frescas o congeladas y almacenarse en forma de reservas congeladas, utilizando, por ejemplo, DMEM con FCS al 40% y DMSO al 10%. También se encuentran disponibles para los expertos en la materia otros métodos para preparar reservas congeladas para células cultivadas.

#### Formulaciones farmacéuticas

El documento U.S. 7.015.037 describe formulaciones farmacéuticas. En determinadas realizaciones, las poblaciones celulares están presentes en una composición adaptada y adecuada para el suministro, es decir, fisiológicamente compatible.

En algunas realizaciones, la pureza de las células (o del medio condicionado) para su administración a un sujeto es de aproximadamente el 100% (sustancialmente homogéneas). En otras realizaciones, es del 95% al 100%. En algunas realizaciones, es del 85% al 95%. En particular, en caso de mezclas con otras células, el porcentaje puede ser de aproximadamente el 10%-15%, 15%-20%, 20%-25%, 25%-30%, 30%-35%, 35%-40%, 40%-45%, 45%-50%, 60%-70%, 70%-80%, 80%-90% o 90%-95%. El aislamiento/pureza puede expresarse en términos de duplicaciones celulares, donde las células han sufrido, por ejemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 o más duplicaciones celulares.

La elección de la formulación para administrar las células para una aplicación dada dependerá de una serie de factores. Entre estos, destaca la especie del sujeto, la naturaleza de la afección que se esté tratando, su estado y distribución en el sujeto, la naturaleza de otras terapias y agentes que se estén administrando, la vía de administración óptima, la capacidad de supervivencia por la vía, la pauta posológica y otros factores que serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, la elección de los vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía de administración exacta y de la naturaleza de la forma farmacéutica particular.

Las formulaciones finales de la suspensión acuosa de células/medio implicará normalmente ajustar la fuerza iónica de las suspensiones hasta la isotonicidad (es decir, de aproximadamente 0,1 a 0,2) y hasta pH fisiológico (es decir, pH de aproximadamente 6,8 a 7,5). La formulación final también contendrá normalmente un lubricante fluido.

En algunas realizaciones, las células/medio se formulan en una forma farmacéutica inyectable unitaria, tal como una solución, suspensión o emulsión. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección de células/medio normalmente son soluciones y dispersiones acuosas estériles. Los vehículos para formulaciones inyectables pueden ser un disolvente o un medio de dispersión que contienen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células y los aditivos opcionales, vehículos y/o portadores en las composiciones que se vayan a administrar. Típicamente, cualquier aditivo (además de las células) está presente en una cantidad del 0,001 a, 50% en peso en solución, tal como en suero salino tamponado con fosfato. El principio activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 5 % en peso, preferentemente, de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 1 % en peso, más preferentemente, de aproximadamente un 0,0001 a aproximadamente un 0,05 % en peso o de aproximadamente un 0,001 a aproximadamente un 20 % en peso, preferentemente, de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 10 % en peso y lo más preferentemente, de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 5 % en peso.

La dosis de las células variará dentro de amplios límites y se ajustará a las necesidades individuales en cada caso particular. En general, en el caso de la administración parenteral, es habitual administrar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 millones de células/kg de peso corporal del receptor. El número de células variará dependiendo del peso y el estado del receptor, el número o la frecuencia de las administraciones y otras variables conocidas por los expertos en la materia. Las células pueden administrarse por una vía que sea adecuada para el tejido u órgano. Por ejemplo, pueden administrarse por vía sistémica, es decir, por vía parenteral, mediante administración intravenosa o pueden dirigirse a un tejido u órgano particular; pueden administrarse mediante administración subcutánea o mediante administración en tejidos específicos deseados.

Las células pueden suspenderse en un excipiente adecuado a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml. Los excipientes adecuados para las soluciones para inyección son aquellos que son biológica y fisiológicamente compatibles con las células y con el receptor, tal como solución de suero salino tamponado u otros excipientes adecuados. La composición para administración puede formularse, producirse y almacenarse de acuerdo con métodos convencionales que cumplen con los criterios de esterilidad y estabilidad adecuados.

#### Administración en tejidos linfohematopoyéticos

Se conocen en la materia técnicas para administración en estos tejidos. Por ejemplo, las inyecciones dentro de la médula ósea pueden implicar inyectar células dentro de la cavidad de la médula ósea, normalmente en la cresta ilíaca posterior, pero pueden incluir otros sitios en la cresta ilíaca, fémur, tibia, húmero o cúbito; las inyecciones esplénicas podrían implicar inyecciones guiadas por radiografía en el bazo o la exposición quirúrgica del bazo mediante laparoscopia o laparotomía; Las inyecciones en la placa de Peyer, GALT o BALT pueden requerir procedimientos de inyección por laparotomía o laparoscopia.

#### Dosificación

Un experto en la materia puede determinar, sin experimentación innecesaria, dosis para seres humanos u otros mamíferos, a partir de esta divulgación, los documentos citados en el presente documento y el conocimiento de la técnica. La dosis de células/medio adecuadas para su uso de acuerdo con las diversas realizaciones dependerán de numerosos factores. Los parámetros que determinarán las dosis óptimas para su administración para terapia primaria y adyuvante incluirán generalmente algunos o todos de los siguientes: la enfermedad que se esté tratando y su estadio; la especie del sujeto, su salud, género, edad, peso y tasa metabólica; la inmunocompetencia del sujeto; otras terapias que se estén administrando; y las complicaciones potenciales esperadas basándose en el historial o el genotipo del sujeto. Los parámetros también pueden incluir: si las células son singénicas, autólogas, alogénicas o xenogénicas; su potencia (actividad específica); el sitio y/o la distribución que ha de dirigirse para que las células/medio sean eficaces; y características similares del sitio, tales como la accesibilidad para las células/medio y/o el injerto de células. Los parámetros adicionales incluyen la administración junto con otros factores (tales como factores de crecimiento y citocinas). La dosis óptima en una situación dada también tomará en consideración la forma en la que se formulan las células/medio, el modo en que se administran y el grado en que las células/medio se localizarán en los sitios diana después de la administración.

La dosis óptima de células puede encontrarse en el intervalo de las dosis usadas para el trasplante autólogo de médula ósea mononuclear. Para las preparaciones de células bastante purificadas, las dosis óptimas en diversas realizaciones variarán de  $10^4$  a  $10^8$  células/kg de masa del receptor por administración. En algunas realizaciones, la dosis óptima por administración será de entre  $10^5$  a  $10^7$  células/kg. En varias realizaciones, la dosis óptima por administración será de entre  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/kg. A modo de referencia, las dosis mayores de lo anterior son análogas a las dosis de células nucleadas usadas en el trasplante autólogo de médula ósea mononuclear. Algunas de las dosis más bajas son autólogas para el número de células  $CD34^+$  /kg usadas en el trasplante de médula ósea mononuclear.

En diversas realizaciones, las células/medio pueden administrarse en una dosis inicial y posteriormente, mantenerse mediante administración adicional. Las células/medio pueden administrarse inicialmente mediante un método y posteriormente, administrarse mediante el mismo método o uno o más métodos diferentes. Los niveles pueden mantenerse mediante la administración continua de las células/medio. Varias realizaciones administran las células/medio ya sea inicialmente o para mantener su nivel en el sujeto o ambos mediante inyección intravenosa. En

una variedad de realizaciones, se usan otras formas de administración, dependiendo del estado del paciente y otros factores, descritos en otras partes del presente documento.

5 Las células/medio pueden administrarse con diversas frecuencias en diversos lapsos de tiempo. La duración de los tratamientos generalmente será proporcional a la duración del proceso de la enfermedad, la eficacia de las terapias que se estén aplicando y el estado y la respuesta del sujeto que se esté tratando.

#### Usos

10 Debido a que las células de la divulgación secretan uno o más factores que en última instancia reducen la inflamación mediante los diversos mecanismos biológicos descritos en la presente solicitud, la administración de las células es útil para reducir la inflamación no deseable en cualquier número de patologías. Estas incluyen, pero sin limitación, las enfermedades listadas anteriormente.

15 Además, se proporcionan otros usos mediante el conocimiento de los mecanismos biológicos descritos en la presente solicitud. Uno de estos incluye el descubrimiento de fármacos. Este aspecto implica explorar uno o más compuestos respecto de su capacidad para modular los efectos antiinflamatorios de las células. Esto podría implicar, en primer lugar, desarrollar un ensayo para determinar la capacidad de las células para reducir cualquiera de los siguientes: (1) inflamación, (2) extravasación, (3) unión de células endoteliales-leucocitos, (4) expresión de CD15s en leucocitos y (5) expresión de Fut-7 en leucocitos (ARN y/o proteína) y/o síntesis de CD15s por Fut-7. Por consiguiente, el ensayo puede diseñarse para llevarse a cabo *in vivo* o *in vitro*. Los ensayos de modulación podrían evaluar el estado de activación a cualquier nivel deseado, por ejemplo, morfológico, expresión génica, funcional, etc. Puede implicar leucocitos en la vasculatura aislada. Como alternativa, puede implicar leucocitos retirados parcial o totalmente de la vasculatura, incluyendo estirpes de leucocitos y líneas celulares leucocitarias, tanto naturales como recombina-  
20 tes. Sin embargo, también puede incluir componentes celulares aislados conocidos por tener afinidad de unión por el antígeno Lewis X sialilado, tales como P y E-selectina. Por lo tanto, además de células (naturales o recombina-  
25 tes) que expresan Fut-7 y CD15s, podrían usarse para evaluar la unión células recombina-  
tes que expresan o secretan P y/o E-selectina. O puede usarse la selectina aislada. Por tanto, estos ensayos proporcionan una forma de seleccionar un agente respecto de su capacidad para reducir o aumentar el efecto de las células (o el medio condicionado). Los ensayos también pueden contener una o más citocinas que activan a las células endoteliales y/o los leucocitos.

35 La expresión génica puede evaluarse ensayando directamente las proteínas o el ARN. Esto puede efectuarse mediante cualquiera de las técnicas de sobra conocidas disponibles en la técnica, tales como mediante FACS y otros medios de detección a base de anticuerpos y PCR y otros métodos de detección basados en la hibridación. También pueden usarse ensayos indirectos para la expresión, tales como unión a cualquiera de los compañeros de unión conocidos.

40 Los ensayos para la expresión/secreción de factores moduladores incluyen, pero sin limitación, ELISA, Luminex, qRT-PCR, transferencias de Western anti-factor e inmunohistoquímica de factor en muestras de tejido o células.

45 La determinación cuantitativa de factores moduladores en células y medio condicionado puede llevarse a cabo usando kits de ensayo disponibles comercialmente (por ejemplo, R&D Systems, que se basa en un ensayo a base de anticuerpos sustractivos en dos etapas).

Un uso adicional es establecer bancos celulares para proporcionar células para administración clínica. En general, una parte fundamental de este procedimiento es proporcionar células que tienen una potencia deseada para su administración en diversas situaciones terapéuticas.

50 También podría aplicarse cualquiera de estos ensayos útiles para descubrimiento de fármacos para seleccionar células para el banco, así como del banco para su administración.

55 Por consiguiente, en un procedimiento para crear un banco, las células (o el medio de cultivo) podría ensayarse respecto de su capacidad para lograr cualquiera de los efectos anteriores. Después, podrían seleccionarse las células que tienen una potencia deseada para cualquiera de los efectos anteriores y estas células podrían formar la base para crear un banco celular.

60 También se contempla que pueda aumentarse la potencia por tratamiento con un compuesto exógeno, tal como un compuesto descubierto mediante la exploración de las células con grandes bibliotecas combinatorias. Estas bibliotecas de compuestos pueden ser bibliotecas de agentes que incluyen, pero sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros de ARNpi ADN, péptidos, anticuerpos, proteínas distintas de anticuerpos, citocinas, quimocinas y quimioatrayentes. Por ejemplo, las células pueden exponerse a dichos agentes en cualquier momento durante el procedimiento de crecimiento y fabricación. El único requisito es que haya un número suficiente para que pueda llevarse a cabo el ensayo para evaluar si los agentes aumentan o no la potencia.  
65 Dicho agente, hallado durante el proceso de descubrimiento general de fármacos descrito anteriormente, podría aplicarse de manera más ventajosa durante el último pase antes de la creación del banco.

Las células se aíslan de un donante de médula cualificado que se ha sometido a los requisitos de ensayo específicos para determinar que un producto celular que se obtiene de este donante podría ser seguro para su uso en una situación clínica. Las células mononucleares se aíslan usando un procedimiento manual o automatizado. Estas células mononucleares se colocan en cultivo, permitiendo que las células se adhieran a la superficie tratada de un vaso de cultivo celular. Se deja que las células MAPC se expandan sobre la superficie tratada, produciéndose los cambios de medio en el día 2 y en el día 4. En el día 6, se retiran las células del sustrato tratado por medios mecánicos o enzimáticos y se vuelven a sembrar en otra superficie tratada de un vaso de cultivo. En los días 8 y 10, se retiran las células de la superficie tratada como en el caso anterior y se vuelven a sembrar. En el día 13, se retiran las células de la superficie tratada, se lavan y se combinan con un material crioprotector y se congelan, en última instancia, en nitrógeno líquido. Después de que las células hayan estado congeladas durante al menos una semana, se retira una alícuota de las células y se evalúa su potencia, identidad, esterilidad y otras pruebas para determinar la utilidad del banco de células. Después, pueden usarse las células de este banco descongelándolas, poniéndolas en cultivo o usándolas según se descongelan para tratar las potenciales indicaciones.

Otro uso es un ensayo diagnóstico de eficacia y de efecto clínico beneficioso después de la administración de las células. Dependiendo de la indicación, puede haber disponibilidad de biomarcadores para su evaluación. Por ejemplo, los niveles elevados de proteína C-reactiva se asocian con una respuesta inflamatoria aguda. Se pueden controlar los niveles de CRP para determinar efectos clínicos beneficiosos.

Un uso adicional es evaluar la eficacia de la célula para lograr cualquiera de los resultados anteriores en forma de un diagnóstico antes del tratamiento que antecede a la administración de las células a un sujeto.

La divulgación abarca métodos para producir células con una potencia aumentada, tal como se describen en el presente documento. Por consiguiente, la divulgación abarca métodos para identificar compuestos que aumentan la capacidad de la célula para tener cualquiera de los efectos descritos en el presente documento, exponiendo a las células a un compuesto y evaluando la capacidad de las células para lograr el efecto a cualquier nivel deseado.

#### Composiciones

La divulgación también se refiere a poblaciones de células con potencias específicas para lograr cualquiera de los efectos descritos en el presente documento (es decir, inflamación, extravasación, adhesión, reducción de la activación de leucocitos, etc.). Como se ha descrito anteriormente, estas poblaciones se establecen seleccionando células que tengan la potencia deseada. Estas poblaciones se usan para preparar otras composiciones, por ejemplo, un banco de células que comprende poblaciones con potencias específicas deseadas y composiciones farmacéuticas que contienen una población de células con una potencia deseada.

#### **Ejemplos**

MultiStem® es la denominación comercial para la preparación de células MAPC usada en los procedimientos experimentales descritos en este ejemplo.

#### Ejemplo 1

La hipótesis inicial de este ejemplo es que MultiStem se asocia con la expresión limitante de CD15s en la superficie celular en células inflamatorias. La figura 2 muestra un diagrama de la hipotética señalización cruzada entre MultiStem y las células diana.

La figura 3 muestra una evaluación de la señalización cruzada entre MultiStem y células mononucleares de sangre periférica en placas Transwell permeables, de tal forma que las dos poblaciones de células se encuentran físicamente separadas. Se permite que se produzca el intercambio de factores solubles a través del soporte de filtro semipermeable. Después, puede recogerse limpiamente cada población, sin contaminación. Las células polinucleares periféricas se colocaron en el compartimento superior y se activaron con anticuerpos para CD3 y CD28. En la parte inferior de la placa de cultivo, se cultivaron MultiStem adherentes. Después de tres días en cultivo, se recogió por separado cada población de células, ya fuese para el aislamiento de ARN y el análisis por micromatriz o para análisis FACS.

La figura 4 muestra una comparación del perfil de expresión génica usando análisis por micromatriz para células mononucleares de sangre periférica activadas que se cultivaron con o sin MultiStem. Usando análisis de micromatrices, se compararon los perfiles de expresión génica en PBMC activadas que o bien se cultivaron junto con MultiStem (condición n.º 5, figura 2) o se cultivaron en ausencia de MultiStem (condición n.º 2, figura 2). La gráfica representa los niveles de expresión de genes individuales. En rojo se resaltan los genes que tienen una expresión diferencial de más de factor 5 entre las dos poblaciones de ensayo. Se observó que un total de 43 genes se expresaban de manera diferencial en las PBMC activadas cuando se cultivaron junto con MultiStem. Se expresaron siete genes a mayores niveles en los linfocitos T activados (región superior izquierda) y 36 genes se encontraban regulados positivamente en los linfocitos T activados cultivados con MultiStem (área inferior derecha).

Tras la identificación de los productos génicos, se determinó que uno de los genes que se encontraba más negativamente regulado (~15 veces) en los linfocitos T expuestos a MultiStem fue el gen para fucosiltransferasa 7 o alfa(1,3)fucosiltransferasa (Fut-7). El gen Fut-7 codifica la enzima del Golgi que dirige la glucosilación de antígenos Lewis X sialilados (sLewX, CD 15s), que es un elemento importante en el proceso de la unión de linfocitos T a las células endoteliales y la extravasación. Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar la expresión de Fut-7 y de antígeno Lewis X sialilado (CD15s) en linfocitos T influenciados por MultiStem.

La figura 5 muestra la expresión de Fut-7 en células mononucleares de sangre periférica activadas cultivadas con y sin MultiStem. Se evaluó mediante qPCR la expresión de Fut-7 en PMC (véase la condición n.º 1, figura 2), en PBMC activadas (véase la condición n.º 2, figura 2) y en PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (véase la condición n.º 5, figura 2). En las PBMC activadas, se produjo un aumento de más de 12 veces en la expresión del gen Fut-7 (barra intermedia), en comparación con las PBMC quiescentes (barra izquierda). Cuando se cultivaron PBMC activadas junto con MultiStem (barra derecha), se redujeron los niveles de expresión del gen Fut-7 al nivel de expresión basal medido en las PBMC quiescentes (barra izquierda). Estos resultados coinciden de manera precisa con los resultados de la micromatriz y confirman que MultiStem regula los niveles de expresión del gen Fut-7 en linfocitos T activados.

Se llevaron a cabo experimentos FACS para evaluar si la regulación del gen Fut-7 mediante MultiStem tiene influencia en la expresión en la superficie celular del producto de Fut-7, específicamente, el antígeno Lewis x sialilado (CD15s). Se llevaron a cabo experimentos FACS posteriores para evaluar si la regulación del gen Fut-7 mediante MultiStem tiene influencia en la expresión en la superficie celular del producto de Fut-7, a saber, el antígeno Lewis X sialilado (CD15s). Las condiciones de ensayo incluyeron PBMC quiescentes (paneles izquierdos), PBMC quiescentes cultivadas junto con MultiStem (segunda columna de paneles, PBMC activadas (tercera columna) y PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (paneles derechos). La expresión de CD15s (eje x en cada panel) se evaluó en linfocitos T CD4-positivos (paneles superiores) y en linfocitos T CD8-positivos (paneles inferiores). Los niveles de expresión de CD4 y CD8 se muestran en el eje y en cada panel. Se calculó el porcentaje de células CD4 o CD8 que expresaban CD15s midiendo la señal en el cuadrante superior derecho en cada panel.

Los resultados muestran niveles basales de células positivas a CD15s en poblaciones de células CD4 y CD8 quiescentes (~3%), ya se cultivasen o no junto con MultiStem. El porcentaje de linfocitos T CD15s positivos aumentó significativamente tras la activación (23% de linfocitos T CD15s-positivos CD4-positivos y un 11% de linfocitos T CD15s-positivos CD8-positivos). De forma importante, cuando se cultivaron linfocitos T activadas junto con MultiStem, se redujeron hasta los niveles basales los números de linfocitos T CD15s-positivos CD4 o CD8-positivos (1-2%, paneles derechos). Estos resultados indican que MultiStem tiene impacto tanto en la expresión del producto génico Fut-7 como en su producto, CD15s, en la superficie de las poblaciones de linfocitos T activados.

La figura 7 muestra experimentos para evaluar si MultiStem previene o reduce la expresión de CD15s. Se llevaron a cabo experimentos de seguimiento para evaluar si MultiStem impide o reduce la expresión de CD15s mediante análisis FACS a las 24, 48 y 72 h después de iniciarse la activación de los linfocitos T. Las condiciones de ensayo incluyeron PBMC quiescentes (primeras tres barras), PBMC quiescentes cultivadas junto con MultiStem (segundo panel de tres barras), PBMC activadas (tercer panel de barras) y PBMC activadas cultivadas junto con MultiStem (panel derecho de barras). El nivel de células positivas a CD 15s es como se presenta en el eje y.

Los datos muestran que los niveles de linfocitos T CD15s-positivos CD4-positivos permanecen en los niveles basales, independientemente del cultivo junto con MultiStem (dos paneles izquierdos). Durante el proceso de activación de linfocitos T, iniciado por la adición de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, los niveles de expresión de CD15s aumentan tras 48 h y alcanzan la expresión máxima tras 72 h (tercer panel desde la derecha). Por el contrario, cuando se lleva a cabo la activación de linfocitos T en presencia de MultiStem, los niveles de CD15s no aumentan de manera significativa con el paso del tiempo. Los resultados indican que MultiStem puede prevenir de manera activa la expresión de CD 15s en linfocitos T durante su activación.

La figura 8 muestra el impacto prolongado de MultiStem en la expresión de CD15s. Posteriormente, se evaluó el impacto prolongado del efecto de MultiStem en la expresión de CD15s. En este experimento, se cultivaron en primer lugar PBMC activadas con MultiStem durante tres días (figura superior, panel izquierdo), a continuación, se recogieron las PBMC y se colocaron en Transwell nuevas que contenían anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28, pero en ausencia de MultiStem (figura superior, panel derecho). A continuación, se llevó a cabo el FACS a las 24, 48 y 72 h.

Los resultados se muestran en la figura inferior y demuestran que los linfocitos T CD4 o CD8 positivos seguirán siendo negativos o expresarán poco CD15s durante hasta 72 h después de su retirada del cultivo junto con MultiStem, lo que indica un impacto de larga duración de MultiStem en los linfocitos T activados.

La figura 9 muestra que una menor expresión de CD15s reduce la capacidad de los linfocitos T para unirse a células endoteliales. CD15s representa un primer componente crítico en el proceso de la extravasación, que incluye la unión de linfocitos a células endoteliales y su movimiento a lo largo del endotelio al interior del tejido subyacente. Ya que MultiStem inhibe la expresión de CD15s en linfocitos T activados, se evaluó si esto alteró su capacidad para unirse a células endoteliales. Para ello, se cultivaron en primer lugar PBMC activadas con MultiStem durante tres días (figura

superior, panel izquierdo). A continuación, se recogieron las PBMC y se marcaron con un colorante fluorescente y después se colocaron en los nuevos pocillos que contenían células endoteliales adherentes al fondo (figura superior, panel derecho). Las células endoteliales se encontraban quiescentes o activadas por tratamiento previo con TNF-alfa, para inducir la expresión de E-selectina, el receptor para CD15s. Las PBMC fluorescentes se incubaron con células endoteliales durante 15 min y las células no unidas se retiraron mediante varias etapas de lavado. Después, se analizó la unión de las PBMC midiendo la fluorescencia de las células adherentes.

Los resultados de la unión se muestran en la parte inferior de la figura 7. La incubación de linfocitos T CD4 quiescentes, activados o inactivados cultivados junto con MultiStem con células endoteliales quiescentes (barras blancas) da como resultado niveles basales de unión de los linfocitos T al endotelio. Cuando los linfocitos T se incubaron con endotelio activado, se observó un aumento de más de 10 veces en la unión de los linfocitos T activados, en comparación con los linfocitos T quiescentes, lo que es consistente con la unión de linfocitos T activados que expresan CD15s al endotelio que expresa E-selectina. Sin embargo, la unión de linfocitos T activados que se habían cultivado junto con MultiStem se redujo significativamente. Esta observación es consistente con el hecho de que MultiStem inhibe la expresión de CD15s.

En resumen, estos hallazgos indican que MultiStem puede regular la capacidad de los linfocitos T para expresar ligandos de la superficie necesarios para la unión al endotelio y la extravasación a tejidos. MultiStem puede lograr esto mediante la secreción de factores solubles, sin necesidad de un contacto directo entre células. Específicamente, MultiStem inhibe la expresión de CD15s en linfocitos T activados, interfiriendo con su capacidad para unirse a células endoteliales activadas que expresan receptores para CD15s. En definitiva, esto confirma la hipótesis de que *in vivo*, MultiStem puede proporcionar un beneficio en la reducción o prevención de afecciones inflamatorias excesivas, alterando la capacidad de las células inmunitarias o inflamatorias relevantes para moverse fuera del torrente sanguíneo y al interior del tejido inflamatorio subyacente.

**REIVINDICACIONES**

1. Células (I) para su uso en el tratamiento de la inflamación en un sujeto, en donde las células se seleccionan porque tienen una potencia deseada para uno o más de los siguientes: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas y en donde, antes de la administración de las células (I) al sujeto, las células (I) se evalúan y seleccionan por tener la potencia deseada.
2. Las células para el uso de la reivindicación 1, en donde las células (I) son alogénicas.
3. Las células para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el sujeto es un ser humano.
4. Un método para construir un banco celular, comprendiendo el método expandir y almacenar, para su futura administración a un sujeto, células (I) que tienen una potencia deseada para uno o más de lo que se expone a continuación: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en donde las células (I) se evalúan por tener la potencia deseada.
5. Un método de descubrimiento de fármacos, comprendiendo el método exponer, *in vitro*, células (I) que tienen una potencia deseada para uno o más de lo que se expone a continuación: (1) reducir la extravasación de leucocitos, (2) reducir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular o a células endoteliales aisladas, (3) reducir la expresión de Fut-7 en leucocitos, (4) reducir la expresión de CD15s en un leucocito, a un agente para evaluar el efecto del agente en la capacidad de las células para llevar a cabo uno o más de (1)-(4) anteriores, siendo dichas células (I) células no embrionarias y no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y/o pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en donde las células (I) se evalúan por tener la potencia deseada.
6. Las células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde la adhesión es de E-selectina y/o P-selectina a CD15s.
7. Las células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde el leucocito es un linfocito, opcionalmente, en donde el linfocito es un linfocito CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>.
8. Las células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde el leucocito es un neutrófilo.
9. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex 1 o rox 1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de las capas germinales ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas.
10. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) pueden diferenciarse en tipos celulares de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
11. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) expresan telomerasa.
12. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) expresan oct4.
13. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) expresan oct4, telomerasa, rex-1 y rox-1.
14. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) proceden de médula ósea.
15. Las células para el uso o el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células (I) son células humanas.

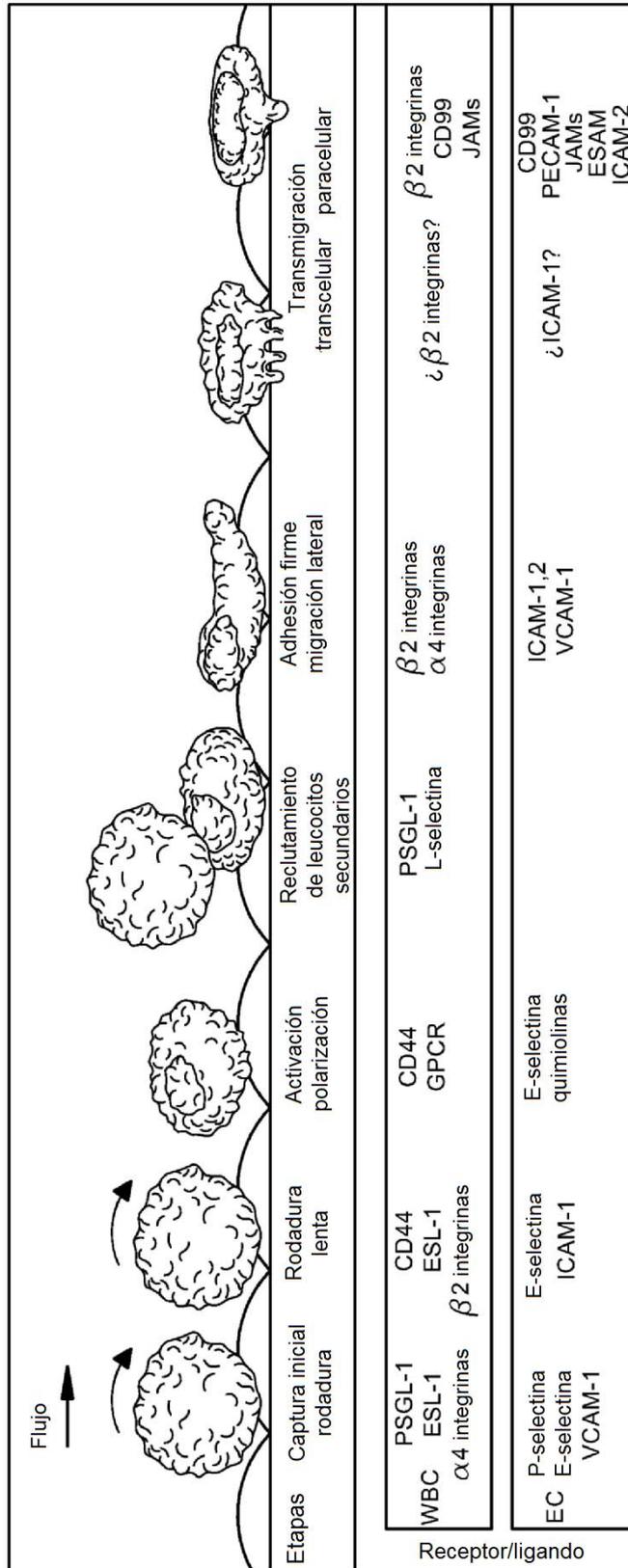
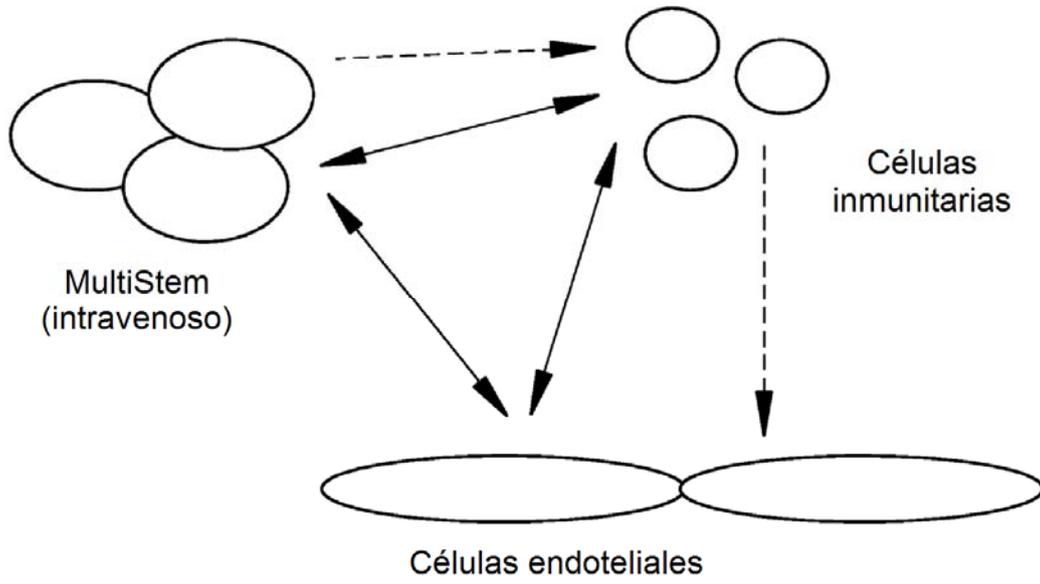
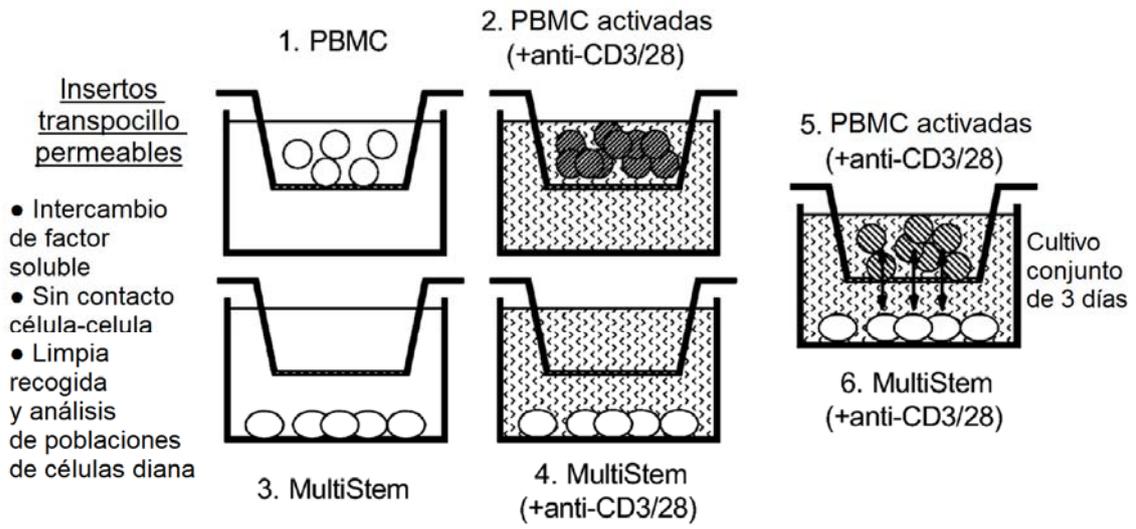


Figura 1

Señalización Cruzada entre MultiStem y Células Diana

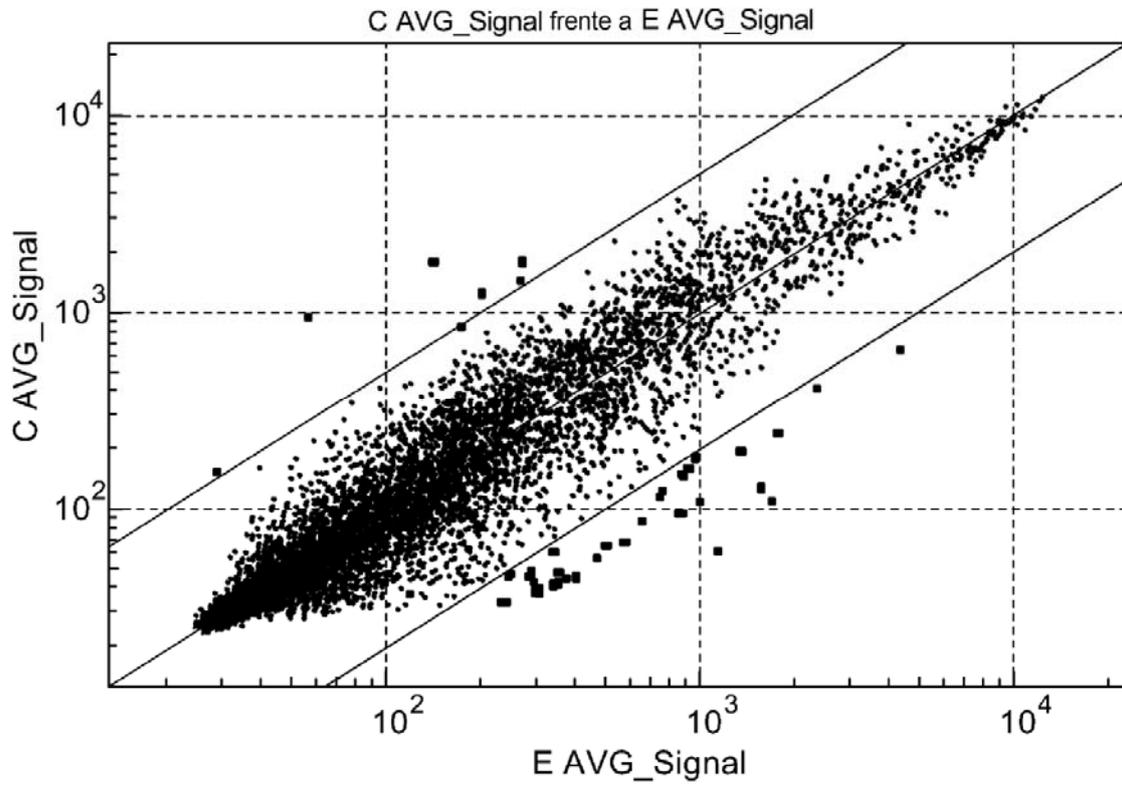


**Figura 2**

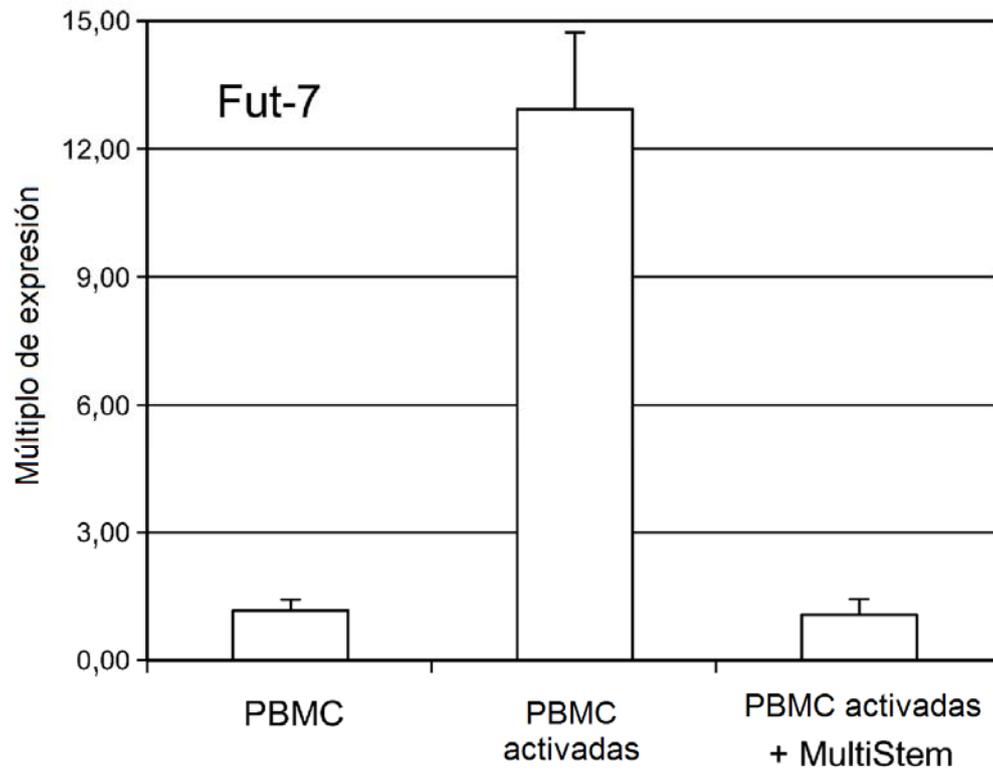


**Figura 3**

Respuesta de PBMC  
Expresión diferencial de factor 5  
43 genes



**Figura 4**



**Figura 5**

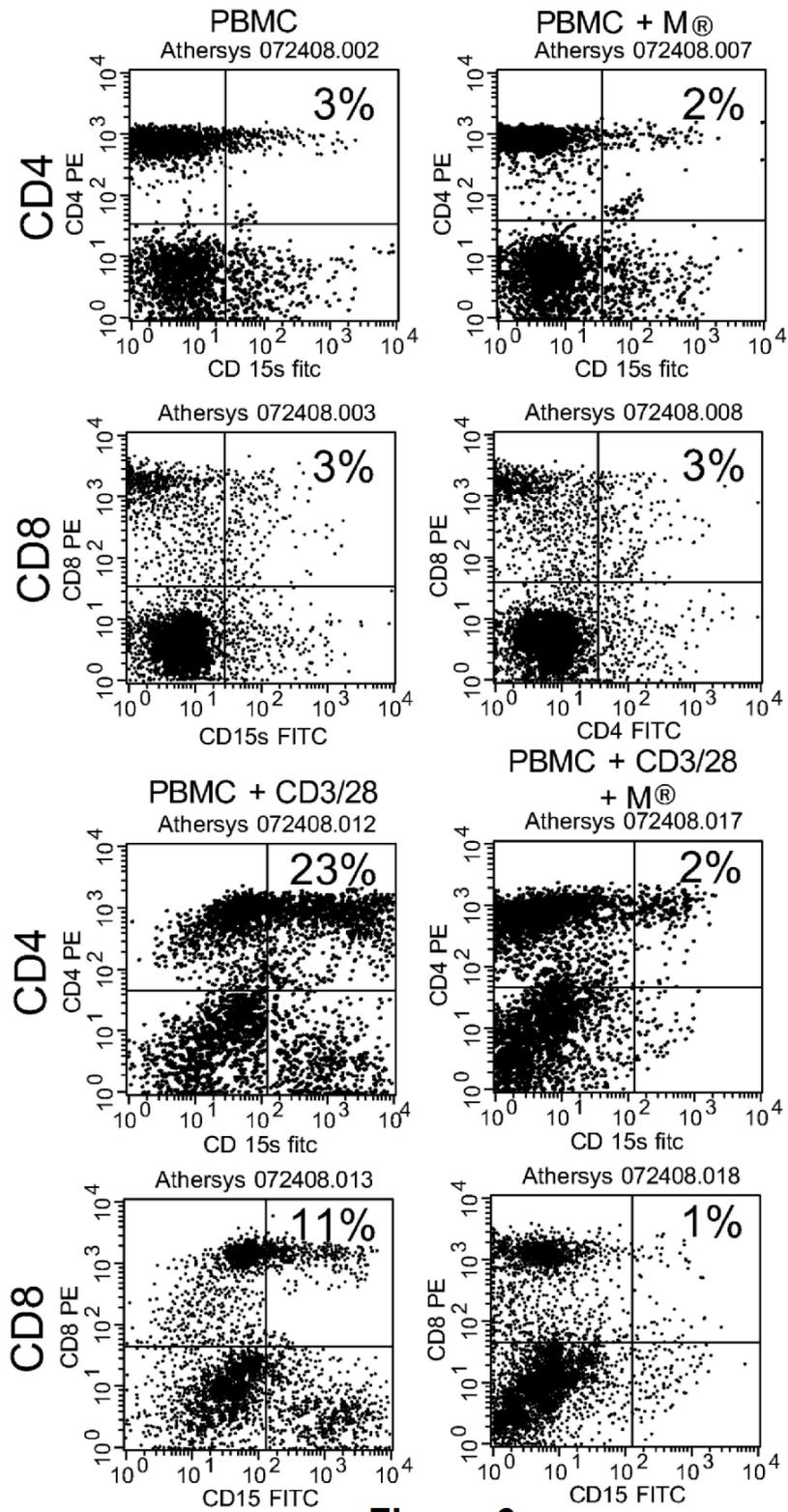


Figure 6

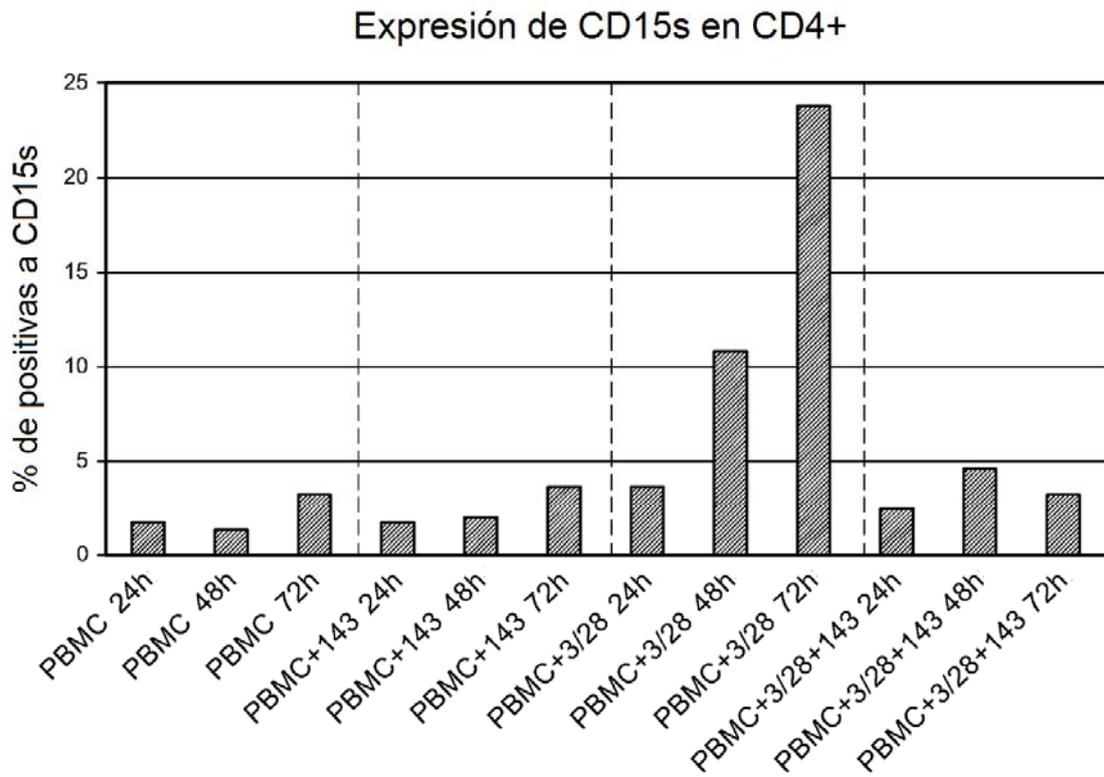


Figura 7

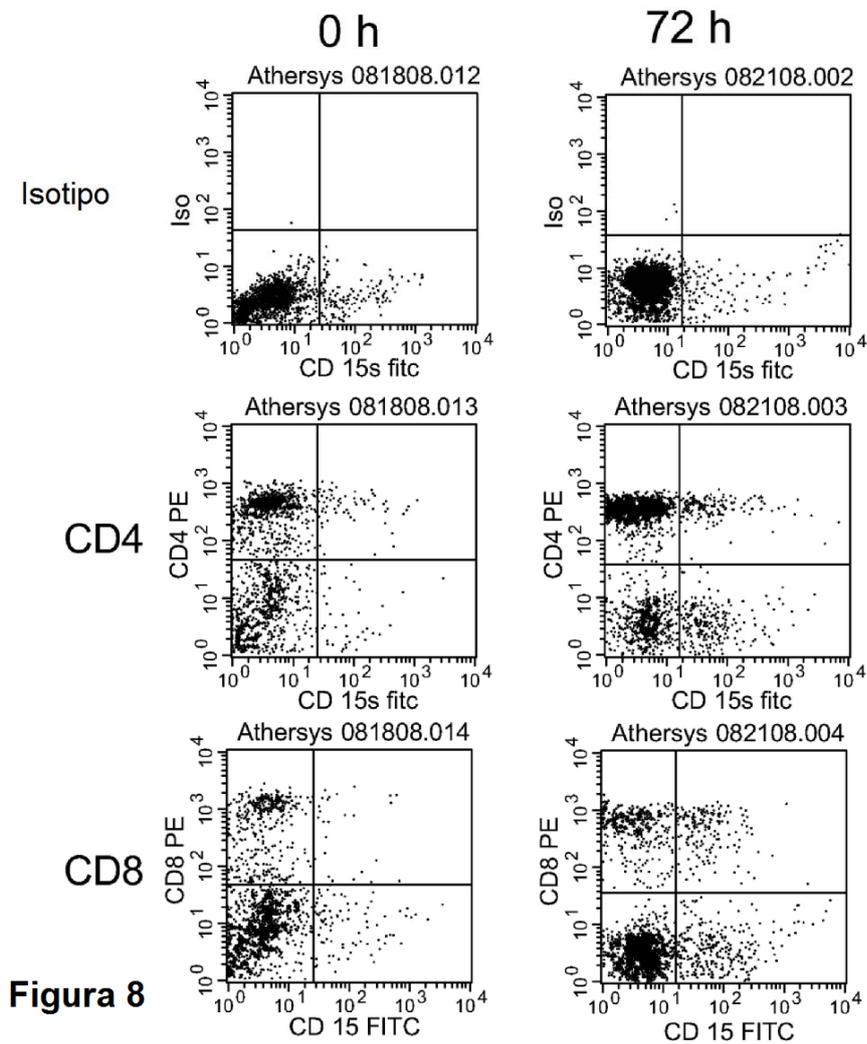
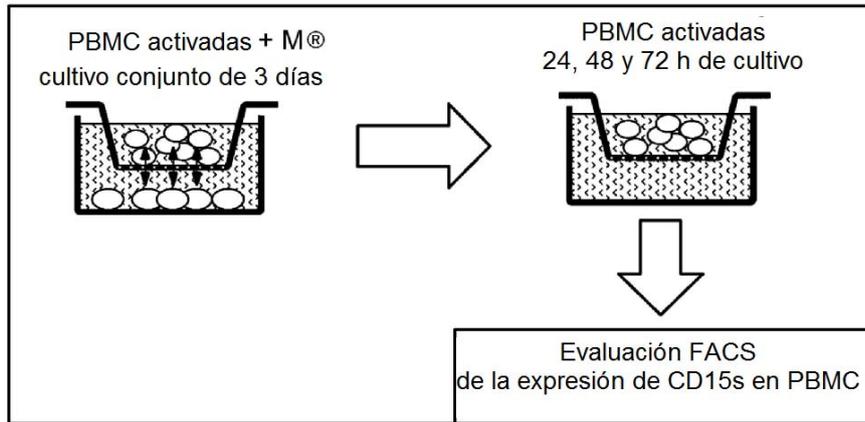
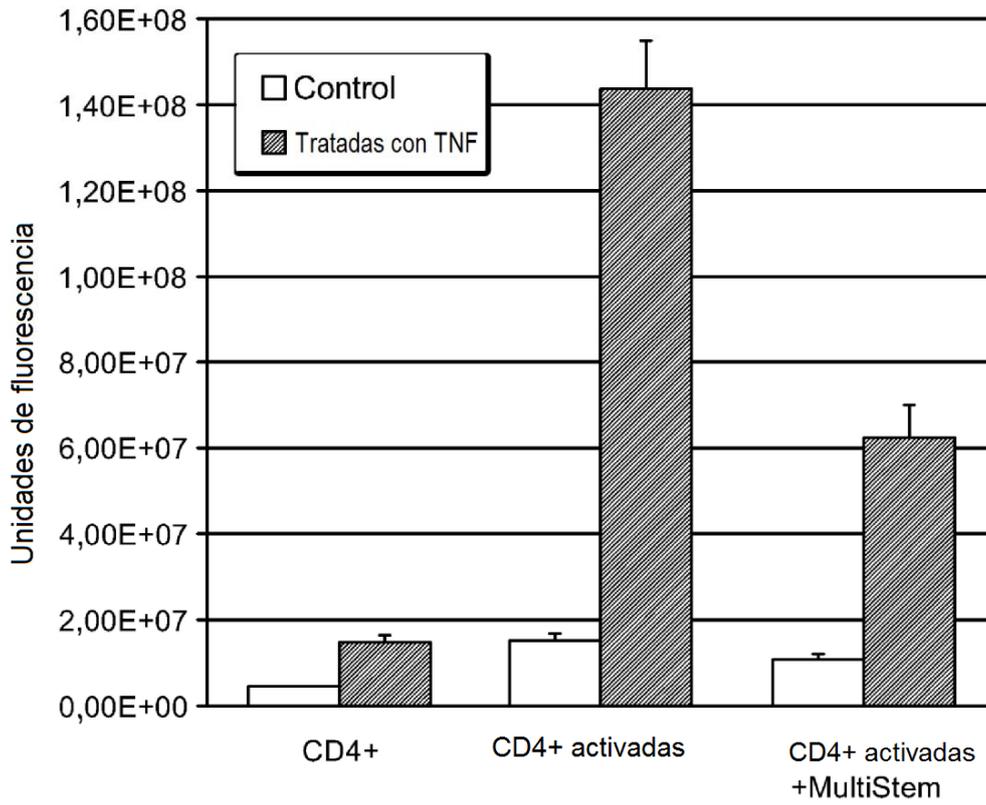
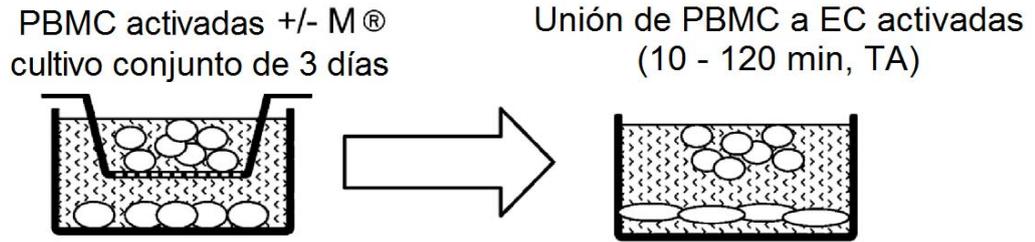
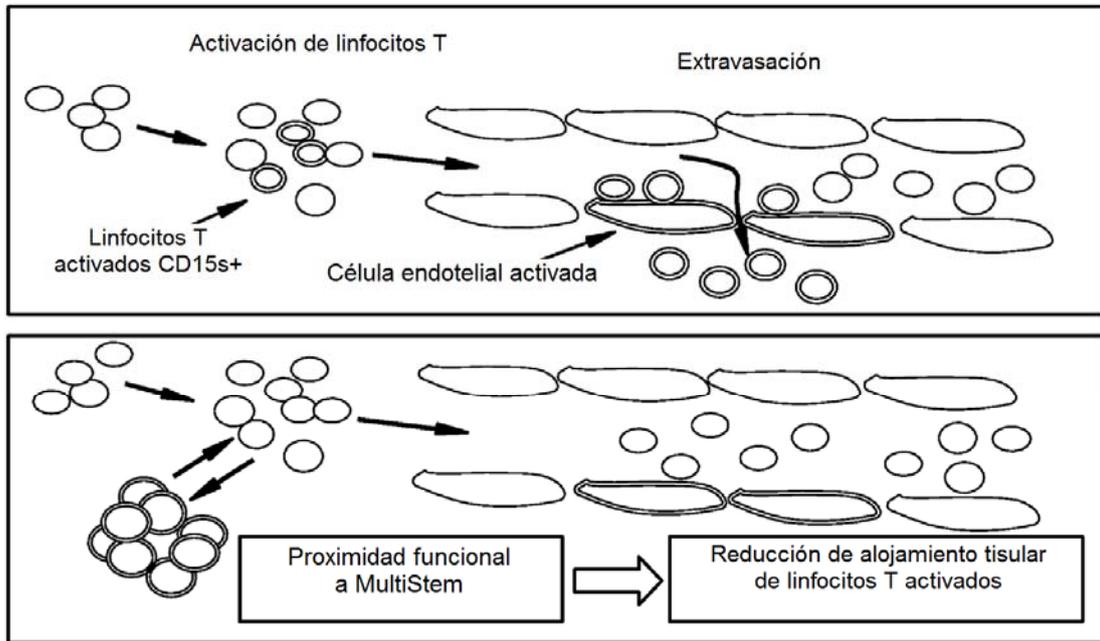


Figura 8



**Figura 9**

Afecciones inflamatorias



Posible mecanismo para la prevención de afecciones inflamatorias mediante MultiStem, por medio de señalización cruzada con células inflamatorias.

**Figura 10**

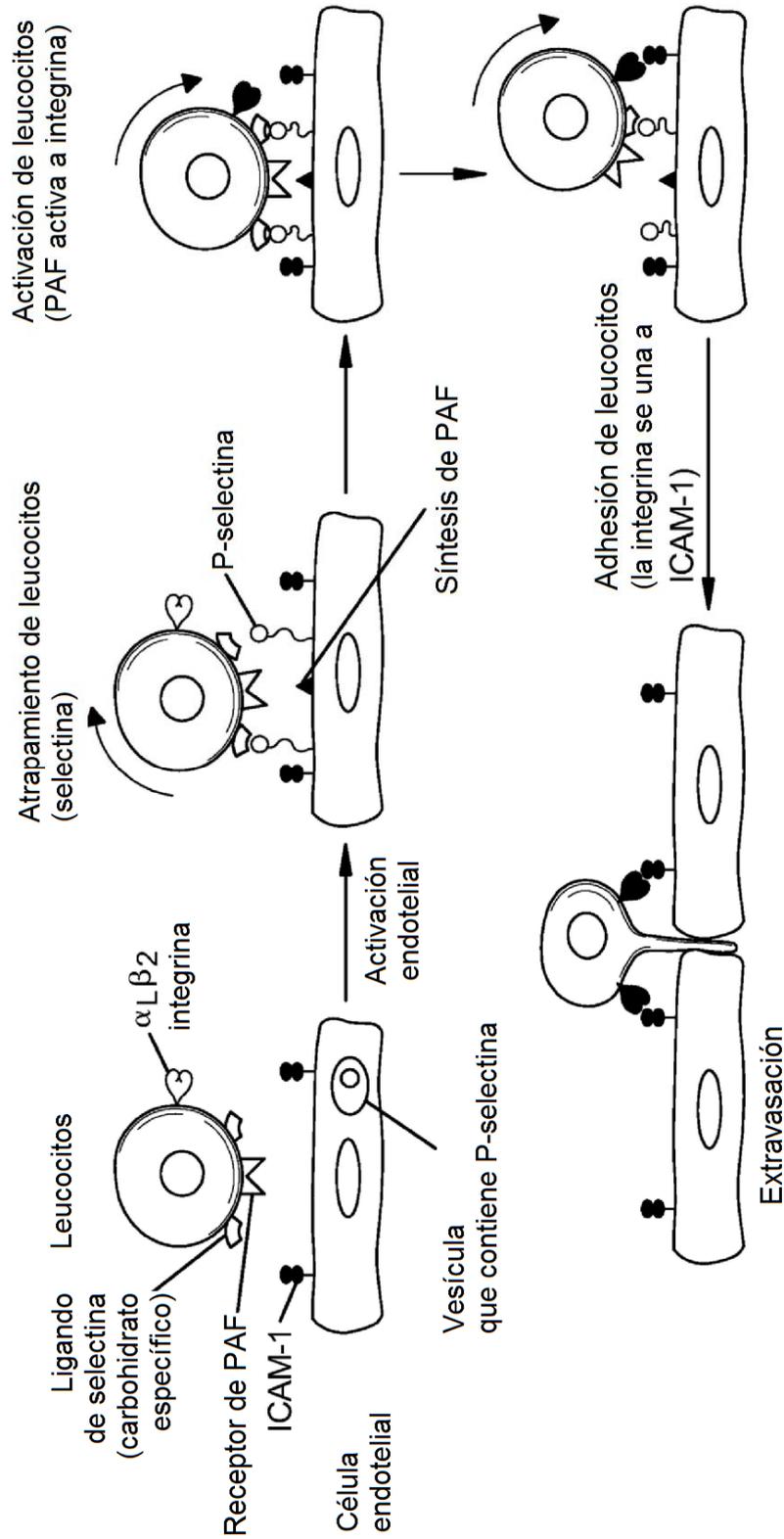


Figura 11