

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 428**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/545</b>	(2015.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/074</b>	(2010.01)
<b>A61K 38/19</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/20</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2011 PCT/US2011/025846**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11106365**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2011 E 11747958 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2539439**

54 Título: **Modulación de la angiogénesis**

30 Prioridad:

**25.02.2010 US 308103 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WODA, JULIANA, MEGAN;  
TING, ANTHONY, E. y  
LEHMAN, NICHOLAS, A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 703 428 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

Modulación de la angiogénesis

## 5 Campo de la invención

La divulgación se refiere a métodos para tratar afecciones patológicas que pueden mejorarse proporcionando angiogénesis. La divulgación se refiere en líneas generales a proporcionar angiogénesis administrando células que expresan y/o secretan uno o más factores proangiogénicos. La divulgación también se refiere a métodos de descubrimiento de fármacos para seleccionar agentes que modulen la capacidad de las células de expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos. La divulgación también se refiere a bancos de células que pueden usarse para proporcionar células para su administración a un sujeto, comprendiendo los bancos células que tienen niveles deseados de expresión y/o secreción de uno o más factores proangiogénicos. La divulgación también se refiere a composiciones que comprenden células que tienen niveles deseados específicos de expresión y/o secreción de uno o más factores proangiogénicos, tales como composiciones farmacéuticas. La divulgación también se refiere a métodos de diagnóstico realizados antes de administrar las células a un sujeto a tratar, que incluyen ensayos para evaluar la potencia deseada de las células a administrar. La divulgación se refiere además a ensayos de diagnóstico posttratamiento para evaluar el efecto de las células en un sujeto que se está tratando. Las células descritas en este documento son células madre no embrionarias, no germinales que pueden caracterizarse por uno o más de los siguientes: replicación prolongada en cultivo y expresión de marcadores de replicación prolongada, tales como telomerasa, marcadores de pluripotencialidad y amplio potencial de diferenciación, sin transformarse.

Sumario de la invención

25 Los aspectos de la invención para la que se busca protección se definen en las reivindicaciones.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona células que tienen expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8 para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección isquémica en un sujeto, siendo las células células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en las que, antes de la administración, dichas células se han ensayado para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8. Las células pueden ser alogénicas. La afección isquémica puede ser una afección seleccionada del grupo que consiste en infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía periférica, apoplejía, oclusión total crónica, isquemia renal y lesión renal aguda. El sujeto puede ser humano. Las células pueden ser células progenitoras multipotentes.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un medio para construir un banco de células, comprendiendo dicho método ensayar células para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, expandir y clasificar, para su futura administración a un sujeto, células que tienen la expresión y/o la secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, siendo las células células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas. Las células pueden ser células progenitoras multipotentes.

De acuerdo con un tercer aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para el descubrimiento de fármacos, comprendiendo dicho método exponer las células que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, a un agente para evaluar el efecto del agente sobre la capacidad de las células de expresar y secretar los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, siendo las células células madre no embrionarias, 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 capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas. Las células pueden haberse ensayado para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8. Las células pueden ser células progenitoras multipotentes.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para aumentar la expresión de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8 en una célula madre, comprendiendo el método exponer la célula a una combinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IPN $\gamma$ , o a un análogo de prostaglandina F, en el que dichas células son células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en el que el análogo de prostaglandina F es latanoprost. Las células pueden ser células progenitoras multipotentes.

La divulgación se refiere ampliamente a métodos para proporcionar angiogénesis.

La divulgación también se refiere a métodos para proporcionar uno o más factores proangiogénicos para proporcionar angiogénesis.

65

Los factores proangiogénicos incluyen, aunque sin limitación, FGF, VEGF, VEGFR, NRP-1, Ang1, Ang2, PDGF (homodímero-BB), PDGFR, TGF- $\beta$ , endogлина, receptores de TGF- $\beta$ , MCP-1, integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ , VE-caderina, CD31, efrina, activadores de plasminógeno, inhibidor-1 del activador de plasminógeno, eNOS, COX-2, AC133, Id1/Id3, angiogenina, HGF, Vegf, Il-1 alfa, 11-8, 11-6, Cxcl5, Fgf $\alpha$ , Fgf $\beta$ , Tgfa, Tgf $\beta$ , MMP (incluyendo mmp9), inhibidor-1 del activador de plasminógeno, trombospondina, angiopoyetina 1, angiopoyetina 2, amfíregulina, leptina, endotelina-1, AAMP, AGGF1, AMOT, ANGLPTL3, ANGPTL4, BTG1, IL-1 $\beta$ , NOS3, TNFSF12 y VASH2.

Proporcionar angiogénesis puede conseguirse administrando células que expresan de forma natural (es decir, de forma no recombinante) y/o que secretan uno o más factores proangiogénicos o medio acondicionado por las células. Las células incluyen, aunque sin limitación, células que son células madre no embrionarias y células no germinales, que tienen algunas características de las células madre embrionarias, pero que se obtienen de tejido no embrionario, y que expresan y/o secretan uno o más factores proangiogénicos. Las células pueden expresar/secretar de forma natural uno o más factores proangiogénicos (es decir, no están modificadas genética o farmacéuticamente para activar la expresión y/o la secreción). Sin embargo, los expresores naturales pueden modificarse de forma genética o farmacéutica para aumentar la potencia.

Las células pueden expresar marcadores de pluripotencia, tales como oct4. También pueden expresar marcadores asociados con la capacidad de replicación prolongada, tal como telomerasa. Otras características de pluripotencia pueden incluir la capacidad de diferenciarse en tipos de células de más de una capa germinal, tal como dos o tres de las capas germinales ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Dichas células pueden estar inmortalizadas o transformadas en cultivo o no. Las células pueden expandirse mucho sin transformarse y también mantienen un cariotipo normal. Por ejemplo, las células madre no embrionarias, no germinales pueden haber experimentado al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo, tal como 50, 60 o más, en las que las células no se transforman y tienen un cariotipo normal. Las células pueden diferenciarse en al menos un tipo celular de cada uno de dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico y pueden incluir diferenciación en los tres. Además, las células pueden no ser tumorigénicas, tal como no productoras de teratomas. Si las células se transforman o son tumorigénicas, y se desea usarlas para infusión, dichas células pueden deshabilitarse de modo que no puedan formar tumores *in vivo*, como por tratamiento que evita la proliferación celular en tumores. Dichos tratamientos son bien conocidos en la técnica.

Las células incluyen:

1. Células madre no embrionarias, no germinales expandidas y aisladas, habiendo experimentado las células al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo, en las que las células expresan oct4, no están transformadas y tienen un cariotipo normal.
2. Las células madre no embrionarias, no germinales de 1 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
3. Las células madre no embrionarias, no germinales de 1 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
4. Las células madre no embrionarias, no germinales de 3 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
5. Las células madre no embrionarias, no germinales de 3 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
6. Las células madre no embrionarias, no germinales de 5 anterior que expresan además uno o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
7. Células madre no embrionarias, no germinales expandidas y aisladas que se obtienen por cultivo de tejido no embrionario, no germinal, habiendo experimentado las células al menos 40 duplicaciones celulares en cultivo, en las que las células no se transforman y tienen un cariotipo normal.
8. Las células madre no embrionarias, no germinales de 7 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
9. Las células madre no embrionarias, no germinales de 7 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
10. Las células madre no embrionarias, no germinales de 9 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
11. Las células madre no embrionarias, no germinales de 9 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.

12. Las células madre no embrionarias, no germinales de 11 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.

13. Células madre no embrionarias, no germinales expandidas y aisladas, habiendo experimentado las células al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo, en las que las células expresan telomerasa, no están transformadas y tienen un cariotipo normal.

14. Las células madre no embrionarias, no germinales de 13 anterior que expresan además uno o más oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.

15. Las células madre no embrionarias, no germinales de 13 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.

16. Las células madre no embrionarias, no germinales de 15 anterior que expresan además uno o más oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.

17. Las células madre no embrionarias, no germinales de 15 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.

18. Las células madre no embrionarias, no germinales de 17 anterior que expresan además uno o más oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.

19. Células madre no embrionarias, no germinales expandidas y aisladas que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico, habiendo experimentado las células al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo.

20. Las células madre no embrionarias, no germinales de 19 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.

21. Las células madre no embrionarias, no germinales de 19 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.

22. Las células madre no embrionarias, no germinales de 21 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.

El sujeto puede ser humano.

Las células que expresan y/o secretan uno o más factores proangiogénicos pueden usarse en métodos de descubrimiento de fármacos para seleccionar un agente que module la capacidad de las células de expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos para que puedan proporcionar angiogénesis. Dichos agentes incluyen, aunque sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos de antisentido, ARNip, aptámeros de ADN, péptidos, anticuerpos, proteínas que no son anticuerpo, citocinas, quimiocinas y quimioatrayentes.

La potencia puede potenciarse exponiendo las células a una combinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Cualquiera de estos componentes podría usarse individualmente. Podrían usarse otras moléculas proinflamatorias incluyendo, aunque sin limitación, otras interleucinas o interferones tales como IL1- $\alpha$ , IL-6, TGF-b, GM-CSF, IL11, IL12, IL17, IL18, IL8, ligandos del receptor de tipo toll, incluyendo LPS, poli(1:C), CPGN-ODN y zimosano. La potencia puede potenciarse exponiendo las células a latanoprost, un análogo de prostaglandina F. Las células pueden exponerse a prostaglandina F, a cualquier otro análogo del receptor de prostaglandina F2 alfa, a prostaglandinas de tipo E o análogos.

Como los efectos angiogénicos descritos en esta solicitud pueden provocarse por factores secretados, no solamente las células, sino también el medio acondicionado (o extractos del mismo) producido del cultivo de las células, son útiles para conseguir los efectos. Dicho medio podría contener los factores secretados y, por lo tanto, podría usarse en lugar de las células o añadirse a las células. Por tanto, cuando pueden usarse células, debe entenderse que el medio acondicionado (o extractos del mismo) también sería eficaz y podría sustituirse o añadirse.

En vista de la propiedad de las células de conseguir los efectos angiogénicos, pueden establecerse bancos de células que contienen células que se seleccionan para que tengan una potencia deseada para expresar y secretar uno o más factores proangiogénicos para proporcionar angiogénesis. Por consiguiente, también se divulga el ensayo de células para la capacidad de expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos y la formación de bancos de células que tienen una potencia deseada. El banco puede proporcionar una fuente para generar una composición farmacéutica a administrar a un sujeto. Las células pueden usarse directamente del banco o expandirse antes de su uso. Especialmente en el caso de que las células se sometan a expansión adicional, después de la expansión es deseable validar que las células aún tengan la potencia deseada. Los bancos permiten el uso "inmediato" de células que son alogénicas para el sujeto.

Por consiguiente, también se divulgan procedimientos de diagnóstico realizados antes de administrar las células a un sujeto. Los procedimientos incluyen evaluar la potencia de las células para expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos para que puedan proporcionar angiogénesis. Las células pueden recogerse de un banco de células y usarse directamente o expandirse antes de la administración. En cualquier caso, las células podrían evaluarse para la potencia deseada. Especialmente en el caso de que las células se sometan a expansión adicional, después de la expansión es deseable validar que las células aún tengan la potencia deseada. O las células pueden obtenerse del sujeto y expandirse antes de la administración. En este caso, además, las células podrían evaluarse para la potencia deseada antes de la administración de nuevo al sujeto (autóloga).

Aunque las células que se seleccionan para la expresión de uno o más factores proangiogénicos se ensayan necesariamente durante el procedimiento de selección, puede ser preferible y prudente ensayar de nuevo las células antes de su administración a un sujeto para tratamiento para confirmar que las células aún expresan los niveles deseados de los factores. Esto es particularmente preferible cuando las células expresoras se han expandido o se han almacenado durante cualquier cantidad de tiempo, tal como en un banco de células, donde las células muy probablemente están congeladas durante el almacenamiento.

Con respecto a los métodos de tratamiento con células que expresan/secretan uno o más factores proangiogénicos, entre el aislamiento original de las células y la administración a un sujeto, puede haber múltiples ensayos (es decir, secuenciales) para la expresión de uno o más factores. Esto es para confirmar que las células aún expresan/secretan el uno o más factores proangiogénicos de las manipulaciones que se producen en este tramo de tiempo. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo después de cada expansión de las células. Si las células se almacenan en un banco de células, pueden ensayarse después de liberarse del almacenamiento. Si se congelan, pueden ensayarse después de descongelarse. Si las células del banco de células se expanden, pueden ensayarse después de la expansión. Preferiblemente, puede ensayarse una parte del producto celular final (es decir, la preparación celular que se administra físicamente al sujeto).

La divulgación incluye además ensayos de diagnóstico postratamiento, después de la administración de las células, para evaluar la eficacia. Los ensayos de diagnóstico incluyen, aunque sin limitación, el análisis de la angiogénesis por síntomas clínicos, morfológicamente (por ejemplo, presencia de vasos) o por uno o más biomarcadores de angiogénesis.

La divulgación también se refiere a métodos para establecer la dosificación de las células evaluando la potencia de las células para expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos para proporcionar angiogénesis. En este caso, la potencia se determinaría y la dosificación se ajustaría en consecuencia.

La potencia puede evaluarse midiendo las cantidades de los propios factores. También puede evaluarse ensayando los efectos que los factores proporcionan, tal como angiogénesis *in vivo* o *in vitro*.

La divulgación también se refiere a composiciones que comprenden una población de las células que tienen una potencia deseada y, particularmente, la expresión y/o secreción de cantidades deseadas de uno o más factores proangiogénicos. Dichas poblaciones pueden encontrarse como composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto y/o en bancos de células de los que pueden usarse las células directamente para su administración a un sujeto o expandirse antes de la administración. Las células pueden tener potencia potenciada (aumentada) en comparación con la población celular previa (precursora). Las células precursoras son como se definen en este documento. La potenciación puede ser por selección de expresores naturales o por factores externos que actúan sobre las células.

Los métodos y las composiciones de la divulgación son útiles para tratar cualquier enfermedad en que sea beneficiosa la angiogénesis. Esto incluye, aunque sin limitación, cualquier afección isquémica, por ejemplo, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía periférica, apoplejía, oclusión total crónica, isquemia renal y lesión renal aguda.

Para estos tratamientos, se administrarían las células que expresan el uno o más factores proangiogénicos. Dichas células podrían haberse evaluado para la cantidad del factor o factores que expresan y/o secretan y haberse seleccionado para las cantidades deseadas de expresión y/o secreción del factor o factores.

Se entiende que para el tratamiento de cualquiera de las enfermedades anteriores, puede ser conveniente usar dichas células; es decir, las que se han evaluado para la expresión y/o la secreción del uno o más factores y se han seleccionado por un nivel deseado de expresión y/o secreción antes de la administración para el tratamiento de la afección.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1 - MultiStem induce angiogénesis *in vitro* y secreta múltiples factores proangiogénicos (A). Fotografías de angiogénesis *in vitro* inducida por medio acondicionado MultiStem (CM) con HUVEC cultivadas. (B) Cantidad promedio de tubos formados por campo en cada condición. (C) Matriz de anticuerpos de angiogénesis incubados

con medio acondicionado del día 4 MultiStem. VEGF, IL-8 y CXCL5 se secretan por MultiStem. Concentraciones de proteína CXCL5 (D) VEGF (E) e IL-8 (F) en el medio usado de 3 días de cuatro cultivos diferentes ilustran que MultiStem expresa de forma constante estas proteínas en condiciones de cultivo convencionales.

5 Figura 2 - Se requiere VEGF para la angiogénesis inducida por MultiStem. La retirada de VEGF del medio acondicionado evita la angiogénesis (A), la inmunorreducción de VEGF completa y la especificidad de anticuerpo, mientras que los niveles de IL-8 (B) y CXCL5 (C) no se alteran. (D,E) La inmunorreducción de VEGF reduce la angiogénesis inducida por medio acondicionado MultiStem. La adición de al menos 250 pg/ml de VEGF165 o 10  
10 50 pg/ml de VEGF121 se requiere para restaurar algún nivel de angiogénesis aunque no se restaura completamente la actividad.

15 Figura 3 - La IL-8 es necesaria para la angiogénesis inducida por MultiStem. La inmunorreducción de IL-8 del medio acondicionado reducía la angiogénesis, pero la adición de IL-8 al medio basal era insuficiente para inducir la angiogénesis. (A) Se incubaron HUVEC durante 18 horas con (a) medio de factor de crecimiento endotelial (EGM), (b) medio MultiStem basal sin suero, (c) MultiStem CM sin suero de 4 días, (d) control de isotipo de IgG de conejo y (e) CM MultiStem sin suero de 4 días inmunorreducido para IL-8. (B) IL-8 se reduce por inmunorreducción (C,D), los niveles de VEGF y CXCL5 no cambiaron.

20 Figura 4 - Se requiere CXCL5 para la angiogénesis inducida por MultiStem. Sin embargo, IL-8 y CXCL5 son insuficientes para iniciar la angiogénesis. (A) Se incubaron HUVEC durante 18 horas con (a) medio de factor de crecimiento endotelial (EGM), (b) EGM + control de isotipo de IgG, c) EGM + 10 ug/ml de anticuerpo neutralizante de CXCL5, (d) medio MultiStem basal sin suero, (e) medio acondicionado MultiStem sin suero de 4 días en solitario (CM), (f) CM + control de isotipo de IgG, (g) CM + anticuerpo neutralizante de CXCL5 (10 ug/ml). (B,C) La adición de IL-8 (4000 pg/ml) o CXCL5 (150 pg/ml) en solitario o junto con medio basal MultiStem fue insuficiente para inducir la angiogénesis.  
25

30 Figura 5 - A diferencia de MultiStem, MSC no induce angiogénesis *in vitro*. (A) Ensayo de angiogénesis *in vitro* que ilustra la diferencia en los efectos de MSC y medio acondicionado MultiStem (CM) sobre la formación de tubos celulares endoteliales (B). Fotografías de un ensayo de angiogénesis *in vitro* que muestran los efectos de MSC y CM Multistem sobre la CM formación de tubos celulares endoteliales después de 6 horas y 24 horas. (C-E) Concentraciones de CXCL5, VEGF e IL-8 secretados por MSC y MultiStem.

35 Figura 6 - MultiStem y MSC tienen perfiles de secreción distintos. Análisis de medio acondicionado de MSC y MultiStem obtenidos del mismo donador (se analizaron 3 conjuntos de muestras del donador) en una matriz de anticuerpo específico de angiogénesis. (A) Fotos de la membrana desarrollada ilustran que el perfil de secreción de MultiStem es similar a MultiStem de otros donadores, pero muestran diferencias significativas en comparación con el perfil de secreción de MSC, incluso del mismo donador. (B) Análisis semicuantitativo de las matrices que muestran perfiles de secreción distintos de MSC frente a MultiStem, incluyendo expresión exclusiva de IL-8 por MultiStem. Los datos se expresan como el promedio de intensidad de mancha como un porcentaje del control positivo, normalizado de nuevo al contenido de proteínas totales.  
40

45 Figura 7 - El tratamiento de MultiStem con Cytomix aumenta la expresión de moléculas proangiogénicas *in vitro*. MultiStem se cultivó durante tres días y después se trató con Cytomix (10 ng/ml de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ ) durante 24, 48, 72 horas. Las células se recogieron posteriormente para el análisis por RT-PCR para la expresión de genes proangiogénicos. La expresión génica de CXCL5, FGF2 y HGF aumentaba sobre el nivel basal con tratamiento de Cytomix. Adicionalmente, IL-8 también aumentaba en estas condiciones.

50 Figura 8 - El análisis de micromatriz también muestra una regulación por aumento de la expresión de genes angiogénicos en MultiStem tratado con Cytomix (48 horas). La figura muestra una muestra de factores angiogénicos que estaban regulados. El análisis de micromatriz muestra un aumento en factores proangiogénicos en MultiStem tratado con Cytomix durante 6 o 48 horas. Se analizó el ARN de MultiStem tratado con Cytomix (n = 6 por punto temporal) o MultiStem no tratado (n = 6 por punto temporal) en un chip de micromatriz Illumina (HumanHT-12\_V4). Se examinaron dos bancos MultiStem. Esta figura da ejemplos del aumento factorial para una muestra de los genes proangiogénicos regulados por aumento. Se requiere confirmación adicional por qPCR y está actualmente en proceso.  
55

60 Figura 9 - El tratamiento con Cytomix aumenta el potencial angiogénico de MultiStem en el ensayo de formación de tubos de HUVEC. La figura muestra la puntuación de la angiogénesis. El tratamiento de MultiStem con Cytomix aumenta la angiogénesis en el ensayo de formación de tubos de HUVEC. El medio acondicionado sin suero recogido de las células después de tres días muestra que aunque el medio acondicionado de MultiStem sin tratar daba una robusta formación de tubos de HUVEC, el tratamiento de las células con Cytomix provocaba un aumento del potencial angiogénico. El medio acondicionado sin suero de MSC de Lonza no inducía formación significativa de tubos de HUVEC. El tratamiento de MSC aumentaba solo ligeramente el potencial angiogénico. EGM = medio de crecimiento endotelial (control positivo). EBM = medio endotelial basal sin suero (control negativo).  
65

Figuras 10A-C - El pretratamiento de MultiStem con prostaglandina F o latanoprost (agonista de prostaglandina F) aumenta la expresión de los factores angiogénicos por MultiStem *in vitro*. El tratamiento de MultiStem con un análogo de prostaglandina F, latanoprost, también aumentaba la expresión de factores proangiogénicos. MultiStem se trató con un intervalo de dosis de latanoprost durante 24, 48 o 72 horas. La expresión génica de los factores proangiogénicos entonces se analizó por RT-PCR. La expresión génica de KITLG (A), HGF y VEGF (B), e Il-8 (C) se aumentó. El agente biológico, prostaglandina F, también aumentó los niveles de VEGF A (B).

Figura 11 - Ensayo de formación de tubos de HUVEC para ensayar el potencial angiogénico de MultiStem tratado con latanoprost (1 uM). La formación de tubos de HUVEC aumentaba moderadamente con el medio acondicionado de células tratadas con latanoprost en comparación con medio acondicionado de células no tratadas. Se recogió medio sin suero en el día tres de MultiStem cultivado en solitario o en presencia de latanoprost (1 uM). El medio basal o el medio basal con latanoprost añadido no inducía formación significativa de tubos. Por el contrario, el medio acondicionado de células no tratadas en solitario o con latanoprost (1 uM) añadido al medio después de recogerlo, induce angiogénesis a niveles iguales. El medio acondicionado sin suero recogido de células tratadas durante tres días con latanoprost aumentaba el potencial angiogénico moderadamente, medido por este ensayo *in vitro*. Los medios MultiStem que contenían EGM y suero sirvieron como controles positivos. Los medios EBM y basal sin suero fueron los controles negativos.

Figura 12 - Puede utilizarse análisis de angiogénesis *In vitro* para examinar la potencia de diferentes lotes de células y protocolos de procesamiento. La medición del potencial angiogénico usando el ensayo de formación de tubos de HUVEC puede usarse para evaluar la potencia de la función de las células de diferentes lotes de células (descongelado a-f) o diferente procesamiento acondicionado (descongelado-f frente 24 h A-F).

#### Descripción detallada de la invención

Los encabezados de sección se usan en este documento con fines organizativos únicamente y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de la materia en cuestión descrita.

Los métodos y las técnicas de la presente solicitud se realizan en general 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 analizan durante toda la presente memoria descriptiva salvo que se indique lo contrario. 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

"Un" o "una" significa en este documento uno o más de uno; al menos uno. Cuando se usa la forma plural en este documento, en general incluye el singular.

Un "banco de células" es la nomenclatura industrial para células que se han cultivado y almacenado para uso futuro. Las células pueden almacenarse en alícuotas. Pueden usarse directamente del almacenamiento o pueden expandirse después del almacenamiento. Esto es una comodidad ya que hay células "inmediatas" disponibles para su administración. Las células pueden estar almacenadas en un excipiente farmacéuticamente aceptable de modo que puedan administrarse directamente o pueden mezclarse con un excipiente apropiado cuando se liberan del almacenamiento. Las células pueden congelarse o almacenarse de otro modo en una forma para conservar su viabilidad. Pueden crearse bancos de células en que las células se han seleccionado para expresión potenciada de uno o más factores proangiogénicos. Después de la liberación del almacenamiento, y antes de su administración al sujeto, puede ser preferible ensayar de nuevo las células para la potencia, es decir, el nivel de expresión de uno o más factores proangiogénicos. Esto puede hacerse usando cualquiera de los ensayos, directos o indirectos, descritos en esta solicitud o conocidos de otro modo en la técnica. Entonces, las células que tienen la potencia deseada pueden entonces administrarse al sujeto para el tratamiento. Los bancos pueden generarse usando células obtenidas del individuo a tratar (de sus tejidos prenatales tales como placenta, sangre de cordón umbilical o matriz de cordón umbilical o expandirse a partir del individuo en cualquier momento después del nacimiento). O los bancos pueden contener células para usos alogénicos.

"Coadministrar" significa administrar junto con otro, conjuntamente, de forma coordinada, incluyendo administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

"Que comprende" significa, sin otra limitación, que incluye lo mencionado, necesariamente, sin ninguna reserva o exclusión sobre cualquier otra cosa que pueda incluirse. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" abarca cualquier composición que contiene x e y, sin importar otros componentes que puedan estar presentes en la composición. Asimismo, "un método que comprende la etapa de x" abarca cualquier método en que se realiza x, sea x la única etapa en el método o sea únicamente una de las etapas, sin importar cuantas otras etapas pueda haber y sin importar como de simple o complejo es x en comparación con ellas. "Comprendido de y frases similares usando

palabras de la raíz "comprender" se usan en este documento como sinónimos de "que comprende" y tienen el mismo significado.

"Comprendido de" es un sinónimo de "que comprende" (véase anteriormente).

"Medio de cultivo celular acondicionado" es una expresión bien conocida en la técnica y se refiere a medio en que se han cultivado células. En este documento, esto significa que las células se cultivan durante un tiempo suficiente para secretar los factores que son eficaces para conseguir cualquiera de los resultados descritos en esta solicitud, incluyendo proporcionar angiogénesis o proporcionar uno o más factores proangiogénicos.

Medio de cultivo celular acondicionado se refiere a medio en que se han cultivado células para que secreten factores al medio. Las células pueden cultivarse a través de un número suficiente de divisiones celulares para producir cantidades eficaces de dichos factores de modo que el medio tenga los efectos, incluyendo proporcionar angiogénesis o proporcionar uno o más factores proangiogénicos. Las células se retiran del medio por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, centrifugación, filtración, inmunorreducción (por ejemplo, mediante anticuerpos marcados y columnas magnéticas), y clasificación FACS.

Las "células EC" se descubrieron a partir del análisis de un tipo de cáncer llamado teratocarcinoma. En 1964, los investigadores apreciaron que una única célula en teratocarcinomas podía aislarse y permanecer indiferenciada en cultivo. Este tipo de célula madre llegó a ser conocido como célula de carcinoma embrionario (célula EC).

"Cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado que resulta de proporcionar angiogénesis. Por ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para lograr un resultado clínico beneficioso o deseado. La cantidad eficaz puede proporcionarse toda de una vez en una única administración o en cantidades fraccionadas 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 lesión que se está tratando, y la cantidad de tiempo desde que se ha producido la lesión o a empezado la enfermedad. Un experto en la materia también será capaz de determinar la cantidad eficaz para un sujeto dado basándose en estas consideraciones que son rutinarias en la técnica. Como se usa en este documento, con respecto al tratamiento, "dosis eficaz" significa lo mismo que "cantidad eficaz".

"Ruta eficaz" generalmente significa una ruta que proporciona el suministro de un agente a un compartimento, sistema o localización deseada. Por ejemplo, una ruta eficaz es una a través de la que puede administrarse un agente para proporcionar en el sitio deseado de acción una cantidad del agente suficiente para lograr un resultado clínico beneficioso o deseado.

Las "células madre embrionarias (ESC)" son bien conocidas en la técnica y se han preparado a partir de muchas especies de mamífero diferentes. Las ESC se describen en este documento por referencia únicamente ya que no están cubiertas por las reivindicaciones. Las células madre embrionarias son células madre derivadas de la masa celular interior de un embrión en fase temprana conocido como blastocisto. Pueden diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales principales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estas incluyen cada uno de los más de 220 tipos celulares en el cuerpo adulto. Las células ES pueden convertirse en cualquier tejido en el organismo, excluyendo la placenta. Únicamente las células de la mórula son totipotentes, con capacidad de convertirse en todos los tejidos y una placenta. Algunas células similares a ESC pueden producirse por transferencia nuclear de un núcleo de célula somática en un óvulo fertilizado enucleado.

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

"Aumentar" o "aumento" significa inducir un evento biológico completamente o aumentar el grado del evento.

"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. Estas células entonces pueden inducirse para que se diferencien en descendencia menos diferenciada. Las células IPS se han obtenido usando modificaciones de una estrategia originalmente descubierta en 2006 (Yamanaka, S. *et al.*, Cell Stem Cell, 1:39-49 (2007)). Por ejemplo, en un caso, para crear células IPS, los científicos empezaron con células de piel que después se modificaron por una técnica de laboratorio convencional usando retrovirus para insertar genes en el ADN celular. En un caso, los genes insertados eran Oct4, Sox2, Lif4 y c-myc, conocidos por actuar conjuntamente como reguladores naturales para mantener las células en un estado de tipo 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 muestran las IPSC y los métodos para producirlas. También es posible que dichas células puedan crearse por condiciones de cultivo específicas (exposición a agentes específicos).

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 están asociados con la célula o células *in vivo*. Una "población enriquecida" significa un

aumento relativo en los números de una célula deseada respecto a uno o más tipos celulares diferentes *in vivo* o en cultivo primario.

5 Sin embargo, como se usa en este documento, el término "aislado" no indica la presencia de únicamente células madre. En su lugar, el término "aislado" indica que las células se retiran de su entorno tisular natural y se presentan a una concentración mayor en comparación con el entorno tisular normal. Por consiguiente, una población de células "aislada" puede incluir además tipos celulares además de células madre y puede incluir componentes tisulares adicionales. Esto también puede expresarse en términos de duplicaciones celulares, por ejemplo. Una célula puede experimentar 10, 20, 30, 40 o más duplicaciones *in vitro* o *ex vivo* de modo que se enriquezca en comparación con sus números originales *in vivo* o en su entorno tisular original (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica, placenta, cordón umbilical, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, etc.).

15 "MAPC" es un acrónimo para "célula progenitora adulta multipotente". Se refiere a una célula que no es una célula madre embrionaria o célula germinal, sino que tiene algunas características de estas. La MAPC puede caracterizarse en varias descripciones alternativas, cada una de las cuales conferiría novedad a las células cuando se descubrieron. Pueden caracterizarse, por lo tanto, por una o más de esas descripciones. En primer lugar, tienen capacidad de replicación prolongada en cultivo sin transformarse (tumorigénica) y con un cariotipo normal. En segundo lugar, pueden dar lugar a descendencia celular de más de una capa germinal, tal como dos o las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) después de la diferenciación. En tercer lugar, aunque no son células madre embrionarias o células germinales, pueden expresar marcadores de estos tipos celulares primitivos de modo que las MAPC pueden expresar uno o más de Oct 3/4 (es decir, Oct 3A), rex-1 y rox-1. También pueden expresar uno o más de sox-2 y SSEA-4. En cuarto lugar, como una célula madre, pueden autorrenovarse, es decir, tienen una capacidad de replicación prolongada sin transformarse. Esto significa que estas células expresan telomerasa (es decir, tienen actividad telomerasa). Por consiguiente, el tipo celular que se denominó "MAPC" puede caracterizarse por características básicas alternativas que describen la célula mediante algunas de sus propiedades novedosas.

20 El término "adulto" en MAPC no es restrictivo. Se refiere a una célula somática no embrionaria. Las MAPC son normales en su cariotipo y no forman teratomas *in vivo*. Este acrónimo se usó por primera vez en la patente de Estados Unidos n.º 7 015 037 para describir una célula pluripotente aislada de médula ósea. Sin embargo, las células con marcadores pluripotenciales y/o potencial de diferenciación se han descubierto posteriormente y, pueden ser equivalentes a aquellas células denominadas por primera vez "MAPC." Se proporcionan descripciones esenciales del tipo de célula MAPC en el sumario de la invención anterior.

25 Las MAPC representan 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)).

30 El término "MultiStem®" es la marca registrada para una preparación de células basada en las MAPC de la patente de Estados Unidos n.º 7 015 037, es decir, una célula madre no embrionaria, no germinal como se describe anteriormente. MultiStem® se prepara de acuerdo con métodos de cultivo celular divulgados en esta solicitud de patente, particularmente, menor contenido de oxígeno y mayor contenido de suero.

35 "Vehículo farmacéuticamente aceptable" es cualquier medio farmacéuticamente aceptable para las células usadas. Dicho medio puede retener la isotonicidad, el metabolismo celular, el pH y similares. Es compatible con la administración a un sujeto *in vivo*, y puede usarse, por lo tanto, para suministro celular y el tratamiento.

40 El término "potencia" se refiere al grado de eficacia de las células (o medio acondicionado de las células) para conseguir los diversos efectos descritos en esta solicitud. Por consiguiente, la potencia se refiere al efecto a diversos niveles, incluyendo, aunque sin limitación, (1) proporcionar angiogénesis, (2) expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos o (3) tratar un síntoma clínico asociado con angiogénesis inadecuada para reducir (incluyendo prevenir) el síntoma.

45 Las "células germinales embrionarias primordiales" (células PG o EG) pueden cultivarse y estimularse para producir tipos celulares mucho menos diferenciados. Las células PG o EG se describen en este documento por referencia únicamente ya que no están cubiertas por las reivindicaciones.

50 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 hasta el final. Las células progenitoras definidas, tales como "células progenitoras cardíacas", están comprometidas a un linaje, pero no a un tipo celular específico o diferenciado hasta el final. El término "progenitor" como se usa en el acrónimo "MAPC" no limita estas células a un linaje particular. Una célula progenitora puede formar célula de la descendencia que está más altamente diferenciada que la célula progenitora.

55 El término "reducir", como se usa en este documento, significa prevenir, así como disminuir. En el contexto de tratamiento, "reducir" es prevenir o mejorar uno o más síntomas clínicos. Un síntoma clínico es uno (o más) que tiene

o tendrá, si se deja sin tratar, un impacto negativo sobre la calidad de vida (salud) del sujeto. También se aplica a los efectos biológicos subyacentes, cuyo resultado final sería mejorar los efectos perjudiciales de la angiogénesis inadecuada.

5 "Seleccionar" una célula con un nivel deseado de potencia (por ejemplo, para expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos) puede significar la identificación (como mediante ensayo), aislamiento y expansión de una célula. Esto podría crear una población que tiene una potencia mayor que la población de células precursoras de la que se aisló la célula. La población de células "precursoras" se refiere a las células precursoras a partir de las que se dividieron las células seleccionadas. "Precursor" se refiere a una relación  $P1 \rightarrow F1$  real (es decir, una célula de la descendencia).  
10 De modo que, si la célula X se aísla de una población mixta de células X e Y, en que X es un expresor e Y no, no se clasificaría un simple aislado de X como con expresión potenciada. Pero, si una célula de la descendencia de X es un expresor superior, se clasificaría la célula de la descendencia como con expresión potenciada.

15 Seleccionar una célula que expresa el uno o más factores proangiogénicos, incluiría tanto un ensayo para determinar si hay expresión/secreción del uno o más factores proangiogénicos y también incluiría obtener la célula expresora. La célula expresora puede expresar de forma natural el uno o más factores proangiogénicos en que la célula no expresa el factor o factores por medios recombinantes. Pero un expresor puede mejorarse incubándolo con o exponiéndolo a un agente que aumenta la expresión del factor. La población celular de la que se selecciona la célula expresora puede no ser conocida por expresar el uno o más factores proangiogénicos antes de realizar el ensayo.

20 La selección podría ser de células en un tejido. Por ejemplo, en este caso, se aislarían células de un tejido deseado, se expandirían en cultivo, se seleccionarían para la expresión/secreción de uno o más factores proangiogénicos y las células seleccionadas se expandirían adicionalmente.

25 La selección también podría ser de células *ex vivo*, tales como células en cultivo. En este caso, se ensayaría una o más de las células en cultivo para la expresión/secreción de uno o más factores proangiogénicos y las células obtenidas que expresan/secretan uno o más factores proangiogénicos podrían expandirse adicionalmente.

30 Las células también podrían seleccionarse para expresión/secreción potenciada de uno o más factores proangiogénicos. En este caso, la población celular de la que se obtiene el expresor potenciado puede que ya exprese/crete el uno o más factores proangiogénicos. La expresión/secreción potenciada significa una cantidad (expresión y/o secreción) promedio mayor de uno o más factores proangiogénicos por célula que en la población expresora precursora.

35 La población precursora de la que se selecciona el expresor superior puede ser sustancialmente homogénea (el mismo tipo celular). Una manera para obtener un expresor superior a partir de esta población es crear células individuales o combinaciones de células y ensayar esas células o combinaciones de células para la expresión/secreción de uno o más factores proangiogénicos para obtener clones que expresen/secreten de forma natural niveles potenciados de uno o más factores proangiogénicos (en oposición al tratamiento de las células con un inductor de uno o más factores proangiogénicos) y después expandir esas células que son expresores superiores de forma natural.  
40

45 Sin embargo, las células pueden tratarse con uno o más agentes que potenciarán la expresión del factor del gen celular endógeno para el factor. Por tanto, pueden tratarse poblaciones sustancialmente homogéneas para potenciar la expresión.

50 Si la población no es sustancialmente homogénea, entonces, es preferible que la población de células precursoras a tratar contenga al menos 100 del tipo de célula expresora en que se busca la expresión potenciada, más preferiblemente al menos 1000 de las células, y aún más preferiblemente, al menos 10 000 de las células. Después del tratamiento, esta subpoblación puede recuperarse de la población heterogénea por técnicas de selección celular conocidas y expandirse adicionalmente si se desea.

55 Por tanto, los niveles deseados de expresión del factor pueden ser aquellos que son mayores que los niveles en una población precedente dada. Por ejemplo, las células que se ponen en cultivo primario a partir de un tejido y se expanden y aíslan por condiciones de cultivo que no están diseñadas específicamente para promover la expresión del factor, pueden proporcionar una población precursora. Dicha población precursora puede tratarse para potenciar la expresión promedio del factor por célula o cribarse para una célula o células dentro de la población que expresa niveles superiores mayores sin tratamiento deliberado. Dichas células pueden expandirse entonces para proporcionar una población con una expresión mayor (deseada).

60 "Autorrenovación" se refiere a la capacidad de producir células madre hijas replicadas que tienen potencial de diferenciación que es idéntico a las de aquellas de las que surgen. Un término similar usado en este contexto es "proliferación".

65 "Célula madre" significa una célula que puede experimentar autorrenovación (es decir, descendencia con el mismo potencial de diferenciación) y también producir células de la descendencia que están más restringidas en el potencial de diferenciación. Dentro del contexto de la invención, una célula madre también abarcaría una célula más diferenciada

que se ha desdiferenciado, por ejemplo, mediante la introducción de factores de transcripción específicos, o mediante cultivo en condiciones específicas. Por motivos de referencia, fuera del contexto de la invención, la desdiferenciación también puede producirse por transferencia nuclear o por fusión con una célula madre más primitiva. 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 desdiferenciación también puede causarse mediante la administración de determinados compuestos o la exposición a un entorno físico *in vitro* o *in vivo* que causaría la desdiferenciación. Las células madre también pueden obtenerse de tejido anómalo, tal como un teratocarcinoma y algunas otras fuentes tales como cuerpos embrioides (aunque estos pueden considerarse células madre embrionarias porque se obtienen de tejido embrionario, aunque no directamente de la masa celular interior). Las células madre también pueden producirse introduciendo genes asociados con la función de la célula madre en una célula que no es célula 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, aunque sin limitación, seres humanos, perros, gatos, caballos, vacas y cerdos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente determinado para producir cualquier respuesta terapéutica en un mamífero. Por ejemplo, los agentes terapéuticos eficaces pueden prolongar la supervivencia del paciente, y/o inhibir los síntomas clínicos evidentes. Los tratamientos que son terapéuticamente eficaces dentro del significado de la expresión como se usa en este documento, incluyen tratamientos que mejoran la calidad de vida de un sujeto incluso si no mejoran el resultado de la enfermedad *per se*. Dichas cantidades terapéuticamente eficaces se averiguan fácilmente por un experto en la materia. Por tanto, "tratar" significa suministrar dicha cantidad. Por tanto, el tratamiento puede prevenir o mejorar los síntomas patológicos de angiogénesis inadecuada.

"Tratar", "que trata", o "tratamiento" se usan ampliamente en relación con la invención y cada uno de estos términos abarca, entre otros, prevención, mejora, inhibición o cura de una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso perjudicial, incluyendo los que interfieren con y/o son el resultado de una terapia.

"Validar" significa confirmar. En contexto de la divulgación, se confirma que una célula es un expresor con una potencia deseada. Esto es de tal manera que entonces se puede usar esa célula (en tratamiento, formación de bancos, cribado de fármacos, etc.) con una expectativa de eficacia razonable. Por consiguiente, validar significa confirmar que las células, que se ha encontrado originalmente que tienen/se han establecido como que tienen actividad proangiogénica, de hecho, retienen esa actividad. Por tanto, la validación es un evento de verificación en un proceso de dos eventos que implica la determinación original y la determinación de seguimiento. El segundo evento se menciona en este documento como "validación."

#### Células madre

La presente invención puede ponerse en práctica, usando células madre únicamente como se define en las reivindicaciones, que pueden ser de especies vertebradas, tales como seres humanos, primates no humanos, animales domésticos, ganado u otros mamíferos no humanos. Los tipos de células madre (de los que las células madre embrionarias y las células germinales están fuera del alcance de las reivindicaciones y se marcan "por motivos de referencia" en consecuencia) se describen a continuación.

#### Células madre embrionarias (por motivos de referencia)

La célula madre mejor estudiada es la célula madre embrionaria (ESC) ya que tiene autorrenovación ilimitada y potencial de diferenciación multipotente. Estas células se obtienen de la masa celular interior del blastocisto o pueden obtenerse de las células germinales primordiales de un embrión posimplante (células germinales embrionarias o células EG). Las células ES y EG se han obtenido, por primera vez de ratón, y posteriormente de muchos animales diferentes, y más recientemente, también de primates no humanos y seres humanos. Cuando se introducen en blastocistos de ratón o blastocistos de otros animales, las ESC pueden contribuir a todos los tejidos del animal. Las células ES y EG pueden identificarse por tinción positiva con anticuerpos contra SSEA1 (ratón) y SSEA4 (ser humano). Véanse, por ejemplo, las patentes de 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, que muestran células madre embrionarias y métodos de generación y expansión de las mismas. Por consiguiente, las ESC y los métodos para aislarlas y expandirlas son bien conocidas en la técnica.

Se han identificado varios factores de transcripción y citocinas exógenas que influyen en el estado de potencia de las células madre embrionarias *in vivo*. El primer factor de transcripción a describir 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 puede activar la transcripción de genes, que contiene una secuencia octamérica llamada "el motivo octamérico" dentro del promotor o región potenciadora. Oct4 se expresa en el momento de la fase de

escisión del cigoto fertilizado hasta que se forma el cilindro del óvulo. La función de Oct3/4 es reprimir los genes que inducen diferenciación (es decir, FoxaD3, hCG) y activar los genes que promueven la pluripotencia (FGF4, Uff1, Rex1). Sox2, un miembro de los factores de transcripción de secuencia de grupo de alta movilidad (HMG), coopera con Oct4 activando la transcripción de genes expresados en la masa celular interior. Es esencial que la expresión de Oct3/4 en las células madre embrionarias se mantenga entre determinados niveles. La sobreexpresión o regulación por disminución de >50 % del nivel de expresión de Oct4 alterará el destino de la célula madre embrionaria, con la formación de endodermo/mesodermo primitivo o trofotodermo, respectivamente. *In vivo*, embriones con deficiencia de Oct4 se desarrollan hasta la fase de blastocisto, pero las células de la masa celular interior no son pluripotentes. En su lugar, se diferencian a lo largo del linaje de trofoblasto extraembrionario. Sall4, un factor de transcripción Spalt de mamífero, es un regulador anterior de Oct4 y, por lo tanto, es importante para mantener los niveles apropiados de Oct4 durante las fases tempranas de embriología. Cuando los niveles de Sall4 caen por debajo de un determinado umbral, las células del trofotodermo se expandirán de forma ectópica en la masa celular interior. Otro factor de transcripción requerido para la pluripotencia es Nanog, por el nombre de una tribu céltica "Tir Nan Og": la tierra de los siempre jóvenes. *In vivo*, Nanog se expresa desde la fase de la mórula compactada, se define posteriormente en la masa celular interior y se regula por disminución mediante la fase de implante. La regulación por disminución de Nanog puede ser importante para evitar una expansión incontrolada de células pluripotentes y para permitir la diferenciación de múltiples linajes 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 sin epiblasto discernible.

## 20 Células madre no embrionarias

Se han identificado células madre en la mayoría de los tejidos. Quizá, la mejor caracterizada es la célula madre hematopoyética (HSC). Las HSC son células derivadas del mesodermo que pueden purificarse usando marcadores de superficie celular y características funcionales. Se han aislado de médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical, hígado fetal y el saco vitelino. Inician la hematopoyesis y generan múltiples linajes hematopoyéticos. Cuando se trasplantan en animales irradiados de forma mortal, pueden repoblar la combinación celular de neutrófilos eritroides-macrófagos, megacariocitos y células linfoides hematopoyéticas. También pueden inducirse para que experimenten algo de división celular de autorrenovación. Véanse, por ejemplo, las patentes de 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 Estados Unidos n.º 5 192 553 informa de métodos para aislar células madre o progenitoras hematopoyéticas neonatales o fetales humanas. La patente de Estados Unidos n.º 5 716 827 informa de células hematopoyéticas humanas que son progenitores Thy-1+, y medios de cultivo apropiados para regenerarlas *in vitro*. La patente de Estados Unidos n.º 5 635 387 informa de un método y dispositivo para cultivar células hematopoyéticas humanas y sus precursores. La patente de Estados Unidos n.º 6 015 554 describe un método de reconstitución de células linfoides y dendríticas humanas. Por consiguiente, las HSC y los métodos para aislarlas y expresarlas son bien conocidas en la técnica.

Otra célula madre que es bien conocido en la técnica es la célula madre neural (NSC). Estas células pueden proliferar *in vivo* y regenerar de forma continua al menos algunas células neuronales. Cuando se cultivan *ex vivo*, las células madre neurales pueden inducirse a proliferar, así como a diferenciarse en diferentes tipos de neuronas y células de la glía. Cuando se trasplantan en el cerebro, las células madre neurales pueden injertarse y generar células neurales y de la glía. Véanse, 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 Estados Unidos n.º 5 851 832 informa de células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral. La patente de Estados Unidos n.º 5 766 948 informa de la producción de neuroblastos a partir de hemisferios cerebrales de recién nacidos. Las patentes de Estados Unidos n.º 5 564 183 y 5 849 553 informan del uso de células madre de la cresta neural de mamífero. La patente de Estados Unidos n.º 6 040 180 informa de la generación *in vitro* de neuronas diferenciadas a partir de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamífero. El documento WO 98/50526 y el documento WO 99/01159 informan de la generación y aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocitos-astrocitos y precursores neuronales de linaje restringido. La patente de Estados Unidos n.º 5 968 829 informa de células madre neurales obtenidas de prosencéfalo embrionario. Por consiguiente, las células madre neurales y los métodos para generarlas y expandirlas son bien conocidos en la técnica.

Otra célula madre que se ha estudiado ampliamente en la técnica es la célula madre mesenquimatosa (MSC). Las MSC se obtienen de mesodermo embrionario y pueden aislarse de muchas fuentes, incluyendo médula ósea adulta, sangre periférica, grasa, placenta y sangre umbilical, entre otras. Las MSC pueden diferenciarse en muchos tejidos mesodérmicos, incluyendo músculo, hueso, cartílago, grasa y tendón. Hay bibliografía considerable sobre estas células. Véanse, por ejemplo, las patentes de 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 células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADSC) que se han aislado de grasa, típicamente por liposucción seguida de liberación de las ADSC usando colagenasa. Las ADSC son similares en muchos aspectos a las MSC derivadas de médula ósea, excepto en que es posible aislar muchas más células de la grasa. Se ha informado de 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 son conocidas en la técnica incluyen células madre gastrointestinales, células madre epidérmicas y células madre hepáticas, que también se han llamado "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 madre no embrionarias que se ha informado que pueden diferenciarse en tipos celulares de más de una capa germinal embrionaria incluyen, aunque sin limitación, células de sangre de cordón umbilical (véase la publicación de Estados Unidos n.º 2002/0164794), placenta (véase la publicación de Estados Unidos n.º 2003/0181269, matriz de cordón umbilical (Mitchell, K.E. et al., *Stem Cells*, 21:50-60 (2003)), células madre de tipo embrionario pequeñas (Kucia, M. et al., *J Physiol Pharmacol*, 57 Suppl 5:5-18 (2006)), células madre de líquido amniótico (Atala, A., *J Tissue Regen Med*, 1:83-96 (2007)), precursores derivados de piel (Toma et al., *Nat Cell Biol*, 3:778-784 (2001)) y médula ósea (véanse la publicación de Estados Unidos n.º 2003/0059414 y 2006/0147246).

#### Estrategias de reprogramación de células somáticas (por motivos de referencia)

Se han empleado varias estrategias diferentes tales como trasplante nuclear, fusión celular y reprogramación inducida por cultivo para inducir la conversión de células diferenciadas en un estado embrionario. La transferencia nuclear implica la inyección de un núcleo somático en un ovocito enucleado que, tras la transferencia a una madre sustituta, puede dar lugar a un clon ("clonación reproductora") o, tras el explante en cultivo, puede dar lugar a células madre embrionarias (ES) genéticamente coincidentes ("transferencia nuclear de células somáticas", SCNT). La fusión celular de células somáticas con células ES provoca la generación de híbridos que muestran todas las características de las células ES pluripotentes. El explante de células somáticas en cultivo selecciona líneas celulares inmortales que pueden ser pluripotentes o multipotentes. Actualmente, las células madre de espermatogonias son la única fuente de células pluripotentes que pueden obtenerse de animales posnatales. La transducción de células somáticas con factores definidos puede iniciar la reprogramación a un estado pluripotente. Estas estrategias experimentales se han revisado ampliamente (Hochedlinger y Jaenisch, *Nature*, 441:1061-1067 (2006) y Yamanaka, S., *Cell Stem Cell*, 1:39-49 (2007)).

#### Transferencia nuclear (por motivos de referencia)

El trasplante nuclear (NT), también mencionado como transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), indica la introducción de un núcleo desde una célula somática donadora a un ovocito enucleado para generar un animal clonado tal como la oveja Dolly (Wilmut et al., *Nature*, 385:810-813 (1997). La generación de animales vivos por NT demostró que el estado epigenético de las células somáticas, incluyendo el de las células diferenciadas hasta el final, aunque estable, no se fija de forma irreversible, sino que puede reprogramarse a un estado embrionario que puede dirigir el desarrollo de un nuevo organismo. Además de proporcionar una estrategia experimental excitante para dilucidar los mecanismos epigenéticos básicos implicados en el desarrollo embrionario y enfermedades, la tecnología de clonación nuclear es de interés potencial para la medicina de trasplante específico de paciente.

#### Fusión de células somáticas y células madre embrionarias (por motivos de referencia)

La reprogramación epigenética de núcleos somáticos a un estado indiferenciado se ha demostrado en híbridos murinos producidos por fusión de células embrionarias con células somáticas. Los híbridos entre diversas células somáticas y células de carcinoma embrionario (Solter, D., *Nat Rev Genet*, 7:319-327 (2006), células germinales embrionarias (EG) o ES (Zwaka y Thomson, *Development*, 132:227-233 (2005)) comparten muchas características con las células embrionarias precursoras, lo que indica que el fenotipo pluripotente es dominante en dichos productos de fusión. Como con ratón (Tada et al., *Curr Biol*, 11:1553-1558 (2001)), las células ES humanas tienen el potencial de reprogramar núcleos somáticos después de la fusión (Cowan et al., *Science*, 309:1369-1373(2005)); Yu et al., *Science*, 318:1917-1920 (2006)). La activación de marcadores de pluripotencia silenciosos tales como Oct4 o la reactivación del cromosoma X somático inactivo proporcionó evidencias 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 los marcadores de pluripotencia, que se observa por primera vez 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)).

#### Reprogramación inducida por cultivo

Las células pluripotentes se han obtenido de fuentes embrionarias tales como blastómeros y la masa celular interna (ICM) del blastocisto (células ES), del epiblasto (células EpiSC), de células germinales primordiales (células EG) y células madre de espermatogonias postnatales ("maGSCsm", células "de tipo ES"). Las células aisladas de células madre embrionarias y células germinales se describen por motivos de referencia únicamente. Las siguientes células pluripotentes, junto con la célula/tejido donador es de la siguiente manera: células ES partogénicas se obtienen de ovocitos murinos (Narasimha et al., *Curr Biol*, 7:881-884 (1997)); las células madre embrionarias se han obtenido de blastómeros (Wakayama et al., *Stem Cells*, 25:986-993 (2007)); las células de la masa celular interior (fuente no aplicable) (Eggan et al., *Nature*, 428:44-49 (2004)); células germinales embrionarias y de carcinoma embrionario se han obtenido de células germinales primordiales (Matsui et al., *Cell*, 70:841-847 (1992)); GMCS, maSSC y MASC se

han obtenido de células madre de espermatogonias (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)); células EpiSC se obtienen de epiblastos (Brons et al., *Nature*, 448:191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448:196-199(2007)); células ES partogénicas se han obtenido de ovocitos humanos (Cibelli et al., *Science*, 295L819 (2002); Revazova et al., *Cloning Stem Cells*, 9:432-449 (2007)); células ES humanas se han obtenido de blastocistos humanos (Thomson et al., *Science*, 282:1145-1147 (1998)); 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 de cordón umbilical (obtenidas de sangre de cordón umbilical) (van de Ven et al., *Exp Hematol*, 35:1753-1765 (2007)); células derivadas de la neuroesfera obtenidas de células neurales (Clarke et al., *Science*, 288:1660-1663 (2000)). Las células donadoras del linaje de células germinales tales como PGC o células madre de espermatogonia son conocidas por ser unipotentes *in vivo*, pero se ha demostrado que pueden aislarse células de tipo ES pluripotentes (Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119:1001-1012 (2004) o maGSCs (Guan et al., *Nature*, 440:1199-1203 (2006) después de cultivo *in vitro* prolongado. Aunque la mayoría de estos tipos celulares pluripotentes tenían capacidad de diferenciación *in vitro* y de formación de teratoma, únicamente las células ES, EG, EC y las células maGCS derivadas de células madre de espermatogonia o células de tipo ES eran pluripotentes por criterios más rigurosos, ya que podían formar quimeras posnatales y contribuir a la línea germinal. Recientemente, se obtuvieron células madre de espermatogonia adultas multipotentes (MASC) a partir de células madre de espermatogonia testiculares de ratones adultos, y estas células tenían un perfil de expresión diferente del de las células ES (Seandel et al., *Nature*, 449:346-350 (2007)) pero similar a las células EpiSC, que se obtuvieron del epiblasto de embriones de ratón posimplante (Brons et al., *Nature*, 448:191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448:196-199 (2007)).

#### Reprogramación por factores de transcripción definidos

Takahashi y Yamanaka han informado de la reprogramación de células somáticas de nuevo a un estado de tipo ES (Takahashi y Yamanaka, *Cell*, 126:663-676 (2006)). Reprogramaron satisfactoriamente fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y fibroblastos adultos en células de tipo ES pluripotentes después de transducción mediada por virus de los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-myc y Klf4 seguido de selección para la activación del gen diana de Oct4 Fbx15 (figura 2A). Las células que habían activado Fbx15 se denominaron células iPS (madre pluripotentes inducidas) y demostraron ser pluripotentes mediante su capacidad de formar teratomas, aunque no podían generar quimeras vivas. Este estado pluripotente dependía de la expresión vírica continua de los genes Oct4 y Sox2 transducidos, mientras que los genes Oct4 y Nanog endógenos no se expresaban o se expresaban a un nivel inferior que en células ES, y se encontró que sus promotores respectivos estaban metilados en gran medida. Esto es coherente con la conclusión de que las células Fbx15-iPS no correspondían a células ES, pero pueden haber representado un estado incompleto de reprogramación. Aunque los experimentos genéticos habían establecido que Oct4 y Sox2 eran 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)), la función de los dos oncogenes c-myc y Klf4 en la reprogramación está menos clara. Algunos de estos oncogenes pueden ser, de hecho, prescindibles para la reprogramación, ya que se han obtenido células iPS de ratón y humanas en ausencia de transducción de c-myc, aunque con baja eficacia (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

Las MAPC humanas se describen en la patente de Estados Unidos 7 015 037. Las MAPC se han identificado en otros mamíferos. Las MAPC murinas, por ejemplo, también se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7 015 037. Las MAPC de rata también se describen en la patente de Estados Unidos n.º 7 838 289.

Estas referencias describen MAPC aisladas por primera vez por Catherine Verfaillie.

#### Aislamiento y crecimiento de MAPC

Los métodos de aislamiento de MAPC son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7 015 037, y estos métodos, junto con la caracterización (fenotipo) de MAPC. Las MAPC pueden aislarse de múltiples fuentes incluyendo, aunque sin limitación, médula ósea, placenta, cordón umbilical y sangre de cordón umbilical, músculo, cerebro, hígado, médula espinal, sangre o piel. Es posible, por lo tanto, obtener aspirados de médula ósea, biopsias de cerebro o de hígado, y otros órganos, y aislar las células usando técnicas de selección positiva o negativa disponibles para los expertos en la materia, que dependen de los genes que se expresan (o no se expresan) en estas células (por ejemplo, por ensayos funcionales o morfológicos tales como los divulgados en las solicitudes mencionadas anteriormente).

Las MAPC también se han obtenido por métodos modificados descritos en Breyer et al., *Experimental Hematology*, 34:1596-1601 (2006) y Subramanian et al., *Cellular Programming and Reprogramming: Methods and Protocols*; S. Ding (ed.), *Methods in Molecular Biology*, 636:55-78 (2010).

65

MAPC de médula ósea humana como se describe en la patente de Estados Unidos 7 015 037

Las MAPC no expresan el antígeno común de leucocitos CD45 o la glucoforina A específica de eritroblastos (Gly-A). La población mixta de células se sometió a separación en Ficoll Hypaque. Las células entonces se sometieron a selección negativa usando anticuerpos anti-CD45 y anti-Gly-A, reduciendo la población de células CD45+ y Gly-A+, y entonces se recuperaron el restante aproximadamente 0,1 % de células mononucleares de médula. Las células también podían sembrarse en placa en pocillos recubiertos con fibronectina y cultivarse como se describe a continuación durante 2-4 semanas para reducir las células de células CD45+ y Gly-A+. En cultivos de células de médula ósea adherentes, muchas células estromales adherentes experimentan senescencia replicativa en aproximadamente la duplicación celular 30 y una población más homogénea de células sigue expandiéndose y mantiene telómeros largos.

Como alternativa, podría usarse selección positiva para aislar células mediante una combinación de marcadores específicos de célula. Ambas técnicas de selección positiva y negativa están disponibles para los expertos en la materia, y numerosos anticuerpos monoclonales y policlonales adecuados para fines de selección negativa están también disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, Leukocyte Typing V, Schlossman, et al., eds. (1995) Oxford University Press) y están disponibles en el mercado en varias fuentes.

Las técnicas para la separación de células de mamífero de una mezcla de poblaciones celulares también se han descrito por Schwartz, et al., en la patente de Estados Unidos n.º 5 759 793 (separación magnética), Basch et al., 1983 (cromatografía de inmunoafinidad), y Wysocki y Sato, 1978 (clasificación de células activada por fluorescencia).

Las células pueden cultivarse en medio de cultivo de bajo contenido en suero o sin suero. El medio sin suero usado para cultivar las MAPC se describe en la patente de Estados Unidos 7 015 037. Los factores de crecimiento habitualmente usados incluyen, aunque sin limitación, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento epidérmico. Véanse, por ejemplo, las patentes de 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; todas muestran el cultivo de células en medio sin suero.

Métodos de cultivo adicionales

En experimentos adicionales, la densidad a la que las MAPC se cultivan puede variar de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> o de 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> a aproximadamente 2000 células/cm<sup>2</sup>. La densidad puede variar entre especies. Adicionalmente, la densidad óptima puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo y la fuente de las células. Pertenece a las habilidades de los expertos en la materia determinar la densidad óptima para un conjunto dado de condiciones de cultivo y células.

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

Las células pueden cultivarse en diversas concentraciones de suero, por ejemplo, aproximadamente un 2-20 %. Puede usarse suero bovino fetal. Puede usarse mayor contenido de suero en combinación con menores tensiones de oxígeno, por ejemplo, aproximadamente un 15-20 %. Las células no tienen que seleccionarse antes de la adherencia a las placas de cultivo. Por ejemplo, después de un gradiente de Ficoll, las células pueden sembrarse directamente en placa, por ejemplo, 250 000-500 000/cm<sup>2</sup>. Las colonias adherentes seleccionarse, posiblemente combinarse y expandirse.

En un caso, usado en los procedimientos experimentales en los ejemplos, se usaron condiciones de alto contenido en suero (aproximadamente un 15-20 %) y bajo contenido en oxígeno (aproximadamente un 3-5 %) para el cultivo celular. Específicamente, las células adherentes de colonias se sembraron en placa 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 un caso específico para MAPC, los complementos son factores celulares o componentes que permiten que las MAPC retengan la capacidad de diferenciarse en tipos celulares de más de un linaje embrionario, tal como los tres linajes. Esto puede indicarse mediante la expresión de marcadores específicos del estado indiferenciado, tal como Oct 3/4 (Oct 3A) y/o marcadores de alta capacidad de expansión, tal como telomerasa.

Cultivo celular

Para todos los componentes enumerados a continuación, véase el documento U.S. 7 015 037.

En general, las células útiles para la invención pueden mantenerse y expandirse en medio de cultivo que está disponible y es bien conocido en la técnica. También se contempla la complementación del medio de cultivo celular con suero de mamífero. También pueden usarse complementos adicionales de forma ventajosa para suministrar a las

células los oligoelementos necesarios para el crecimiento óptimo y la expansión. También pueden usarse de forma ventajosa hormonas en cultivo celular. También pueden usarse lípidos y transportadores lipídicos para complementar el medio de cultivo celular, dependiendo del tipo de célula y el destino de la célula diferenciada. También se contempla el uso de capas celulares de alimentación.

5 Las células en cultivo pueden mantenerse en suspensión o adherirse a un soporte sólido, tal como componentes de matriz extracelular. Las células madre a menudo requieren factores adicionales que favorezcan su adhesión a un soporte sólido, tal como colágeno de tipo I y tipo II, sulfato de condroitina, fibronectina, "superfibronectina" y polímeros de tipo fibronectina, gelatina, poli-D y poli-L-lisina, trombospondina y vitronectina. La presente divulgación puede utilizar fibronectina. Véanse, por ejemplo, Ohashi et al., *Nature Medicine*, 13:880-885 (2007); Matsumoto et al., *J Bioscience and Bioengineering*, 105:350-354 (2008); Kirouac et al., *Cell Stem Cell*, 3:369-381 (2008); Chua et al., *Biomaterials*, 26:2537-2547 (2005); Drobinskaya et al., *Stem Cells*, 26:2245-2256 (2008); Dvir-Ginzberg et al., *FASEB J*, 22:1440-1449 (2008); Turner et al., *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 82B:156-168 (2007); y Miyazawa et al., *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22:1959-1964 (2007)).

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

20 Una vez establecidas en cultivo, las células pueden usarse frescas o congeladas y almacenarse como soluciones madre congeladas usando, por ejemplo, DMEM con FCS al 40 % y DMSO al 10 %. Otros métodos para preparar soluciones madre congeladas para células cultivadas también están disponibles para los expertos en la materia.

#### Formulaciones farmacéuticas

25 El documento U.S. 7 015 037 muestra formulaciones farmacéuticas. Las poblaciones celulares pueden estar presentes de una composición adaptada para y adecuada para suministro, es decir, fisiológicamente compatible.

30 La pureza de las células (o medio acondicionado) para la administración a un sujeto puede ser de aproximadamente un 100 % (sustancialmente homogéneas). Puede ser de un 95 % a un 100 %. Puede ser de un 85 % a un 95 %. Particularmente, en el caso de mezclas con otras células, el porcentaje puede ser de aproximadamente un 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 %. O el aislamiento/pureza puede expresarse en términos de duplicaciones celulares donde las células han experimentado, por ejemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 o más duplicaciones celulares.

35 La elección de la formulación para administrar las células para una aplicación dada dependerá de una diversidad de factores. Los prominentes entre estos serán la especie del sujeto, la naturaleza de la afección que se está tratando, su estado o distribución en el sujeto, la naturaleza de otros tratamientos y agentes que se están administrando, la vía óptima de administración, la supervivencia mediante la vía, la pauta posológica y otros factores que serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, la elección de vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y la naturaleza de la forma galénica particular.

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

45 Las células/medio pueden formularse en una forma de forma galénica inyectable, tal como una solución, suspensión o emulsión. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección de células/medio típicamente son soluciones y dispersiones acuosas estériles. Los vehículos para formulaciones inyectables pueden ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, 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.

50 Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o medios opcionales en las composiciones a administrar en métodos descritos en este documento. Típicamente, cualquier aditivo (además de las células) está presente en una cantidad de un 0,001 a un 50 % en peso en solución, tal como en solución salina tamponada con fosfato. El ingrediente activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente un 5 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente un 1 % en peso, mucho más preferiblemente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente un 0,05 % en peso o de aproximadamente 0,001 a aproximadamente un 20 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente un 10 % en peso, y mucho más preferiblemente 0,05 a aproximadamente un 5 % en peso.

55 Las células pueden encapsularse para su administración, particularmente cuando la encapsulación potencia la eficacia del tratamiento, o proporciona ventajas en la manipulación y/o vida útil. Las células pueden encapsularse por membranas, así como cápsulas, antes del implante. Se contempla que puede emplearse cualquiera de los muchos métodos de encapsulación celular disponibles.

65

Puede usarse una amplia diversidad de materiales para microencapsulación de células. Dichos materiales incluyen, por ejemplo, cápsulas poliméricas, microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, cápsulas de bario poli-L-lisina alginato, cápsulas de bario alginato, fibras huecas de poliacrilonitrilo/poli(cloruro de vinilo) (PAN/PVC) y fibras huecas de polietersulfona (PES).

Las técnicas para microencapsulación de células que pueden usarse para la administración de células son conocidas para los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Chang, P., et al., 1999; Matthew, H.W., et al., 1991; Yanagi, K., et al., 1989; Cai Z.H., et al., 1988; Chang, T.M., 1992 y en la patente de Estados Unidos n.º 5 639 275 (que, por ejemplo, describe una cápsula biocompatible para mantenimiento a largo plazo de células que expresa de forma estable moléculas biológicamente activas. Hay métodos adicionales de encapsulación en la publicación de patente europea n.º 301 777 y en las patentes de Estados Unidos n.º 4 353 888; 4 744 933; 4 749 620; 4 814 274; 5 084 350; 5 089 272; 5 578 442; 5 639 275; y 5 676 943.

Las células pueden incorporarse en un polímero, tal como un biopolímero o polímero sintético. Los ejemplos de biopolímeros incluyen, aunque sin limitación, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Otros factores, tales como las citocinas analizadas anteriormente, también pueden incorporarse en el polímero. Las células pueden incorporarse en los intersticios de un gel tridimensional. Un polímero grande o gel, típicamente, se implantará quirúrgicamente. Un polímero o gel que pueda formularse en partículas o fibras suficientemente pequeñas puede administrarse por otras vías no quirúrgicas comunes más convenientes.

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

Las células pueden suspenderse en un excipiente apropiado en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente  $5 \times 10^9$  células/ml. Los excipientes adecuados para soluciones de inyección son aquellos que son biológica y fisiológicamente compatibles con las células y con el destinatario, tales como solución salina tamponada u otros excipientes adecuados. La composición para administración puede formularse, producirse y almacenarse de acuerdo con métodos convencionales que cumplen la esterilidad y estabilidad apropiadas.

#### Administración en tejidos linfohematopoyéticos

Las técnicas para administración en estos tejidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las inyecciones intramedulares pueden implicar inyectar células directamente a la cavidad de la médula ósea típicamente de la cresta iliaca posterior, pero pueden incluir otros sitios en la cresta iliaca, el fémur, la tibia, el húmero o el cúbito; las inyecciones esplénicas podrían implicar inyecciones guiadas por radiografía en el bazo o exposición quirúrgica del bazo mediante laparoscopia o laparotomía; los parches de Peyer, las inyecciones GALT o BALT podrían requerir laparotomía o procedimientos de inyección laparoscópica.

#### Dosificación

Las dosis para seres humanos u otros mamíferos pueden determinarse sin experimentación excesiva por el experto en la materia, a partir de esta divulgación, los documentos citados en este documento y el conocimiento en la técnica. La dosis de células/medio apropiada a usar dependerá de numerosos factores. Los parámetros que determinarán las dosis óptimas a administrar para tratamiento primario y adyuvante generalmente incluirán algunos o todos los siguientes: la enfermedad que se está tratando y su fase; la especie del sujeto, su salud, género, edad, peso y tasa metabólica; la inmunocompetencia del sujeto; otros tratamientos que se están administrando; y las posibles complicaciones esperadas por el historial o 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 distribución que debe abordarse para que las células/medio sea eficaz; y dichas características del sitio tales como accesibilidad a las células/medio y/o injerto de las células. Parámetros adicionales incluyen coadministración con otros factores (tales como factores de crecimiento y citocinas). La dosis óptima en una situación dada también tendrá en consideración el modo en que las células/medio se formulan, 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 podría estar en el intervalo de dosis usadas para trasplante de médula ósea mononuclear autóloga. Para preparaciones bastante puras de células, las dosis óptimas variarán de  $10^4$  a  $10^8$  células/kg de masa del destinatario por administración. La dosis óptima por administración puede estar entre  $10^5$  a  $10^7$  células/kg. La dosis óptima por administración puede ser de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/kg. A modo de referencia, dosis mayores a las anteriores son análogas a las dosis de células nucleadas usadas en trasplante de médula ósea mononuclear autóloga.

Algunas de las dosis inferiores son análogas al número de células CD34+/kg usadas en trasplante de médula ósea mononuclear autóloga.

5 Las células/medio pueden administrarse en una dosis inicial y, después de ello, mantenerse mediante administración adicional. Las células/medio pueden administrarse por un método inicialmente y, después de ello, administrarse por el mismo método o uno o más métodos diferentes. Los niveles pueden mantenerse por la administración en curso de las células/medio. Las células/medio pueden administrarse inicialmente o para mantener su nivel en el sujeto o ambos por inyección intravenosa. Pueden usarse otras formas de administración, dependiendo la afección del paciente y otros factores, analizados en otra parte en este documento.

10 Las células/medio pueden administrarse en muchas frecuencias sobre una amplia gama de tiempos. En general, las longitudes de tratamiento serán proporcionales a la longitud del proceso patológico, la eficacia de los tratamientos que se están aplicando y el estado y respuesta del sujeto que se está tratando.

15 Usos

La administración de las células es útil para proporcionar angiogénesis en una cantidad indefinida de patologías, incluyendo, aunque sin limitación, cualquier afección isquémica, por ejemplo, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía periférica, apoplejía, oclusión total crónica, isquemia renal y lesión renal aguda.

20 Pueden mezclarse inductores de uno o más factores proangiogénicos con las células a administrar antes de la administración o podrían coadministrarse (simultánea o secuencialmente) con las células.

25 Además, se proporcionan otros usos por el conocimiento de los mecanismos biológicos descritos en esta solicitud. Uno de estos incluye descubrimiento de fármacos. Esto implica seleccionar uno o más compuestos por la capacidad de modular la expresión y/o secreción de uno o más factores proangiogénicos y/o los efectos angiogénicos del uno o más factores proangiogénicos secretados por las células. Esto implicaría un ensayo para la capacidad de la célula de expresar y/o secretar uno o más factores proangiogénicos y/o los efectos angiogénicos del uno o más factores proangiogénicos. Por consiguiente, el ensayo puede diseñarse para realizarse *in vivo* o *in vitro*.

30 Las células (o el medio) pueden seleccionarse ensayando directamente el factor proteínico o ARN. Esto puede hacerse mediante cualquiera de las técnicas bien conocidas disponibles en la técnica, tal como por FACS y otros métodos de detección basados en anticuerpo y PCR y otros métodos de detección basados en hibridación. También pueden ensayos indirectos para la expresión del factor, tal como la unión a cualquiera de los receptores conocidos. Los efectos indirectos también incluyen ensayos para cualquiera de las etapas/eventos de señalización biológicos específicos desencadenados por la unión de un factor a cualquiera de sus receptores. Por lo tanto, también puede usarse un ensayo basado en células. También pueden usarse dianas posteriores para ensayar la expresión/secreción del uno o más factores proangiogénicos. La detección puede ser directa, por ejemplo, mediante ensayos de ARN o proteína o indirecta, por ejemplo, ensayos biológicos para uno o más efectos biológicos de estos factores.

35 Por consiguiente, podría usarse un marcador equivalente siempre que sirva como indicador de que las células expresan/secretan el uno o más factores proangiogénicos.

40 Los ensayos para la expresión/secreción incluyen, aunque sin limitación, ELISA, Luminex qRT-PCR, transferencias de Western antifactor e inmunohistoquímica del factor en muestras tisulares o en células.

45 Puede realizarse determinación cuantitativa del factor o factores en las células y medios acondicionados usando kits de ensayo disponibles en el mercado (por ejemplo, R&D Systems que depende de un ensayo basado en anticuerpos sustractivo de dos etapas).

50 También pueden usarse ensayos de angiogénesis *in vitro* para evaluar la expresión/secreción de los factores. Dichos ensayos de angiogénesis *in vitro* son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, el ensayo de formación de tubos de HUVEC como se describe en esta solicitud, los ensayos de proliferación o migración de células endoteliales, los ensayos de anillo aórtico y el ensayo de membrana corioalantoica de pollo (CAM). También puede aplicarse ensayos para angiogénesis *in vivo* usando cualquiera de los ensayos bien conocidos para determinar la angiogénesis *in vivo*, tal como ensayos en lecho de matrigel, ensayo de arco aórtico de pollo y ensayos en esponja de matrigel.

55 Un uso adicional es establecer bancos de células para proporcionar células para administración clínica. En general, una parte fundamental de este procedimiento es proporcionar células que tengan una potencia deseada para su administración en diversos entornos clínicos terapéuticos.

60 Cualquiera de los mismos ensayos útiles para el descubrimiento de fármacos también podría aplicarse para seleccionar células para el banco, así como del banco para su administración.

65 Por consiguiente, en un procedimiento de formación de bancos, las células (o el medio) se ensayarían para la capacidad de conseguir cualquiera de los efectos anteriores. Después, se seleccionarían las células que tienen una

potencia deseada para cualquiera de los efectos anteriores, y estas células formarían la base para crear un banco de células.

5 También se contempla que la potencia aumentarse por el tratamiento con un compuesto exógeno, tal como un compuesto descubierto mediante selección de las células con colecciones combinatorias grandes. Estas colecciones de compuestos pueden ser colecciones de agentes que incluyen, aunque sin limitación, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos de antisentido, ARNip aptámeros de ADN, péptidos, anticuerpos, proteínas que no son anticuerpo, citocinas, quimiocinas y quimioatrayentes. Por ejemplo, las células pueden exponerse a dichos agentes en cualquier momento durante el procedimiento de cultivo y fabricación. El único requisito es que haya suficientes cantidades para realizar el ensayo deseado para evaluar si el agente aumenta o no la potencia. Dicho agente, encontrado durante el proceso de descubrimiento de fármacos general descrito anteriormente, podría aplicarse de forma más ventajosa durante el último pase antes de la formación del banco.

15 Un uso que se ha aplicado satisfactoriamente a MultiStem es el siguiente. Las células pueden aislarse de un donador de médula competente que ha experimentado requisitos de ensayo específicos para determinar que un producto celular que se obtiene de este donador sería seguro para usarse en un entorno clínico. Las células mononucleares se aíslan usando un procedimiento manual o automatizado. Estas células mononucleares se colocan en cultivo, que permite que las células se adhieran a la superficie tratada de un recipiente de cultivo celular. Se permite que las células MAPC se expandan sobre la superficie tratada con cambios de medio que se producen en el día 2 y en el día 4. En el día 6, las células se retiran del sustrato tratado por un medio mecánico o enzimático y se vuelven a sembrar en otra superficie tratada de un recipiente de cultivo celular. En los días 8 y 10, las células se retiran de la superficie tratada como anteriormente y se vuelven a sembrar. En el día 13, las células se retiran de la superficie tratada, se lavan y se combinan con un material crioprotector y se congelan, finalmente, en nitrógeno líquido. Después de que las células se hayan congelado durante al menos una semana, se retira una alícuota de las células y se ensaya para la potencia, la identidad, la esterilidad y otros ensayos para determinar la utilidad del banco de células. Estas células en este banco entonces pueden usarse descongelándolas, colocándolas en cultivo y usándolas sin congelación para tratar posibles indicaciones.

30 Otro uso es un ensayo de diagnóstico para la eficacia y el efecto clínico beneficioso después de la administración de las células. Dependiendo de la indicación, puede haber biomarcadores disponibles para la evaluación. La dosificación de células puede ajustarse durante el tratamiento de acuerdo con el efecto.

35 Un uso adicional es evaluar la eficacia de la célula para conseguir cualquiera de los resultados anteriores como un diagnóstico previo al tratamiento que precede a la administración de las células a un sujeto. Además, la dosificación puede depender de la potencia de las células que se están administrando. Por consiguiente, un ensayo de diagnóstico previo al tratamiento para la potencia puede ser útil para determinar la dosis de las células inicialmente administrada al paciente y, posiblemente, administrada adicionalmente durante el tratamiento basado en la evaluación en tiempo real del efecto clínico.

40 También debe entenderse que las células pueden usarse para proporcionar angiogénesis no solamente con fines de tratamiento, sino también con fines de investigación, tanto *in vivo* como *in vitro* para entender el mecanismo implicado en la angiogénesis, de forma normal y en modelos de enfermedad. Los ensayos de angiogénesis, *in vivo* o *in vitro*, pueden hacerse en presencia de agentes que se sabe que están implicados en la angiogénesis. Entonces puede evaluarse el efecto de esos agentes. Estos tipos de ensayos también podrían usarse para seleccionar agentes que tengan un efecto sobre la angiogénesis que se promueve por las células. Por consiguiente, se podrían seleccionar agentes en el modelo de enfermedad que anulan los efectos negativos y/o promueven los efectos positivos. A la inversa, se podrían seleccionar agentes que tengan efectos negativos en un modelo de angiogénesis normal.

#### 50 Composiciones

También se describen en este documento poblaciones celulares con potencias específicas para conseguir cualquiera de los efectos descritos en este documento. Como se describe anteriormente, estas poblaciones se establecen seleccionando células que tienen potencia deseada. Estas poblaciones se usan para generar otras composiciones, por ejemplo, un banco de células que comprende poblaciones con potencias deseadas específicas y composiciones farmacéuticas que contienen una población de células con una potencia deseada específica.

60 El potencial angiogénico de las células puede aumentarse mediante una combinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . La exposición de las células a esta combinación de factores aumenta la expresión génica proangiogénica, tal como CXCL5, FGF2 y HGF. IL-8 también puede aumentarse en estas condiciones.

65 La secreción de moléculas proangiogénicas también puede aumentarse mediante el tratamiento de células con un análogo de prostaglandina F, latanoprost. La expresión génica de los factores proangiogénicos analizados por RT-PCR muestra un aumento en HGF, VEGF, KITLG e IL-8. La prostaglandina F biológica también aumentaba los niveles de VEGF A.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 Objetivo

El suministro de células madre exógenas después de lesión isquémica ha demostrado proporcionar beneficio terapéutico mediante soporte trófico a tejido lesionado regulando las células inmunitarias e inflamatorias, limitando la apoptosis, estimulando la neoangiogénesis y reclutando tejido hospedador para la reparación. Los resultados previos sugieren que el mecanismo de MultiStem de beneficio en lesión isquémica puede ser, en parte, un resultado de la capacidad de MultiStem de inducir neovascularización promoviendo la angiogénesis. Por lo tanto, este estudio está dirigido a ensayar si MultiStem puede inducir la angiogénesis e identificar factores responsables de esta actividad, así como comparar la actividad angiogénica de MultiStem con MSC.

#### 15 Métodos y resultados

Usando un ensayo *in vitro* bien establecido de angiogénesis de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), los inventores descubrieron que medio acondicionado recogido de MultiStem después de cuatro días induce la angiogénesis *in vitro*. Los inventores identificaron múltiples factores proangiogénicos secretados por MultiStem incluyendo VEGF, CXCL5 e IL-8 y descubrieron que los tres factores son necesarios para que MultiStem indujera la angiogénesis. De forma interesante, no se descubrió que CXCL5 e IL-8 se expresaran por células estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea (MSC) cultivadas. En contraste con MultiStem, el medio acondicionado en solitario de MSC era incapaz de inducir angiogénesis en este sistema *in vitro*.

#### 25 Conclusión

MultiStem puede inducir la angiogénesis, en parte, mediante la expresión de IL-8, VEGF y CXCL5. Este perfil de secreción es divergente de MSC y estas diferencias se reflejan en sus actividades funcionales.

#### 30 Resumen condensado

Usando un ensayo de angiogénesis bien establecido, los inventores descubrieron que el medio acondicionado recogido de MultiStem induce la angiogénesis *in vitro*. Los inventores identificaron múltiples factores proangiogénicos secretados por MultiStem incluyendo VEGF, CXCL5 e IL-8 y descubrieron que los tres factores son necesarios para que MultiStem indujera la angiogénesis. De forma interesante, CXCL5 e IL-8 no se expresaban por células estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea (MSC) cultivadas. En contraste con MultiStem, el medio acondicionado de MSC era incapaz de inducir la angiogénesis en este sistema *in vitro*.

La lesión isquémica, caracterizada por la pérdida de flujo sanguíneo a los tejidos o a los órganos, puede tener consecuencias devastadoras como resultado del daño tisular y la muerte celular inducidos por la pérdida de nutrientes y oxígeno a la zona isquémica<sup>1</sup>. El infarto agudo de miocardio (AMI), la vasculopatía periférica (PVD) y la apoplejía son tres ejemplos habituales de lesiones isquémicas que se producen por pérdida de flujo sanguíneo al corazón, las extremidades y el cerebro, respectivamente. Estas afecciones pueden provocar daño orgánico grave a largo plazo, amputación de extremidades e incluso muerte por privación de oxígeno y nutrientes. El tratamiento de estas afecciones a menudo se centra en un retorno rápido del flujo sanguíneo a la zona lesionada para evitar daño tisular adicional, muerte celular y para reducir la inflamación<sup>2</sup>.

MultiStem®, una población de células progenitoras multipotentes adherentes expandidas a gran escala derivadas de médula ósea, ha demostrado ser beneficioso en modelos animales cuando se suministra después de lesión isquémica tal como AMI y PVD<sup>3-6</sup>. Por ejemplo, en comparación con controles de vehículo, el suministro de MultiStem en sitios alrededor del infarto después de la inducción de infarto de miocardio por ligamiento de la arteria descendente anterior izquierda directa provocaba una mejora en el rendimiento contráctil del ventrículo izquierdo, una zona de cicatriz reducida, densidad vascular aumentada y características energéticas del miocardio mejoradas<sup>7</sup>. MultiStem de ratón y humano también ha demostrado mejorar el movimiento de las extremidades, aumentar el flujo sanguíneo y la densidad de capilares y necrosis disminuida en modelos de isquemia crítica de extremidades<sup>5</sup>. Debido a los bajos niveles de injerto de MultiStem y la diferenciación mínima de MultiStem en miocardio o células endoteliales, se cree que los beneficios de MultiStem para AMI y PVD se obtienen de efectos paracrinos.

La densidad aumentada de los vasos observada en animales tratados con MultiStem de AMI y PVD en comparación con controles tratados con vehículo sugiere que MultiStem puede inducir la neovascularización promoviendo la angiogénesis. Esta actividad puede ser un mecanismo importante de beneficio en el tratamiento de AMI y PVD. La densidad aumentada de los vasos finalmente provoca un flujo sanguíneo aumentado y, por tanto, un suministro de oxígeno y nutrientes al sitio de la lesión<sup>8-9</sup>.

Numerosos estudios han demostrado que las células madre pueden promover o potenciar la angiogénesis y la neovascularización secretando factores proangiogénicos tales como VEGF<sup>10-11</sup>. Basándose en estos estudios, los

inventores presentaron la hipótesis de que MultiStem también tendría la capacidad de inducir angiogénesis. Por lo tanto, se examinó MultiStem para determinar si secreta factores que podrían promover la angiogénesis. Usando matrices de inmunotransferencia de factor angiogénico, se ensayó el medio acondicionado de MultiStem y cultivos MSC establecidos de donadores comunes, lo que demuestra patrones de expresión de factor angiogénico coherentes entre las condiciones de cultivo.

El medio sin suero acondicionado recogido de MultiStem induce la angiogénesis *in vitro*. Múltiples factores proangiogénicos secretados por MultiStem se identificaron incluyendo VEGF, CXCL5 e IL-8; y estudios de inmunorreducción demostraron que los tres factores son necesarios para que MultiStem induzca angiogénesis. Sin embargo, ninguno de estos factores en solitario es suficiente para inducir la angiogénesis.

CXCL5 e IL-8 no se expresaban por células estromales mesenquimatosas derivadas de médula ósea (MSC) cultivadas. En contraste con MultiStem, el medio acondicionado de MSC era incapaz de inducir la angiogénesis en este sistema *in vitro*. Los estudios previos han demostrado que MSC puede estabilizar la formación de vasos *in vitro* y aumentar la densidad de los vasos en modelos animales isquémicos, aunque los estudios recientes han sugerido que MSC inhibe la angiogénesis y causa muerte de células endoteliales en determinadas condiciones<sup>11-13</sup>. Los resultados sugieren que MSC no secreta factores solubles suficientes para mantener la angiogénesis en ausencia de cocultivo con células endoteliales. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que MultiStem y MSC tienen perfiles de secreción divergentes y estas diferencias se reflejan en sus actividades paracrinas en diversas condiciones y entornos.

#### Materiales y métodos

##### Cultivo celular

MultiStem humano se mantuvo en cultivo como se describe previamente<sup>7</sup>. Las MSC se adquirieron de Lonza (Walkersville, MD) y se expandieron en cultivo como se describe por el protocolo del proveedor. Para las preparaciones de MultiStem y MSC del mismo donador, se aislaron células adherentes y se cultivaron a partir de una médula ósea reciente usando las condiciones descritas previamente para cada línea celular<sup>14</sup>. Se expandieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Lonza) en cultivo siguiendo las instrucciones de los fabricantes a una concentración de 2500 células/cm<sup>2</sup>. Se usaron HUVEC entre el pase tres y cinco, sembrando a 3000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante tres días, momento en el cual, la confluencia es de aproximadamente un 70-80 % antes de su uso en el ensayo de angiogénesis.

##### Preparación de medio acondicionado (CM) sin suero

MultiStem se sembró en un matraz de cultivo tisular que contenía medio de cultivo MultiStem. Veinticuatro horas después, se retiró el medio que contenía suero, las células se lavaron con PBS 1 X y se añadió medio de cultivo MultiStem humano que contenía factores de crecimiento, pero carece de suero. Las células se cultivaron durante 4 días sin ningún cambio de medio y en el día 4, se recogió el medio acondicionado sin suero, se centrifugó a 1900 rpm durante 5 min a 4 °C, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

##### Matriz Panomics

Se realizó matriz de anticuerpos humanos contra angiogénesis Panomics (Fremont, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 2 ml de una muestra de medio acondicionado MultiStem sin suero del día 4 diluido en factor 2.

##### Matriz de angiogénesis

Se realizó matriz de anticuerpos contra angiogénesis (R& D systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando 2 ml de muestras de medio acondicionado de 3 días diluido en factor 2 de MultiStem y MSC obtenidos del mismo donador.

##### ELISA

Los niveles de proteína de IL-8, VEGF y CXCL5 se determinaron por ELISA (R&D Systems). Se detectan todas las isoformas de VEGF. Las barras de error se expresan +/- desviación típica.

##### Inmunorreducción de VEGF y CXCL8/IL-8

Se usaron microesferas de proteína A-agarosa (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) a una concentración de 75 1 de una suspensión al 50 % por 1 ml de CM. Se usó anticuerpo monoclonal de ratón anti-VEGF humano (Santa Cruz) a una concentración de 4 ug/ml de CM y se usó anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-8 humana (Millipore, Billerica, MA) a 2 ug/ml de CM. Se usó IgG de ratón normal (Santa Cruz) e IgG de conejo ChromPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) como controles de isotipo.

Se preincubaron microesferas de proteína A-agarosa con anticuerpo anti-VEGF, anti-IL-8 o controles de isotipo durante una noche a 4 °C con rotación seguido de 4 lavados con PBS 1 X enfriado en hielo, centrifugación a 2500 rpm, 2 minutos, 4 °C. El CM se inmunorredujo durante 2 horas a 4 °C con rotación en alícuotas de 6 ml seguido de filtración a través de filtro de 0,45 µm para desechar cualquier microesfera residual. El CM tratado con IgG de ratón-AC se usó como control de isotipo. Se añadieron de nuevo las isoformas humanas recombinantes de VEGF121 (eBioscience, San Diego, CA) y/o VEGF165 (R&D Systems) al CM inmunorreducido a concentraciones que varían de 50 a 1000 pg/ml.

#### Neutralización de CXCL5/ENA-78

CXCL5 se neutralizó usando el anticuerpo humano contra CXCL5/ENA-78 (R&D Systems) a una concentración de 10 µg/ml de CM durante 2 horas a 4 °C con rotación. Se usó IgG de cabra total normal (Jackson ImmunoResearch,) a una concentración de 10 µg/ml de CM como control de isotipo. Los controles adicionales usados son medio de crecimiento endotelial (EGM, Lonza) con adiciones de anticuerpo neutralizante ENA-78 humano o IgG de cabra total normal a concentración de 10 µg/ml.

#### Ensayo de angiogénesis

Se descongeló Matrigel reducido para factor de crecimiento (BD Bioscience, San Jose, CA) en hielo a 4 °C durante una noche y usó a una concentración de 6,0-6,5 mg/ml, se diluyó en hielo usando PBS 1 X enfriado en hielo. Se distribuyeron cuatrocientos microlitros de Matrigel en los pocillos interiores de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se permitió que solidificaran durante 1 hora a 37 °C. La adición de Matrigel se hizo en hielo y los pocillos exteriores de la placa se llenaron con 1 ml de PBS 1 X.

Las HUVEC se recogieron de acuerdo con el siguiente protocolo: Las células se lavaron con PBS 1 X seguido de un breve aclarado con tripsina-EDTA 0,25 X y después se inactivaron usando el lavado de PBS 1 X (con suero residual). Las células se resuspendieron en medio basal de células endoteliales (EBM) y se contaron. Las HUVEC se añadieron al CM, otras condiciones experimentales y controles a una concentración de 55 000 células/ml/pocillo. Cada muestra y control se ensayó por triplicado. Las placas se incubaron durante 6 horas o 18 horas a CO<sub>2</sub> al 5 % y 37 °C para permitir la formación de tubos. Se analizaron cuatro campos por pocillo para un total de 12 campos. Se tomaron imágenes usando un objetivo 10 X. La angiogénesis se puntuó contando el número de tubos formados entre las células. Los resultados se expresan como el promedio de tubos formados por campo +/- ETM.

#### Resultados

##### MultiStem secreta factores que promueven la angiogénesis *in vitro*

Los estudios previos han demostrado que el tratamiento de lesión isquémica con MultiStem provoca una densidad aumentada de vasos rodeando la zona de lesión en comparación con los controles tratados con vehículo, lo que sugiere que MultiStem induce neovascularización y angiogénesis. Para ensayar si MultiStem secreta factores que promueven la angiogénesis, se utilizó un ensayo de angiogénesis *in vitro* usando medio acondicionado de MultiStem. MultiStem se sembró en condiciones normales durante 24 horas. Las células después se transfirieron a condiciones sin suero para generar medio acondicionado durante cuatro días. Este medio se ensayó entonces para la actividad angiogénica en un ensayo de formación de tubos *in vitro*. Las HUVEC se sembraron en Matrigel de factor de crecimiento reducido que se diluyó adicionalmente hasta una concentración que no producía ninguna angiogénesis espontánea con medio MultiStem basal sin suero o medio de células endoteliales sin suero. Las HUVEC se sembraron en medio acondicionado, medio basal o medio de crecimiento endotelial durante 18 horas. La angiogénesis se midió como el número promedio de tubos formados por campo de visión para condición. En ausencia de cualquier factor adicional, la presencia de suero en solitario en medio basal puede inducir la angiogénesis. Por lo tanto, se usó un medio sin suero para todos los experimentos. Se observó formación de tubos complejos robusta en medio de células endoteliales que contenía suero mientras que el medio de células endoteliales sin suero o el medio MultiStem basal sin suero no mostraba casi nada de inducción de formación de tubos. Los inventores descubrieron que el medio acondicionado sin suero de cultivos de cuatro días de MultiStem inducía angiogénesis en comparación con el medio basal (figura 1 A,B).

Para identificar los factores secretados por MultiStem que promueven la angiogénesis y la neovascularización, se analizó el medio acondicionado sin suero MultiStem en una matriz de anticuerpos contra angiogénesis (figura 1 C). Muchos factores proangiogénicos, así como unos pocos factores angiostáticos se secretan por MultiStem en el medio. De forma más notable, se secretaba VEGF por MultiStem así como interleucina 8 (IL-8), ambos cuales son potentes moléculas angiogénicas<sup>15-17</sup>. CXCL5, otra citocina angiogénica potente, también se secreta por MultiStem (figura 1 D)<sup>18</sup>. VEGF, CXCL5 e IL-8 se expresan a niveles fisiológicamente activos en medio acondicionado MultiStem de cuatro días (figura D-F).

La función de VEGF como factor clave implicado en la inducción de la angiogénesis nos impulsó a examinar si VEGF era necesario para la actividad proangiogénica de MultiStem<sup>19-20</sup>. Usando un anticuerpo contra VEGF, se inmunorredujo VEGF del medio acondicionado MultiStem. Para asegurar que VEGF se reducía realmente del medio,

se determinaron los niveles de VEGF del medio inmunorreducido usando un ELISA de VEGF. Los niveles de VEGF se redujeron en más de un 95 % en el medio inmunorreducido en comparación con el medio acondicionado y el medio reducido solo de IgG (figura 2 A). Los niveles de CXCL5 y los niveles de IL-8 no se vieron afectados por la inmunorreducción de VEGF (figura 2 B,C). En ausencia de VEGF, se redujo la inducción de la angiogénesis por el medio acondicionado MultiStem (figura 2, figura 1 complementaria). Estos resultados demuestran que VEGF es necesario para que el medio acondicionado MultiStem induzca la angiogénesis.

Para establecer los niveles mínimos de VEGF necesarios para que el medio acondicionado MultiStem mantenga la actividad angiogénica, se añadieron de nuevo cantidades crecientes de VEGF al medio inmunorreducido. VEGF-A, la forma más estudiada de VEGF, habitualmente mencionado como VEGF, tienen múltiples isoformas incluyendo VEGF 121 y VEGF 165. Cuando estas dos isoformas se añadían de nuevo por separado al medio acondicionado MultiStem inmunorreducido para determinar la cantidad mínima de VEGF necesaria para inducir la angiogénesis (figura 2A,C), los inventores descubrieron que ninguna isoforma en solitario era suficiente para restaurar completamente los niveles de angiogénesis previamente observados con medio acondicionado MultiStem, 250 pg/ml de VEGF 121 eran suficientes para restaurar algo de la angiogénesis (figura 2C). Para VEGF 165, 50 pg/ml eran suficientes para restaurar algunos niveles de angiogénesis y la adición de más VEGF 165 no aumentaba los niveles de angiogénesis en ninguna cantidad apreciable (figura 2D).

#### CXCL5 y IL-8 son ambos necesarios para niveles normales de angiogénesis inducida por MultiStem, pero no suficientes para inducir la angiogénesis

Aunque se requiere VEGF para la angiogénesis, VEGF en solitario no es suficiente para inducir una angiogénesis robusta a la concentración presente en el medio acondicionado<sup>22-24</sup>. La identificación de factores angiogénicos adicionales secretados por MultiStem nos impulsó a examinar si CXCL5 e IL-8 eran necesarios para la actividad angiogénica de MultiStem. Para ensayar esta hipótesis, se inmunorredujo IL-8 del medio acondicionado MultiStem y se descubrió que estaba reducido en un 95 % (figura 3). Los niveles de VEGF y CXCL5, medidos por ELISA, permanecían inalterados en el medio inmunorreducido de IL-8. En ausencia de IL-8, la formación de tubos *in vitro* de las HUVEC usando medio acondicionado MultiStem se reducía en un 60 % (figura 3, figura II complementaria). Estos resultados sugieren que IL-8 es necesaria para la inducción de la angiogénesis por el medio acondicionado MultiStem, aunque el medio acondicionado MultiStem aún mantiene algún nivel de actividad angiogénica incluso en ausencia de IL-8. Asimismo, el bloqueo de la actividad de CXCL5 mediante la adición de un anticuerpo de bloqueo de CXCL5 en el medio provocaba una disminución significativa en la formación de tubos en el ensayo de angiogénesis de HUVEC (figura 4 A). Los niveles de CXCL5 se reducían en el medio con el anticuerpo de bloqueo, pero los niveles de VEGF e IL-8 permanecían inalterados (Figure III complementaria). De forma interesante, la adición de CXCL5 en solitario, IL-8 en solitario o ambos no era suficiente para inducir la angiogénesis en el medio basal, lo que sugiere que estos factores son necesarios para que MultiStem induzca la angiogénesis, pero no suficientes para inducir la angiogénesis (figura 4 B, C).

#### MSC expresa VEGF, pero no puede iniciar la angiogénesis en el ensayo *in vitro* de HUVEC

Para evaluar si los niveles de angiogénesis inducidos por MultiStem eran similares a los inducidos por otras líneas de células madre, se recogió medio acondicionado sin suero de MSC y se ensayó para su capacidad de inducir angiogénesis en cultivo en comparación con MultiStem. El medio acondicionado MSC no inducía angiogénesis en este ensayo, incluso cuando se repetía con MSC de múltiples donadores (figura 6A, figura complementaria III). Aunque otros informes han mostrado que MSC puede inducir angiogénesis en ensayos de HUVEC *in vitro*, estos ensayos se analizaron 4-6 horas de la siembra en placa, mostraron angiogénesis incompleta o usaron condiciones diferentes<sup>25-27</sup>. Cuando se examinó la formación de tubos angiogénicos a las 6 horas, ambos medios acondicionados MSC y MultiStem indujeron algo de formación de tubos. A las 24 horas, sin embargo, la angiogénesis con el medio acondicionado MSC se había desplomado, pero se mantenía con el medio acondicionado MultiStem (figura 5).

La expresión de VEGF, CXCL5 e IL-8 en el medio acondicionado MSC se examinó y se descubrió que VEGF se expresaba a niveles mayores que en el medio acondicionado MultiStem, mientras que CXCL5 e IL-8 no se expresaban a niveles detectables en medio acondicionado MSC. Para confirmar que estos resultados eran indicativos del perfil de secreción de MSC en lugar de un artefacto inducido por el cultivo sin suero, los niveles de VEGF, IL-8 y CXCL5 expresado por MSC se examinaron en sus condiciones de cultivo normales y se compararon con los niveles de proteína de estos factores encontrados en medio acondicionado MultiStem en condiciones de cultivo de MultiStem. Para estas líneas celulares, los inventores obtuvieron MSC y MultiStem del mismo donador para eliminar cualquier variación genética entre las dos líneas. Incluso cuando estos tipos celulares se obtenían del mismo donador, los niveles de CXCL5 e IL-8 eran indetectables en medio acondicionado MSC, pero se expresaban a niveles fisiológicamente activos en medio MultiStem (figura 5B). Para examinar adicionalmente el perfil de secreción de estas líneas celulares, los inventores compararon el perfil de secreción del medio acondicionado MultiStem con el perfil de secreción del medio acondicionado MSC en matrices de anticuerpos contra angiogénesis (figura 6A) de las células obtenidas del mismo donador (figura 6, datos complementarios I). Los datos revelaron que había múltiples factores angiogénicos y angiostáticos secretados por MultiStem que no se secretaban por MSC, incluyendo angiogenina, HGF, IL-8, leptina, TIMP-4 e IGFBP-1. Por el contrario, TIMP-1 (25 veces mayor) e IGFBP-2 (16 veces mayor), se expresaban ambos a niveles mucho mayores en MSC en comparación con MultiStem. Tanto VEGF como IGFBP-3 se expresaban también

a niveles coherentemente más elevados en MSC que en MultiStem aunque únicamente 3-4 veces mayores. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que MultiStem y MSC tienen diferentes perfiles de secreción incluso cuando se obtienen del mismo donador y estas diferencias se reflejan en las diferencias funcionales entre las líneas celulares.

## 5 Discusión

Las células madre adultas aisladas de diversos tejidos, incluyendo médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo se están desarrollando actualmente para tratar lesiones isquémicas tales como infarto agudo de miocardio, apoplejía y vasculopatía periférica<sup>21-30</sup>. Estas lesiones inducen daño celular y tisular por la pérdida inicial de oxígeno y nutrientes en el tejido afectado, pero también por la posterior inflamación en la región. La recuperación rápida y mantenida del flujo sanguíneo puede reducir el daño y la inflamación dentro de la región isquémica. La intención original de los tratamientos basados en células fue la regeneración y reparación de la pérdida de tejidos y de tejidos dañados después de lesión, mediante el suministro y posterior diferenciación de células madre exógenas. Sin embargo, estudios posteriores que examinan el mecanismo del beneficio de los tratamientos con células madre han demostrado que muchas células madre funcionan principalmente mediante efectos paracrinos en lugar de la regeneración, ya que muchos de los tipos celulares ya no son detectables unos pocos días después del suministro<sup>31-33</sup>. Las hipótesis terapéuticas son que estas poblaciones celulares pueden proporcionar soporte trófico al tejido lesionado regulando las células inmunitarias e inflamatorias, limitando la apoptosis, estimulando la neoangiogénesis y reclutando tejido hospedador para la reparación. El beneficio se debe probablemente a una cascada dinámica de estas rutas, y diferentes poblaciones celulares pueden ejercer influencias más fuertemente sobre determinadas rutas. La selección de la población de células madre adherentes más apropiada para el tratamiento puede reflejar tanto la potencia de una población dada para rutas clave, como el tiempo de suministro para mediar de forma eficaz la respuesta. Por lo tanto, es importante establecer ensayos normalizados para estas rutas para proporcionar datos comparativos, y después correlacionar estos equivalentes de actividad *in vitro* con la lesión y la recuperación.

Las células progenitoras adultas multipotentes son una población de células madre adultas adherentes derivada de cultivos de médula ósea. Estudios *in vivo* previos han mostrado un aumento en la densidad de vasos en animales tratados con MultiStem después de lesión isquémica<sup>4, 7</sup>. En este estudio, se ha mostrado que MultiStem secreta factores que pueden inducir angiogénesis en un ensayo de formación de tubos *in vitro*. Un análisis adicional reveló que MultiStem secreta una diversidad de factores proangiogénicos, incluyendo VEGF, IL-8 y CXCL5. Dos de estos factores, CXCL5 e IL-8, se secretan de forma muy diferencial por MultiStem en comparación con MSC, que secreta muy poco, si acaso, CXCL5 e IL-8. VEGF, CXCL5 e IL-8 son todos necesarios para que MultiStem induzca angiogénesis. La eliminación o inhibición de cualquiera de estos factores reduce enormemente la capacidad del medio acondicionado MultiStem de promover la angiogénesis. VEGF165 es la isoforma principal implicada en angiogénesis. Sin embargo, múltiples isoformas de VEGF pueden ser responsables de que MultiStem induzca angiogénesis, ya que la formación de tubos no podía restaurarse hasta un 100 % usando las isoformas VEGF121 o VEGF165 independientemente en medio acondicionado MultiStem inmunorreducido de VEGF.

Aunque otros grupos han suministrado factores proangiogénicos individuales tales como VEGF a modelos de lesión isquémica para proporcionar algún efecto beneficioso en animales, los resultados han sido variados para indicaciones clínicas tales como AMI y PVD<sup>34,35</sup>. La expresión incontrolada de factores angiogénicos puede dar lugar a efectos secundarios importantes tales como formación de hemangioma, artritis y retinopatía, y efusión pleural grave y efusión pericárdica en el modelo de AMI de rata<sup>14, 36, 37</sup>. Los resultados de ensayos clínicos para factores angiogénicos individuales mediante suministro de genes o proteínas han sido decepcionantes para PVD, muy probablemente debido a múltiples factores que incluyen inestabilidad de factores actualmente ensayados que son necesarios para el beneficio a largo plazo, complicaciones en el suministro, baja captación y respuesta del tejido isquémico y necesidad de varias moléculas simultáneas para conseguir la revascularización funcional. Por el contrario, el tratamiento de lesiones isquémicas con células madre ofrece una alternativa atractiva al tratamiento con proteínas o genes individuales. El uso de células madre para tratar lesiones isquémicas podría provocar el suministro de múltiples factores angiogénicos directamente al sitio de la lesión, mediante las células que responden y se dirigen al microentorno hipóxico e inflamatorio, consiguiendo un equilibrio dinámico para estimular una respuesta angiogénica apropiada. Adicionalmente, las células madre tales como MultiStem también podrían evitar simultáneamente el daño tisular mediante mecanismos inmunomoduladores y antiapoptóticos. En este estudio, los inventores demuestran que MultiStem, de hecho, puede inducir angiogénesis directamente mediante la expresión de al menos tres factores proangiogénicos.

Aunque MSC expresa y secreta niveles altos de VEGF, el medio acondicionado de MSC era insuficiente para inducir angiogénesis en este sistema de ensayo *in vitro*. Se ha demostrado que MSC estabiliza la formación de vasos *in vitro* en estudios previos. Sin embargo, muchos de estos estudios examinan la formación de vasos en un punto temporal anterior, tal como a las 4-6 horas o en diferentes condiciones<sup>25-27, 38</sup>. Los inventores descubrieron que estos en puntos temporales anteriores, hay un nivel mayor de fondo de angiogénesis en controles negativos que no es estable a las 24 horas. Asimismo, se descubrió que, a las 6 horas, MSC puede inducir algún nivel de angiogénesis que posteriormente se pierde en el punto temporal de 24 horas. Por el contrario, MultiStem induce la formación de tubos, que permanece estable a las 24 horas. Estos resultados sugieren que, aunque MSC puede mantener la angiogénesis a corto plazo, en ausencia de otros factores, esta formación de vasos no es estable. Estos resultados reflejan datos de estudios previos de que VEGF en solitario no es suficiente para iniciar la formación de vasos estables a los niveles

expresados por estas células<sup>24</sup>. En el contexto de los experimentos *in vivo* previos que muestran densidad de vasos aumentada en lesiones isquémicas tratadas con MSC, MSC puede aumentar la densidad de vasos induciendo células inflamatorias endógenas o progenitores tisulares para promover la angiogénesis.

5 Referencias

1. Rosamond, W. et al., "Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee" *Circulation*, 6 de febrero de 2007; 115(5):e69-171.
- 10 2. Molin, D y Post, M.J., "Therapeutic angiogenesis in the heart: protect and serve" *Current opinion in pharmacology*. abril de 2007; 7(2):158-163.
- 15 3. Kovacsovics-Bankowski, M. et al. "Clinical scale expanded adult pluripotent stem cells prevent graft-versus-host disease" *Cellular immunology*. 2009; 255(1-2):55-60.
- 20 4. Pelacho, B. et al., "Multipotent adult progenitor cell transplantation increases vascularity and improves left ventricular function after myocardial infarction" *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. enero-febrero de 2007; 1(1):51-59.
- 25 5. Aranguren, X.L.M. et al., "Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs by stimulating vessel and muscle regeneration" 2007.
6. Kovacsovics-Bankowski, M. et al., "Pre-clinical safety testing supporting clinical use of allogeneic multipotent adult progenitor cells" *Cytotherapy*. 2008; 10(7):730-742.
7. Van't Hof, W. et al., "Direct delivery of syngeneic and allogeneic large-scale expanded multipotent adult progenitor cells improves cardiac function after myocardial infarct" *Cytotherapy*. 2007; 9(5):477-487.
- 30 8. van der Laan, A.M. et al., "Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI" *Nat Rev Cardiol*. 16 de junio de 2009.
- 35 9. Idris, N.M. et al., "Therapeutic angiogenesis for treatment of peripheral vascular disease" *Growth factors (Chur, Suiza)*. diciembre de 2004; 22(4):269-279.
- 40 10. Markel, T.A. et al., "VEGF is critical for stem cell-mediated cardioprotection and a crucial paracrine factor for defining the age threshold in adult and neonatal stem cell function" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. diciembre de 2008; 295(6):H2308-2314.
- 45 11. Payne, T.R. et al., "A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts" *J Am Coll Cardiol*. 23 de octubre de 2007; 50(17):1677-1684.
- 50 12. Kinnaird, T., et al. "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms" *Circulation*. 30 de marzo de 2004; 109( 12):1543-1549.
- 55 13. Tang, Y.L. et al., "Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction" *Ann Thorac Surg*. julio de 2005; 80(1):229-236; discusión 236-227.
- 60 14. Boozer, S. et al., "Global Characterization and Genomic Stability of MultiStem, a Multipotent Adult Progenitor Cell" *Journal of Stem Cells*. 2009; 4(1):17-28.
- 65 15. Koch, A.E. et al., "Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint" *Arthritis and rheumatism*. enero de 2001; 44(1):31-40.
16. Strieter, R.M. et al., "Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization" *The American journal of pathology*. diciembre de 1992; 141(6):1279-1284.
17. Keeley, E.C. et al., "Chemokines as mediators of neovascularization" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. noviembre de 2008; 28(11):1928-1936.
18. Keane, M.P. et al., "ENA-78 is an important angiogenic factor in idiopathic pulmonary fibrosis" *American journal of respiratory and critical care medicine*. 15 de diciembre de 2001; 164(12):2239-2242.
19. Carmeliet, P., "Angiogenesis in health and disease" *Nature medicine*. junio de 2003; 9(6):653-660.

20. Carmeliet, P., "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis" *Nature medicine*. abril de 2000; 6(4):389-395.
21. Neufeld, G. et al., "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors" *Faseb J*. Jan 1999;13(1):9-22.
- 5 22. Kinnunen, K. et al., "Overexpression of VEGF-A induces neovascularization and increased vascular leakage in rabbit eye after intravitreal adenoviral gene transfer" *Acta physiologica (Oxford, Inglaterra)*. agosto de 2006; 187(4):447-457.
- 10 23. Milkiewicz, M. et al., "Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during noninflammatory skeletal muscle ischaemia in rat" *The Journal of physiology*. 1 de diciembre de 2006; 577(Pt 2):671-678.
- 15 24. Loffredo, F. y Lee, R.T., "Therapeutic vasculogenesis: it takes two" *Circulation research*. 18 de julio de 2008; 103(2):128-130.
- 20 25. Iwase, T. et al., "Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia" *Cardiovasc Res*. 1 de junio de 2005; 66(3):543-551.
26. Zacharek, A. et al., "Angiopoietin/Tie2 and VEGF/Fikl induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke" *J Cereb Blood Flow Metab*. octubre de 2007; 27(10):1684-1691.
- 25 27. Hung, S. C. et al., "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. septiembre de 2007; 25(9):2363-2370.
- 30 28. Burns, T.C. y Verfaillie, C.M., "Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review" *The Journal of comparative neurology*. 1 de julio de 2009; 515(1):125-144.
- 35 29. Singh, S. et al., "Stem cells improve left ventricular function in acute myocardial infarction" *Clinical cardiology*. abril de 2009; 32(4):176-180.
- 40 30. Aranguren, X.L. et al., "Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease" *Journal of molecular medicine (Berlín, Alemania)*. enero de 2009; 87(1):3-16.
- 45 31. Zhang, M. et al., "SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction" *Faseb J*. octubre de 2007; 21(12):3197-3207.
- 50 32. Block, G.J. et al., "Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1)" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 18 de diciembre de 2008.
- 55 33. Gnecci, M. et al., "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy" *Circulation research*. 21 de noviembre de 2008; 103(11):1204-1219.
- 60 34. Makinen, K. et al., "Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study" *Mol Ther*. julio de 2002; 6(1):127-133.
35. Rajagopalan, S. et al., "Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication" *Circulation*. 21 de octubre de 2003; 108(16):1933-1938.
36. Su, H. et al., "Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 9 de julio de 2002; 99(14):9480-9485.
37. Schwarz, E.R. et al., "Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation" *JAm Coll Cardiol*. abril de 2000; 35(5):1323-1330.
38. Oswald, J. et al., "Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*" *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2004; 22(3):377-384.

Datos complementarios I: Comparación de factores angiogénicos expresados por MultiStem y MSC

	Promedio de señal de MSC: % de control positivo por ug de proteína	Promedio de señal de MultiStem % de control positivo por ug de proteína	Des. MSC	típ.	Des. MultiStem	típ.
Angiogenina	0,00000	0,03081	0,00000	0,00400		
Endotelina-1	0,00317	0,03469	0,00550	0,00524		
HGF	0,00000	0,04639	0,00000	0,00737		
IGFBP-1	0,00000	0,00148	0,00000	0,00038		
IGFBP-2	0,02350	0,00145	0,03394	0,00251		
IGFBP-3	0,06941	0,02018	0,01728	0,00374		
IL-8	0,00000	0,02004	0,00000	0,00834		
Leptina	0,00000	0,01607	0,00000	0,00585		
Trombospondina-1	0,00401	0,00334	0,00694	0,00307		
VEGF	0,08976	0,03124	0,04583	0,00485		

Ejemplo 2

5

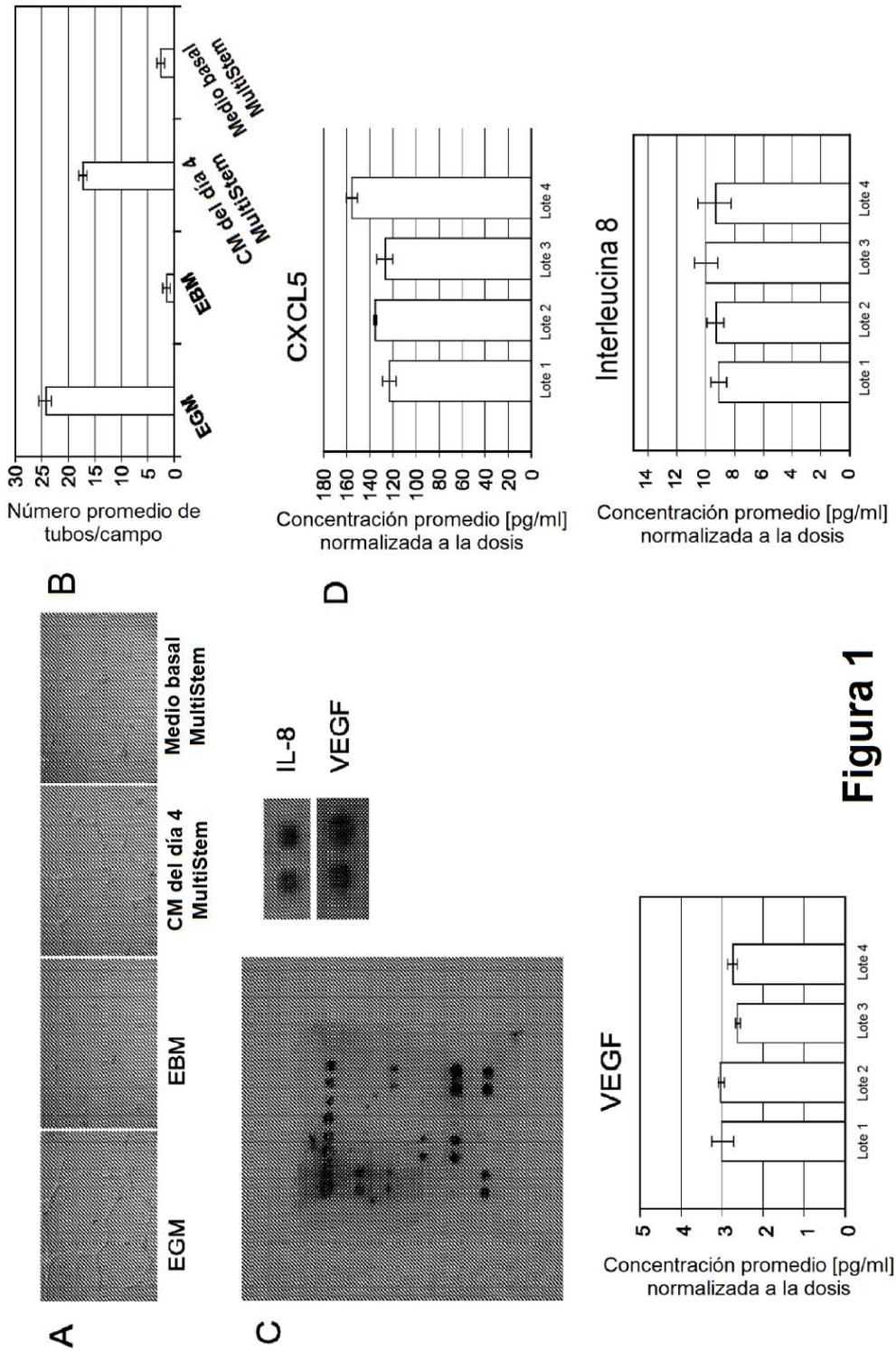
Expresión potenciada de factores angiogénicos en MultiStem

Las figuras 7-12 muestran que la expresión de factores angiogénicos puede aumentarse en la preparación de MultiStem (MAPC).

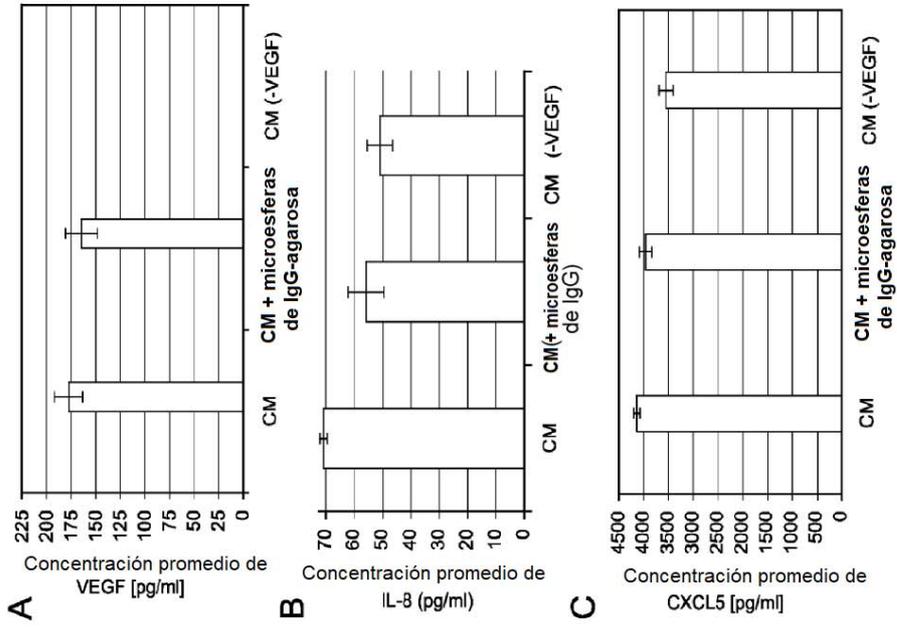
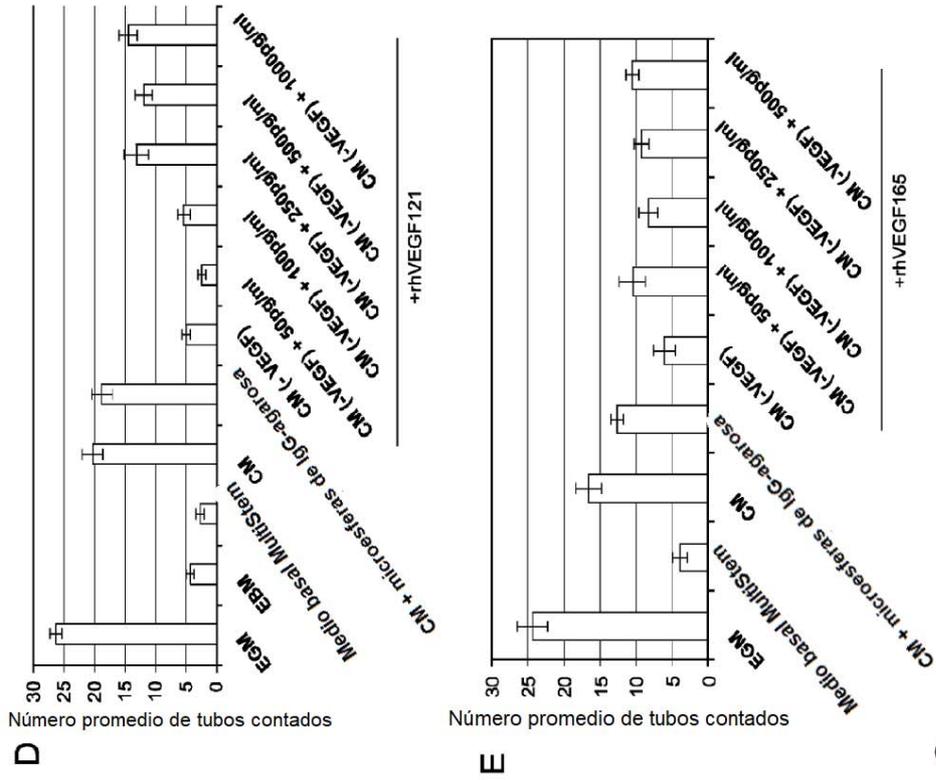
10

**REIVINDICACIONES**

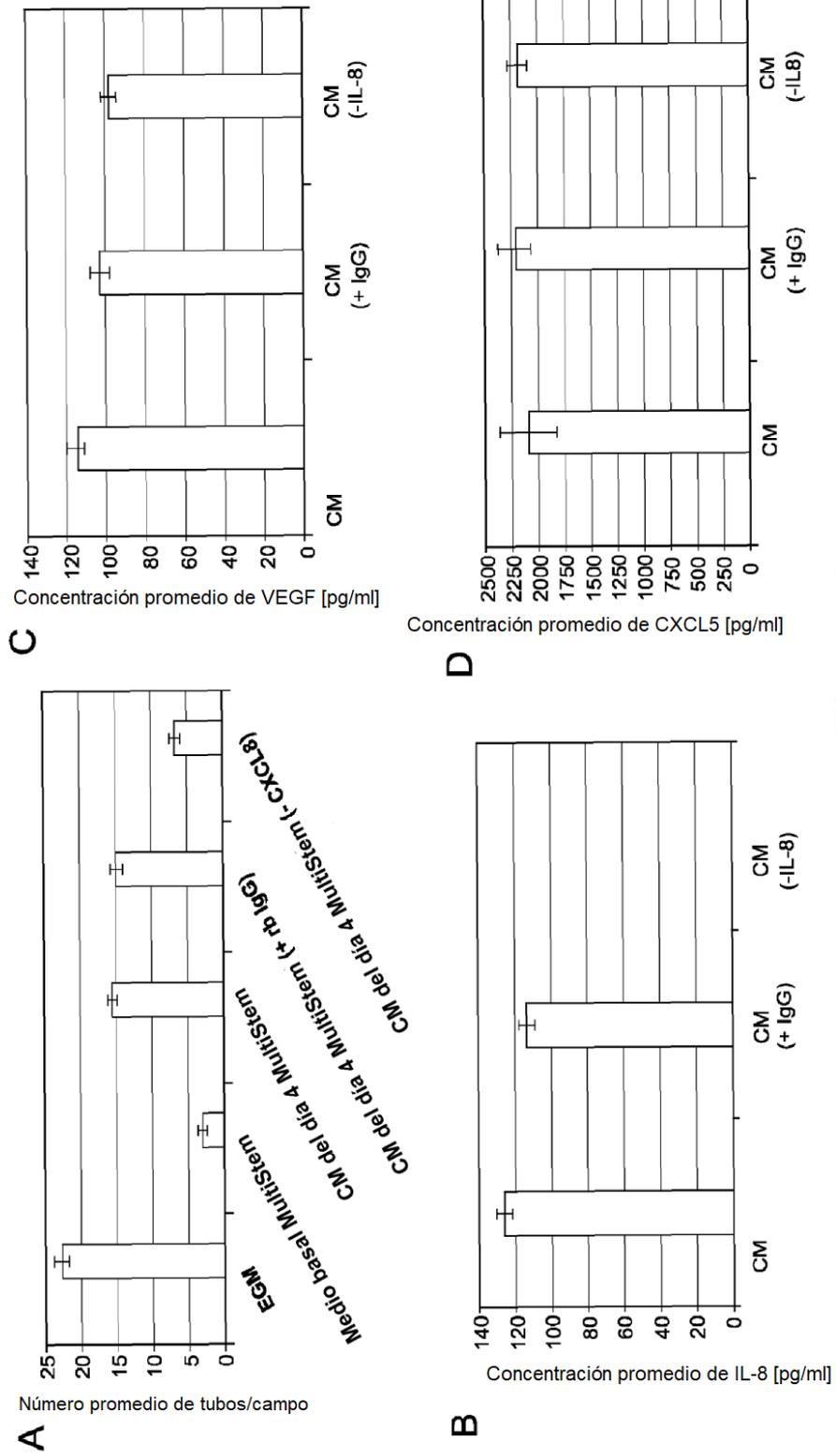
- 5 1. Células que tienen expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8 para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección isquémica en un sujeto, siendo las células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en las que, antes de la administración, dichas células se han ensayado para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8.
- 10 2. Las células para el uso de la reivindicación 1, en las que las células son alogénicas.
- 15 3. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en las que la afección isquémica es una afección seleccionada del grupo que consiste en infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, vasculopatía periférica, apoplejía, oclusión total crónica, isquemia renal y lesión renal aguda.
- 20 4. Las células para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que dicho sujeto es humano.
- 25 5. Un método para construir un banco de células, comprendiendo dicho método ensayar células para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, expandir y clasificar, para su futura administración a un sujeto, células que tienen la expresión y/o la secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, siendo las células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas.
- 30 6. Un método *in vitro* para el descubrimiento de fármacos, comprendiendo dicho método exponer las células que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, a un agente para evaluar el efecto del agente sobre la capacidad de las células de expresar y secretar los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8, siendo las células madre no embrionarias, 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 capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que dichas células se han ensayado para que tengan expresión y/o secreción de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8.
- 40 8. Un método *in vitro* para aumentar la expresión de los factores proangiogénicos VEGF, CXCL5 e IL-8 en una célula madre, comprendiendo el método exponer la célula a una combinación de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ , o a un análogo de prostaglandina F, en el que dichas células son células madre no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1 y pueden diferenciarse en tipos celulares de al menos dos de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas, en el que el análogo de prostaglandina F es latanoprost.
- 45 9. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en las que las células son células progenitoras multipotentes.
- 50 10. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en las que las células expresan telomerasa.
- 55 11. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en las que las células expresan oct4.
- 60 12. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en las que las células expresan telomerasa y oct4.
13. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 12, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en las que las células pueden diferenciarse en tipos celulares de capas germinales endodérmicas, ectodérmicas y mesodérmicas.
14. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 13, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en las que las células son células humanas.
15. Las células para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 9 a 14, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en las que las células se obtienen de médula ósea.



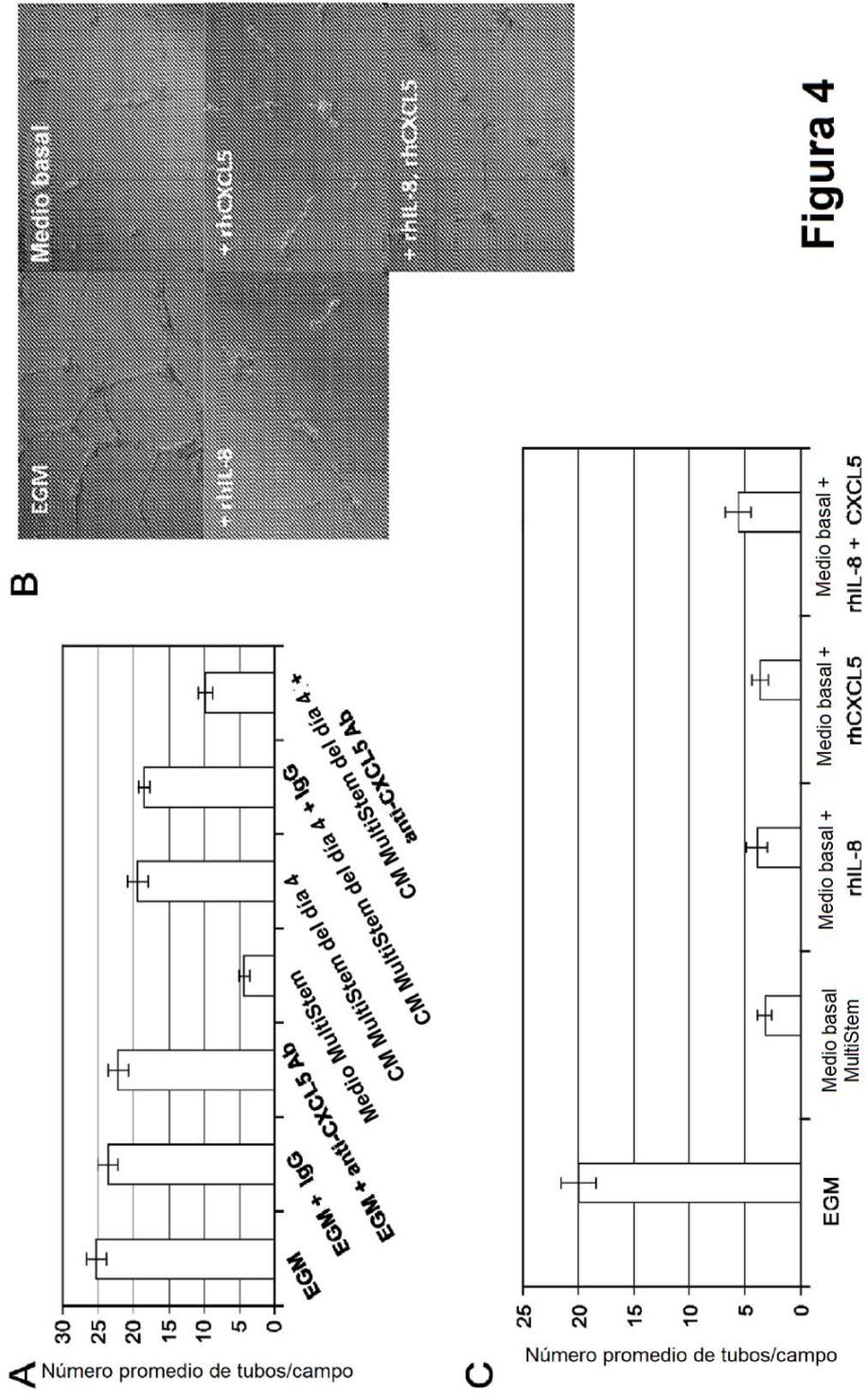
**Figura 1**



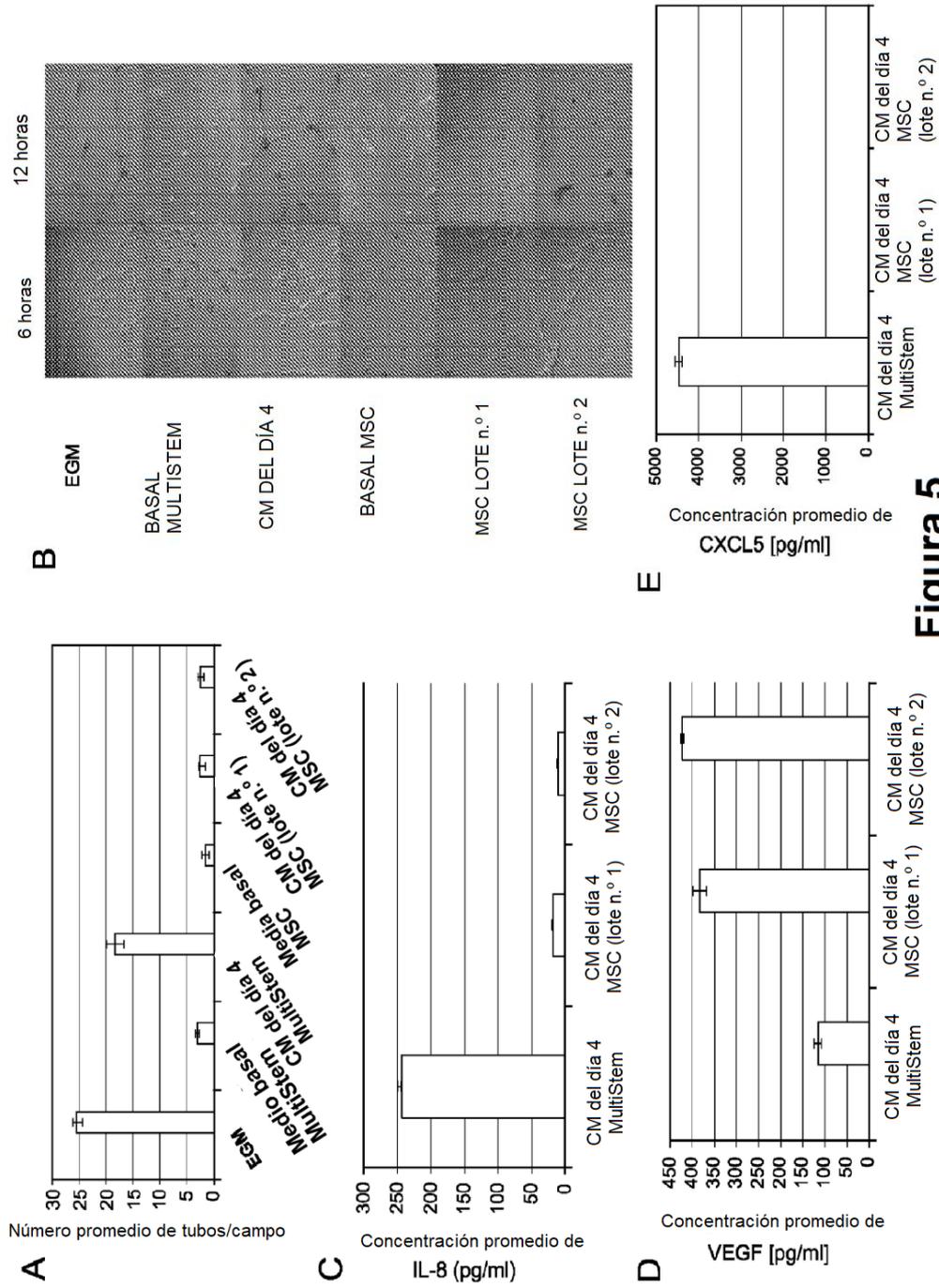
**Figura 2**



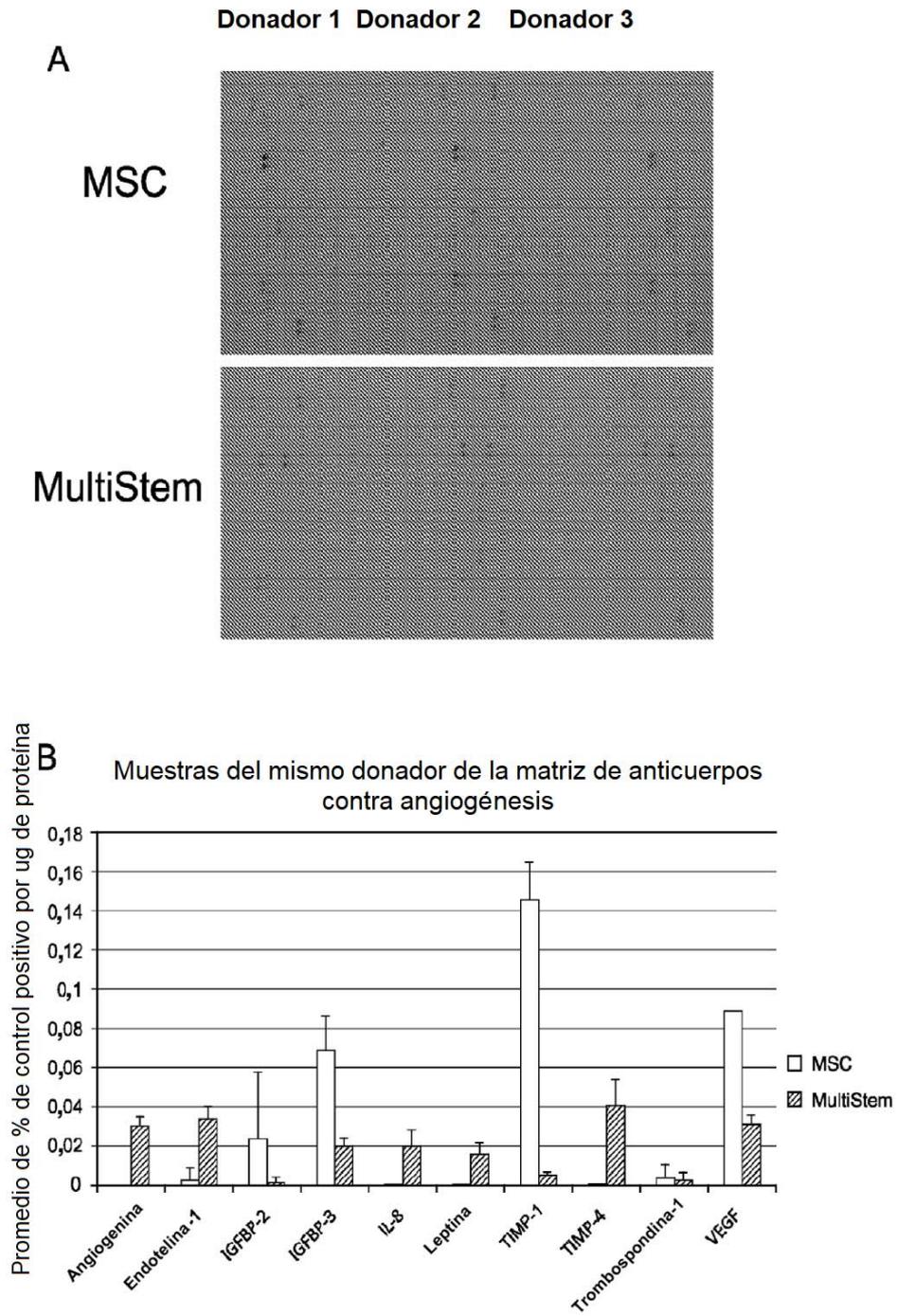
**Figura 3**



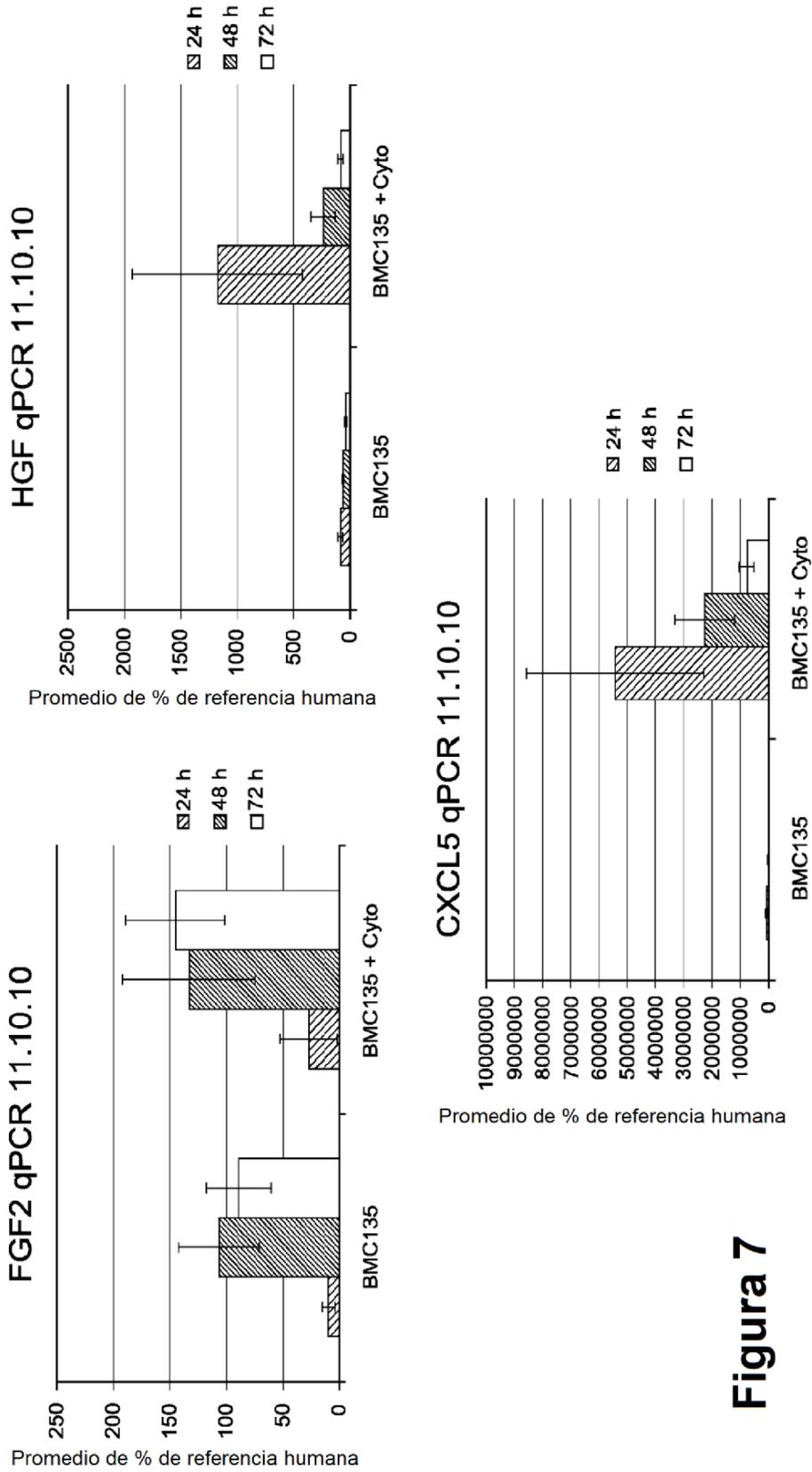
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



# Puntuación de angiogénesis

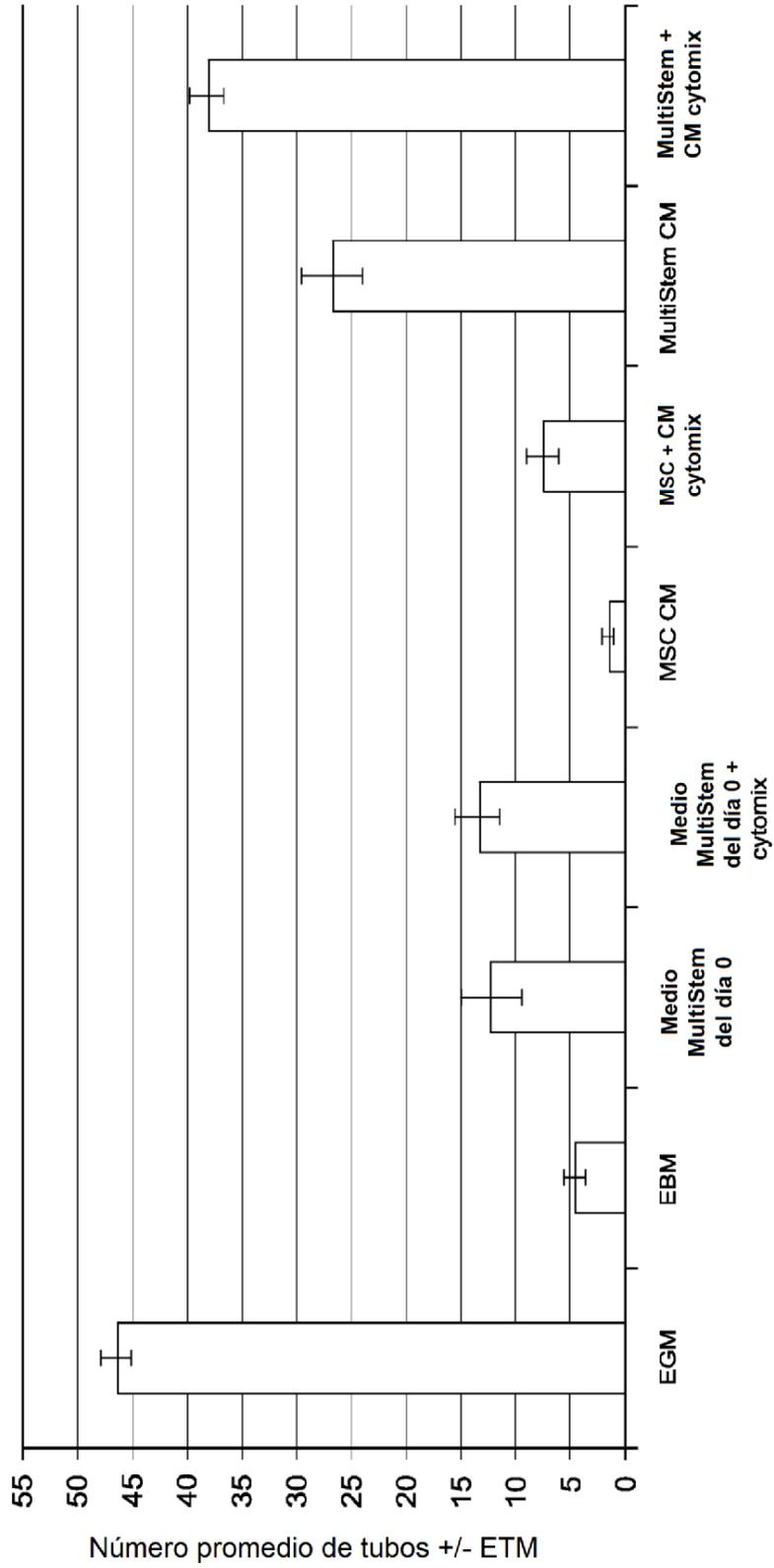


Figura 9

# KITLG/SCF qPCR 12.21.10

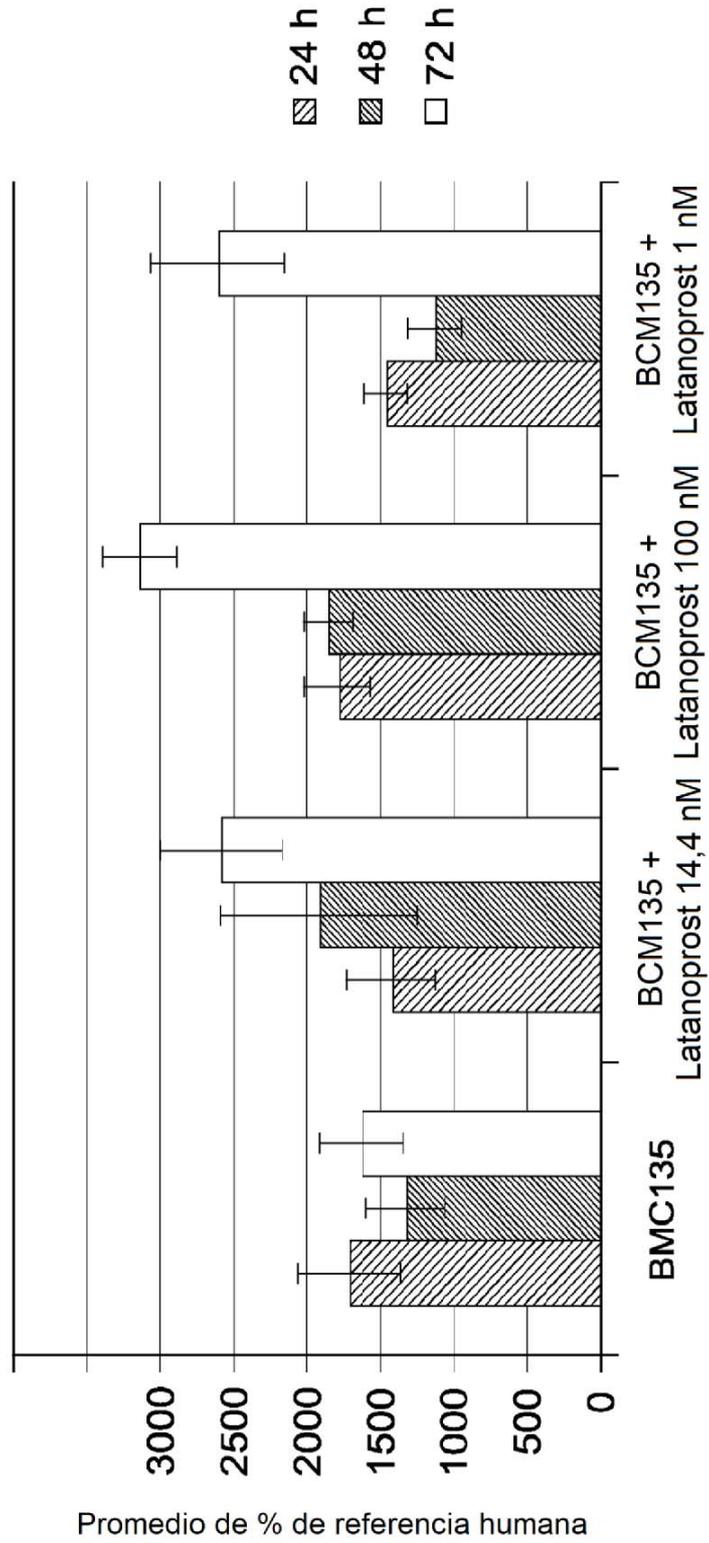
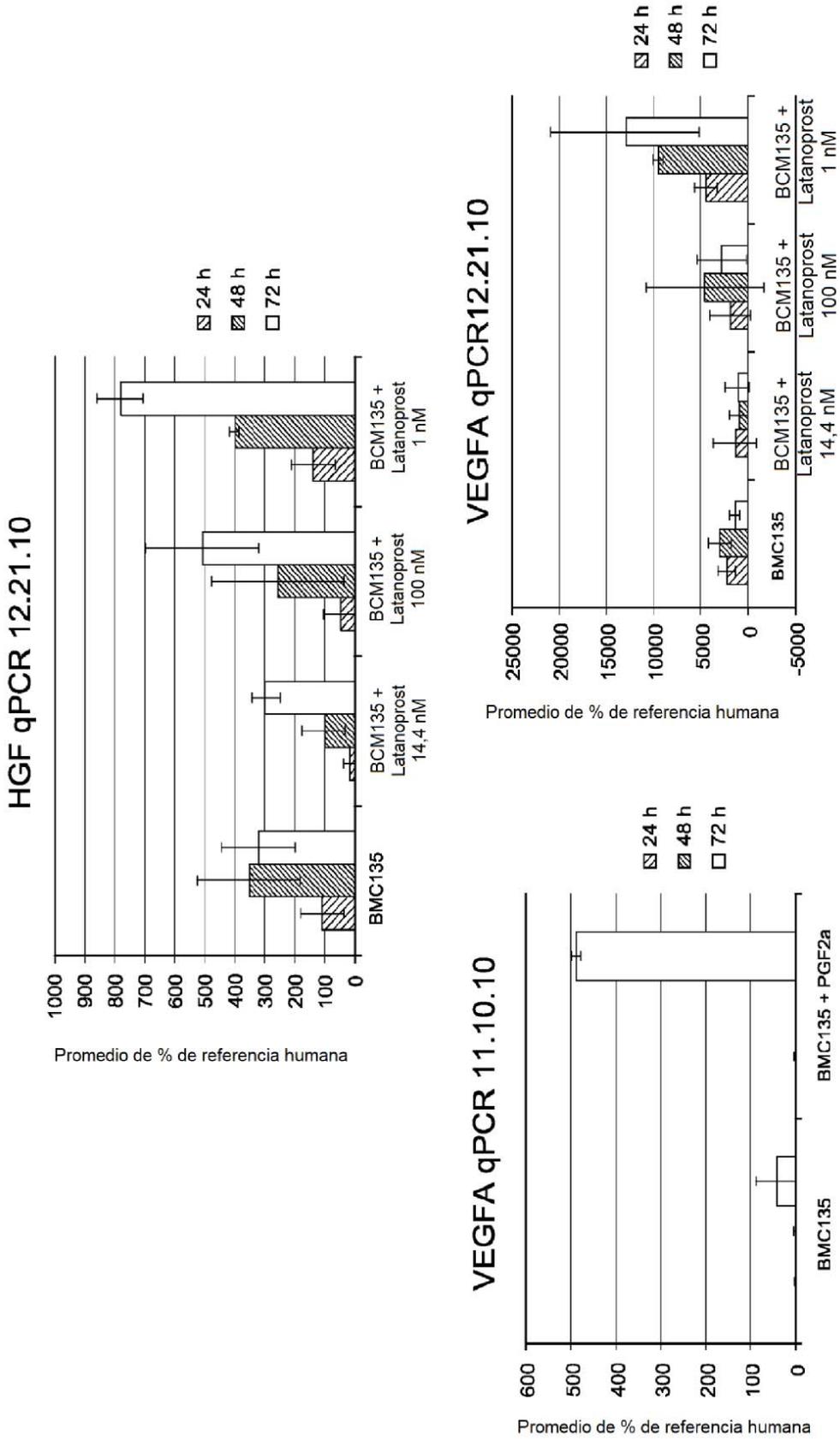
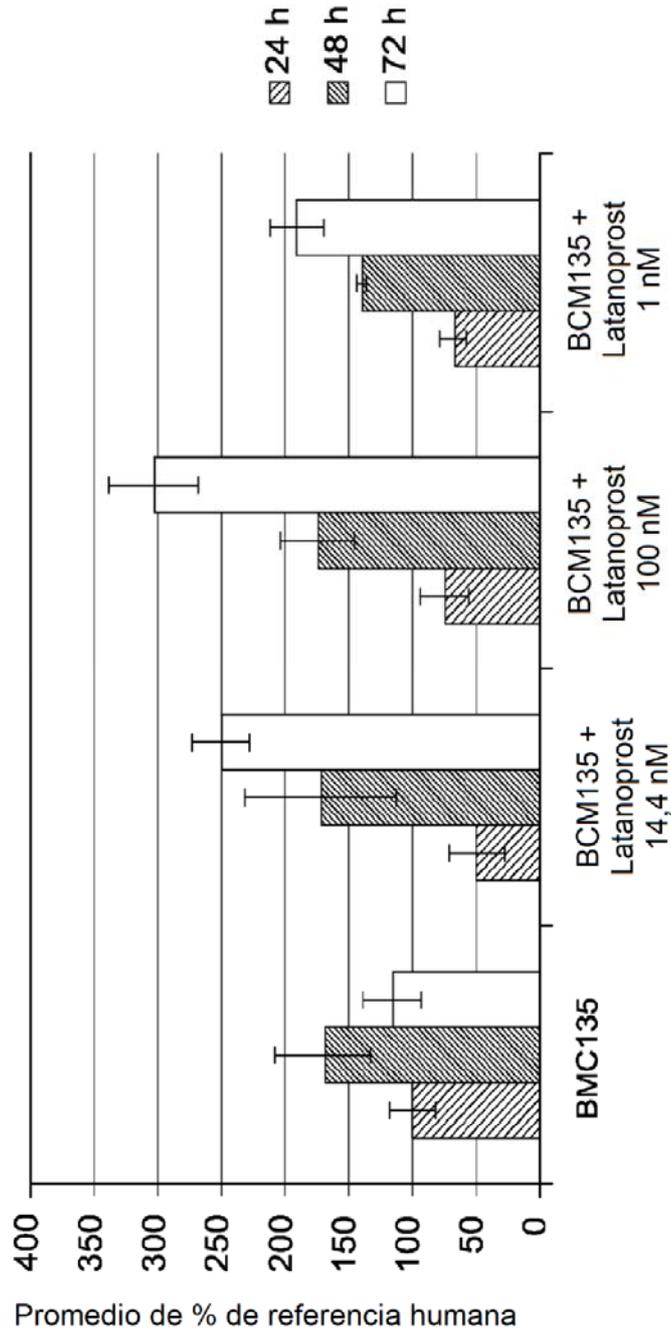


Figura 10A

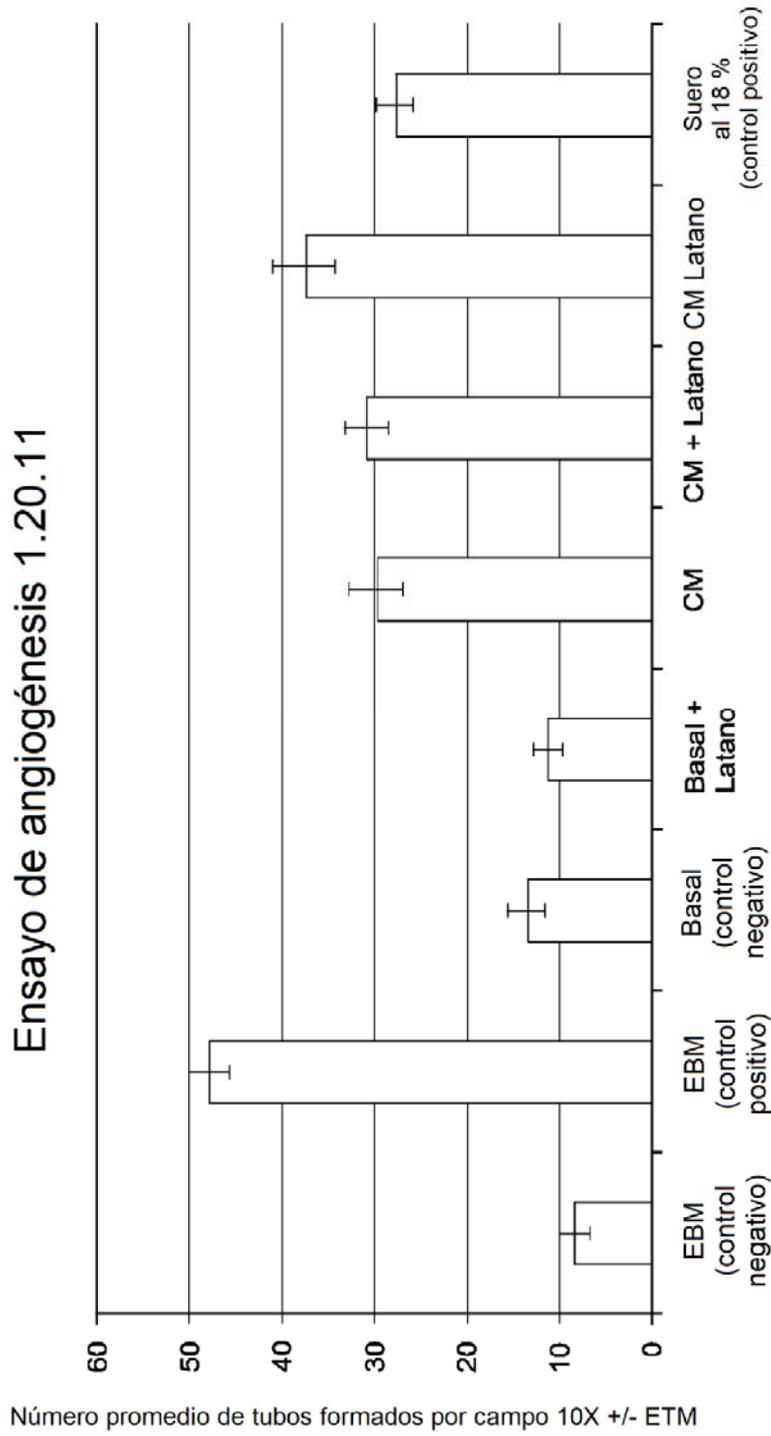


**Figura 10B**

# IL-8 qPCR 12.21.10



**Figura 10C**



**Figura 11**

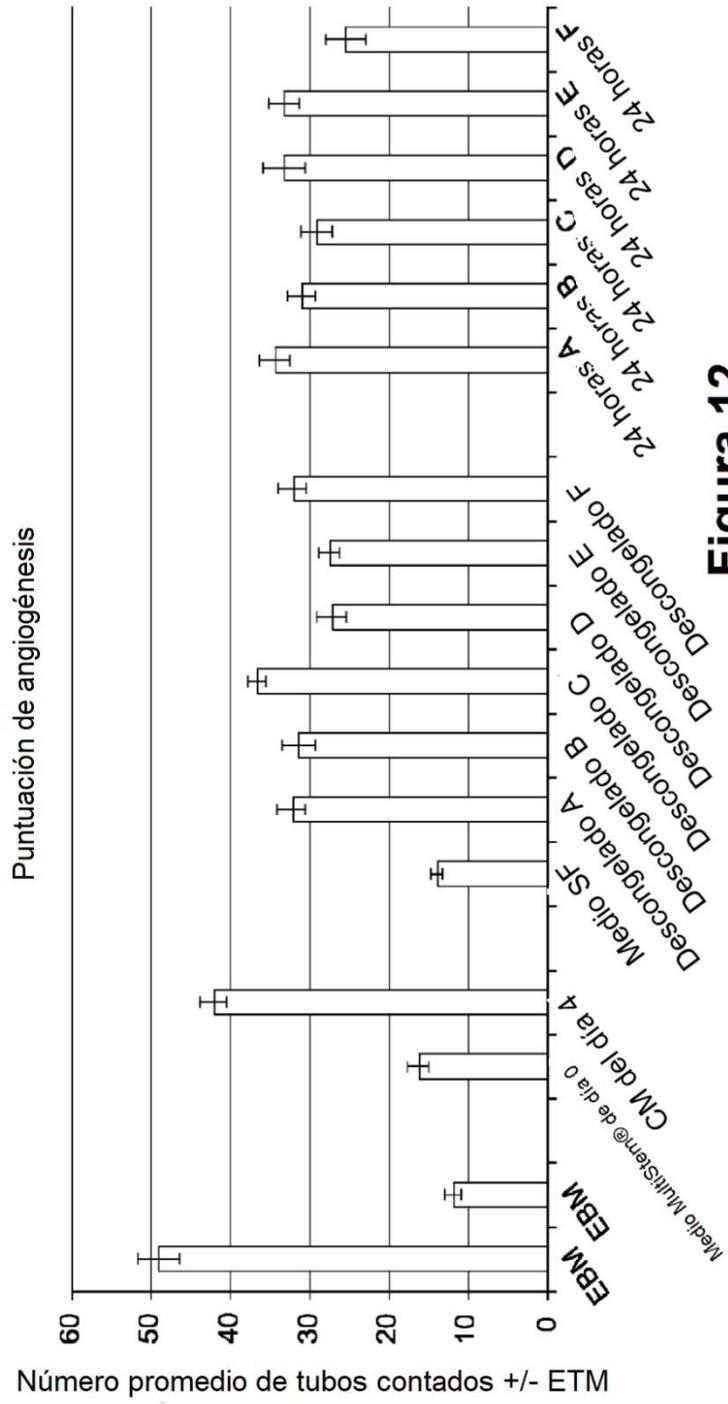


Figura 12