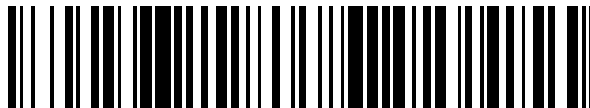


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 115**

51 Int. Cl.:

A61K 31/573 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2011 PCT/US2011/048297**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12024519**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2011 E 11752017 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2605765**

54 Título: **Dexametasona para su uso en el tratamiento de osteoartritis, fallo hepático, diabetes mellitus tipo-2, ictus y enfermedad de Parkinson, en combinación con un tratamiento con células madre**

30 Prioridad:

04.03.2011 US 201161449372 P
10.02.2011 US 201161441485 P
18.08.2010 US 374943 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2020

73 Titular/es:

DEISHER, THERESA (100.0%)
1749 Dexter Ave N
Seattle, WA 98109, US

72 Inventor/es:

DEISHER, THERESA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 738 115 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

Dexametasona para su uso en el tratamiento de osteoartritis, fallo hepático, diabetes mellitus tipo-2, ictus y enfermedad de Parkinson, en combinación con un tratamiento con células madre

5

Campo de la invención

La materia objeto de la divulgación se refiere a métodos y composiciones para modular la unión de células madre a órganos y tejidos y para la regeneración de centros germinales en tejidos linfáticos.

10

Antecedentes de la invención

La medicina regenerativa es el procedimiento de creación de tejidos vivos funcionales para reparar o reemplazar la función de un tejido u órgano perdida debido a lesiones o defectos congénitos. Este campo mantiene la promesa de regeneración de tejidos y órganos dañados en el cuerpo estimulando órganos previamente irreparables para que se curen por sí mismos.

15

Un método utilizado para regenerar la función del tejido u órgano es el suministro de células madre en el órgano o tejido afectado. Sin embargo, las células madre no se retienen bien en el órgano dirigido para la regeneración tisular incluso cuando se inyectan las células madre directamente en el tejido del órgano lesionado. Los estudios de creación de imágenes en seres humanos y animales han demostrado que la mayoría de las células madre suministradas pueden encontrarse dentro del bazo una hora después de la inyección de células madre. Los estudios en animales también han demostrado que la retirada quirúrgica del bazo antes de la terapia con células madre después de inducir un infarto de miocardio mejoraba la recuperación funcional en los corazones lesionados (Blood, Vol 84, No 5: 1482-1491, 1994; NATURE 410: 701-705, 2001). La esplenectomía también ha demostrado que mejora el injerto en pacientes humanos después del trasplante de médula ósea (Stem Cells Dev 13(1):51-62, 2004; Transplant Proc. 28(2):736-7, 1996; Am J Hematol. 22(3):275-83, 1986). Sin embargo, la esplenectomía también se ha asociado con mortalidad quirúrgica, sepsis, y complicaciones trombóticas de larga duración (Blood Rev. 14(3):121-129, 2000; Leukemia.15(3):465-467, 2001; Pediatr Transplant 13(2):171-176,2009)

20

25

30

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos y composiciones que se puedan utilizar para evitar la localización de las células madre en el bazo y otros tejidos linfáticos sin retirar el bazo.

35

El documento US 2010/0247491 A1 (Westenfelder) de 30 de septiembre de 2010 describe métodos y composiciones para el tratamiento de un fallo multiorgánico o disfunción renal mediante células madre mesenquimáticas y un inhibidor de CD26, donde la inhibición del CD26 aumenta el asentamiento de las células madre mesenquimáticas en el tejido diana. El documento US 2006/0233766 A1 (Messina) de 19 de octubre de 2006 describe células derivadas de tejidos postparto, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células, y métodos para utilizar dichas células y composiciones para tratar pacientes que tiene una afección neurodegenerativa tal como la enfermedad de Parkinson. El documento US 5486359 (Caplan) de 23 de enero de 1996 describe células madre mesenquimáticas humanas que pueden diferenciarse en más de un tipo tisular y el uso de las mismas, así como anticuerpos monoclonales específicas de dichas células. Bjorkstrand et al., Blood 1996 Vol 88, No 12:4711-4718 comparó el trasplante de médula ósea alogénica con el trasplante de células madre autólogas para la tasa de supervivencia en el mieloma múltiple.

40

45

Jin et al., Nature Medicine 2006 vol. 12:1167-1174 informa que el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) utilizando un anticuerpo dirigido a CD44 reducía marcadamente la repoblación leucémica de células madre leucémicas. Matthews et al. Blood 1999; 94(4):1237-47 informa que el suministro de radiación hematopoyética dirigida utilizando un anticuerpo monoclonal radiomarcado puede mejorar el resultado del trasplante de médula en la leucemia aguda avanzada disminuyendo la recaída sin aumentar la toxicidad. Avigdor et al., Blood. 15 de abr de 2004;103(8):2981-9 informan que el CD44 y el ácido hialurónico cooperan con el SDF-1 en el tráfico de células madre/progenitoras CD34+ humanas hacia la médula ósea.

50

MacLennan I. Annu Rev Immunol 1994; 12:117-139 revisa el desarrollo y existencia de centros germinales en tejidos linfoides. Cancelas et al. Nature Medicine 2006; 12,3:278-279 describe que la movilización de células madre desde la médula ósea como una fuente de células madre para el trasplante se pueden estimular mediante señales del sistema nervioso simpático. Lapidot et al. Blood 2005 15;106(6):1901-1910 describe los mecanismos y reguladores clave del asentamiento de células madre humanas hacia la médula ósea. Hoshi et al., TJEM 1973 vol 109, no 2: 97-111 informa que la formación del centro germinal en pollos puede influenciarse por ciertos factores dependientes del timo. Cozine et al., Curr Opin Immunol. Jun de 2005;17(3):298-302 revisa la respuesta del centro germinal primario en ratones. de Vos et al., Eur J Immunol. Dic de 2004;34(12):3446-55 describe que el anticuerpo anti-CD40 humano inhibe la formación del centro germinal en monos Cynomolgus.

55

60

Sumario de la invención

65

En un primer aspecto, la presente invención proporciona dexametasona para su uso en un método de tratamiento de

una afección en un individuo, comprendiendo el método la administración de la dexametasona al individuo antes o junto con el tratamiento con células madre, en el que la afección se selecciona de entre el grupo que consiste en: osteoartritis, fallo hepático, diabetes mellitus tipo 2, ictus, y enfermedad de Parkinson.

5 En algunas realizaciones, el método comprende la administración de dexametasona al individuo antes del tratamiento con células madre. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de dexametasona al individuo 1-14 días antes del tratamiento con células madre. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de dexametasona al individuo 3-7 días antes del tratamiento con células madre. En algunas realizaciones, el método comprende la administración de dexametasona al individuo 3-4 días antes del tratamiento con células madre.

10 En algunas realizaciones, el tratamiento con células madre comprende células madre seleccionadas de entre el grupo que consiste en células madre pluripotenciales, células madre embrionarias, células madre somáticas, células progenitoras y precursoras. En algunas realizaciones, las células madre somáticas se seleccionan de entre el grupo que consiste en células madre mamarias, células madre mesenquimáticas, células madre endoteliales, células madre neurales, células madre olfatorias de adulto, células madre derivadas del tejido adiposo, células madre de la cresta neural, y células madre testiculares. En algunas realizaciones, el tratamiento con células madre comprende células madre mesenquimáticas.

15 En algunas realizaciones, el tratamiento con células madre comprende el acto de administración de células madre al individuo. En algunas realizaciones, el tratamiento con células madre comprende células madre exógenas y/o células madre endógenas.

25 Descripción de la invención

Sumario

30 La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para inhibir la unión de las células madre al tejido linfóide que comprende la administración de las células madre junto con un agente o agentes terapéuticos que inhiben la unión de las células madre al tejido linfóide, en particular a los centros germinales de los ganglios linfáticos y los centros germinales del bazo. La expresión "en conjunción con" significa en juntos, antes o después del tratamiento con células madre. 'Tratamiento con células madre' significa el acto de la administración de células madre al individuo, la movilización de células madre desde dentro de los almacenes de células madre endógenos del individuo, o que se basa en la liberación espontánea de las células madre de los almacenes de células madre endógenos del individuo.

35 Por ejemplo, los pacientes tratados con células madre para producir la regeneración de un órgano han presentado reducciones de la mortalidad y mejoras en la función a continuación de la terapia con células madre, aunque los tratamientos con células madre generalmente no restauran el estado funcional del paciente antes de la lesión del órgano. Las reducciones de la unión de las células madre al bazo y otros linfáticos aumenta el número de células madre circulantes que pueden ser atraídas hacia el órgano lesionado y de esta manera aumentar el grado de recuperación funcional inducida por el tratamiento con células madre de ese paciente.

40 En la administración de agentes terapéuticos que inhiban la unión de células madre a los tejidos linfáticos se prefiere administrar los agentes terapéuticos 1 - 14 días antes del tratamiento, más preferentemente 3 - 7 días y más preferentemente 3 - 4 días antes del tratamiento con células madre o la movilización de células madre. En la administración de agentes terapéuticos que inhiban la unión de células madre a los tejidos linfáticos en conjunción con las células madre liberadas espontáneamente de los almacenes de células madre endógenas del individuo se prefiere administrar los agentes terapéuticos durante un periodo de 1-60 días, más preferentemente 1-30 días, y más preferentemente 1-14 días.

45 Los agentes que inhiben la unión de las células madre a los tejidos linfoides, particularmente a los centros germinales de tejidos linfoides, incluyen radiación, agentes quimioterápicos, inmunosupresores y antagonistas del CD45 y antagonistas del CD26. Las células madre que se encuentran en las fracciones mononucleares de la sangre completa o médula ósea, o las células madre purificadas de la sangre completa o la médula ósea se unen con las regiones de pulpa blanca del tejido linfático, incluyendo el bazo, e incluso más específicamente a los centros germinales activos en la pulpa blanca del bazo. Los anticuerpos contra CD45 particularmente contra el epítipo identificado por el anticuerpo monoclonal anti-CD45 30-F11 de rata anti-IgG2b de ratón, reduce la unión de células madre a sitios identificados en el bazo, haciendo que haya más células madre disponibles para la biodistribución hacia el órgano lesionado diana, y aumentando la regeneración tisular y recuperación funcional.

50 En otra realización, se administran agentes terapéuticos que reducen, destruyen, o anulan los centros germinales activos en el tejido linfóide resultando así en la reducción de la unión de las células madre al tejido linfático. Otra realización describe métodos para reducir el número de centros germinales activos en el bazo para reducir la unión de células madre al bazo, aumentando de esta manera el número de células madre circulantes disponibles para su suministro o asentamiento en órganos dañados que necesitan la reparación. Los agentes que suprimen la respuesta

inmunitaria pueden reducir el número de centros germinales activos en el bazo y otros tejidos linfáticos. Las categorías generales de moduladores inmunitarios incluyen agentes que interfieren la síntesis de purinas, los antimetabolitos, radiación, radiación del bazo, inmunosupresores, glucocorticoides, agentes anti-beta amiloide, anti-factor rhesus, agentes anti-TNF, agentes anti-receptor de célula T (TCR), agentes anti-interferones, agentes anti-interferón alfa, agentes anti-interferón beta, agentes anti-interferón gamma, agentes anti-TGF, agentes anti-TGF alfa, agentes anti-TGF beta, agentes anti-integrinas, agentes anti-alfa 4, agentes anti-interleucinas, agentes anti-interleucina 1, agentes anti-interleucina 2, agentes anti-interleucina 4, agentes anti-interleucina 5, agentes anti-interleucina 6, agentes anti-interleucina 12, agentes anti-interleucina 13, agentes anti-interleucina 23, agentes anti-IgE, agentes anti-proteína de adhesión vascular (VAP), agentes anti-B7, agentes anti -Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), agentes anti-BAFF (BLys), agentes anti-CTLA4, agentes, anti-complemento, agentes anti-CD2, agentes anti-CD3, agentes anti-CD4, agentes anti-CD5, agentes anti-CD20, agentes anti-CD23, agentes anti-CD25a, agentes anti-CD40, agentes anti-CD154 (CD40L), agentes anti-CD62L, agentes anti-CD80, agentes anti-CD147, agentes anti-LFA1, agentes anti-(CD11a), agentes anti-CD18, inhibidores de la síntesis de purina, inhibidores de la síntesis de pirimidina, agentes anti-proliferativos, agentes anti-metabolito, agentes anti-folato y agentes anti-mTOR.

La deficiencia de adenosina desaminasa también dará lugar a una reducción de la formación del centro germinal activo como agentes que desencadenarán la acumulación de desoxiATP (J Immunol 171: 5562-5570, 2003). De manera similar, los agentes que aumentan la expresión o activan el CCR7 dará lugar a una disminución de la formación del centro germinal activo.

También se pueden utilizar agentes quimioterápicos para inhibir la formación de centros germinales de tejido linfático o para destruir o anular los centros germinales. Ejemplos representativos incluyen los agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa, antineoplásicos y trióxido de arsénico.

Ejemplos de agentes alquilantes incluyen cisplatino y carboplatino, así como oxaliplatino, que son agentes alquilantes. Discapacitan la función celular formando enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, y fosfato en las moléculas biológicamente importantes.

Ejemplos de antimetabolitos son azatioprina, mercaptopurina, capecitabina, fluorouracilo que se convierte en bloques de construcción del ADN. Evitan que estas sustancias se puedan incorporar al ADN durante la fase "S" (del ciclo celular), parando el desarrollo y división normales. También afectan la síntesis de ARN. Debido a su eficacia, estos fármacos son los citostáticos que se utilizan más ampliamente.

Los alcaloides incluyen los alcaloides de la vinca y los taxanos. Los alcaloides de la vinca incluyen vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina. Los taxanos incluyen taxol, paclitaxel y docetaxel.

Las topoisomerasas son enzimas esenciales que mantienen la topología del ADN. La inhibición de las topoisomerasas de tipo I o tipo II interfieren con la transcripción y la replicación del ADN alterando el superenrollamiento apropiado del ADN. Algunos inhibidores de la topoisomerasa tipo I incluyen las camptotecinas: irinotecan y topotecan. Ejemplos de inhibidores de topoisomerasa tipo II incluyen amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, y tenipósido.

Los agentes antineoplásicos incluyen dactinomicina, doxorrubicina, epirrubicina, y bleomicina.

Definiciones

Definiciones utilizadas para describir las realizaciones:

El término agonista como se utiliza en el presente documento significa una entidad que activa un receptor específico o ruta de señalización corriente abajo esencial para mediar los efectos del receptor. Los agonistas pueden incluir pero no se limitan a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ligandos solubles, moléculas pequeñas, péptidos cíclicos, agentes de entrecruzamiento.

El término antagonista como se utiliza en el presente documento significa cualquier entidad que interfiere la unión de una estructura contraria del receptor, o con la activación de un receptor específico o ruta de señalización corriente abajo esencial para mediar los efectos del receptor. Los antagonistas pueden incluir, pero no se limitan a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, ligandos solubles, receptores de fusión con Fc, receptores quiméricos, moléculas pequeñas, péptidos cíclicos, péptidos.

El término inhibidor como se utiliza en el presente documento significa cualquier entidad que disminuya el efecto diana de un ligando específico o su receptor. Los inhibidores pueden ser moléculas pequeñas, agentes antisentido, ácidos nucleicos incluyendo ARNip y microARN.

Tejido linfático, ganglios linfáticos, bazo y centros germinales

Tejido linfático es una forma especializada de tejido conjuntivo reticular del sistema linfático que contiene un gran número de linfocitos. Este tipo de tejido constituye el bazo, el timo y las amígdalas, así como ganglios viscerales, placas de Peyer y lácteos que se asocian con membranas mucosas del tracto gastrointestinal.

5 **Ganglio linfático** es un pequeño órgano con forma de bola del sistema inmunitario, distribuido ampliamente a lo largo del cuerpo incluyendo la axila y estómago/intestino y unido por vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos son acuartelamientos de células B, células T, y otras células inmunitarias. Los ganglios linfáticos se encuentran por todo el cuerpo, y actúan como filtros o trampas para partículas extrañas. El ganglio linfático está rodeado de una cápsula fibrosa, y dentro del ganglio linfático la cápsula fibrosa se extiende formando trabéculas. La sustancia del ganglio linfático se divide en la corteza externa y la médula interna rodeada por la primera, alrededor excepto en el hilio, donde la médula se pone en contacto directamente con la superficie. La corteza externa consiste principalmente en células B dispuestas en folículos, que pueden desarrollar un centro germinal cuando se desafían con un antígeno, y la corteza más profunda consiste en células T. Hay una zona conocida como zona subcortical donde las células T (o células que son principalmente rojas) interactúan principalmente con las células dendríticas, y donde el entramado reticular es denso.

10 El **bazo** es un órgano intraperitoneal localizado en el lado izquierdo del abdomen entre el estómago y el diafragma. Este órgano es un sitio regulador principal del sistema inmunitario. Es un órgano vascular que tiene un gran suministro de sangre arterial. Al entrar en el bazo, el flujo de sangre entra en una red de vasos sanguíneos dilatados o "senos", que reposan entre grandes masas de linfocitos. Las paredes de los senos contienen fagocitos que son capaces de englobar células muertas y partículas extrañas de la sangre y las retira de la circulación general. Como los ganglios linfáticos, el bazo es una fuente importante de anticuerpos, sin embargo, en mayor medida que los ganglios linfáticos, el bazo está dedicado a la retirada de glóbulos rojos anormales o gastados normalmente ("muertos") de la circulación para destruirlos.

20 El bazo contiene una pulpa blanca y una pulpa roja. La pulpa roja del bazo mantiene macrófagos que normalmente filtran y retiran los glóbulos rojos senescentes o defectuosos (RBC) y las bacterias o los glóbulos rojos marcados con anticuerpos de la circulación. La pulpa blanca del bazo contiene los compartimentos linfoides y es crucial para la vigilancia inmunitaria y la respuesta: sintetiza anticuerpos contra agentes patógenos invasores y libera plaquetas y neutrófilos en respuesta a una hemorragia o infección. Durante el desarrollo se cree que el bazo tiene múltiples papeles incluyendo que es el primer sitio de hematopoyesis (a las seis semanas de gestación). Aunque se ha creído durante mucho tiempo que el bazo pierde su función hematopoyética durante los estadios tempranos de desarrollo, cuando la hematopoyesis de la médula ósea la asume, recientes investigaciones han identificado que el bazo es un sitio de generación de células madre, diferenciación de células madre en diferentes linajes y almacenamiento de células madre (Trends Mol Med 11(6):271-276, 2005;). Sin embargo, los sitios dentro del bazo donde se acumulan las células madre exógenas y los mecanismos moleculares por los que las células madre exógenas se unen al bazo aún no se conocen.

30 Las vainas linfoides peri arteriales (PALS) de la pulpa blanca del bazo están pobladas principalmente por células T, mientras que las partes linfoides están pobladas principalmente por células B. Los centros germinales (GC) son sitios dentro de los ganglios linfáticos o nódulos linfáticos en los tejidos linfáticos periféricos y en la pulpa blanca del bazo donde los linfocitos B maduros intensos, conocidos de otra manera como Centrocitos, proliferan rápidamente, se diferencian, mutan mediante hipermutación somática y cambian de clase durante las respuestas de anticuerpo. Los centros germinales son una parte importante de la respuesta inmunitaria humoral de células B. Se desarrollan dinámicamente después de la activación de las células B mediante el antígeno dependiente de T. Histológicamente, los GC describen partes distinguibles microscópicamente en los tejidos linfoides. Las células B activadas migran desde el foco primario en los folículos primarios del sistema folicular y comienzan una expansión monoclonal en el ambiente de las células dendríticas foliculares (FDC).

40 Después de varios días de expansión, las células B mutan su ADN que codifica anticuerpos y así generan diversos clones en el centro germinal. Esto implica sustituciones, eliminaciones e inserciones aleatorias debido a hipermutación somática. Con algún estímulo no identificado de las FDC las células B que maduran (Centroblastos) migran desde la zona oscura a la zona clara y comienzan a exponer sus anticuerpos en la superficie y en se les hace referencia en este estadio como Centrocitos. Los centrocitos están en un estado de apoptosis activada y compiten por las señales de supervivencia de las FDC que presentan el antígeno. Se cree que este proceso de rescate depende de la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Las células B funcionales tienen que interactuar entonces con las células T auxiliares para obtener las señales de diferenciación final. Esto también implica un cambio de fenotipo, por ejemplo de IgM a IgG. Se cree que la interacción con las células T evita la generación de anticuerpos autorreactivos. Las células B se convierten en células plasmáticas diseminando anticuerpos o en células B de memoria que se activarán con contactos posteriores con el mismo antígeno. También pueden reiniciar el proceso de proliferación completo, mutación y selección de acuerdo con la hipótesis del reciclado.

50 Las células B contenidas en la región de la pulpa blanca del bazo se pueden dividir adicionalmente en áreas específicas, identificadas por tinción con marcadores moleculares específicos. La zona marginal del bazo contiene células B maduras no circulantes que bordean la pulpa blanca creando una separación entre la pulpa blanca y la pulpa roja y expresan altos niveles de CD21 e IgM y CD24 y CD79a, y niveles medibles de CD9 y CD22. La zona del

manto rodea los folículos del centro germinal normal y expresa CD21, CD23 y CD38. La zona folicular está contenida dentro de los centros germinales y expresa altos niveles de IgD y CD23, niveles intermedios de CD21 y CD2, y también se pueden identificar por tinción con PNA. El centro germinal se distingue mejor mediante unión con PNA y expresa niveles más altos de CD54 que la zona folicular. Los centros germinales tienen una población especial de células T auxiliares que parece que se distribuyen uniformemente en todos los centros germinales. Los centros germinales se asocian tradicionalmente con respuestas inmunitarias que necesitan células T auxiliares, aunque esto no es absoluto. Los centros germinales son donde se produce la mutación genética hipervariable y se generan células B productoras de IgG de alta afinidad. Los centros germinales activos tienen macrófagos tangibles y células dendríticas que expresan CD21. Los centros foliculares también se pueden identificar por la expresión de CD45R (B220) [Toxicologic Pathology, 35:366-375, 2007]. Los centros foliculares CD45R se encuentran rodeando los centros germinales que expresan Bcl6 y Bcl2. BioEssays 29:166-177, 2007; Toxicol Pathol 34(5): 648-655, (2006)].

El CD45 es un antígeno de leucocitos común también conocido como PTPRC (proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo C), que se encuentra en todas las células hematopoyéticas diferenciadas excepto en eritrocitos y células plasmáticas. También se expresa en linfomas, en células de B leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, y leucemia no linfocítica aguda. Se ha demostrado que es esencial en la señalización del receptor de antígeno de célula T y B. La familia del CD45 consiste en múltiples miembros que son todos ellos productos de un único gen complejo. Este gen contiene 34 exones y tres exones de las transcripciones primarias se cortan y empalman alternativamente para generar hasta ocho ARNm maduros diferentes y después de la traducción ocho productos proteicos diferentes. Estos tres exones generan las isoformas RA, RB y RC.

Existen distintas isoformas del antígeno CD45. Las isoformas del antígeno CD45 incluyen CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R (ABC). El CD45RA se localiza en células T intactas y CD45RO se localiza en las células T de memoria. El CD45 también está altamente glicosilado. El CD45R es la proteína más larga y migra a 200 kDa cuando se aísla de las células T. Las células B también expresan CD45R con una glicosilación más pesada, dando un peso molecular de 220 kDa, y por lo tanto el nombre de B220; la isoforma de célula B de 220 kDa. La expresión de B220 no se restringe a células B y también se puede expresar en células T activadas, en un subconjunto de células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T intactos expresan grandes isoformas de CD45 y son normalmente positivos al CD45RA. Los linfocitos T activados y de memoria expresan la isoforma más corta de CD45, CD45RO, que carece de los exones RA, RB y RC. Esta isoforma más corta facilita la activación de células T. El dominio citoplasmático de CD45 es uno de los más conocidos y tiene una actividad fosfatasa intrínseca que elimina un grupo fosfato inhibidor de una tirosina cinasa llamada Lck (en las células T) o Lyn/Fyn/Lck (en las células B) y la activa. El CD45 puede existir en ambas formas monomérica y dimerica, y la dimerización puede regular negativamente la actividad fosfatasa del CD45 (Blood v103(9):3440-3447,2004).

Como el CD45 se expresa en todas las células hematopoyéticas y es el más ampliamente expresado de todos los antígenos hematopoyéticos, se ha utilizado para aislar la población de células que también contiene células madre hematopoyéticas en el trasplante y otros modelos de reconstitución de células madre, sin embargo, las células madre mesenquimáticas, aunque se derivan de una población de precursores tempranos de CD45+, son en general negativas a CD45 (Stem Cells 28:140-151, 2010). Se ha demostrado una ausencia completa de todas las isoformas de CD45 en ratones para influenciar la retención de células madre, motilidad y asentamiento en la médula ósea y para que tengan un papel en la generación de células B funcionales en el bazo a partir de células madre anteriores (J. Exp. Med. 205:2381-2395, 2008). De manera interesante, los ratones knock-out a CD45, que carecen de todas las isoformas de CD45, tenían un número reducido de células progenitoras hematopoyéticas cKit+Lin- en la médula ósea, pero un número aumentado en el bazo.

30-F11 es una IgG2b monoclonal de rata que surgida contra el timo y bazo de origen de ratón. El clon 30-F11 reacciona con ambos aloantígenos (CD45.1 y CD45.2) y todas las isoformas de CD45.30-F11 y el clon 30-F4 bloquean cada uno la unión entre ellos a CD45 indicando que se unen al mismo o a epitopos solapados en el CD45 (J Immunol 127(3):982-986, 1981). De la misma manera, estos dos clones se bloquean de manera cruzada con un anticuerpo descrito por Dennert et. al., sin embargo, el anticuerpo anti-CD45 55-6.1 no se bloquea de manera cruzada con 30-F11 o 30-F4 (Cell Immunol 53:350-364, 1980).

El anticuerpo 30-F11 radiomarcado muestra una acumulación más alta en el bazo de ratón (un 60 %), con solo un 20 % de acumulación en la médula (Blood 93(2):737-745, 1999), y se ha utilizado en ratones para suministrar la radiación hematopoyética dirigida. El anticuerpo 30-F11 se ha utilizado para identificar, en conjunción con el antígeno Seal, fracciones de células madre del músculo de los ratones, aunque el CD45 se expresan en todas las células hematopoyéticas (PNAS 99 1341-1346, 2002). Se han evaluado el 30-F11 radiomarcado y fragmentos de F(ab')₂ del 30-F11 como un método para suministrar radioterapia. La captación de 30-F11 era más drástica en los bazos de los ratones, seguida por el ganglio linfático axilar (Cancer Res 52(5):1228-34, 1992).

El polipéptido CD45 se puede producir por procedimientos que se han publicado. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales anti-CD45 se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); y Hurrell, J. G. R.,

Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1982). Como sería evidente para un experto habituado en la técnica, los anticuerpos policlonales se pueden generar a partir de varios animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas. La producción de anticuerpos humanizados se conoce bien. Véase, Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988). "Reshaping human antibodies for therapy". Nature 332 (6162): 332:323. Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA. (Dic 1989). "A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor.". Proc Natl Acad Sci U S A. 86 (24): 10029-33. Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. (mayo 1997). "Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells.". J Immunol Methods 204 (1): 77 87.

Métodos y agentes para evitar la unión de células madre al tejido linfático

Otras realizaciones particulares proporcionan un método para moderar la unión de células madre a un bazo exponiendo el bazo a una solución de antagonistas de un antígeno del agrupamiento de diferenciación 45 (CD45). La solución de antagonistas del antígeno CD45 puede configurarse o formularse para unirse al epítipo 30-F11. La solución de antagonistas del antígeno CD45 puede formularse para promover la regeneración terapéutica aumentando el suministro de células madre en los tejidos u órganos dañados. La solución que contiene el anticuerpo contra el antígeno CD45 puede formularse para unirse al epítipo 30-F11 y a un equivalente humano del epítipo 30-F11.

La presente divulgación describe métodos para reducir la unión de células madre al tejido linfático tal como los ganglios linfáticos y el bazo y el uso de estos métodos para tratar pacientes humanos. La divulgación describe el sitio específico dentro del bazo donde las células madre circulantes se unen en el bazo, y métodos para aumentar o disminuir la unión de las células madre a este sitio. El análisis de inmunofluorescencia e histológico de secciones frescas del grosor del bazo demostraba que las células madre circulantes del sistema vascular se unen a centros germinales activos del bazo cuando se administran tanto *in vivo* como *ex vivo*, como se muestra en los Ejemplos 1, 2, 3 y 4. Un método para disminuir la cantidad de células madre unidas al bazo es el suministro de agentes que bloqueen la unión de las células madre administradas a la diana molecular de los centros germinales activos del bazo. De acuerdo con el procedimiento de la presente divulgación el anticuerpo 30-F11 se une al antígeno CD45 de ratón y bloquea la unión de las células madre a los centros terminales del bazo de ratón. Los anticuerpos anti-CD45 humano que pueden ser equivalentes a la IgG2b 30-F11 de rata anti-CD45 de ratón incluyen el YAM1568 que reconoce el epítipo P del CD45 humano (Nucl Med 47:1335-1341, 2006; En: Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens pp. 811-814, 1987; Transplantation 40:538-544, 1985), clon HI30 anti-CD45, o anticuerpos YTH-24 y YTH-54 anti-CD45 humano.

Otra realización es el uso de antagonistas de CD26 tales como los anticuerpos contra CD26 para inhibir la unión de las células madre a los centros germinales. Como el CD26 lo expresan las células madre y es el antígeno presente en las células madre que las adhiere al tejido linfático en particular el tejido linfático de los centros germinales. Bloqueando el CD26 de las células madre, las células madre son incapaces de unirse a los tejidos linfáticos.

Agentes que inhiben, regulan negativamente la formación de centros germinales o destruyen o anulan los centros germinales

Otra realización es la inhibición de la unión de las células madre a los tejidos linfáticos inhibiendo o regulando negativamente la proliferación de los centros germinales o destruyendo o anulando los centros germinales. Los centros germinales (GC) se desarrollan dinámicamente después de la activación de las células B mediante el antígeno dependiente de T. El antígeno de célula T que activa las células B y por lo tanto induce la proliferación de los centros germinales es el CD40L (también conocido como CD154) que se une al receptor de CD40 presente en las células B. Esta unión del CD40L al receptor de CD40 no solo activa las células B sino que también induce la proliferación de centros germinales. Por lo tanto, otra realización está compuesta por la administración a un individuo de un agente que inhiba la unión del CD40L al CD40. Ejemplos de dichos agentes son los anticuerpos antagonistas de CD40 o de CD40L.

Otra proteína importante para el desarrollo de los centros germinales es la 'proteína asociada a la activación de señalización linfocítica' (SAP). (Hai Qui, et al., Nature, 455: 764-769 (2008). Por lo tanto, un anticuerpo contra SAP inhibiría la formación de centros germinales y por lo tanto se inhibiría la unión de las células madre a los tejidos linfáticos.

La IL-21 es otro polipéptido importante para la diferenciación y la proliferación de células B del centro germinal mediante un mecanismo intrínseco de las células B. La ausencia de señalización de IL-21 afecta profundamente la respuesta de las células B al antígeno proteico, reduciendo la formación de células plasmáticas del bazo y médula ósea y la persistencia y función de GC, influenciando su proliferación, transición a células B de memoria, y la maduración de afinidad. [Zotos, D., et al. JEM 207: 365-378 (2010)]. Por lo tanto, administrando antagonistas tales como anticuerpos contra IL-21 a alguien se pueden regular negativamente los centros germinales, y se inhibe su formación. Esto inhibiría la unión de células madre al tejido linfático y bazo debido a la falta de centros germinales en el tejido linfático.

Los agentes quimioterápicos pueden inhibir la unión de células madre a los centros germinales de los tejidos linfoides incluyendo los ganglios linfáticos, placas de Peyer y la pulpa blanca del bazo. También, los agentes que suprimen la respuesta inmunitaria pueden reducir el número de centros germinales activos en el bazo. Dichos agentes incluyen:

Azatioprina, (IMURAN®, Prometheus Laboratories, San Diego, CA) administrada a 3 - 5 mg/kg, diariamente, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. La azatioprina interfiere con la síntesis de purinas (adenina y guanina), que son necesarias para la síntesis de ADN. Las células de crecimiento rápido, incluyendo las células T y células B, están afectadas particularmente por la inhibición de la síntesis de purina.

Los corticosteroides tales como la dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, fosfato sódico de dexametasona y betametasona. Los comprimidos de dexametasona (Merck) y las inyecciones de fosfato sódico de dexametasona se pueden administrar 1 - 14 días antes del tratamiento con células madre más preferentemente 3 - 7 días y más preferentemente 3 - 4 días antes del tratamiento con células madre. La cantidad total de dexametasona que se administra es una cantidad suficiente para regular negativamente los centros germinales en el tejido linfático de manera que las células madre no se pueden unir al tejido linfático. La cantidad de dexametasona durante un periodo de tiempo puede variar desde 2 mg a 3 g, preferentemente 27 mg en total. La dosis diaria de dexametasona puede variar desde 0,75 mg a 700 mg al día preferentemente 7 mg al día. La dexametasona, como otros esteroides glucocorticoides inhibe la formación y proliferación de centros germinales en los tejidos linfáticos.

El ácido micofenólico (cápsulas de liberación retardada Myfortic®, Novartis Pharmaceuticals Corporation East Hanover, New Jersey, a 720 mg administrados dos veces al día (1440 mg de dosis diaria total) con el estómago vacío, una hora antes o dos horas después de la ingestión de alimento), preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. (CellCept® Roche Labs, Nutley, NJ, micofenolato de mofetilo) en comprimidos y cápsulas, suspensión oral de clorhidrato de micofenolato mofetilo para inyección intravenosa, 2-morfolinoetilen éster de ácido micofenólico (MPA), administrado IV, 1 g dos veces al día por vía oral 1,5 g administrados dos veces al día, preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. Inhiben la monofosfato de inosina deshidrogenasa, la enzima que controla la tasa de síntesis monofosfato de guanina en la ruta *de novo* de la síntesis de purina utilizada en la proliferación de linfocitos B y T. El micofolato es potente y se puede utilizar en lugar del antiguo anti-proliferativo azatioprina. Normalmente se utiliza como parte de un régimen de tres compuestos inmunosupresores, también incluye un inhibidor de la calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) y prednisolona.

Leflunomida, Sanofi-Aventis U.S. LLC, Bridgewater, NJ 100 mg al día durante tres días, 3-4 días antes de la administración de las células madre. La leflunomida es un inhibidor de la síntesis de pirimidina que pertenece a la clase de fármacos DMARD (fármaco antirreumático modificador de la enfermedad), que son muy heterogéneos química y farmacológicamente. La leflunomida es un fármaco inmunomodulador que inhibe la dihidrofolato deshidrogenasa (una enzima implicada en la síntesis de pirimidina) (abreviada como DHODH).

La teriflunomida, el metabolito activo de la leflunomida, Sanofi-Aventis U.S. LLC, Bridgewater, NJ 100 mg al día durante tres días, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El metotrexato - es un fármaco antimetabolito y anti-folato. Actúa inhibiendo el metabolismo del ácido fólico. Se administra por vía oral o intramuscular en dosis de 15 a 30 mg al día durante hasta cinco días, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Mylan Pharmaceuticals, Morgantown, West Virginia.

Macrólidos inmunosupresores:

El tacrolimus reduce la producción de interleucina-2 (IL-2) por las células T. En forma de cápsula o inyección 0,10-0,15 mg/kg/día, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (Astellas Pharma US, Inc. Deerfield, IL).

Ciclosporina - Se cree que la ciclosporina se une a la proteína citosólica ciclofilina (inmunofilina) de linfocitos inmunocompetentes, especialmente linfocitos T. Comercializado como Sandimmune®, en forma de cápsulas, solución oral o inyección, y dosificado a 14 - 18 mg/kg/día, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey).

El Pimecrolimus (Elidel) es un derivado del macrolactamo ascomicina. Se ha demostrado *in vitro* que el pimecrolimus se une a la macrofilina-12 e inhibe la calcineurina. Por lo tanto, el pimecrolimus inhibe la activación de células T inhibiendo la síntesis y liberación de citocinas de células T. El pimecrolimus también evita la liberación de citocinas inflamatorias y mediadores de mastocitos. El pimecrolimus se utiliza como una crema tópica al 1 % durante hasta 6 semanas preferentemente antes de la terapia con células madre.

El Gusperimus es un derivado del antibiótico antitumoral espergualina, e inhibe la maduración de células T estimulada por la interleucina-2 para las fases S y G2/M y la polarización de las células T en células T efectoras Th1 que secretan IFN gamma, dando como resultado la inhibición del crecimiento de células T CD4 intactas activadas.

Se administra por vía SC, 0,5 mg/kg/día durante 21 días consecutivos, preferentemente completado 3-4 días antes de la administración de las células madre. Nippon Kayaku Co., Ltd.

5 El everolimus (RAD-001) se administra por vía oral a una dosis de 10 mg/día, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Novartis, East Hanover, NJ, con la marca registrada Zortress (USA).

10 Talidomida. La talidomida puede reducir los niveles de NF α (THALOMID®, Celgene Corporation, Summit, NJ). La dosificación aceptable es 100 - 300 mg/día preferentemente a la hora de acostarse 1 hora después de la cena, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

15 La lenalidomida es un derivado de la talidomida 50.000 veces más potente que la talidomida en la inhibición del factor alfa de necrosis tumoral y tiene reacciones farmacológicas adversas menos graves. Celgene Corporation, Summit, NJ) 25 mg una vez al día por vía oral los días 1-21, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

La anakinra es una versión recombinante, no glicosilada de la IL-1RA humana (RA por antagonista del receptor) El Kineret® Biovitrum, Estocolmo, Suecia suministrado como una inyección concentrada que contiene 100 mg cada dosis única, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

20 El infliximab (marca registrada REMICADE®) es un anticuerpo monoclonal contra el factor alfa de necrosis tumoral (TNF α). Centocor Ortho Biotech, Horsham, PA administrado por infusión intravenosa a una dosis de desde 3 mg/kg hasta 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

25 El golimumab (CNTO 148) es un anticuerpo monoclonal humano y se comercializa bajo la marca Simponi. El golimumab se dirige al TNF-alfa. Centocor Ortho Biotech, Horsham, PA administrado por inyección subcutánea de 50 mg en 0,5 ml dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

30 El adalimumab (HUMIRA, Abbott Laboratories, North Chicago, IL) es un inhibidor del TNF, el adalimumab se une al TNF α , evitando que active los receptores TNF; el adalimumab se construyó a partir de anticuerpo monoclonal humano completo, comercializado tanto en jeringas precargadas de 0,8 ml y también en dispositivos precargados tipo lápiz que contienen cada uno 40 mg de adalimumab. Para regular negativamente los centros germinales antes de la administración de células madre de al menos 40 mg de adalimumab se debería administrar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-7 días antes de la administración de las células madre. Preferentemente, se deberían administrar dosis de 40 mg de adalimumab dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-7 días antes de la administración de las células madre.

40 El certolizumab pegol es un anticuerpo mononuclear dirigido contra el factor alfa de necrosis tumoral. Más precisamente, es un fragmento Fab' PEGilado de un anticuerpo monoclonal humanizado inhibidor del TNF. Se administra con dos inyecciones subcutáneas de 200 mg. dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (UCB Inc., Atlanta, Georgia).

45 El temsirolimus (Pfizer Corp.) es un inhibidor específico de mTOR (diana en mamíferos de rapamicina) e interfiere con la síntesis de proteínas que regulan la proliferación y supervivencia de las células tumorales. La dosis recomendada de temsirolimus es de 25 mg IV en infusión durante 30-60 minutos, dentro de los 7-14 días y preferentemente dentro de 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El zotarolimus es un derivado semi-sintético de la rapamicina, Abbot Laboratories, North Chicago, IL) Biolimus A9 Biosensors International, Singapur.

50 El eculizumab (marca registrada Soliris) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de complemento C5. Este anticuerpo bloquea la escisión de C5 y detiene el proceso de destrucción celular mediada por complemento. El Soliris se administra como una infusión IV administrada en dosis de 600 mg o dosis de 900 mg, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (Alexion Pharmaceuticals Cheshire, CT)

55 El mepolizumab (marca registrada propuesta Bosatria) es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce la interleucina-5 (IL-5) administrado como una infusión de 750 mg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. GlaxoSmithKline, King of Prussia, PA.

60 El omalizumab (marca registrada Xolair, Genentech/Novartis) es un anticuerpo humanizado. El omalizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1k humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente a una Inmunoglobulina E (IgE) humana. El Xolair (Omalizumab) de 150 a 375 mg se administra SC, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

65 El nerolimumab (BAYX) es un anticuerpo anti-TNF de ratón y se puede administrar a 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El faralimumab es un anticuerpo anti-TNF de ratón y se puede administrar a 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

- 5 El elislimumab (también conocido como B-E8) es un anticuerpo monoclonal de ratón y un fármaco inmunosupresor. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

- 10 El lebrizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se ha diseñado para unirse específicamente a la IL-13 y se puede administrar a 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Genentech, South San Francisco, California,

- 15 El ustekinumab (de nombre experimental CNTO 1275, nombre comercial Stelara propiedad de Centocor) es un anticuerpo monoclonal humano. Se dirige contra la interleucina 12 y la interleucina 23, proteínas de origen natural que regulan el sistema inmunitario y los trastornos inflamatorios inmunomediados. 2 inyecciones, separadas un mes, de 90 o 45 miligramos, o una única inyección de 45 mg, completadas 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

- 20 El muromonab-CD3 (marca registrada Orthoclone OKT3, comercializado por Janssen-Cilag) es un anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de CD3, una proteína de membrana de la superficie de células T. Se administra a 5 mg/día en una única inyección intravenosa en embolada durante 10 a 14 días. La administración se debería completar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Los niños que pesen menos de 13,61 kg deberían recibir 2,5 mg/día (Ortho Biotech, Raritan, NJ).

- 25 El otelixumab es un anticuerpo monoclonal que se dirige a la cadena épsilon del CD3. Se administra a 5 mg/día en una única inyección intravenosa en embolada durante 10 a 14 días. La administración se debería completar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Los niños que pesen menos de 13,61 kg deberían recibir 2,5 mg/día. El anticuerpo se ha desarrollado por Tolerx, Inc., en colaboración con GlaxoSmithKline y se fabrica por Abbott Laboratories.

- 30 El teplizumab es un anticuerpo monoclonal modificado con Fc humanizado también conocido como MGA031 y hOKT3γ1(Ala-Ala). Es un anticuerpo anti-CD3. Se puede administrar de acuerdo con la presente divulgación a una dosis de 5 mg/día en una única inyección intravenosa en embolada durante 10 a 14 días. La administración se debería completar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Los niños que pesen menos de 13,61 kg deberían recibir 2,5 mg/día (Eli Lilly, Indianapolis, IN).

- 35 El visilizumab (con una tentativa de marca registrada Nuvion, PDL BioPharma Inc.) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al CD3 en las células T activadas. Se puede administrar de acuerdo con la presente divulgación a una dosis de 5 mg/día en una única inyección intravenosa en embolada durante 10 a 14 días. La administración se debería completar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Los niños que pesen menos de 13,61 kg deberían recibir 2,5 mg/día.

- 40 El clenoliximab es un anticuerpo monoclonal contra CD4. Se puede administrar de acuerdo con la presente divulgación a una dosis de 5 mg/día en una única inyección intravenosa en embolada durante 10 a 14 días. La administración se debería completar dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

- 45 El keliximab es un anticuerpo monoclonal que se une a los leucocitos sanguíneos mediante la proteína CD4. Se administra a una dosis de 3 mg/kg en infusión dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

- 50 El zanolimumab (marca registrada esperada HuMax-CD4) es un anticuerpo monoclonal humano que se dirige a CD4 y se administra a una dosis de 20 mg/kg/día dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (Genmab, A/S COPENHAGEN/TenX Biopharma, Inc., Philadelphia, PA).

- 55 El efalizumab (marca registrada Raptiva, Genentech, Merck Serono) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante. El efalizumab se une a la subunidad CD11a del antígeno 1 asociado a la función del linfocito. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

- 60 El erlizumab, también conocido como rhuMAb, es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante desarrollado por Genentech en colaboración con Roche. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. El fármaco funciona bloqueando un factor de crecimiento en los vasos sanguíneos. Específicamente, el erlizumab se dirige al CD18 y una integrina LFA-1.

65

- 5 El afutuzumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (Hoffmann-La Roche Inc.)
- 10 El ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD20. Se dirige a los linfocitos B maduros. Está en desarrollo en Genentech, y Biogen Idec. Subsidiarias de Hoffmann La Roche. De acuerdo con la presente divulgación se dosifica a 200 mg y 600 mg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 15 El pascolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-4. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 20 El lumiliximab es un anticuerpo monoclonal que se dirige contra CD23. De acuerdo con la presente divulgación se puede dosificar a 50 mg/m², a 450 mg/m², a 500 mg/m² a dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. El fármaco es un anticuerpo quimérico de *Macaca irus* y *Homo sapiens*. (Biogen IDEC)
- 25 El teneliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une a la proteína CD40 inmunoestimulante. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 30 El toralizumab (IDEC 131) es un anticuerpo monoclonal humanizado. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar una vez a la semana mediante inyección subcutánea a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. (IDEC Pharmaceuticals Corporation)
- 35 El aselizumab es un anti-CD62L administrado mediante infusión I.V., a dosis que varían desde 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, y 2,0 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- El galiximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD80 (Biogen Idec) que se administra a una dosis de 500 mg/m² IV dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Es un anticuerpo quimérico de *Macaca irus* y *Homo sapiens*.
- 40 El gavilimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón (también conocido como ABX-CBL desarrollado por Abgenix. Se une al antígeno CD147. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar infusión I.V., a una dosis de 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 45 El BG9588 un anti-CD40L humanizado que se administra a 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. La administración de anticuerpos contra el CD154, también llamado ligando de CD40 o CD40L, es una proteína que se expresa primariamente en las células T activadas y es un miembro de la superfamilia de moléculas TNF. Se une al CD40 en las células presentadoras de antígeno (APC), lo que da lugar a muchos efectos dependiendo del tipo celular direccionado. En general el CD40L tiene un papel de molécula co-estimulante e induce la activación en las APC en asociación con la estimulación del receptor de células T mediante moléculas del MHC en las APC. En total, el CD40L tiene tres parejas de unión: CD40, integrina $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 11\beta 33$.
- 50 El (Hu5c8) 5c8, un anticuerpo monoclonal que se une a CD154 (ligando de CD40), bloqueando así la interacción entre CD40 y CD154 se administra a 20 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 55 El belimumab (marca registrada Benlysta previamente conocido como LymphoStat-B), es un anticuerpo monoclonal completamente humano que reconoce específicamente e inhibe la actividad biológica del estimulador de linfocitos B (BLyS), también conocido como factor de activación de células B de la familia del TNF (BAFF) Human Genome Sciences. De acuerdo con la presente divulgación, se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 60 El ipilimumab (también conocido como MDX-010 o MDX-101) es un anticuerpo monoclonal humano anti-CTLA-4 (asociado a linfocitos T citotóxicos) que se ha desarrollado por Bristol-Myers Squibb. De acuerdo con la presente divulgación se administra a una dosis de 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 65 El tremelimumab (anteriormente ticilimumab, CP-675.206) es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano producido por Pfizer. Se une a la proteína CTLA-4, que se expresa en la superficie de los linfocitos T

- 5 activados. El tremelimumab bloquea la unión de los ligandos de células presentadoras de antígeno B7.1 y B7.2 al CTLA-4 dando como resultado la inhibición de la regulación negativa mediada por B7-CTLA-4 de la activación de células T; posteriormente, el B7.1 o B7.2 pueden interactuar con otra proteína receptora de superficie, CD28, dando como resultado una activación de células T mediada por B7-CD28 no opuesta por la inhibición mediada por B7-CTLA-4. El tremelimumab se administra por infusión IV a 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 10 El bertilimumab es un anticuerpo monoclonal humano que se une a la eotaxina-1. (iCo Therapeutics Inc. Vancouver, B.C.) De acuerdo con la presente divulgación se administra a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 15 El lerdelimumab (CAT-152) es una anti-TCP beta-2 estando en desarrollo por Cambridge Antibody Technology. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 20 El metelimumab (CAT-192) es un anticuerpo IgG4 monoclonal humano desarrollado por Cambridge Antibody Technology que neutraliza al TGF beta 1. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. El natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra la molécula de adhesión celular integrina- α 4. Se comercializa por Biogen Idec y Élan como Tysabri y se llamó anteriormente Antegren. El natalizumab se administra a una dosis de 300 mg en infusión intravenosa durante aproximadamente una hora dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 25 El tocilizumab o atlizumab, desarrollado por Hoffmann-La Roche y Chugai con las marcas registradas Actemra y RoActemra, es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor de la interleucina-6 (IL-6R). De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar mediante infusión intravenosa a 8 mg/kg, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 30 El odilimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la cadena alfa del antígeno 1 asociado a la función de la proteína linfocítica, que está implicado en reacciones inmunitarias. Se administra a una dosis de 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 35 El basiliximab (de marca registrada Simulect) es un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano contra la cadena α (CD25) del receptor de IL-2 de las células T. La dosis es de 20 mg dos veces dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.
- 40 El daclizumab (de marca registrada Zenapax) es un anticuerpo monoclonal terapéutico humanizado contra la subunidad alfa del receptor de IL-2 de las células T. Roche Pharmaceuticals, Hoffmann - La Roche Inc, 340 Kingsland Street, Nutley, New Jersey. Se administran 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 45 El inotimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la cadena alfa del receptor de la interleucina-2. OPi (anteriormente Orphan Pharma International). Se administran 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 50 El zolimumab aritox es un anticuerpo monoclonal y es un anticuerpo anti-CD5 que se une a la cadena A de la proteína ricina (que se refleja en el nombre del fármaco *aritox*). De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 55 El atorolimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra el factor Rhesus. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 60 El cedelizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD4. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- 65 El dorlizumab es un anticuerpo monoclonal quimérico/humanizado y un fármaco inmunosupresor. Se administra a una dosis de 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.
- El fontolizumab (de nombre comercial HuZAF) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-interferón gamma. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis I.V., de fontolizumab administrada como 4,0 mg/kg o 10,0 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células

madre. (PDL Biopharma)

El gantenerumab es un anticuerpo monoclonal anti-beta amiloide (Roche). Se administra a una dosis de 10 mg/kg de fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

5 El gomiliximab es un anticuerpo monoclonal que se dirige al receptor de IgE de baja afinidad (FcεRII o CD23). De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

10 El maslimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón que se dirige al receptor de células T. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

15 El morolimumab es un anticuerpo monoclonal humano contra el factor Rhesus humano. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

20 El pexelizumab es un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el componente 5 del sistema de complemento. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

25 El reslizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-5. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar como una infusión a una dosis preferida de reslizumab de 3,0 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. (Ception Therapeutics Inc).

30 El rovelizumab, también conocido como LeukArrest y Hu23F2G, es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD11/CD18 que suprime los leucocitos sanguíneos. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

35 El siplizumab (MEDI-507) es un anticuerpo monoclonal anti-CD2 con una IgG1, kappa humana dirigida contra CD2. El agente ha demostrado potentes efectos inmunomoduladores, que suprimen selectivamente la función de las células T y NK. El siplizumab se une a CD2, un receptor específico que se encuentra en las células T y células NK, desencadenando de esta manera una respuesta inmunitaria del huésped que da como resultado la lisis de las células CD2+, la supresión selectiva del sistema inmunitario, y el control del crecimiento de células T activadas. De acuerdo con la presente divulgación el siplizumab se puede administrar a una dosis preferida de 0,04 mg/kg i.v., y 5 o 7 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. (Medimmune)

40 El talizumab (TNX-901) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se está desarrollando por Tanox en Houston, Texas. Se diseñó para dirigirse a la inmunoglobulina E (o IgE) y los linfocitos B que expresan IgE específicamente, sin unirse a la IgE ya unida a los receptores de IgE de los mastocitos y basófilos. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

45 El omalizumab es un anticuerpo monoclonal anti-IgE, desarrollado por Tanox, Novartis, y Genentech. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

50 El telimomab aritox es un anticuerpo monoclonal de ratón. El anticuerpo se une a la cadena A de la proteína ricina (que se refleja en el nombre del fármaco *aritox*). De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

55 El vapaliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-VAP-1. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

60 El vepalimumab es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VAPI. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

65 El abatacept (comercializado como Orencia) es una proteína de fusión compuesto por una inmunoglobulina fusionada con el dominio extracelular de CTLA-4, una molécula capaz de unirse a B7, evitando así la activación completa de las células T. El abatacept se debería administrar como una infusión intravenosa de 30 minutos de acuerdo con el calendario de dosis basado en el peso. Las dosis deberían ser preferentemente de 500 mg para < 60 kg; 750 mg para 60 kg-100 kg; y 1 gramo para > 100 kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de

la administración de las células madre.

Belatacept (Bristol-Myers-Squibb) es una proteína de fusión compuesta del fragmento Fc de una IgG1 humana unido con el dominio extracelular de CTLA-4, que es una molécula crucial para la co-estimulación de células T, que bloquea selectivamente el proceso de activación de células T. Se desarrolló por. Se diferencia del abatacept (Orencia) solo en 2 aminoácidos. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar como una infusión intravenosa de 30 minutos de acuerdo con el calendario de dosis basado en el peso a las dosis preferidas de 500 mg para < 60 kg; 750 mg para 60 kg-100 kg; y 1 gramo para > 100 kg administradas dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El etanercept (nombre comercial Enbrel, Amgen, Thousand Oaks, CA) es un fármaco que trata enfermedades autoinmunitarias interfiriendo el factor de necrosis tumoral (TNF, una parte del sistema inmunitario) actuando como un inhibidor del TNF. El etanercept se puede administrar por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 25 mg o 50 mg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El pegsunercept es un receptor del factor de necrosis tumoral pegilado. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis preferida de 9 mg/kg s.c., dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre.

El aflibercept es una proteína comprendida por segmentos de los dominios extracelulares de los receptores 1 (VEGFR1) y 2 (VEGFR2) del factor de crecimiento endotelial vascular humano fusionado con la región constante (Fc) de la IgG1 humana con una potencial actividad angiogénica y que se ha desarrollado en conjunto por Sanofi-Aventis y Regeneron Pharmaceuticals. El aflibercept (VEGF Trap), un agente anti-angiogénico, es una proteína de fusión específicamente diseñado para unirse a todas las formas del factor A de crecimiento endotelial vascular (llamado VEGF-A). Además, el aflibercept se une al factor de crecimiento placentario (PLGF), que también se ha implicado en la angiogénesis tumoral. El aflibercept es puede administrar por inyección o infusión IV a dosis preferidas de 2 miligramos por kilogramo (mg/kg) o 4 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre.

El alefacept es una proteína de fusión: combina parte de un anticuerpo con una proteína que bloquea el crecimiento de algunos tipos de células T. El AMEVIVE® (alefacept) es una proteína de fusión dimérica inmunosupresora que consiste en la parte de unión al CD2 extracelular del antígeno-3 de función leucocitaria humano (LFA-3) unido a la parte Fc (dominios de bisagra, CH2 y CH3) de la IgG1 humana. La dosificación preferida es de 7,5 mg IV o 15 mg IM, preferentemente administrada dentro de 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Astellas Pharma US, Inc. Deerfield, IL 60015.

El rilonacept también conocido como IL-1 Trap (comercializado con la marca registrada Arcalyst), es una proteína de fusión dimérica que consiste en el dominio extracelular del receptor de la interleucina-1 humana y el dominio Fc de la IgG1 humana que se une y neutraliza la IL-1h. El tratamiento se debería utilizar con una dosis de carga de 320 mg suministrado como dos inyecciones subcutáneas de 2 ml, de 160 mg cada una administradas el mismo día en dos sitios diferentes, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. En pacientes pediátricos de 12 a 17 años de edad: El tratamiento se debería iniciar con una dosis de carga de 4,4 mg/kg hasta un máximo de 320 mg suministrados como una o dos inyecciones subcutáneas con un volumen máximo de inyección única de 2 ml, dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Producido por Regeneron.

El dacetuzumab (también conocido como SGN-40 o huS2C6) es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD40. El antígeno CD40 se expresa altamente en la mayoría de las enfermedades malignas hematológicas del linaje B incluyendo el mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin y leucemia linfocítica crónica. El CD40 se encuentra también en muchos tipos de tumores sólidos, incluyendo el cáncer de vejiga y ovárico y en las células que tienen un papel en los trastornos inmunológicos. Se administra a una dosis preferida de 10 mg/kg del fármaco activo dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. Seattle Genetics, Inc.

El HCD122 es un anticuerpo monoclonal antagonista completamente humano anti-CD40. El CD40 es un receptor de superficie celular que tiene un papel pivotante en las respuestas inmunitarias, así como de señalización de crecimiento y supervivencia mediante su activación por el ligando de CD40 (CD40L). Se sobre-expresa comúnmente y se activa en enfermedades malignas de células B. De acuerdo con la presente divulgación se puede administrar a una dosis de 10 mg/kg dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de células madre. Esto se ha desarrollado por XOMA/NOVARTIS ONCOLOGY.

El rituximab se vende con los nombres comerciales Rituxan y MabThera, Genentech, Inc., San Francisco, CA, es un anticuerpo monoclonal quimérico contra la proteína CD20 que se encuentra principalmente en la superficie de células B. Puede por lo tanto destruir células B. El CD20 se expresa ampliamente en las células B, desde las células pre-B tempranas hasta las últimas en diferenciación, pero está ausente en las células plasmáticas diferenciadas en último término. El rituxan se suministra con una concentración de 10 mg/ml en viales de un solo uso de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml). Se puede administrar como una infusión a una velocidad de 50 mg/h. En ausencia de toxicidad

de la infusión, se aumenta la velocidad de infusión con incrementos de 50 mg/h cada 30 minutos hasta un máximo de 400 mg/h preferentemente administrados dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. La dosis preferida recomendada es de 375 mg/m² como infusión IV preferentemente administrada 3-4 días antes de la administración de las células madre.

5 El rituximab también se puede administrar como un componente de Zevalin® infundiendo rituximab a una dosis preferible de 250 mg/m² dentro de 4 horas antes de la administración de indio-111 (In-111) Zevalin y dentro de 4 horas antes de la administración de Itrio-90 (Y-90) Zevalin, esto se debería hacer dentro de los 7-14 días y preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. El rituxan también se puede administrar en combinación con metotrexato, preferentemente 3-4 días antes de la administración de las células madre. Biogen Idec Inc. y Genentech USA, Inc.

15 El ibritumumab tiuxetan, que se vende con el nombre comercial Zevalin, es un anticuerpo monoclonal para radioinmunoterapia que se dirige a las células B. El fármaco utiliza el anticuerpo IgG1 monoclonal de ratón ibritumumab en conjunción con el quelante tiuxetan, al que se añade un isótopo radioactivo (sea itrio-90 o indio-111). El tiuxetan es una versión modificada del DTPA cuya estructura de carbono contienen un grupo isotiocianato de bencilo y un metilo.

20 La deficiencia de adenosina desaminasa también dará lugar a una reducción de la formación del centro germinal activo como agentes que desencadenarán la acumulación de desoxiATP (J Immunol 171: 5562-5570, 2003). De manera similar, los agentes que aumentan la expresión o activan el CCR7 dará lugar a una disminución de la formación del centro germinal activo.

25 **Células madre: Definición, aislamiento, suministro y usos terapéuticos**

La expresión célula madre dentro del alcance de la presente invención incluye cualquier célula capaz de diferenciarse en un tejido deseado. Dichas células incluyen las células madre pluripotenciales, células madre embrionarias, células madre de adulto multipotenciales, y células progenitoras y precursoras. Una "célula madre" es una célula del embrión, feto, o adulto que tiene, en ciertas condiciones, la capacidad para reproducirse por sí misma durante largos periodos o, en el caso de las células madre de adulto, a través de la vida del organismo. También dan lugar a células especializadas que construyen los tejidos y órganos del cuerpo.

35 Una "célula madre pluripotente" tiene la capacidad de dar lugar a tipos de células que se desarrollan a partir de las tres capas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo) de las que surgen todas las células del cuerpo. Las fuentes naturales conocidas de células madre pluripotenciales humanas son las aisladas y cultivadas de embriones tempranos humanos del tejido fetal que se destinaba a ser parte de las gónadas.

40 Una "célula madre embrionaria" se deriva de un grupo de células llamadas la masa celular interna, que es parte del embrión temprano (de 4 a 5 días) llamado blastocisto. Una vez retiradas del blastocisto las células de la masa celular interna se pueden cultivar en células madre embrionarias.

45 Una "células madre de adulto" es una célula no diferenciada (no especializada) que se produce en un tejido diferenciado (especializado), se renueva por sí misma, y se convierte en especializada para dar lugar a todos los tipos celulares especializados del tejido en el que se sitúa cuando se transfiere al tejido apropiado. Las células madre de adulto son capaces de hacer copias idénticas de sí mismas durante la vida del organismo. Se hace referencia a esta propiedad como "autorrenovación". Las células madre de adulto habitualmente se dividen para generar células progenitoras o precursoras, que entonces se diferencian o desarrollan en tipos celulares "maduros" que tienen la forma característica y las funciones especializadas, por ejemplo, la contracción en la célula muscular o la señalización celular nerviosa. Las fuentes de células madre de adulto incluyen pero no se limitan a la médula ósea, sangre, córnea y retina del ojo, cerebro, músculo esquelético, pulpa dental, hígado, piel, membrana basal del tracto gastrointestinal y páncreas.

55 El suministro o administración de células madre a un individuo incluye tanto el suministro o administración de células madre exógenas así como la movilización de células madre endógenas, así como el aumento de la biodisponibilidad de células madre endógenas liberadas espontáneamente.

60 Las células madre de la médula ósea son el tipo más estudiado de células madre de adulto. Actualmente, se utilizan clínicamente para restaurar distintos componentes de la sangre e inmunitarios de la médula ósea mediante el trasplante. Se han identificado actualmente dos tipos principales de células madre que se encuentran en la médula ósea: las células madre hematopoyéticas (HSC o células CD34+) que se consideran normalmente que forman las células de la sangre e inmunitarias, y las células madre del estroma (mesenquimáticas) (MSC) que se considera normalmente que forman el hueso, cartílago, músculo y grasa. Sin embargo, se ha demostrado que ambos tipos de células madre derivadas de la médula tienen mucha flexibilidad y multipotencialidad en su capacidad para formar los mismos tejidos. La médula ósea, localizada en la cavidad medular de los huesos, es el sitio principal de hematopoyesis en seres humanos adultos. Produce aproximadamente seis billones de células por kilogramo de peso corporal por día. La médula hematopoyéticamente activa (roja) retrocede después del nacimiento hasta la

adolescencia tardía después de cuyo momento se enfoca en las vértebras inferiores del cráneo, los cinturones escapular y pélvico, costillas y esternón. Las células grasas remplazan las células hematopoyéticas en los huesos de las manos, pies, piernas y brazos (médula amarilla). La grasa llega a ocupar el cincuenta por ciento del espacio de la médula ósea roja en el adulto y una metamorfosis grasa adicional continúa lentamente con la edad. En los individuos muy viejos, se puede producir una transformación gelatinosa de la grasa en un material mucoso (médula blanca). La médula amarilla puede revertirse en una médula hematopoyéticamente activa si hay presente una necesidad prolongada tal como una anemia hemolítica. Por tanto, la hematopoyesis se puede expandir aumentando el volumen de médula roja y disminuyendo el tiempo de desarrollo (el tránsito) desde una célula progenitora a madura.

El estroma de la médula consiste principalmente en una red de senos que se originan en el endostio desde los capilares corticales y terminan en vasos colectores que entran en la circulación venosa sistémica. La pared trilaminar del seno está compuesta por células endoteliales; una membrana basal delgada sin desarrollar, y células reticulares adventicias que son fibroblastos capaces de transformarse en adipocitos. Las células del endotelio y reticulares son fuentes de citocinas hematopoyéticas. La hematopoyesis tiene lugar en los espacios intersenos y se controla por una matriz compleja de citocinas estimulantes e inhibitorias, contactos célula a célula y los efectos de los componentes de la matriz extracelular en las células próximas. En este entorno único, las células madre linfohematopoyéticas se diferencian en todos los tipos de células sanguíneas. Las células maduras se producen y liberan para mantener el estado de equilibrio de los niveles de células sanguíneas. El sistema puede cumplir el aumento de demanda de células adicionales como resultado de pérdida de sangre, hemólisis, inflamación, citopenias autoinmunitarias, y otras causas.

Una célula "precursora o progenitora" está parcialmente especializada; se auto renueva y también da lugar a células diferenciadas. Los investigadores a menudo distinguen las células precursoras/progenitoras de las células madre adultas en que cuando la célula madre se divide, una de las dos nuevas células a menudo es una célula madre capaz de replicarse por sí misma de nuevo. Por el contrario cuando una célula progenitora/precursora se divide, puede formar más células progenitoras/precursoras, o puede formar dos células especializadas. Las células progenitoras/precursoras pueden remplazar células que están dañadas o muertas, manteniendo así la integridad y funciones de un tejido tal como el hígado o el cerebro.

Los medios para el aislamiento y cultivo de células madre útiles en la presente invención son bien conocidos. La sangre del cordón umbilical es una fuente abundante de células madre hematopoyéticas. Las células madre obtenidas de la sangre del cordón umbilical y las que se obtienen de médula ósea o sangre periférica parecen ser muy similares para su uso en trasplantes. La placenta es una fuente excelente fácilmente disponible de células madre mesenquimáticas. Además, se ha demostrado que las células madre mesenquimáticas se pueden derivar del tejido adiposo y las células del estroma de la médula ósea y se ha especulado que están presentes en otros tejidos. El líquido y el tejido amniótico son otra fuente excelente de células madre. Aunque hay drásticas diferencias cualitativas y cuantitativas en los órganos de los que se pueden derivar las células madre, las diferencias iniciales entre las células pueden ser relativamente superficiales y equilibradas por el intervalo similar de plasticidad que presentan. Por ejemplo, las células madre de adulto tanto hematopoyéticas como mesenquimáticas, en condiciones apropiadas pueden convertirse en células musculares cardíacas. La delimitación del intervalo completo del potencial de células madre de adulto acaba de empezar. Las células madre se pueden aislar y diferenciarse utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, en ratones, se aíslan las células de médula ósea sacrificando al ratón, cortando los huesos de las patas con un par de tijeras y extrayendo las células madre por lavado. Las células madre también se pueden aislar de células de la médula ósea mediante selección de las células de médula ósea con anticuerpos que se unen a células no deseadas, tales como CD4+ y CD8+ (células T), CD45+ (células panB), GR-1 (granulocitos). Para un ejemplo de este protocolo véase, Inaba et al., J. Exp. Med. 176:1693-1702(1992).

La Fig. 1 muestra una vista típica de las capas que resultan de la centrifugación en gradiente de sangre completa. 1 muestra las plaquetas; 2 la capa leucocitaria con los MNC y las células madre; 3 el ficoll; y 4 el aglomerado de RBC y células madre.

En los seres humanos, las células madre hematopoyéticas CD34+ pueden obtenerse a partir de varias fuentes que incluyen la sangre del cordón umbilical, médula ósea, y sangre periférica movilizada. La purificación de las células CD34+ se puede conseguir mediante procedimientos con anticuerpos de afinidad. Un procedimiento de aislamiento en columna de afinidad para el aislamiento de células CD34+ se describen en Ho et al., Stem Cells 13 (supl. 3): 100-105(1995). Véase también, Brenner, Journal of Hematotherapy 2: 7-17 (1993). Los métodos para el aislamiento, purificación y expansión cultural de células madre mesenquimáticas se conocen. Los antígenos específicos para las MSC también se conocen (véase las Pat. de EE. UU. N.º 5.486.359 y 5.837.539).

Las células madre se caracterizan por la capacidad para renovarse por sí mismas mediante división celular mitótica y para diferenciarse en un diverso intervalo de tipos celulares especializados. Las células madre existen a lo largo de un intervalo de potenciales. Las células madre totipotenciales son células tales como un huevo fertilizado que puede generar todos los tejidos necesarios para el desarrollo de un organismo completo. Las células madre pluripotenciales son células que pueden dar lugar a células madre de las 3 capas germinales e incluyen células tales como células madre embrionarias, células madre espermatozoides (Cell. 119(7): 1001-1012, 2009; NATURE 440:1199-1203, 2006), o células madre pluripotenciales inducidas que cuando se inyectan en un embrión tetraploide pueden dar

lugar a un organismo completo (Stem Cell Rev. 2010), pero no los tejidos extraembrionarios necesarios, tales como la placenta. Las células embrionarias muy pequeñas tales como las células madre son células que se encuentran en la médula ósea, sangre, corazón y otros tejidos del adulto que pueden dar lugar a células de linajes de las 3 capas germinales, sin embargo, aún no han se han mostrado en ensayos de complementación tetraploide para
 5 generar un organismo completo, ya que no está claro si son células madre realmente pluripotenciales para las que la sensibilización somática evita su actividad en la complementación tetraploide o si está más restringida a las células madre multipotenciales extremadamente plásticas (DEVELOPMENTAL DYNAMICS 236:3309-3320, 2007). Las células madre multipotenciales son células tales como las células madre hematopoyéticas (HSC) (J Exp Med. 207(6):1127-1130, 2010), células madre del tejido adiposo (ASC) (Stem Cells Dev. 2010 [Epub antes de la impresión]) (6) o células madre mesenquimáticas (MSC) (StemBook ,Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2009) que pueden dar lugar a varias células funcionales dentro de linajes restringidos.

Las células madre se pueden caracterizar adicionalmente por el grado al que pueden diferenciarse y se distinguen por su potencial. *Potencia* especifica el potencial de diferenciación (el potencial para diferenciarse en diferentes tipos celulares) de la célula madre.
 15

Las células madre totipotenciales (u omnipotenciales) pueden diferenciarse en tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Dichas células pueden construir un organismo viable completo. Estas células se producen de la fusión de un huevo y una célula espermática. Las células producidas por las primeras divisiones del huevo fertilizado también son totipotenciales.
 20

Las células madre pluripotenciales son descendentes de células totipotenciales y se pueden diferenciar en casi todas las células, es decir, las células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales.

Las células madre multipotenciales se pueden diferenciar en varias células, pero solo las de una familia de células estrechamente relacionadas.
 25

Las células madre oligopotenciales se pueden diferenciar en solo unas pocas células, tales como células madre linfoides o mieloides.
 30

Las células unipotenciales solo pueden producir un tipo celular, a ellas mismas, pero tienen la propiedad de autorrenovación que las distingue de las que no son células madre (por ejemplo, las células madre del músculo).

Los dos tipos generales de células madre de mamífero son: las células madre embrionarias que se aíslan de la masa celular interna de los blastocistos y las células madre de adulto que se encuentran en los tejidos de adulto.
 35

Las células madre de adulto son células no diferenciadas, que se encuentran a lo largo del cuerpo después del desarrollo embrionario, que se multiplican por división celular para reponer las células muertas y regenerar tejidos dañados. También conocidas como células madre somáticas, se pueden encontrar en animales y seres humanos juveniles así como en adultos. Los tipos de células madre de adulto incluyen las células madre hematopoyéticas, células madre mamarias, células madre mesenquimáticas, células madre endoteliales, células madre neurales, células madre olfatorias de adulto, células madre derivadas del tejido adiposo, células madre de la cresta neural, y células madre testiculares.
 40

Las células progenitoras tienen tendencia a diferenciarse en un tipo de célula específico. Por el contrario, las células madre, sin embargo, son ya mucho más específicas: son empujadas a diferenciarse en su célula "diana". La diferencia más importante entre las células madre y las células progenitoras es que las células madre se pueden replicar indefinidamente mientras que las células progenitoras solo pueden dividirse un número de veces *limitado*. Sigue habiendo controversia acerca de la definición exacta y el concepto sigue en evolución.
 45

Las expresiones "célula progenitora" y "célula madre" a veces se equiparan.
 50

Se ha demostrado que las células madre que se encuentran dentro de la fracción mononuclear de la sangre completa, médula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical y otros tejidos, así como como las células madre aisladas de estas fracciones mononucleares proporcionan beneficios a pacientes humanos. Una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) es cualquier célula sanguínea que tenga un núcleo redondeado. Por ejemplo: un linfocito, monocito o un macrófago. Estas células sanguíneas son un componente crítico del sistema inmunitario para luchar contra la infección y adaptarse a intrusos. La población de linfocitos consiste en células T (positivas a CD4 y CD8 ~75 %), células B y células NK (~25 % combinadas). Las PBMC a menudo se extraen de la sangre completa utilizando ficoll, un polisacárido hidrófilo que separa las capas de sangre, formando los monocitos y linfocitos una capa leucocitaria bajo una capa de plasma. La capa leucocitaria contiene las PBMC. De manera adicional, las PBMC pueden extraerse de la sangre completa utilizando la lisis hipotónica que lisará preferentemente los glóbulos rojos sanguíneos. Este método da como resultado neutrófilos y otras células polimorfonucleares (PMN), que son importantes en la defensa inmunitaria innata que se obtiene. Las fracciones de PBMC de aspirados de médula ósea se han utilizado para tratar pacientes después de un infarto de miocardio y se ha demostrado que reducen la mortalidad posterior y que mejoran ligeramente la función cardíaca en estos pacientes (Eur Heart J 27:2775-2783,
 55
 60
 65

2006). Aunque se reduce la mortalidad significativamente mediante estos tipos de tratamiento, la función cardíaca solo mejora ligeramente. Los estudios de imagen nuclear en estos pacientes han demostrado que la mayoría, hasta un 97 % de las células madre de la fracción mononuclear que se inyecta no permanecen en el corazón, sino que se pueden encontrar predominantemente en el bazo y el hígado dentro de los 60 a 90 minutos después de la inyección (Circulation 111:2198-2202, 2005). Otros estudios por imagen han demostrado igualmente que las células madre que se encuentran en la fracción mononuclear de sangre entera, médula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, placenta, líquido amniótico, y otros tejidos, así como las células madre aisladas de estas fracciones mononucleares, se acumulan en el bazo en muchas especies diferentes (STEM CELLS 24:2279-2283, 2006; J Nucl Med 45:512-518, 2004; J Nucl Med 47:1212-1219, 2006; J Nucl Med 47:1295-1301, 2006).

Los estudios con animales han demostrado que la administración de grandes cantidades de células mononucleares de médula ósea da lugar a una mejor reparación cardíaca y recuperación funcional (Circulation 114:2163-2169, 2006). Sin embargo, para el paciente clínico, esto requeriría la aspiración de grandes volúmenes de médula ósea, hasta 200 ml, con anestesia general, y esto se considera altamente indeseable para pacientes postinfarto recientes cuya función cardíaca permanece deprimida. Los investigadores también han intentado concentrar las células madre que se inyectan con el fin de obtener un mejor direccionamiento y retención en el órgano. Aunque el enriquecimiento del número de células CD45+ inyectadas ha dado lugar a una mayor acumulación de células CD34+ en el corazón después de la inyección intracoronaria, se cree que este método para aumentar el suministro de células madre sea subóptimo debido a que no se conoce en este momento que células madre particulares contenidas en la fracción de células mononucleares son necesarias para la regeneración tisular (Circulation 111:2198-2202, 2005). Además, se ha demostrado que las células madre mesenquimáticas (MSC) humanas purificadas aumentan el injerto de células madre CD34+ de la sangre del cordón umbilical humano (Hematology VOL 14 NO 3:125-132, 2009).

Las células madre pueden ser autólogas o de un donante no relacionado. Las células madre se pueden contener dentro de la fracción celular mononuclear de la médula ósea, sangre completa, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo u otras fuentes, o se pueden purificar mediante selección por exclusión con tinción de CD34, CD133, CD105, CD117, SSEA1-4, u otros antígenos específicos de célula madre. Las células madre se pueden aislar de la sangre completa, médula ósea, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, raspaduras tisulares de la mucosa olfatoria y otras fuentes de células madre que se pueden disociar en suspensiones celulares únicas, tales como tejido del cordón umbilical, por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque u otros gradientes disponibles en el mercado. Las células madre se pueden recuperar de la fracción de células mononucleares que resultan de dichos procedimientos. De manera alternativa, las células madre se pueden encontrar dentro de otras fracciones después de la centrifugación en gradiente de densidad (Stem Cells and Development 2011 Bhartiya et. al.). Por ejemplo, se puede diluir la sangre del cordón umbilical 1:1 en PBS, depositarla con cuidado sobre Histopaque 1077 (Sigma) y centrifugarla a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las capas resultantes que se representan en la Figura 1 se pueden procesar posteriormente para el aislamiento de las células madre. La capa 1 es la capa de plaquetas, la capa 2 es la capa leucocitaria que contiene células mononucleares, la capa 3 es la capa de Ficoll, y la capa 4 es la capa de aglomerado de glóbulos rojos. Se pueden recolectar las capas 1, 2 y 3, diluirse con el medio apropiado tal como DMEM F12 con o sin FBS y centrifugarse de nuevo para obtener el aglomerado celular. La capa 4 se puede diluir con un medio apropiado tal como DMEM F12 y centrifugarse a 800 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga convencional de encimera. Las células madre se pueden recuperar predominantemente de la capa 2 (capa leucocitaria) y la capa 4 (aglomerado de RBC).

Las células madre se pueden caracterizar y aislar adicionalmente mediante antígenos específicos expresados en su superficie utilizando clasificadores celulares tales como ARI de BD, utilizando columnas magnéticas tales como las que están disponibles en Miltenyi, utilizando perlas magnéticas e imanes DYNAL y otros métodos de separación basados en anticuerpo /antígeno conocidos por los expertos en la técnica. Las células madre también se pueden identificar y aislar según su capacidad para unirse a otras células como se describe en la presente divulgación.

Las células madre pluripotenciales se pueden caracterizar por la expresión del antígeno embrionario específico del estadio (SSEA), los factores de transcripción Oct4 y Nanog y otros marcadores. Las células madre hematopoyéticas se caracterizan por la expresión de marcadores tales como CD34, CD133, c-kit, Sca1, y también son positivas a CD45. La abreviatura CD se refiere a una familia de antígenos y significa "agrupamiento de diferenciación".

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células madre multipotenciales que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas incluyendo linajes mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linfoides (células T, células B, células NK). El tejido hematopoyético contiene células con capacidades de regeneración a largo plazo y corto plazo y comprometen progenitores multipotenciales, oligopotenciales y unipotenciales. Las HSC constituyen 1:10.000 de las células del tejido mieloide. Las HSC expresan los siguientes antígenos: CD34, CD90 (Thy1), CD45, CD41, CD105, CD117 (c-kit), SCF (ligando de kit), Ly6A/E (sca-1), CD127, CD44, CD33, CD38, CD14, CD106, CD84, CD90, Flk-1, CD164, Notch1, CD338 (ABCG2), CD202b, CD184, AC133 (=CD133), y CXCR4.

Las células madre mesenquimáticas, o MSC, son células madre multipotenciales que pueden diferenciarse en varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos (células óseas), condrocitos (células del cartílago) y adipocitos (células grasas). Las células madre mesenquimáticas se caracterizan por la expresión de CD45, CD90, CD105, CD34,

CD31, CD29, CD106, CD44, CD51, CD166, Ly6A/E (sca-1), CD117, CD71, CD10, CD49d, CD49e, TNAP, PTP LAR, antígeno W5C5, antígeno W3D5, antígeno W4A5, y CXCR4.

5 Las células madre endoteliales (o células progenitoras o precursoras endoteliales) son células madre multipotenciales. Son uno de los tres tipos de células madre que se van a encontrar en la médula ósea y que expresan los siguientes antígenos: CD45, CD31, CD34, CD105, CD146, CD106, CD54, CD117, CD102, CD120a, CD120b, CD14, CD29, CD49d, CD49e, CD49f, CD62P, CD62L, y CXCR4.

10 Las células madre del sistema neural (NSC) son las células autorregenerativas, multipotenciales que generan los principales fenotipos del sistema nervioso. Las células madre y progenitoras neurales se han aislado del tejido estriado, incluyendo la zona subventricular - una de las áreas neurogénicas - de tejido cerebral de ratones adultos y de varias áreas del cerebro de adulto, incluyendo áreas no neurogénicas, tales como la médula espinal, y de varias especies incluyendo al ser humano. Las NSC expresan los siguientes antígenos: CD29, CD146, Notch1, Ki67, CD24, CD49f, Vimentin, CD81 y CXCR4. Las células progenitoras neurales expresan los siguientes antígenos:
15 Antígeno 57D2, antígeno W4A5 y CXCR4.

20 Las células madre embrionarias, espermatogónicas, testiculares y pluripotentes tales como iPS, SCNT, ANT-OAR expresan los siguientes antígenos: CD24, CD9, Nanog, Smad, Runx2, c-myc, CD30, GSC, Oct3/4, Sox2, SSEA 1 (CD15), SSEA 4, CD324, CD29, Tra-1-60, Tra-1-81, CD338 (ABCG2), CD49f, FoxD3, Stat3, Hox11, y CXCR4.

25 Las VSEL son positivas a SSEA1, Oct4, Nanog, Rex1 y otros marcadores de células madre pluripotenciales, y a CD133, CD34, AP, cMet, LIF-R, y CXCR4. (J Am Coll Cardiol 53(1):10-20, 2009; Stem Cell Rev 4:89-99, 2008). Adicionalmente, las nuevas células madre que se identifican de manera rutinaria se caracterizan por marcadores distintos tales como las células madre Hox11+ que se encuentran en el bazo de adulto (Horm Metab Res 40: 137 - 146, 2008). Se ha identificado una célula madre que permanece en el bazo de adulto que es capaz de regenerar las células de los islotes pancreáticos, sin embargo, esta célula está presente en la fracción negativa a CD45 del bazo (Mol Cell Proteomics 4(10):1459-1470, 2005). Las células esplénicas Hox11+, aunque son negativas al CD45, expresan OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC y NANOG, haciéndolas potencialmente equivalentes a las células madre embrionarias y células madre pluripotenciales inducidas (iPS) (Int J Biochem Cell Biol. 18 de Dic de 2009).
30

Usos terapéuticos de las células madre

35 La terapia con células madre se ha investigado y perfeccionado para el tratamiento de muchas enfermedades. Las afecciones que se podrían beneficiar de la terapia con células madre incluyen: enfermedades oculares, enfermedades neurales, enfermedades del tracto GI, enfermedades musculoesqueléticas, enfermedades metabólicas, enfermedades endocrinas, enfermedades vasculares, enfermedades pulmonares, enfermedades cardíacas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inmunomediadas, enfermedades auto inmunomediadas, enfermedades cardiovasculares, y todas las enfermedades en las que sería beneficiosa una terapia regenerativa. La información de ensayos clínicos contenida en el sitio de internet del NIH www.clinicaltrials.gov enumera
40 aproximadamente 3000 investigaciones con células madre. Las enfermedades en evaluación incluyen: vasculitis, trastornos reumáticos utilizando células progenitoras endoteliales, neovascularización terapéutica mediante implante de células mononucleares autólogas en pacientes con enfermedades del tejido conjuntivo, administraciones repetidas de factor estimulante de colonias de granulocitos para la movilización de células madre sanguíneas en pacientes con parálisis supranuclear progresiva, degeneración cortico basal y atrofia sistémica múltiple;
45 enfermedades malignas hematológicas, leucemias, linfomas, cánceres, osteopetrosis, anemia aplásica y citopenias, enfermedad de células falciformes y talasemia, deficiencias de células madre del limbo, cáncer de mama, infarto de miocardio agudo (véase la Patente de EE. UU. N.º 7.862.810 de aislamiento y cultivo de células madre cardíacas que son positivas a c-kit) enfermedad de arterias coronarias (Véase la Patente de EE. UU. N.º 7.470.538 de aislamiento y administración mediante infusión en la arteria coronaria de células enriquecidas en
50 CD133⁺/CD34⁺/CXCR4⁻ de la sangre del cordón umbilical), enfermedad vascular periférica, fallo cardíaco, diabetes mellitus tipo I (Véase la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2011000830, Human Adipose Derived Insulin Making Mesenchymal Stem Cells For Treating Diabetes Mellitus), diabetes mellitus tipo 2, ictus, lesión de médula espinal, neuroblastoma, esclerosis múltiple (Véase la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 20100166712 que administra precursores neurales derivados de células madre mesenquimáticas para tratar la MS),
55 esclerosis sistémica, lupus eritematoso, curación de heridas crónicas, quemaduras, cicatrización de fracturas, reparación del cartílago, tumores el SNC, osteoartritis, fallo renal, enfermedad de Parkinson (Véase la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 20100010087, Methods for Inducing Stem Cell Migration and Specialization with EC-18), mielomas, pie de diabético, cirrosis hepática y biliar, cardiomiopatía dilatada, anemia, retinitis pigmentosa, enfermedad de Crohn, neuropatía diabética, mastocitosis, cáncer ovárico, epilepsia, miastenia gravis, enfermedades autoinmunitarias, enfermedad granulomatosa, osteonecrosis, fallo hepático, enfermedad PMD, lipodistrofia,
60 enfermedades desmielinizantes, defectos del cartílago, enfermedad retiniana, nefritis de lupus , enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, sarcoma, miositis, hiperglicemia, degeneración macular, colitis ulcerativa, degeneración muscular, y otras. Las limitaciones de estas terapias de células madre incluyen la incapacidad de suministrar e injertar de manera óptima las células madre, sea a un órgano lesionado específico o a los centros hematopoyéticos de la médula ósea y el bazo.
65

Suministro de células madre exógenas

Las células madre se pueden suministrar a un paciente mediante muchas vías. Por ejemplo, las células madre en un excipiente apropiado que optimice la viabilidad de las células madre y elimine la aglomeración celular, se pueden administrar por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intrapericárdica, intraocular, intravascular, transendocárdica, transepicárdica, transeptal, epicárdica, mediante la vena transcoronaria, mediante revascularización percutánea transmiocárdica, intratecal, intraorgánica, intranasal, intraventricular, o intra-epidural mediante una agua, catéter u otro método mínimamente invasivo. Las células madre también se pueden administrar por estas vías en una mezcla 'matriz' o mezcla en suspensión diseñada para ayudar a mantener las células madre en el sitio de la inyección, por ejemplo, en un colágeno, fibrinógeno, fibronectina, laminina, alginato, agarosa, metilcelulosa, liposoma, nanopartícula, micela, burbuja de albúmina, ácido graso, u otra formulación en suspensión semisólida.

Los sistemas de suministro basados en catéteres que se pueden utilizar para el suministro de células madre incluyen los catéteres para infusión de angioplastia con balón, catéteres de suministro arterial coronario percutáneos, parada de flujo inflando catéteres con balón sobre la vía, catéteres tipo Swan Ganz, catéteres tipo Hickman, catéteres tipo Foley, catéteres centrales venosos, catéteres tipo cola de cerdo, sistemas SmartPort™, catéteres guiados por una punta metálica magnética tales como el Sistema Gentle Touch Magnetic Navigation desarrollado por Stereotaxis Inc., o el Mitralign, el Sistema Accucinch, y por catéteres que se inyectan directamente en un órgano tales como el HELIX™, el MyoCath™, NOGA R-guided Myostar™, el Stiletto™, o el Sistema de suministro TransAccess™ guiado por ultrasonidos (IVUS), o catéteres de suministro por vía arterial tales como el OpenSail™, Concerto™, catéter de infusión Microsyringe de Mercator, y Maverick™, o mediante terapias de un dispositivo implantable tales como dispositivos auxiliares de ventrículo izquierdo (LVAD), dispositivos auxiliares biventriculares (BiVAD), el Optimizer™, catéteres de suministro celular tales como el descrito en el documento US 2009/0299269.

Las células madre también se pueden administrar a un paciente utilizando medios quirúrgicos invasivos, y luego inyectarlas directamente en el órgano o aplicado en el órgano. Las aplicaciones para la aplicación de la composición de células madre en un órgano incluyen las matrices de colágeno, las composiciones de matriz extracelular, los microtejidos de biopolímero hechos de fibrina u otro material de la matriz extracelular, parches que contienen matriz extracelular y materiales biodegradables, parches de fibrina, parches basados en alginato o agarosa, armazones compuestos de material de la matriz extracelular y material inerte degradable fisiológicamente que podría incluir componentes tales como dextranos, revestimientos de células madre con antígenos específicos o moléculas de unión del órgano, matrices extracelulares remanentes también conocidos como armazones u órganos descelularizados a partir de donantes de órganos digeridos *ex vivo* u órganos de cadáveres, y lentes de contacto, entre otros.

Movilización de células madre endógenas

Otro método para tratar pacientes con células madre: implica la movilización de sus propias células madre del cuerpo para que salgan de los órganos, tales como la médula ósea y entren en la circulación. Por ejemplo, agentes terapéuticos tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF; Filgrastim) que se vende como Neupogen o en formas de acción más largas tal como Neulasta, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; Sargramostim) que se vende como Leukine, AMD3100 que se vende como Mozobil/Plerixafor por Genzyme Corporation, producen el aumento de células madre en la circulación. El Neupogen viene en viales de un solo uso o jeringas de un solo uso que contienen 300 o 480 microgramos de Filgrastim. El excipiente está compuesto de acetato, sorbitol, polisorbato 80, sodio y agua para inyección. El Neupogen se utiliza clínicamente como inyección intravenosa dos veces al día por dosis, una inyección subcutánea una vez al día por dosis o un tratamiento subcutáneo crónico. El Neupogen se ha aprobado para acelerar la recuperación del recuento de neutrófilos en pacientes de cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora, en pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia de inducción o consolidación, en pacientes de cáncer que reciben un trasplante de médula ósea, en pacientes con neutropenia crónica grave, y en pacientes sometidos a recolección y terapia de células progenitoras de sangre periférica. El Neupogen se administra normalmente con una base diaria entre 3 y 69 microgramos por kilogramo de peso corporal comenzando 4 días después de la quimioterapia con un tratamiento que dura durante 2 a 20 días. De acuerdo con el prospecto del Neupogen, el G-CSF regula la producción de neutrófilos dentro de la médula ósea y afecta a la proliferación, diferenciación de progenitores de neutrófilos, y activación funcional celular seleccionada finalmente (incluyendo el aumento de capacidad fagocítica, sensibilización del metabolismo celular asociado con la explosión respiratoria, destrucción dependiente de anticuerpo, y el aumento de la expresión de algunas funciones asociadas con los antígenos de superficie celular). Se ha demostrado que el G-CSF moviliza células madre en la circulación mediante: su acción para reducir la expresión de CXCL12 en el estroma de la médula ósea y para reducir la expresión de CXCR4, dando lugar a un recorte del extremo N del CXCR4 (1) reduciendo la expresión de VCAM en la médula ósea (2). Se ha demostrado que el G-CSF aumenta el CXCL2, el ligando equivalente de CXCR2. Desde su aprobación para la terapia clínica, también se ha demostrado que el G-CSF aumenta el número de células madre tipo embrionarias muy pequeñas en la circulación.

De acuerdo con el prospecto, LEUKINE está indicado para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas en la sangre periférica para su recolección mediante leucoféresis. La movilización permite la recolección de un

número aumentado de las células progenitoras capaces de injertarse cuando se compara con la recolección sin movilización. Después de la quimioterapia mieloablativa, el trasplante de un número aumentado de células progenitoras puede dar lugar a un injerto más rápido, que puede dar como resultado una disminución de la necesidad de cuidados de soporte. La reconstitución mielóide se acelera adicionalmente mediante la administración de LEUKINE a continuación del trasplante de células progenitoras de la sangre periférica. La dosis recomendada de LEUKINE es de 250 microgramos por metro cuadrado de superficie corporal por día, administrados como una infusión intravenosa de 24 horas o por vía subcutánea una vez al día. El momento de tratamiento óptimo con LEUKINE es aparentemente 5 días para la movilización de células madre en la circulación. También se ha demostrado que Leukine es eficaz en combinación con G-CSF en pacientes que movilizaron pobremente en respuesta al G-CSF solo.

El mobozil tiene el nombre químico 1,1'-[1,4-fenileno bis (metileno)]-bis-1,4,8,11-tetraazacliclotetradecano. Tiene la fórmula molecular C₂₈H₅₄N₈. El mobozil es un inhibidor del receptor CXCR4 de quimiocina, y bloquea la unión de su ligando equivalente SDF-1 (CXCL12). El mobozil produce el aumento de células madre circulantes alterando la unión del CXCR4 expresado por las células madre al SDF-1 (CXCL12) expresado por las células del estroma y otras células de la médula ósea. La movilización óptima después del tratamiento con Mobozil se basa en la activación del complemento. La inyección subcutánea de Mobozil se aprobó para su uso en combinación con Neupogen para movilizar células madre hematopoyéticas hacia la sangre periférica para la recolección y posterior trasplante autólogo en pacientes con linfoma no de Hodgkin (NHL) y mieloma múltiple (MM). El mobozil se vende como un vial de un solo uso que contiene 1,2 ml de una solución de 20 mg/ml. Los pacientes se tratan con mobozil de acuerdo con siguiente calendario recomendado como se detalla en el prospecto: se inicia el tratamiento con Mobozil después de que el paciente haya recibido el G-CSF una vez al día durante 4 días; se repite la dosis de Mobozil hasta 4 días consecutivos; se selecciona la dosis basándose en 0,24 mg/kg de peso corporal actual, se administra por inyección subcutánea aproximadamente 11 horas antes del inicio de la aféresis. Se ha demostrado que la combinación de G-CSF y Mobozil moviliza más células madre primitivas en la circulación que el G-CSF solo.

Otros agentes conocidos por movilizar células madre, incluyendo las células madre hematopoyéticas, en la circulación incluyen el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), eritropoyetina, hormona paratiroidea, ligando Flt3, factor de células madre (SCF). Otros agentes conocidos o de los que se esperaría que dieran como resultado la movilización de las células madre y progenitoras en la circulación incluyen; agentes que aumentan la proliferación de células madre tales como los factores estimulantes de colonias, agentes que aumentan la producción de G-CSF endógeno tal como Maitake beta-glucano, agentes que reducen la expresión de SDF-1 o CXCR4 incluyendo agonistas reguladores negativos de CXCR4, agentes que reducen la unión de afinidad de SDF-1 o CXCR4, agentes que atenúan la señalización de CXCR4, agentes que bloquean la bioacumulación de células madre lejos de la circulación, agentes que aumentan el ingreso de células madre en la circulación tal como la activación del complemento o el aumento de fosfato de esfingosina-1, agentes que regulan positivamente la expresión de CXCR2 en la médula ósea o su ligando equivalentes CXCL2, agentes que reducen la expresión de VCAM en la médula ósea tales como el quimioterápico ciclofosfamida, agonistas del receptor retinoico, inhibidores de VLA-4 de molécula pequeña, activadores de la metaloproteinasas o carboxipeptidasa que degradarían el CXCL12 expresado en la médula ósea o regímenes quimioterápicos seleccionados, o regímenes que añaden ciclofosfamida o etopósido, un inhibidor de topoisomerasa al tratamiento con G-CSF, ingestión de fucoidan, mediante la quimiocina CXCL2 y ácido colomínico, entre otros.

Células madre endógenas liberadas espontáneamente

Otro método para tratar pacientes con células madre implica evitar que las células madre endógenas se liberen espontáneamente del secuestro en los tejidos linfáticos. Las células madre y progenitoras se liberan espontáneamente en la corriente sanguínea a diario. Los experimentos que utilizan ratones parabióticos han demostrado que el bazo intercambia fácilmente células madre y progenitoras con la circulación. De manera adicional, se ha demostrado que los estados de enfermedad dan lugar al aumento de los niveles de células madre y progenitoras, por ejemplo, en hipercolesterolemia, ataques cardíacos, ligadura arterial de STEMI o CAD o isquemia transitoria, la estancia en altitudes moderadas, el hiperparatiroidismo primario, y el daño del epitelio pigmentario de la retina, entre otros. Evitando la liberación espontánea de células madre inducidas por la enfermedad del secuestro en tejidos linfáticos hará que haya más células madre disponibles para la regeneración de tejidos u órganos dañados.

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA REGENERACIÓN DE CENTROS GERMINALES EN LOS TEJIDOS LINFÁTICOS

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para la regeneración, rejuvenecimiento y aumento del número de centros germinales en los tejidos linfáticos después de la radiación o quimioterapia. Los agentes terapéuticos que rejuvenecen o regeneran los centros germinales de los tejidos linfáticos incluyen activadores, moléculas co-estimulantes, adyuvantes inmunitarios y combinaciones de los mismos.

En una realización los centros germinales de los tejidos linfáticos se regeneran mediante la administración de adyuvantes. Ejemplos de dichos adyuvantes incluyen patrones moleculares asociados a patógenos, liposomas,

- liposacáridos, jaulas moléculas para antígenos, componentes de las paredes celulares bacterianas, ácido nucleicos que se han endocitosado tales como ARN de doble cadena (dsARN), ADN de cadena sencilla (ssADN), sales minerales tales como el hidróxido de aluminio (alum), fosfato de aluminio, fosfato cálcico, hidróxido de aluminio, fosfato potásico de aluminio, fosfato hidrógeno de sodio aluminio, y sulfato de hidroxifosfato de aluminio. Otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite en agua tales como escualeno montanido ISA720 (escualeno) o ISA 51 (Drakeol), MF59 (Novartis) y SBAS2. Otra clase de adyuvantes que se pueden utilizar son los adyuvantes particulados tales como los virosomas, saponinas y lípidos incluyendo los derivados microbianos y motivos CpG del monofosforil lípido A, inmunidad sensibilizada a BCG llamado BCG-CWS (de *Mycobacterium bovis*).
- Los liposacáridos y mitógenos tales como Concanavalina A, componentes de paredes celulares bacterianas, arqueosomas (éter glicerolípidos de la arquea *Methanobrevibacter smithii*), el agonista de TLR4 adyuvante lípido GLA glucopiranosilo, LPS y BCG (Immune Design), los agonistas del TLR2 peptidoglicano de BCG, y bacterias grampositivas, el agonista de TLR5 flagelina, antígenos de huevos de esquistosomas (*Sea*), *Listeria monocytogenes* (LM). Otros adyuvantes incluyen agonistas del receptor tipo Toll y activadores incluyendo oligonucleótidos CpG de longitudes de hasta 100 bases, más preferentemente de longitudes de 20 bases, agonistas del TLR1 tales como Pam3Cys, agonistas del TLR2 tales como el Pam3Cys; agonistas del TLR3 tales como dsARN y poli I:C, agonistas del TLR7 tales como quinolenos de imidazol por ejemplo el Imiquimod (R-839) y Resiquimod (R-848), agonistas del TLR8 tales como Resiquimod (R-848); y agonistas del TLR9 tales como poli I:C y CpG. También se incluye el uso de adyuvantes derivados de plantas, beta-glucano, QS21 basado en saponina, y concanavalina A.
- Otra realización está compuesta por métodos para aumentar el número de centros germinales activos en el bazo para aumentar el injerto del trasplante de células madre y la recuperación hematológica en pacientes sometidos a terapia para el cáncer, terapia no mieloablativa o terapia ablativa, incluyendo quimioterapia, radiación y tratamientos de combinación. El aumento del número de centros germinales activos da lugar a un aumento de la unión de células madre e injerto en el bazo, y en consecuencia velocidades aceleradas de recuperación hematopoyética después de los regímenes para enfermedades con quimioterapia y tratamientos del cáncer. Además del tratamiento del cáncer y leucemias, se utiliza una terapia no mieloablativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias (Pediatr Clin North Am. 57(1):239-71, 2010) incluyendo la diabetes tipo I (JAMA. 297(14):1568-1576, 2007), lupus y esclerosis múltiple (www.clinicaltrials.gov). La presente divulgación proporciona métodos para aumentar la recuperación hematopoyética en pacientes con cáncer o enfermedades autoinmunitarias sometidos a estados mieloablativos y no mieloablativos aumentando el número de centros germinales esplénicos y de esta manera aumentar la unión de células madre trasplantadas, el injerto y la proliferación. Por ejemplo, los pacientes que se someten a tratamiento con células madre a continuación de regímenes de tratamiento mieloablativo o no mieloablativo tienen riesgo de infección y muerte durante el tiempo necesario para administrar el injerto de células madre y la regeneración hematopoyética. La aceleración y aumento del injerto de células madre aumentando el número de centros germinales disponibles para la unión con las células madre en el bazo puede reducir el tiempo necesario para la recuperación hematopoyética y de esta manera disminuir el riesgo de infección y muerte en estos pacientes.
- Las células madre pueden ser autólogas o de un donante no relacionado. Las células madre se pueden contener dentro de la fracción celular mononuclear de la médula ósea, sangre completa, sangre del cordón umbilical, tejido adiposo u otras fuentes, o se pueden purificar mediante selección por exclusión con tinción de CD34, CD133, CD105, CD117, SSEA1-4, u otros antígenos específicos de célula madre.
- Los centros germinales esplénicos pueden aumentarse específicamente mediante tratamientos que activen el receptor de CD40 (Blood-104:4088-4096, 2004; J. Clin. Invest. 112:1506--1520 2003) (50) (51). El receptor funcional es un trímero o multímero de CD40 con componentes TNFR1 o TNFR2. Ejemplos de tratamientos que activan el receptor CD40 incluyen: Anticuerpos agonistas de CD40 que activan el receptor de CD40, conformaciones apropiadas de solCD40L pueden activar el receptor de CD40, y agentes que aumentan la expresión del receptor de CD40 alterando las velocidades de transcripción tal como mediante un factor de transcripción AT-hook AKNA, la estabilidad del ARNm o la estabilidad proteica también puede dar lugar a un aumento de la actividad y señalización. De manera alternativa, los miembros de las familias TRAP y TTRAP interactúan con el receptor CD40 y media en su señalización, dando lugar a un aumento del número de centros germinales activos. Los agentes que activan el centro germinal son el ciclo-oxigenasa 2 de células B o el receptor de EP2 que replica la unión del receptor CD40 y puede dar lugar al aumento de formación de centros germinales activos. Otros medios para activar la formación y la persistencia de centros germinales incluyen la inhibición o pérdida de CCR7 (J. Leukoc. Biol. 85: 409-417, 2009). Otros medios para activar la formación y la persistencia de centros germinales incluyen la inhibición o pérdida de CCR7 (J. Leukoc. Biol. 85: 409-417, 2009).
- En otra realización está comprendida por la administración de moléculas inmunoestimulantes para promoverla regeneración de los centros germinales en los tejidos linfáticos. Las moléculas inmunoestimulantes pueden ser anticuerpos, proteínas de fusión, ligandos solubles, moléculas pequeñas, reguladores de la transcripción, ARNm o estabilizantes proteicos, y otros restos inmunoestimulantes. Por ejemplo, se puede activar la ruta del CD28 co-estimulantes mediante proteínas solubles B7 y un anticuerpo tal como el compuesto TeGenero 1412.
- El TNG1412 es un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado como un agonista del receptor CD38 de los linfocitos T, que estimula la producción y activación de linfocitos T. Boehringer Ingelheim fabricó el TGN1412.

Moléculas co-estimulantes adicionales y rutas incluyen: OX40/ligando OX40 , 4-1BB/ligando 4-1BB , la familia B7/CD28; B7-1/CD80, CD28, B7-2/CD86, CTLA-4, B7-H1/PD-L1, ICOS, B7-H2, PD-1, B7-H3, PD-L2/B7-DC, B7-H4, PDCD6, BTLA, la superfamilia TNF de moléculas co-estimulantes; 4-1BB/TNFRSF9/CD137, ligando 4-1BB/TNFSF9, 5 BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFFR/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, Ligando CD27/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, Ligando CD30/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, Ligando CD40/TNFSF5, GITR/TNFRSF18, ligando GITR/TNPSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, OX40/TNFRSF4, Ligando OX40 /TNFSF4, y TAC1/TNFRSF13B, la familia SLAM; 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, y SLAM/CD150, y otras moléculas co-estimulantes; 10 CD2, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, Ikaros, Integrina alfa 4/CD49d, Integrina alfa 4 beta 1, Integrina alfa 4 beta 7/LPAM-1, LAG-3, LMIR1/CD300A, CRTAM, DAP12, Dectina-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TCL1A, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, HLA-DR, y efrinas.

Otros agentes que pueden aumentar la regeneración de centros germinales son agentes conocidos que producen la 15 explosión de citocinas tales como el anti-CD20 (Rituximab).

Otros agentes activadores inmunitarios pueden incluir agonistas del receptor de la IL-21, con anticuerpos agonistas.

Otros adyuvantes utilizados preclínica o clínicamente incluyen: 20 Ácidos nucleicos que se han endocitosado tales como ARN de doble cadena (dsARN), ADN de cadena sencilla (ssADN) y ADN que contiene el dinucleótido CpG no metilado.

Los adenovirus y componentes de adenovirus tales como los adenovirus tipo 5 (Ad5).

25 Agonistas y activadores del gen inducible por ácido receptores tipo (RIG)-1 (RLR).

Activadores o agonistas de P2X1, P2X4, o P2X7.

30 Agonistas y activadores de receptores tipo dominio de oligomerización de la unión al nucleótido (NLR).

Advax, liposomas, microsferas de quitosano y bromuro de dimetil-dioctildecil amonio (DDA).

Los adyuvantes humanos más nuevos en desarrollo son ISCOMS, QS21, AS02, y AS04.

35 ASO₄ es un monofosforil lípido A MPL desacilado más aluminio.

Los oligonucleótidos con CpG pueden tener longitudes de hasta 100 bases, más preferentemente longitudes de 20 bases.

40 También se puede administrar anti-CD3 OKT3 por vía intravenosa (i.v.) para inducir la regeneración de células germinales dentro de los tejidos linfáticos.

La presente divulgación también comprende la administración de dos o más agentes terapéuticos para generar 45 centros germinales dentro de los tejidos linfáticos. En otra realización, las células madre se administran en conjunción con el agente terapéutico que regenera los centros germinales.

Dosificación de los adyuvantes

50 El fosfato potásico de aluminio se puede administrar a una dosis de aproximadamente 0,17 mg.

El fosfato de aluminio se puede administrar a una dosis de aproximadamente 1,5 mg.

55 El hidróxido de aluminio se puede administrar a una dosis de aproximadamente 0,15 mg a aproximadamente 0,3 mg. Las sales de aluminio en general se pueden administrar a dosis de 0,85 mg como mucho.

El hidroxifosfato de aluminio se puede administrar a una dosis de aproximadamente 0,225 mg.

60 Como combinación el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio se puede administrar como una dosis combinada de aproximadamente 0,45 mg.

Dosificación de las emulsiones oleosas

El SBAS-2 es una emulsión de aceite en agua de MPL y QS21.

65 Las emulsiones de aceite en agua tales como montanida ISA720 (escualeno) o ISA 51 (Drakeol).

El escualeno está en el adyuvante MF59 utilizado por Novartis y dosificado al 1,95 % o 2 partes por cien o a 4 gramos por 100 ml para una inyección de 0,5 a 1 ml para la actividad adyuvante.

- 5 El adyuvante MF59 contiene (Lipovant; un 4-5 % p/v de escualeno, un 0,5 % p/v de Tween 80, un 0,5 % de Span 85, y opcionalmente, cantidades variables de muramil tripéptido fosfatidil-etanolamina (MTP-PE), que activa receptores sensibles no TLR conocidos como NOD-LRR).

Dosificación de los derivados microbianos

- 10 La inmunidad sensibilizada por BCG llamada BCG-CWS (*Mycobacterium bovis*) 1 a 8×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por vial para adultos y la mitad de la dosis para niños.

Los arqueosomas (éter glicerolípidos de la arquea *Methanobrevibacter smithii*) dosificada a 0,1 a 500 microgramos por gramo de peso corporal y más preferentemente a 38 microgramos por mg de peso corporal.

15

Dosificación de agonistas y activadores del receptor tipo Toll

- 20 Los oligonucleótidos con CpG de longitudes hasta de 100 bases, más preferentemente de longitudes de 20 bases, se dosifican a 1, 10, 100, 500 microgramos por cada 20-25 gramos de peso corporal. La dosis preferida es de 10 µg por 20-25 mg de peso corporal.

- 25 La ruta co-estimulante del CD28 se puede activar mediante proteínas solubles B7 y un anticuerpo tal como el compuesto TeGenero 1412. El TNG1412 es un anticuerpo monoclonal humanizado diseñado como un agonista del receptor CD38 de los linfocitos T, que estimula la producción y activación de linfocitos T. Boehringer Ingelheim fabricó el TGN1412. Para los fines de activación inmunitaria para regenerar los centros germinales linfáticos una dosis preferida de TGN1412 sería menor de 0,1 mg/kg de peso corporal administrada en infusión durante 3-6 minutos. Las dosis eficaces de TGN1412 para la regeneración de centros germinales serían entre 0,001 mg/kg a 0,1 mg/kg, preferentemente 0,01 mg/kg.

- 30 Otros agentes que pueden aumentar la regeneración de los centros germinales son agentes conocidos por producir la explosión de citocinas tales como el anti-CD20 (Rituximab) a una dosis de 50 mg/mm², o 150 mg/mm² pero por debajo de 375 mg/mm²; el anti-CD3 OKT3 administrado por vía intravenosa (i.v.) a una dosis preferida de menos de 5 mg/día durante 10 a 14 días; los anticuerpos anti-CD52 (CAMPATH) administrados a 30 mg en infusión durante 2 horas administrados tres veces a la semana durante hasta 12 semanas.

35

Agentes activadores inmunitarios adicionales pueden incluir agonistas del receptor IL21, con anticuerpo agonistas dosificados entre 0,001 mg/kg a 50 mg/kg, preferentemente entre 0,01 y 0,1 mg/kg. Los agonistas de ligandos proteicos se pueden dosificar diariamente entre 0,0001 mg/kg hasta 50 mg/kg durante hasta 28 días después de los tratamientos mieloablativos o no mieloablativos. Los agonistas de ligandos proteicos serán útiles en general a 1/10^o de la dosis de un anticuerpo terapéutico dependiendo del peso molecular y biodistribución del agonista.

40

Los activadores inmunitarios de molécula pequeña se pueden suministrar por vía oral entre 1 mg a 1000 mg diariamente, en una única dosis oral, o en intervalos específicos que pueden incluir cada 2 horas, cada 4-6 horas o periodos de intervalo más largos.

45

El ASO₄ es un monofosforil lípido A MPL desacilado más aluminio. Dosificado a 50 microgramos en dosis de 0,5 ml de Fendrix (GSK) en combinación con 0,5 mg de fosfato de aluminio.

- 50 Los oligonucleótidos con CpG de longitudes hasta de 100 bases, más preferentemente de longitudes de 20 bases, se dosifican a 1, 10, 100, 500 microgramos por cada 20-25 gramos de peso corporal más aluminio. La dosis preferida es de 10 µg por 20-25 mg de peso corporal.

Administración

- 55 La administración de los agentes terapéuticos que inducen la regeneración de los centros germinales dentro de los tejidos linfáticos pueden ser por cualquier método que incluya la administración intravenosa, intraarterial, oral, intramuscular, en aerosol, inhalada, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intrapericárdica, intraocular, transvascular, transendocárdica, transepicárdica, transeptal, epicárdica, por la vena transcoronaria, por revascularización transmiocárdica percutánea, intratecal, intra-orgánica, intranasal, intraventricular, o intra-epidural mediante una aguja, catéter u otro método mínimamente invasivo.

60

Los ejemplos posteriores ilustran los resultados experimentales de los métodos y composiciones para regular o moderar el número de sitios de unión disponibles para participar en la unión con células madre.

- 65 **Ejemplo 1**

Fracciones de médula ósea y mononucleares de sangre completa enriquecidas en células madre que se unen a regiones de células B en los extremos de la pulpa blanca del bazo cuando se administran a un ratón alogénico

5 Se aislaron las fracciones de médula ósea y células mononucleares de sangre completa de un macho de ratón 129S1/SvImJ utilizando Histopaque y se combinaron. Las células se incubaron a 37 °C, un 5 % CO₂ durante 4 días para permitir que las células somáticas diferenciadas murieran, concentrando de esta manera la fracción de células madre entre las células mononucleares. Las células resultantes se marcaron entonces con el rastreador celular naranja (CTO Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se administraron aproximadamente 10 millones de células marcadas mediante inyección retro-orbital a un receptor de la camada, y 90 minutos más tarde 10 se exanguinó el ratón y se recolectó la sangre, el sistema vascular se limpió de glóbulos rojos sanguíneos y se recolectó el bazo. El bazo se fijó durante una noche en un 1 % de PFA y entonces se embebió en agarosa de baja temperatura de fusión baja gelificación y se seccionó a 200 micrómetros de grosor por sección. La unión de las células madre MNC al bazo se visualizó utilizando inmunofluorescencia. La fracción de células madre que contenían 15 MNC marcadas se unían a las regiones de células B en los extremos de la pulpa blanca del bazo. El examen por inmunofluorescencia de la fracción MNC de la sangre completa recolectada durante la exanguinación demostraba que aproximadamente 40.000 de los 10 millones de células marcadas que se inyectaron se encontraban aún en la circulación 90 minutos después de la inyección.

20 Resultados y conclusiones: Las células MNC enriquecidas en células madre marcadas con CTO se unían a la periferia de la región de la pulpa blanca. La unión de las células es evidente histológicamente en las regiones de células B. Esto demuestra que las fracciones de médula ósea y mononucleares de sangre completa enriquecidas en células madre se unen a regiones de células B en los extremos de la pulpa blanca del bazo cuando se administran a un ratón alogénico.

25 **Ejemplo 2**

Las células madre CD34+, CD105+ y CD117+ purificadas se unen en la misma región esplénica que las fracciones que contienen células madre MNC marcadas.

30 Se aislaron las fracciones de médula ósea y células mononucleares de sangre completa de un ratón macho utilizando Histopaque y se combinaron. Las células MNC marcadas con el rastreador celular verde (CTG, Invitrogen) se incubaron entonces con anticuerpos marcados con biotina contra CD34, c-kit y CD105 y se purificaron utilizando columnas de separación magnética Miltenyi de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Una parte de las MNC aisladas se marcaron por separado con CTO. Un millón de MNC marcadas con CTO se co-incubaron con 35 205.000 células madre purificadas marcadas con CTG sobre secciones recientes de 100-200 micrómetros de grosor durante 12-18 horas a 4 °C. Las secciones de bazo se lavaron completamente para retirar las células no unidas, se fijaron durante una hora en un 1 % de PFA y entonces se montaron húmedas para la creación de imágenes fluorescentes. Se utilizó el software MetaMorph para la captura y depósito de la unión resultante roja (MNC) y verde (células madre).

40 Resultados y conclusiones: La población de células madre se unía a la misma región esplénica que las fracciones de MNC. Esto indica que las células madre CD34+, CD105+ y CD117+ purificadas se unen en la misma región esplénica que las fracciones que contienen células madre MNC marcadas.

45 **Ejemplo 3**

Las células madre de la fracción mononuclear de sangre completa y médula ósea se unen a las áreas positivas al PNA en los centros germinales del bazo.

50 Las células mononucleares (MNC) de sangre completa y médula ósea se aislaron de un ratón adulto utilizando Histopaque. Las células mononucleares resultantes se tiñeron con colorantes de rastreo celular tales como el CellTracker Naranja, Verde o Azul, Dil, o Calcein Naranja o Azul de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron PNA marcado con FITC (10 ug), IgD (10 µg) o anti-CD21 (10 µg) para identificar las regiones de células B específicas en la pulpa blanca del bazo. El PNA marca los centros germinales, la IgD marca las zonas foliculares y 55 el anti-CD21 marca las zonas de manto y marginales. Se utiliza anti-CD3 (200 ng a 1 µg) para identificar las regiones de células T en la pulpa blanca del bazo. Después de un lavado completo las células unidas y los anticuerpos se fijaron sobre secciones de bazo utilizando un 1 % de PFA durante 1 hora a 4 °C. Las secciones húmedas montadas se visionaron para la fluorescencia y se tomaron fotos utilizando el software MetaMorph.

60 Resultados y conclusiones: Las MNC marcadas con CTO unidas después de una incubación de 15 horas a 4 °C para activar los centros germinales PNA+. No se vio unión de MNC marcadas con CTO co-localizada con IgD o anti-CD21. Esto indica que las células madre de la fracción mononuclear de sangre completa y médula ósea se unen a las áreas positivas al PNA, negativas a IgD, negativas a CD21 en los centros germinales del bazo.

65 **Ejemplo 4**

Las células madre CD34+, CD105+, CD117+ aisladas de las fracciones de células mononucleares de médula ósea y sangre completa se unen a centros germinales PNA+ en la pulpa blanca del bazo.

- 5 Las fracciones de células mononucleares de la médula ósea y la sangre completa del ratón se combinaron, se marcaron con CTO e incubadas entonces con anti-CD34, anti-CD117 y anti-CD105 biotinilados y después las células unidas al anticuerpo se aislaron utilizando columnas de separación celular magnética de Miltenyi de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El número de células madre CD34+ CD105+ CD117+ recuperadas variaba entre un 0,3 % a un 3 % de la fracción de MNC de partida.
- 10 Las células CD34+ CD105+ CD117+ resultantes se co-incubaron durante 15 horas con 10 µg de PNA sobre secciones recientes de bazo de ratón. Las células seleccionadas positivamente se añadieron a 100.000 células por sección de bazo (A), 50.000 (B), 25.000 (C), o 10.000 (D) células por sección de bazo. Al igual que en las incubaciones de MNC, las células madre purificadas se unieron a los centros germinales positivos al PNA de la pulpa blanca del bazo. Las células madre se unían de una manera dependiente de la concentración. Las células se unían a nichos separados de los centros germinales, y las cantidades mayores de células añadidas de aproximadamente 100.000 daban como resultado una señal de unión más fuerte, más que la expansión a nichos adicionales (véase el ejemplo 2).
- 15
- 20 Resultados y conclusiones - Estos resultados indican que las células madre CD34+, CD105+, CD117+ aisladas de las fracciones de células mononucleares de médula ósea y sangre completa se unen a centros germinales PNA+ en la pulpa blanca del bazo.

Ejemplo 5

- 25 La unión de las células madre de la fracción MNC se bloquea mediante un anticuerpo anti-CD45.

La unión de células madre y MNC a las secciones de bazo se bloquea mediante una IgG2b de rata anti-CD45 anti-ratón (800 nanogramos a 4 microgramos) pero no por los anticuerpos anti-CD45R (10 microgramos) o anti-CD3 (1 microgramo). El anticuerpo 30-F11 anti-CD45 anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology) o el anticuerpo 17A2 anti-CD3 (Santa Cruz Biotechnology) se diluyó a 1:50 o 1:10 y se co-incubaron con 250.000 MNC marcadas con CTO durante una hora. Se hizo el recuento de la unión de MNC visualmente como número de nichos de unión y tamaño de los nichos. Las secciones recientes con CTO-MNC de control tenían entre 3-6 nichos de unión a MNC de tamaño medio a grande por sección. El anticuerpo anti-CD3 no tenía ningún impacto ni en el número ni el tamaño de los nichos de unión a MNC. El anticuerpo 30-F11 anti-CD45 con una dilución de 1:50 reducía tanto el número como el tamaño de los nichos de unión a MNC a la mitad. El anticuerpo 30-F11 anti-CD45 con una dilución de 1:10 anulaba completamente la unión de CTO-MNC a las secciones recientes de bazo.

30

35

En otro experimento, las MNC marcadas se incubaron en secciones de bazo durante una hora en presencia de 30-F11 anti-CD45 (4 microgramos) o PC3/188A anti-CD3 (1 microgramo). (Santa Cruz Biotechnology).

40

En otro experimento las MNC marcadas con rastreador celular naranja (CTO) se incubaron durante 15 horas a 4 °C con anticuerpo contra CD45R o 30-F11 anti-CD45. El anticuerpo contra CD45R (Miltenyi Biotec) diluido a 1:10 (5 µg) no bloqueó la unión de CTO-MNC a las secciones recientes de bazo de ratón. Por el contrario, el anticuerpo 30-F11 anti-CD45 (Santa Cruz) a 1:10 (4 µg) reducía la unión de MNC marcadas con CTO a las secciones recientes de bazo. El CD45R se unía a las células B de la zona folicular pero no a los centros germinales activos.

45

Una co-incubación a 1:10 con 30F-11 anti-CD45 reducía la unión de MNC marcadas con CTO a la sección reciente de bazo aproximadamente un 75 % .

- 50 Resultados y conclusiones: Estos datos indican que la unión de las células madre de la fracción MNC al bazo se bloquea mediante un anticuerpo anti-CD45.

Ejemplo 6

- 55 El epítipo se une al anticuerpo 30-F11, una IgG2b de rata anti-CD45 anti-ratón.

30-F11 se une a todas las isoformas de CD45 de ratón.

La unión exacta del epítipo de 30-F11 no se había mapeado nunca. Se generó el 30-F11 por inmunización con bazo de ratón y células del timo. El dominio extracelular de la isoforma 1 de CD45 de ratón está compuesta por los aminoácidos 24 a 564. La isoforma 2 ha perdido los aminoácidos 31 a 73, mientras que la isoforma 3 ha perdido los aminoácidos 31 a 169. Como se ha informado de que el 30-F11 se une a todas las isoformas del CD45 de ratón, el epítipo de unión debería estar por lo tanto entre los aminoácidos 170 a 564 de la isoforma 1. Las regiones antigénicas de las proteínas se pueden predecir utilizando algoritmos de hidrofobia (Kyte Doolittle) y accesibilidad que se encuentran en el sitio de internet de SwissProt. Las regiones antigénicas se encuentran más probablemente en áreas de baja hidrofobia y alta accesibilidad. Los restos de aminoácidos cerca del 501 a 521 en la secuencia

60

65

humana tienen una predicción de baja hidrofobia indicando esta área de la proteína como un sitio antigénico potencial. Esta región también está bastante conservada del ratón al ser humano. (Véase Okumura M., et al. 1996 Aug 15;157(4):1569-75).

5 Ejemplo 7

Los adyuvantes inmunitarios aumentan la formación de centros germinales y aumentan la unión de la fracción de células madre mononucleares al bazo

10 Los centros germinales activos se obtuvieron en ratones normales mediante la inmunización propuesta utilizando un adyuvante incompleto de Freund o Ribi. Se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) los ratones con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (FIA) mezclado 1:1 con PBS o con 0,5 ml de adyuvante RIBI el día 0. El día 7 o día 14 después de la inmunización, los ratones se heparinizaron con 100 U de heparina intraperitoneal durante 30 minutos antes de la anestesia con avertin. Los ratones se exanguinaron mediante extracción retro-orbital en el ojo, obteniendo un total de 1,5 a 1,8 ml de sangre completa que se añadieron a un tubo cónico de 15 ml con 200 µl de heparina a 5 U/ml. Después, se cortaron la aorta abdominal y la vena cava y se extrajo la sangre restante completamente del sistema vascular mediante infusión de empuje de 10 ml de heparina a 5 U/ml mediante la vena cava torácica ascendente. Se retiró el bazo y se depositó en medio de cultivo y posteriormente se embebió en agarosa blanda y se seccionó para obtener secciones uniformes de 200 micrómetros de espesor. Se extrajo la médula ósea esternal y del fémur de los huesos con una solución salina tampón de Hanks, y se aislaron las fracciones de células madre mononucleares de la sangre completa y la médula ósea utilizando Histopaque y se combinaron. Se utilizó PNA marcado con FITC (10 µg) para identificar los centros germinales en la sección de bazo mediante incubación a 4 °C durante una noche. Después de la incubación de una noche con PNA, sin lavar, se añadieron las fracciones de células madre mononucleares marcadas con CTO a las secciones durante una hora a 4 °C. Después del lavar completamente las células unidas y PNA marcado se fijaron en las secciones de bazo utilizando un 1 % de PFA durante 1 hora a 4 °C. Las secciones húmedas montadas se vieron para la fluorescencia y se tomaron fotos utilizando el software MetaMorph.

30 La unión del PNA 7 días después de la inmunización era similar en ratones tratados con FIA y RIBI, ambas casi el doble de unión que los controles. Sin embargo, los ratones tratados con FIA estaban más sanos que los ratones tratados con RIBI por lo que todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con FIA. Comparando el día 7 y el día 14 después del tratamiento con FIA, el brillo del PNA era mayor el día 7, sin embargo, el día 14 los centros germinales activos aparecían más fuertemente organizados y compactos. En comparación con el control, la inmunización con FIA doblaba el número de centros germinales activos en los bazos de ratón. La adición de fracciones de células madre mononucleares marcadas con CTO, aisladas de los ratones de control a los bazos, demostraba que el aumento de formación de centros germinales activos observado en los ratones tratados con FIA daban como resultado también a una unión de células madre mononucleares significativamente mayor en los bazos. La unión de células madre mononucleares el día 7 aumentaba aproximadamente 3-5 veces sobre la unión a los bazos de control, mientras que la unión de la fracción de células madre mononucleares aumentaba hasta 10 veces y en algunos casos más que la unión a los bazos de control.

Resultados y conclusiones: Estos datos indican que los adyuvantes inmunitarios aumentan la formación de centros germinales y aumentan la unión de la fracción de células madre mononucleares al bazo.

45 Ejemplo 8

La inhibición de la formación de centros germinales activos reduce la unión ex vivo de células madre al bazo.

50 Los ratones se trataron con 1 mg de dexametasona solubilizada en etanol (1 parte) y PBS (9 partes) mediante inyección intraperitoneal 7 días antes de la recolección de sus bazos y células madre para el análisis *in vitro* de la unión de las células madre a las secciones esplénicas. Los ratones de control se trataron solo con etanol (1 parte) y PBS (9 partes), con un volumen total de 1 ml. El día 7 se recolectaron los ratones y se procesaron como se detalla en el Ejemplo 7. Las fracciones de células madre mononucleares de los ratones de control se utilizaron para los estudios de unión sobre los controles y las secciones tratadas con dexametasona. La unión de las células madre mononucleares el día 7 se había reducido un 30-40 % después de un único tratamiento de 1 mg con dexametasona administrada 7 días antes de la experimentación.

60 Un único tratamiento de 1 mg de dexametasona 7 días antes de la recolección reducía el peso de los bazos una media de un 22 % , reducía el número medio de MNC circulantes un 34 % , y reducía los centros germinales marcados con PNA hasta un 24 % , sin embargo, el porcentaje de células madre dentro de las fracciones de MNC de la sangre completa y la médula ósea no se reducían, de hecho aumentaban una media del 32 % en comparación con el control.

65 Resultados y conclusiones: Estos datos indican que los inmunosupresores reducen el número de la fracción de células mononucleares unidas a los bazos de los ratones tratados.

Ejemplo 9

La inhibición de la formación de centros germinales activos reduce la unión ex vivo de células madre al bazo.

5 Se heparinizó un ratón intacto de control con 100 U de heparina intraperitoneal durante 30 minutos antes de la anestesia con avertin. El ratón se exanguinó mediante extracción retro-orbital en el ojo, obteniendo un total de 1,5 a 1,8 ml de sangre completa que se añadieron a un tubo cónico de 15 ml con 200 µl de heparina a 5 U/ml. Después, se cortaron la aorta abdominal y la vena cava y se extrajo la sangre restante completamente del sistema vascular mediante infusión de empuje de 10 ml de heparina a 5 U/ml mediante la vena cava torácica ascendente. Se extrajo la médula ósea esternal y del fémur de los huesos con una solución salina tampón de Hanks, y se aislaron las fracciones de células madre mononucleares de la sangre completa y la médula utilizando Histopaque y se combinaron. Las fracciones de células madre mononucleares se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM plus con un 10 % de FBS) y se incubaron a 37 grados C con un 5 % CO2 durante una noche. A la mañana siguiente las células madre mononucleares se marcaron con rastreador celular verde (CTG) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Inmediatamente después de la tinción de las células madre mononucleares intactas de control (MNC) con CTG, se inyectaron en cada uno de los ratones receptores a aproximadamente 6 M de CTG MNC en 100 µl en el seno retro-orbital el día 7. Cinco ratones de control habían recibido inyecciones intraperitoneales de 100 µl de etanol y 900 µl de PBS el día 0 y el día 4; 3 ratones se habían tratado por vía ip con 1 mg de dexametasona el día 0 y el día 4; y dos ratones se habían tratado por vía ip con 1 mg de dexametasona el día 0, día 2 y día 5. Una hora más tarde, los ratones se exanguinaron mediante extracción retro-orbital del ojo. Después, se cortaron la aorta abdominal y la vena cava y se extrajo la sangre restante completamente del sistema vascular mediante infusión de empuje de 10 ml de heparina a 5 U/ml mediante la vena cava torácica ascendente. Los bazos se extrajeron y se mantuvieron en RPMI sobre hielo sin rojo fenol más un 1 % de BSA. Se extrajo la médula ósea esternal y del fémur de los huesos con una solución salina tampón de Hanks, y se aislaron las fracciones de células madre mononucleares de la sangre completa y la médula utilizando Histopaque.

Los bazos se disociaron en suspensiones celulares únicas y se determinó el grado de secuestro de las células MNC CTG en el bazo utilizando citometría de flujo. La dexametasona (un total de 2 mg) reducía la acumulación del número total de células MNC CTG en el bazo un 33-43 % mientras que la dosis de 3 mg en total de dexametasona reducía la acumulación del número total de MNC CTG en el bazo aproximadamente un 70 % .

Resultados y conclusiones: Estos datos indican que un tratamiento inmunosupresor de 7 días reduce el número de células madre MNC inyectadas exógenamente que se secuestran en el bazo.

Ejemplo 10

La inhibición de la formación de centros germinales activos reduce la unión de células madre al bazo.

(Profético)

Se trataron voluntarios humanos profilácticamente con inmunosupresores generales disponibles en el mercado tales como prednisona de acuerdo con protocolos clínicos establecidos, utilizando las dosis escogidas para limitar o evitar completamente todos los efectos adversos de los agentes. Otro grupo de voluntarios humanos se trató con anticuerpos antagonistas contra CD40 tales como el mAb HCD-122 anti-CD40 a dosis entre 5 y 100 mg/kg.

Antes de o el día final de la inmunosupresión profiláctica se aislaron las células madre de la fracción celular mononuclear de 50 ml de médula ósea de la cresta ilíaca o de productos de aféresis de sangre completa. La fracción de MNC resultante que contenía las células madre se marcó con 2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (18F-FDG) para la posterior creación de imágenes con 3D-PET o con un marcador de creación de imágenes nuclear apropiado para la posterior creación de imágenes con SPECT. Las fracciones que contenían células madre MNC marcadas, con entre 2 y 10 millones de células madre, se inyectaron por vía intravenosa y se determinó su biodistribución con creación de imágenes por PET o SPECT 60-90 minutos y hasta 48 horas después de su administración. Las células madre entre las MNC se acumulaban predominantemente en los bazos de los voluntarios normales dentro de los 90 minutos después de la inyección. Por el contrario, los voluntarios inmunosuprimidos tratados con HCD-122 tenían una acumulación esplénica reducida de las fracciones de células madre MNC.

Ejemplo 11

La inhibición o reducción de la formación de centros germinales activos aumenta el suministro de células madre en el corazón y promueve una recuperación funcional en ratones.

(Profético)

Se inyectaron por vía intravenosa (i.v.; 250 mg/inyección los días 0, 2 y 4) ratones PN y 129S1/Sv-ImJ de 3 meses y

12 meses de edad con mAb anti-CD40L (Pharmingen) o Ig de hámster de control (Pierce, Rockford, IL). Se recolectó la fracción de células madre mononucleares de la sangre completa y médula ósea de ratones de la misma camada intactos, se marcaron con colorantes trazadores celulares tales como CTO y después se purificaron las células madre utilizando anticuerpos biotinilados anti-CD34, anti-CD105, anti-SSEA1 y anti-CD117 con columnas de separación magnética de Miltenyi. Los ratones experimentales se inyectaron por vía retro-orbital o intravenosa con entre 100.000 y 1 M de células madre purificadas el día 5. De 15 a 24 horas después, se exanguinaron los ratones, y se recolectó la sangre, el sistema vascular se aclaró de glóbulos rojos sanguíneos residuales y se recolectaron los bazo para la creación de imágenes fluorescentes de la acumulación de células madre. La acumulación de células madre era evidente en los centros germinales PNA+ en los ratones PN tratados con Ig demostrando un número significativamente mayor de centros germinales activos y una unión de células madre más elevada en consecuencia que en los ratones 129S1. Los ratones 129S1 tratados con un mAb anti-CD40L tenían menos, si había, centros germinales activos evidentes y ninguna unión de células madre o insignificante.

Para estudiar la regeneración cardíaca en estos ratones, se inyectaron por vía intravenosa (i.v.; 250 mg/inyección los días 0, 2 y 4) ratones PN y 129S1/Sv-ImJ de 3 meses y 12 meses de edad con mAb anti-CD40L (Pharmingen) o Ig de hámster de control (Pierce, Rockford, IL). El día 4 los ratones se anestesiaron, se llevó a cabo una ecocardiografía para establecer la línea basal de la función cardíaca y los volúmenes y después se ligó permanentemente la arteria coronaria LAD mediante toracotomía para infartar aproximadamente el 70 % de la pared libre del ventrículo izquierdo.

Se recolectó la fracción de células madre mononucleares de la sangre completa y médula ósea de ratones de la misma camada intactos, y se purificaron las células madre utilizando anticuerpos biotinilados anti-CD34, anti-CD105, anti-SSEA1 y anti-CD117 con columnas de separación magnética de Miltenyi. Los ratones experimentales se inyectaron por vía retro-orbital o intravenosa con entre 100.000 y 1 M de células madre purificadas el día 7, tres días después de la ligadura permanente de LAD. Se llevó a cabo la ecocardiografía en serie de los ratones el día 14, día 21 y día 28.

Los ratones de control tratados con Ig que no recibieron inyecciones de células madre presentaban un declive funcional cardíaco y un aumento de los volúmenes diastólicos finales, volúmenes sistólicos finales y aumento del grosor de la pared no infartada, sucumbiendo el 50-100 % de los ratones por fallo cardíaco antes del día 28. Los ratones 129S1 con Ig de control tratados que recibieron inyecciones de células madre presentaban una reducción de muertes por fallo cardíaco y una función cardíaca ligeramente mejor en comparación con los que no recibieron células madre. Los ratones PN con Ig de control tratados que recibieron inyecciones de células madre no presentaban una mejora de la supervivencia o la función en comparación con los ratones 129S1. Por el contrario los ratones 129S1 tratados con el mAb anti-CD40L a los que se inyectaron células madre presentaban una mejora significativa de la supervivencia y la función cardíaca en comparación con los otros grupos de ratones, mientras que los ratones PN tratados con mAb anti-CD40L a los que se inyectaron células madre tenían una mejoría de la supervivencia y función cardíaca en comparación con los ratones PN tratados con Ig a los que se inyectaron células madre.

40 **Ejemplo 12**

45 La inhibición o reducción de la formación de centros germinales activos aumenta el suministro de células madre en el corazón y promueve una recuperación funcional en seres humanos.

(Profético)

Se eligieron para el estudio pacientes con una elevación aguda del segmento ST, tratados satisfactoriamente de MI mediante una intervención coronaria percutánea con implante de un stent en la fase aguda del infarto. Los pacientes se trataron con un mAb anti-CD40L, el Replizumab, a 5, 10, 20 o 100 mg/kg el día 1 durante una infusión IV de 30 minutos.

55 A los 3 a 15 días después del MI, se recuperaron las células mononucleares de un aspirado de 50 ml de médula ósea mediante Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El procedimiento completo, desde la aspiración de médula ósea hasta el producto terminado se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Práctica de Buena Fabricación.

60 Se hizo un seguimiento de la función cardíaca por MRI y de los resultados adicionales incluyendo la muerte, MI recurrente, y revascularización posterior o la hospitalización (evento de supervivencia libre). En comparación con los pacientes del placebo, los pacientes tratados con células madre tenían históricamente reducciones de un año en las tasas de evento de supervivencia libre del 80 % frente al 55-60 % . Los pacientes tratados con CD40L y células madre tenían un evento de supervivencia libre mejorado en comparación con los pacientes tratados solo con células madre. Adicionalmente, los pacientes tratados con anti-CD40L y células madre presentaban reducciones adicionales en los volúmenes ventriculares en comparación con los pacientes tratados solo con células madre y mejores parámetros de eyección cardíaca.

Ejemplo 13

Identificación y aislamiento de la pareja de unión de la fracción mononuclear de células madre en el bazo de ratón

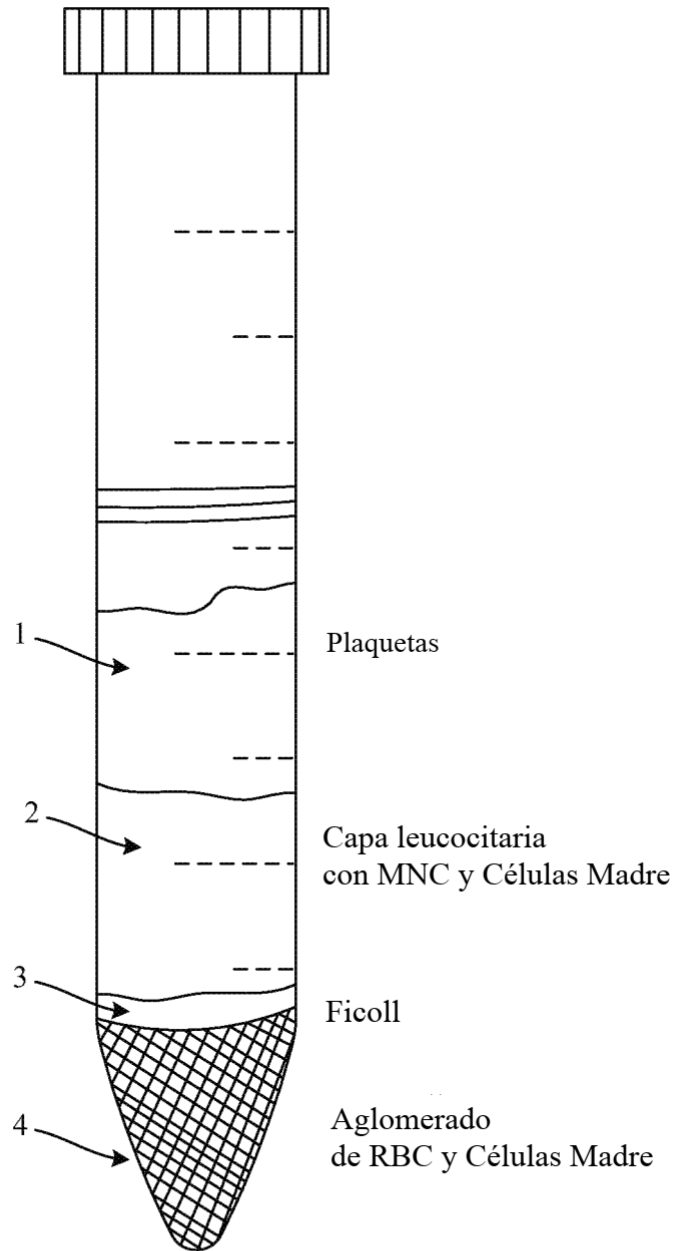
- 5 Se aislaron las fracciones de médula ósea y células mononucleares de sangre completa de un macho de ratón 129S1/SvImJ utilizando Histopaque, se combinaron y se marcaron con CTO de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se disociaron los bazos en suspensiones celulares únicas y se marcaron con CTB. Se obtuvieron las células madre cultivando las MNC durante 7 días en medio de cultivo seguido por 7 días en medio de cultivo sin FBS suplementado con 120 ng/ml de factor de células madre y un 25 % de suero de caballo y se recolectaron las células no adherentes. Normalmente, hasta un 40 % de las células no adherentes expresaban CD34, CD105, SSEA1 y/o CD117. Las células madre se marcaron con CTO.

- 15 Los esplenocitos marcados con CTB se incubaron en un rocker a 37 grados C, un 5 % de CO₂ en una relación de 1:1 (10 millones de esplenocitos marcados con CTB y 10 M de MNC en un volumen de 500 ul de PBS) con MNC marcadas con CTO o una relación de 100:1 (10 millones de esplenocitos marcados con CTB y 100.000 células madre marcadas con CTO en un volumen de 500 ul de PBS). Se tomaron alícuotas y se ejecutaron en un citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios capturando la fluorescencia FL2 y FL9. La unión célula a célula era evidente con un aumento dependiendo del tiempo en las señales positivas CTB+CTO+ en el cuadrante superior derecho (UR) del diagrama de dispersión. El fondo en el UR era del 0,15 % . La unión máxima de esplenocitos y células madre era del 2,6 % del UR a los 50 minutos y la unión máxima de esplenocitos y MNC era del 5 % del UR a los 30 minutos.

Resultados y conclusiones: Estos datos indican que las células esplénicas implicadas en la unión de las células madre al bazo se pueden identificar y aislar utilizando una citometría de flujo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dexametasona para su uso en un método de tratamiento de una afección en un individuo, comprendiendo el método la administración de la dexametasona al individuo antes o junto con el tratamiento con células madre, en donde la afección se selecciona de entre el grupo que consiste en: osteoartritis, fallo hepático, diabetes mellitus tipo 2, ictus, y enfermedad de Parkinson.
- 10 2. Dexametasona para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende la administración de dexametasona al individuo antes del tratamiento con células madre.
3. Dexametasona para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el método comprende la administración de dexametasona al individuo 1-14 días antes del tratamiento con células madre.
- 15 4. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende la administración de dexametasona al individuo 3-7 días antes del tratamiento con células madre.
5. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el método comprende la administración de dexametasona al individuo 3-4 días antes del tratamiento con células madre.
- 20 6. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el tratamiento con células madre comprende células madre seleccionadas de entre el grupo que consiste en: células madre pluripotenciales, células madre embrionarias, células madre somáticas, células madre progenitoras y precursoras.
- 25 7. Dexametasona para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las células madre somáticas se seleccionan de entre el grupo que consiste en: células madre mamarias, células madre mesenquimáticas, células madre endoteliales, células madre neurales, células madre olfatorias de adulto, células madre derivadas del tejido adiposo, células madre de la cresta neural, y células madre testiculares.
- 30 8. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento con células madre comprende células madre mesenquimáticas.
9. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el tratamiento con células madre comprende el acto de la administración de células madre al individuo.
- 35 10. Dexametasona para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tratamiento con células madre comprende células madre exógenas.
- 40 11. Dexametasona para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en donde el tratamiento con células madre comprende células madre endógenas.



Capas que resultan de la centrifugación en gradiente de la sangre completa

Fig. 1