(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 742 035**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0775 (2010.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/AU2013/001452**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14089623**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13862555 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2931876**

(54) Título: **Tratamiento de las enfermedades de la disfunción y la inflamación endotelial**

(30) Prioridad:

12.12.2012 US 201261736361 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KIMPTON, WAYNE GREGORY;
BAILEY, SIMON REEVES;
ITESCU, SILVIU y
GHOSH, PETER

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Tratamiento de las enfermedades de la disfunción y la inflamación endotelial

Campo

La presente descripción se refiere a procedimientos para tratar o prevenir enfermedades de disfunción o inflamación endotelial y afecciones relacionadas con las mismas.

ANTECEDENTES

La disfunción endotelial se caracteriza por un cambio de la acción del endotelio hacia una reducción de la vasodilatación, un estado proinflamatorio y propiedades protrombóticas. Existe un consenso general entre los biólogos vasculares en que la lesión endotelial con la disfunción resultante es el evento iniciador de la aterosclerosis (Ross Nature 362:801-9, 1993) y juega un papel importante en las manifestaciones isquémicas de la enfermedad coronaria. La disfunción endotelial también precede a la presencia física de aterosclerosis (Reddy y otros, J Am Coll Cardiol 23:833-843, 1994). También se asocia con la mayoría de las formas de enfermedad cardiovascular (como hipertensión, arteriopatía coronaria, insuficiencia cardíaca crónica y arteriopatía periférica), complicaciones de la diabetes (como nefropatía) e insuficiencia renal crónica.

Los mecanismos que participan en la reducción de las respuestas vasodilatadoras en la disfunción endotelial incluyen la reducción de la generación de óxido nítrico, el exceso oxidativo y la reducción de la producción de factor hiperpolarizante. La regulación al alza de las moléculas de adhesión, la generación de quimiocinas, como el péptido-1 quimioatrayente de macrófagos, y la producción del inhibidor del activador del plasminógeno-1 participan en la respuesta inflamatoria y contribuyen a un estado protrombótico. Péptidos vasoactivos tales como angiotensina II y endotelina-1; la acumulación de dimetilarginina asimétrica, un inhibidor endógeno del óxido nítrico; hipercolesterolemia; hiperhomocisteinemia señalización alterada de la insulina; y la hiperglucemia puede contribuir a estos diferentes mecanismos. Por ejemplo, se observa un exceso de angiotensina II en afecciones asociadas con la disfunción endotelial. La angiotensina II se considera un inhibidor competitivo de la angiotensina I, ya que la angiotenisina I participa en la inhibición del engrosamiento del endotelio, lo que promueve la supervivencia endotelial, la estabilización de las células perivasculares de soporte y la inhibición de la permeabilidad endotelial. Los niveles excesivos de angiotensina II inhiben estos efectos beneficiosos.

La disfunción endotelial es también un evento temprano importante en la patogénesis de la aterosclerosis, al contribuir al inicio y la progresión de la placa.

La disfunción endotelial también es un contribuyente destacado a los efectos de enfermedades inflamatorias como la sepsis. La patogenia de la sepsis es el resultado de una compleja red de eventos. Los componentes de la pared celular bacteriana gramnegativa (endotoxinas) son las especies predominantes (aunque no exclusivas) responsables del inicio de la sepsis. Las endotoxinas, junto con otras moléculas bacterianas, desencadenan una respuesta generalizada que involucra tanto vías celulares como humorales con la generación de mediadores pro y antiinflamatorios. Estos mediadores incluyen citoquinas, factores de coagulación, moléculas de adhesión, sustancias depresoras del miocardio y proteínas de choque térmico. El endotelio es una diana importante de los eventos inducidos por sepsis y el daño celular y la disfunción del endotelio explican gran parte de la patología del shock séptico. Las células endoteliales vasculares se encuentran entre las primeras células del cuerpo que entran en contacto con las moléculas bacterianas en circulación. Las células endoteliales poseen mecanismos que reconocen patrones estructurales de patógenos bacterianos y posteriormente, inician la expresión de mediadores inflamatorios.

Un enfoque para el tratamiento de la disfunción endotelial consiste en dirigirse a los componentes que desencadenan la disfunción del endotelio en el proceso de la enfermedad. Por ejemplo, la disminución de los niveles de homocisteína en la hiperhomocisteinemia puede mejorar la disfunción endotelial mediante la administración de suplementos de ácido fólico. La L-arginina y la tetrahidrobiopterina, así como los miméticos de tetrahidrobiopterina, pueden mejorar la función endotelial mediante un aumento de la biodisponibilidad del óxido nítrico. No obstante, algunos estudios no han demostrado que la administración de L-arginina mejore la disfunción endotelial.

Se ha demostrado que las estatinas tienen efectos beneficiosos sobre la disfunción endotelial, lo que puede deberse, en parte, a la disminución de los lípidos, pero también de sus efectos antiinflamatorios pleiotrópicos. No obstante, las estatinas se asocian al dolor muscular y la rabdomiolisis (que puede conducir a la insuficiencia renal e incluso, la muerte), así como a debilidad muscular, neuropatía y pérdida de memoria. Además, las estatinas tienen una vida media relativamente corta y se necesitan dosis regulares para proporcionar un beneficio terapéutico. Por ejemplo, la atorvastatina tiene una vida media efectiva de aproximadamente 20-30 horas y se considera una estatina de acción prolongada.

También se ha demostrado que los agonistas del receptor γ activados por proliferador de peroxisomas mejoran la disfunción endotelial. No obstante, los beneficios potenciales de dichos compuestos deben evaluarse cuidadosamente frente a los problemas de seguridad relacionados con esta clase de compuestos en cuanto a retención de líquidos e insuficiencia cardíaca congestiva, así como frente a la posibilidad de un mayor riesgo cardiovascular.

Yamaza y otros, 2010, Stem Cell Research & Therapy 1:5, páginas 1-10 describen el uso de células madre mesenquimales que expresan STRO-1 para el tratamiento del lupus eritematoso, una enfermedad de disfunción o inflamación endotelial vascular, en un modelo murino.

Bonfield y otros, 2010, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 299:760-770 describen el uso de células madre mesenquimales para el tratamiento de la inflamación crónica de las vías respiratorias en un modelo murino de asma.

JJin y otros, 2012, International Orthopedics 36:2589-2596 describen el uso de células madre mesenquimales para la reparación vascular y la angiogénesis en un modelo canino de osteonecrosis.

Gonzalez y otros, 2009, Gastroenterology 136:978-989 describen el uso de células madre derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de la colitis experimental.

Gonzalez y otros, 2009, Arthritis & Rheumatism 60:1006-1019 describen el uso de células madre derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de la artritis experimental.

La solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2006/121445 A2 describe un procedimiento para tratar la insuficiencia renal aguda y crónica y los trastornos inflamatorios con células madre mesenquimales.

La solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2012/162754 A1 describe células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), incluidas MSC STRO-1^{bright}, para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, encefalomielitis inflamatoria.

La solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2004/084921 A1 describe el uso de MSC derivadas de hueso, incluidas MSC STRO-1^{bright}, para inducir neovascularización a fin de tratar tejidos isquémicos/dañados.

La solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO 2013/003899 A1 describe el uso de MSC derivadas de hueso, incluidas MSC STRO-1bright, para inducir neovascularización a fin de tratar tejidos isquémicos/dañados.

Ghosh y otros, 2010, Arthritis Research & Therapy 12:R28, páginas 1 a 17 describen que el polisulfato de pentosano promueve la proliferación y diferenciación condrogénica de células precursoras mesenquimales derivadas de médula ósea humana adulta.

Yi y otros, 2012, Arch Pharma Res 35:213-221 revisan las propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales y sus aplicaciones terapéuticas.

De lo anterior se deduce que en la técnica existe una necesidad de tratar o prevenir enfermedades de disfunción o inflamación endotelial.

Resumen

La presente invención se refiere al tema expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

Al llegar a la presente invención, los inventores demostraron que la administración sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) de células mesenquimales progenitoras que expresan STRO-1 (MPC, por sus siglas en inglés) o su progenie a animales que padecen disfunción endotelial incrementó la respuesta de las arterias coronarias a dilatadores específicos del endotelio (bradiquinina y carbacol), pero no al dilatador del músculo liso nitroprusiato de sodio. Por ejemplo, las MPC o su progenie aumentaron la respuesta máxima a los dilatadores específicos del endotelio, lo que indicaría una reducción de la disfunción endotelial en comparación con los resultados en animales no tratados con MPC o su progenie. Estos datos indican que las MPC que expresan STRO-1 o su progenie o uno o más factores secretados de las mismas tratan o previenen el desarrollo de disfunción endotelial.

En base a los hallazgos de los inventores, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad de disfunción endotelial vascular o inflamación en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración sistémica al sujeto de una población de células enriquecidas para células STRO-1^{+} y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, el sujeto padece una afección causada por una disfunción endotelial.

En un ejemplo, la disfunción endotelial se encuentra en el interior de un vaso sanguíneo, por ejemplo, es una disfunción endotelial vascular.

En un ejemplo, la afección causada por la disfunción endotelial se selecciona de entre el grupo que consiste en sepsis, hipertensión, arteriopatía coronaria, insuficiencia cardíaca crónica y arteriopatía periférica, nefropatía e insuficiencia renal crónica.

En un ejemplo, la afección causada por la disfunción endotelial es la nefropatía. Por lo tanto, en un ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la nefropatía en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración sistémica al sujeto de una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, la nefropatía es nefropatía diabética. Por lo tanto, en un ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la nefropatía diabética en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración sistémica al sujeto de una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

En otro ejemplo, la afección es la aterosclerosis. Por lo tanto, en un ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la aterosclerosis en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración sistémica al sujeto de una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, la afección es una enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria puede ser un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, como sepsis, shock séptico o una afección similar a la sepsis. En otro ejemplo, la afección es sepsis o shock séptico. Por lo tanto, en un ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la sepsis o el shock séptico en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración sistémica al sujeto de una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

La sepsis, el shock séptico o una afección similar a la sepsis pueden estar causadas por un virus, un hongo, un protozoo o una bacteria.

En un ejemplo, el procedimiento comprende la administración de una población de células enriquecidas para células STRO-1 ^{bright} y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas se administran por vía intravenosa. En este sentido, los inventores han demostrado que las células STRO-1$^+$ y/o su progenie administradas sistémicamente pueden mejorar la disfunción endotelial. Así, la descripción contempla la administración de células STRO-1$^+$ y/o su progenie en un sitio remoto de un sitio de disfunción endotelial en un sujeto.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en una cantidad suficiente para reducir la IL-6, TNFα y/o IL-17 en un sujeto. Al reducir los niveles de estas citoquinas inflamatorias, el procedimiento de la descripción previene la disfunción endotelial.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de angiopoyetina I en un sujeto, por ejemplo, en el endotelio de un sujeto. Como se mencionó anteriormente, los niveles de angiopoyetina II (un antagonista de la angiopoyetina I) se incrementan en sujetos que padecen disfunción endotelial. Los inventores han demostrado que las MPC STRO-1$^+$ y/o su progenie secretan angiopoyetina II y razonan que esta contribuye al tratamiento de la disfunción endotelial.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en una cantidad suficiente para mejorar la dilatación del endotelio (por ejemplo, endotelio vascular) en un sujeto (por ejemplo, en respuesta a un dilatador endotelial como bradiquinina o carbacol).

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en una cantidad suficiente para mejorar la dilatación del endotelio (por ejemplo, endotelio vascular) sin aumentar la dilatación del músculo liso (por ejemplo, músculo liso vascular) en un sujeto (por ejemplo, en respuesta a un dilatador del músculo liso como el nitroprusiato de sodio).

Las dosificaciones ejemplares de las células incluyen entre 0,1 x 10^6 y 5 x 10^6 células STRO-1^+ y/o su progenie por kilogramo. Por ejemplo, el procedimiento comprende la administración de entre 0,3 x 10^6 y 2 x 10^6 células STRO-1^+ y/o su progenie por kilogramo.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de entre aproximadamente 0,3 x 10^6 células/kg y aproximadamente 4 x 10^6 células/kg, por ejemplo entre aproximadamente 0,3 x 10^6 células/kg y aproximadamente 2 x 10^6 células/kg.

Una forma del procedimiento comprende la administración de una dosis baja de células STRO-1^+ y/o su progenie. Una dosis baja es una dosis de, por ejemplo, entre 0,1 x 10^5 y aproximadamente 0,5 x 10^6 células STRO-1^+/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,3 x 10^6 células STRO-1^+/kg.

En otro ejemplo, al sujeto se le administra una dosis alta de células. Las dosis ejemplares incluyen al menos aproximadamente 1,5 x 10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende entre aproximadamente 1,5 x 10^6 y aproximadamente 4 x 10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende entre aproximadamente 1,5 x 10^6 o aproximadamente 2 x 10^6 células/kg.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis corporal constante, es decir, independientemente del peso corporal del sujeto.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de entre aproximadamente 100 millones y 300 millones de células, independientemente del peso del sujeto.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de entre aproximadamente 100 millones y 200 millones de células, independientemente del peso del sujeto.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de aproximadamente 100 millones de células, independientemente del peso del sujeto.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de aproximadamente 150 millones de células, independientemente del peso del sujeto.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de aproximadamente 200 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células se administran a una dosis de aproximadamente 300 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células STRO-1^+ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en combinación con un polisacárido polisulfatado.

En otro ejemplo, el polisacárido polisulfatado es polisulfato de pentosano (PPS) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, el PPS es una sal de sodio de PPS (NaPPS) o una sal de calcio de PPS (CaPPS). Por ejemplo, la sal de PPS es NaPPS.

En un ejemplo, la concentración de PPS depende del número de células STRO-1^+ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas en la composición.

En un ejemplo, la concentración de PPS es de aproximadamente 5 ng/ml/millón de células - 10 mg/ml/millón de células o 500 ng/ml/millón de células - 10 mg/ml/millón de células, 500 ng/ml/millón de células - 2000 µg/ml/millones de células, 1 µg/ml/millón de células - 1000 µg/ml/millón de células, o 1 µg/ml/millón de células - 500 µg/ml/millón de células, 500 ng - 10µg/ml/millón de células, 1 µg - 10 µg/ml/millón de células, 1µg - 8µg/ml/millón de células, 1µg - 6µg/ml/millón de células, 1µg - 5µg/ml/millón de células, 1µg - 3µg/ml/millón de células, 2µg - 6µg/ml/millón de células, 2,5µg - 5µg/ml/millón de células, o 3 µg - 5 µg/ml/millón de células, 1 µg - 100 µg/ml/millón de células, 1 µg - 50 µg/ml/millón de células, 1 µg - 20 µg/ml/millón de células, 1 µg - 15 µg/ml/millón de células, 10µg - 100µg/ml/millón de células, 20µg - 100µg/ml/millón de células, o 50µg - 100µg/ml/millón de células, 1µg - 1000µg/ml/millón de células, 100µg - 800µg/ml/millón de células, 100µg - 600µg/ml/millón de células, 100 µg - 500 µg/ml/millón de células, 200 µg - 500 µg/ml/millón de células.

En un ejemplo, la cantidad de PPS es de aproximadamente entre 1 mg-100 mg/75 millones de células, por ejemplo, de aproximadamente 25-75 mg/75 millones de células, por ejemplo, de aproximadamente 75 mg/75 millones de células

(por ejemplo, 1 mg/millón de células).

En un ejemplo adicional, la concentración de PPS es de aproximadamente 500ng, 1µg, 2µg, 2.5µg, 5µg, 10µg, 15µg 20µg, 30µg, 40µg, 50µg, 60µg, 70µg, 80µg, 90µg, 100µg, 150µg, 200µg, 250µg, 300µg, 350µg, 400µg, 450µg, 500µg, 550µg, 600µg, 650µg, 700µg, 750µg, 800µg, 850µg, 900µg, 950µg, 1000µg, 1050µg, 1100µg, 1150µg, 1200µg, 1250µg, 1300µg, 1350µg, 1400µg, 1450µg, 1500µg, 1550µg, 1600µg, 1650µg, 1700µg, 1750µg, 1800µg, 1850µg, 1900µg, 1950µg, o 2000µg/ml/millón de células.

Por ejemplo, la cantidad total de PPS administrado es de aproximadamente 1 a 100 mg.

Por ejemplo, la cantidad total de PPS administrado es de aproximadamente 75 mg.

En otro ejemplo, el PPS puede administrarse en una cantidad tal que se produzca una concentración de PPS de entre 0,01 y 100 microgramos/ml de composición para administrarse al sujeto, por ejemplo entre 0,1 y 50 microgramos por ml de composición, entre 0,1 y 50 microgramos por ml de composición, entre 0,1 y 10 microgramos por ml de composición, entre 1 y 10 microgramos por ml de composición, entre 2 y 8 microgramos por ml de composición, entre 4 y 6 microgramos por ml de composición, o de 4, 5, o 6 microgramos por ml de composición.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran, con o sin PPS, una vez a la semana o con menor frecuencia; por ejemplo, una vez cada cuatro semanas o con menor frecuencia.

La presente descripción también contempla numerosas administraciones de las células y/o factores solubles. Por ejemplo, un procedimiento de este tipo puede comprender la administración de las células y la monitorización del sujeto para determinar cuándo se dan o se repiten uno o más síntomas de disfunción endotelial y la administración de una dosis adicional de las células y/o factores solubles. Los procedimientos adecuados para evaluar los síntomas de disfunción endotelial resultarán evidentes a los expertos en la materia y/o se describen en el presente documento.

En otro ejemplo, las células y/o los factores solubles se administran según un calendario fijo, por ejemplo, una vez por semana o dos semanas o tres semanas o cuatro semanas o cinco semanas o seis semanas o periodos más prolongados.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o las células de progenie son autogénicas o alogénicas y/o los factores solubles pueden derivarse de células autogénicas o alogénicas.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ y/o las células de progenie se han expandido mediante cultivo antes de la administración y/o antes de obtener los factores solubles.

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1$^+$ son STRO-1^{bright} y/o expresan fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP) y/o las células de progenie y/o los factores solubles se derivan de células STRO-1$^+$ que son STRO-1^{bright} y/o expreso TNAP.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas se administran en forma de una composición que comprende dichas células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas y un vehículo y/o excipiente.

En un ejemplo, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, por ejemplo, un humano. En otro ejemplo, el sujeto es un animal no humano (por ejemplo, un mamífero no humano), tal como un mamífero domesticado, por ejemplo, un perro o un gato o un caballo o una vaca o una oveja.

La presente descripción proporciona, además, una población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas, opcionalmente, en combinación con PPS para su uso en el tratamiento o prevención de la disfunción endotelial o de una afección causada por disfunción endotelial en un sujeto.

La presente descripción proporciona, además, el uso de una población de células enriquecidas para STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o factores solubles derivados de las mismas, opcionalmente, en combinación con PPS en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la disfunción endotelial o una afección causada por disfunción endotelial en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Coexpresión de TNAP (STRO-3) y el marcador celular de precursor mesenquimal STRO-1^{bright} por células

morfonucleares de médula ósea (BMMNC, por sus siglas en inglés) humana adulta. Se practicó una inmunofluorescencia de color doble y citometría de flujo por incubación de BMMNC de STRO-1 seleccionadas por MACS y marcadas indirectamente con un anticuerpo de IgM antimurina de cabra acoplado a FITC (eje x) y AcM STRO-3 (IgG1 murina) marcado indirectamente con una IgG antimurina de cabra acoplada a PE (eje y). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10^4 eventos recogidos como datos a modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población minoritaria de células STRO-1^{bright} coexpresaron TNAP (cuadrante superior derecho), mientras que el resto de células STRO-1^+ no consiguieron reaccionar con el AcM STRO-3.

Figura 2. Perfil de expresión génica de progenie de STRO-1^{bright} o STRO-1^{dim} de MPC STRO-1^{bright} expandidas y cultivadas. Se prepararon suspensiones de células únicas de MPC de médula ósea expandidas *ex vivo* mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Las células se tiñeron con el anticuerpo STRO-1 que se reveló posteriormente mediante incubación con isotiocianato de IgM-fluoresceína anti-cabra murino. Se preparó ARN celular total a partir de poblaciones purificadas de células que expresan STRO-1^{dim} o STRO-1^{bright}, después de la clasificación celular activada por fluorescencia (A). Utilizando el procedimiento de extracción RNAzolB y procedimientos estándar, se aisló ARN total de cada subpoblación y se utilizó como una plantilla para la síntesis de ADNc. La expresión de diversos transcritos se evaluó mediante amplificación por PCR, utilizando un protocolo estándar como se describió previamente (Gronthos y otros, J Cell Sci. 116:1827-1835, 2003). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio (B). Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQant (C).

Figura 3. La progenie de STRO-1^{bright} de MPC STRO-1^+ cultivadas y expandidas expresan niveles elevados de SDF-1, lo cual no sucede con la progenie de STRO-1^{dim}. (A) Las preparaciones aisladas por MACS de BMMNC STRO-1^+ se dividieron en distintos subgrupos de STRO-1 según las regiones STRO-1^{bright} y STRO-$1^{dim/dull}$ utilizando FACS. Se preparó ARN total de cada subpoblación de STRO-1 y se utilizó para construir una biblioteca de hibridación sustractiva de STRO-1^{bright} (B-C). Los filtros de nitrocelulosa replicada, que se han transferido con productos de PCR representativos se amplificaron a partir de clones bacterianos transformados con ADNc sustraído de STRO-1^{bright}. A continuación, los filtros se sondearon con o bien STRO-1^{bright} marcadas con [^{32}P] desoxicitidina trifosfato (dCTP)(B) o ADNc sustraído de STRO-$1^{dim/dull}$ (C). Las flechas indican la expresión diferencial de 1 clon que contiene un fragmento de ADNc correspondiente a SDF-1 humano. (D) Análisis de PCR-transcriptasa inversa (RT) que demuestra la expresión relativa del SDF-1 y transcritos de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en ARN total preparado a partir de poblaciones de BMMNC STRO-1 recién aisladas por MACS/FACS antes del cultivo. bp indica par de bases.

La figura 4 es una serie de representaciones gráficas que muestran la expresión de CD146, CXCL12 y angiopoyetina 1 en células estromales y cultivos primarios a largo plazo. (A) Análisis FACS de las líneas celulares estromales HS5 y HS27a para CD146 (MCAM) junto con controles de isotipo. (B) Análisis FACS de un LTC primario en el primer pase para CD146 junto con control de isotipo. Los LTC primarios se ordenaron en poblaciones CD146^{hi} y CD146$^{l^\circ}$ por clasificación de flujo asistida por FACS. También se indican las puertas aproximadas para las poblaciones hi y lo. (C) Niveles de CXCL12 de 9 LTC ordenados en CD146^{hi} y CD146$^{l^\circ}$ y cuantificados por RT-PCR (en relación con la beta-actina, multiplicados por un factor de 1000). Las muestras pareadas del mismo cultivo están conectadas por una línea. (D) Niveles de angiopoyetina-1 de los mismos 9 LTC, también cuantificados por RT-PCR (en relación con la beta-actina, multiplicados por un factor de 10000). El experimento del panel A se confirmó en tres experimentos independientes, Los experimentos de los paneles B, C y D se confirmaron en 9 muestras independientes. El análisis estadístico de los conjuntos de datos de los paneles C y D por la prueba de pares emparejado de Wilcoxon reveló un valor de p <0,01 en ambos casos.

La figura 5 muestra la media ± SEM de los niveles de IL-10 (ng/ml) en el plasma de ovinos tratados y no tratados durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 6 muestra la media ± SEM de los niveles de fibrinógeno (g/L) en el plasma de ovinos tratados y no tratados durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 7 muestra la media + SEM de los niveles de actina A (pg/ml) en el plasma de ovinos tratados y no tratados durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 8 muestra la media + SEM de los niveles de proteína C reactiva (mg/L) en el plasma de ovinos tratados y no tratados durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 9 muestra el cambio de porcentaje en los niveles de proteína C reactiva en el plasma de ovinos tratados y no tratados durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 10 es una serie de representaciones gráficas que muestran el porcentaje de relajación de las arterias coronarias(A y C) o de arterias digitales (B y D) de ovinos tras la contracción con endotelina-1 y la posterior relajación con bradiquinina (A), carbacol (C) o nitroprusiato de sodio (B y D) de ovinos a los que se administró ("tratados con") MPCs o solución salina ("controles").

La figura 11 es una representación gráfica que muestra la media ± SD de los niveles máximos de IL10 (ng/ml) en relación con la base de referencia en el plasma de ovinos tratados y no tratados con MPC ± PPS tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 12 es una representación gráfica que muestra la media ± SEM del cambio en los niveles de fibrinógeno (g/L) en el plasma (g/L), en relación con la base de referencia, de ovinos tratados y no tratados con MPC ± PPS durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 13 es una representación gráfica que muestra la media ± SEM de los niveles de actina A (pg/ml) en el plasma de ovinos tratados y no tratados con MPC ± PPS durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 14 es una representación gráfica que muestra la media ± SEM del cambio en los niveles de proteína C reactiva en el plasma, en relación con la base de referencia, de ovinos tratados y no tratados con MPC ± PPS durante un periodo de dos semanas tras la inducción de disfunción endotelial mediante la administración de colágeno.

La figura 15 es una serie de representaciones gráficas que muestran el porcentaje de relajación de las arterias coronarias (A y C) o de arterias digitales (B y D) de ovinos tras la contracción con endotelina-1 y la posterior relajación con bradiquinina (A), carbacol (C) o nitroprusiato de sodio (B y D) de ovinos a los que se administró ("tratados con") MPC ± PPS o solución salina ("controles").

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique o que el contexto exija lo contrario, al hacer referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se entenderá que esta abarca uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de dichas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupo de composiciones de materia.

Cada realización o ejemplo descrito en el presente documento se ha de aplicar *mutatis mutandis* al resto de realizaciones a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los expertos en la materia observarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a otras variaciones y modificaciones además de las que se describen específicamente. Se ha de entender que la descripción incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos o más cualquiera de dichas etapas o características.

La presente descripción no ha de estar limitada por los ejemplos específicos descritos en el presente documento, que se incluyen únicamente a modo de ejemplo. Los productos, las composiciones y los procedimientos funcionalmente equivalentes se encuentran claramente dentro del alcance de la invención, según se describe en el presente documento.

La presente descripción se lleva a cabo sin experimentación indebida utilizando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida, e inmunología. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, segunda edición (1989), Vol. I, II, y III completos; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y concretamente los trabajos de Gait, pág. 1-22; Atkinson *y otros*, pág. 35-81; Sproat *y otros*, pág. 83-115; y Wu y otros, pág. 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, texto completo; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical

Approach (1986) IRL Press, Oxford, texto completo; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), serie completa; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Base de datos de conocimientos de acceso a sitio web de laboratorio virtual (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, RL (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en The Peptides (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wünsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Metoden der Organischen Chemie (Müler, E., ed.), vol. 15, 4ª edición, Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y Animal Cell Culture: Practical Approach, tercera edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que el término "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende/comprenden" implican la inclusión de determinada etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivados/derivadas de" se entenderá que indica que un número entero especificado se puede obtener de una fuente en particular aunque no necesariamente directamente de dicha fuente. En el contexto de los factores solubles derivados de células madre y/o células de su progenie, se entenderá que este término significa uno o más factores, por ejemplo, proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. producidos durante el cultivo *in vitro* de células madre + y/o células de su progenie.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "disfunción endotelial" significa un estado (por ejemplo, un estado sistémico) en un sujeto que se caracteriza por un desequilibrio entre las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras y/o que se caracteriza por un cambio en la acción del endotelio hacia una reducción de la vasodilatación y/o un estado proinflamatorio y/o propiedades protrombóticas. Los procedimientos para detectar la disfunción endotelial serán evidentes para el experto en la técnica y/o se describen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "afección causada por disfunción endotelial" significa cualquier afección médica en la cual la disfunción endotelial juega un papel patológico. En un ejemplo, la afección es una afección vascular. Por ejemplo, la afección es una enfermedad cardiovascular (como hipertensión, arteriopatía coronaria, insuficiencia cardíaca crónica y arteriopatía periférica), una complicación vascular de la diabetes (como nefropatía) o insuficiencia renal crónica.

Como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "nefropatía" significa una afección caracterizada por daño renal e incluye nefropatía no inflamatoria (nefrosis) y nefropatía inflamatoria (nefritis). Las causas de la nefropatía incluyen la deposición de los anticuerpos IgA en el glomérulo, la administración de analgésicos, la deficiencia de xantina oxidasa y/o la exposición a largo plazo al plomo o sus sales. Las afecciones crónicas que pueden producir nefropatía incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), diabetes mellitus o presión arterial alta (hipertensión), que conducen a nefropatía diabética y nefropatía hipertensiva, respectivamente.

Se entenderá que el término "nefropatía diabética" (también conocida como síndrome de Kimmelstiel-Wilson o glomeruloesclerosis nodular diabética y glomerulonefritis intercapilar) se refiere a una afección renal progresiva causada por la angiopatía de los capilares en los glomérulos renales. Se caracteriza por síndrome nefrótico y glomeruloesclerosis difusa. La primera anomalía de laboratorio generalmente detectada en esta afección es una prueba de microalbuminuria positiva. A menudo, se sospecha el diagnóstico cuando un análisis de orina rutinario de una persona con diabetes muestra un nivel excesivo de proteína en la orina (proteinuria). También es posible que el análisis de orina muestre glucosa en la orina, sobre todo si el control de la glucosa en sangre es deficiente. La creatinina sérica puede aumentar a medida que avanza el daño renal. Se puede emplear una biopsia renal para confirmar el diagnóstico, aunque no siempre es necesario si el caso es sencillo, con una progresión documentada de la proteinuria a lo largo del tiempo y la presencia de retinopatía diabética al examinar la retina ocular.

En el presente documento, el término "síndrome de respuesta inflamatoria sistémica" (o "SIRS") se utiliza según su significado normal, para referirse a un estado inflamatorio de todo el cuerpo sin una fuente de infección. Hay cuatro síntomas diagnósticos principales de SIRS, aunque dos de estos son suficientes para el diagnóstico (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl A, 1-7).

El término "sepsis" se refiere a una forma de SIRS causada por una infección sospechada o probada (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl. A, 1-7). Una infección que conduce a la sepsis puede estar causada, por ejemplo, por un virus, un hongo, un protozoo o una bacteria.

El término "shock séptico" se refiere a la sepsis con hipotensión a pesar de la reanimación adecuada con líquidos (hipotensión refractaria), junto con la presencia de anomalías de perfusión (véase, por ejemplo, Nystrom (1998) Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41, Suppl. A, 1-7).

El término "afección similar a la sepsis" se refiere a un estado en el que un paciente presenta síntomas similares a la sepsis o al shock séptico, pero en el que la cascada de mediadores inflamatorios y/o el cambio en los parámetros hemodinámicos no están causados principal o inicialmente por un agente infeccioso. Por ejemplo, se pueden observar condiciones similares a la sepsis en un paciente con insuficiencia hepática aguda o crónica (véase Wasmuth HE, y otros. J Hepatol. Febrero de 2005; 42(2): 195-201), pacientes que padecen una enfermedad posterior a la reanimación después de un paro cardíaco (véase Adrie C y otros. Curr Opin Crit Care. Junio de 2004; 10(3):208-12), pacientes que padecen síntomas similares a la sepsis después de la quimioterapia para el cáncer (véase Tsuji E y otros. Int J Cancer. 2003 Nov. 1; 107(2):303-8) pacientes sometidos a perfusión hipertérmica de extremidades aisladas con TNF-alfa recombinante o a tratamientos similares (véase Zwaveling JH y otros. Crit Care Med. Mayo de 1996; 24(5):765-70) o enfermedad similar a sepsis en neonatos (véase Griffin MP y otros. Pediatr Res. Junio de 2003; 53(6):920-6.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "cantidad efectiva" significa una cantidad suficiente de células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para lograr un aumento significativo de la dilatación vascular (por ejemplo, en presencia de un dilatador endotelial (como bradiquinina o carbacol) en un sujeto y/o un aumento en el nivel de angiopoyetina I en el endotelio en un sujeto o en un tejido o región del mismo del sujeto (por ejemplo, una región del endotelio con una disfunción). Este término no significa que la "cantidad efectiva" se analice para detectar estos efectos en todos los casos, sino que la cantidad puede establecerse en un estudio preliminar y, en función de los resultados de dichos estudios, se puede suponer que la cantidad surtirá el mismo efecto en la mayoría de los sujetos.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para tratar una afección causada por una disfunción endotelial o un síntoma de la misma o una manifestación clínica de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "cantidad profilácticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de células madre y/o células progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para prevenir, inhibir o retrasar la aparición de una afección causada por una disfunción endotelial o un síntoma de la misma o una manifestación clínica de la misma.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "dosis baja" significa una cantidad de células madre y/o su progenie inferior a 1×10^6, pero que aún así es suficiente para constituir una "cantidad eficaz" tal como se define en el presente documento y/o una "cantidad terapéuticamente eficaz" y/o una "cantidad profilácticamente eficaz" tal como se define en el presente documento. Por ejemplo, una dosis baja comprende $0,5 \times 10^6$ o menos células, o $0,4 \times 10^6$ o menos células o $0,3 \times 10^6$ o menos células o $0,1 \times 10^6$ o menos células.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "dosis alta" significa más de $1,5 \times 10^6$ células/kg. Por ejemplo, una dosis comprende entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente 4×10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende aproximadamente $1,5 \times 10^6$ o aproximadamente 2×10^6/kg.

Se entenderá que la referencia a una "dosis corporal fija" significa que la dosis declarada se administra a un sujeto o población de sujetos independientemente de su peso corporal.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "tratar" o "tratamiento" o "que trata" significa administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de factores y/o células solubles y reducir o inhibir el síntoma o síntomas de una afección causada por una disfunción endotelial hasta el punto de que ya no se diagnostique clínicamente que el sujeto padece la afección en cuestión o que se reduzcan el nivel o la gravedad de la afección.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que los términos "prevenir" o "que previene" o "prevención" significan administrar una cantidad profilátcticamente eficaz de factores solubles y/o células y detener o impedir o retrasar el desarrollo o progresión de una afección causada por una disfunción endotelial.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "factores solubles" significa cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido, glicoproteína, glicopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc. producida por células madre y/o su progenie que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser intracelulares y/o secretados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (por ejemplo, sobrenadante) y/o una fracción de estos y/o pueden ser un factor purificado. En un ejemplo de la presente descripción

los factores solubles son o están contenidos dentro de un sobrenadante. En consecuencia, se entenderá que cualquier ejemplo del presente documento dirigido a administración de uno o más factores solubles aplica *mutatis mutandis* a la administración de sobrenadante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sobrenadante" se refiere al material no celular producido después del cultivo *in vitro* de células madre y/o su progenie en un medio adecuado, tal como un medio líquido. Normalmente, el sobrenadante se produce cultivando las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, y a continuación se elimina el material celular mediante un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede o puede no haber sido sometido a etapas de purificación adicionales antes de la administración. En un ejemplo, el sobrenadante comprende menos de 10^5, por ejemplo, menos de 10^4, por ejemplo, menos de 10^3 y, por ejemplo, no comprende células vivas.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "individuo normal o sano" significa un sujeto que no padece una disfunción endotelial según se evalúa mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. En un ejemplo, un "individuo normal o sano" no padece ninguno de los síntomas de una afección causada por una disfunción endotelial.

Disfunción endotelial

Numerosas pruebas para evaluar la función endotelial se conocen en la técnica y/o se describen a continuación y son útiles para detectar la disfunción endotelial.

Un parámetro común que se evalúa al someter a prueba la función endotelial es la vasodilatación dependiente del endotelio. En las arterias coronarias, esto se realiza angiográficamente mediante mediciones de flujo Doppler, evaluando el efecto de los agonistas dependientes del endotelio, principalmente acetilcolina (Schachinger y otros, Circulation 101: 1899-1906, 2000).

También puede utilizarse la prueba de estimulación por frío con medición de la perfusión coronaria mediante tomografía por emisión de positrones como una medida de la función endotelial (Gokce y otros, Am Coll Cardiol 41: 1769-1775, 2003).

Dado que la tensión de cizallamiento es un estímulo para que el endotelio libere óxido nítrico, una técnica no invasiva consiste en inducir un aumento de la tensión de cizallamiento durante la hiperemia reactiva para evaluar la vasodilatación de la arteria braquial mediada por flujo mediante ecografía (Celermajer y otros, Lancet 340: 1111-1115, 1992).

Dado que la disfunción endotelial va unida a la inflamación arterial, los marcadores de disfunción endotelial incluyen formas solubles de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, que pueden evaluarse en plasma.

Hace tiempo que la microalbuminuria se considera una expresión de disfunción endotelial. En la mayoría de las afecciones patológicas, la microalbuminuria parece representar un trastorno de la pared capilar del glomérulo con fuga transcapilar de albúmina. En la diabetes, la microalbuminuria se ha correlacionado con la disfunción endotelial y puede preceder a su desarrollo. Además, se ha demostrado que la microalbuminuria se correlaciona con marcadores de disfunción endotelial.

Es posible realizar una evaluación cuantitativa del flujo sanguíneo miocárdico y de la actividad metabólica mediante tomografía por emisión de positrones (Gould y otros, Circulation 89:1530-1538, 1994). Se pueden obtener tanto el flujo basal como el flujo hiperémico (generalmente hasta el dipiridamol intravenoso) para calcular la reserva de flujo coronario. Dado que el aumento del flujo miocárdico está relacionado con los aumentos inducidos por adenosina y la vasodilatación mediada por flujo, este es, en parte, una medida de la función endotelial. Esta técnica no es invasiva y tiene la ventaja de ofrecer la posibilidad de realizar múltiples pruebas por paciente.

Hokanson y otros (IEEE Trans Biomed Eng 22:25-29, 1975) describieron la pletismografía calibrada eléctricamente para la medición directa del flujo sanguíneo de las extremidades. El aparato es relativamente económico y versátil, ya que las infusiones intraarteriales directas de metacolina o acetilcolina evalúan la función endotelial. Debido a la medición del flujo de sangre del antebrazo (ml/min/100 ml), la pletismografía de oclusión venosa refleja la función del vaso de resistencia en el antebrazo.

Células madre o células de progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles derivados de las mismas

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula madre" se refiere a células autorrenovables capaces de dar lugar a hijas idénticas desde el punto de vista fenotípico y genotípico, así como a al menos otro tipo de célula final

(por ejemplo, células diferenciadas terminalmente). El término "células madre" incluye células totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales, así como células progenitoras y/o precursoras derivadas de la diferenciación de las mismas. La célula madre puede ser una célula madre adulta o embrionaria o puede ser una célula pluripotente inducida (iPS).

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula totipotente" o "célula totipotencial" se refiere a una célula capaz de formar un embrión completo (por ejemplo, un blastocisto).

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula pluripotente" o "célula pluripotencial" se refiere a una célula que presenta plena versatilidad de diferenciación, es decir, la capacidad de crecer para convertirse en cualquiera de los aproximadamente 260 tipos de células existentes en el cuerpo de un mamífero. Una célula pluripotente puede ser autorrenovable y permanecer latente o inactiva dentro de un tejido.

Por "célula multipotencial" o "célula multipotente" nos referimos a una célula capaz de dar lugar a cualquiera de varios tipos de células maduras. Tal como se usa en el presente documento, esta frase abarca células madre adultas o embriónicas y células progenitoras, tales como células precursoras mesenquimales (MPC) y la progenie multipotencial de dichas células. A diferencia de una célula pluripotente, una célula multipotente no posee la capacidad de formar todos los tipos de células.

Tal como se usa en el presente documento, el término "célula progenitora" se refiere a una célula comprometida a diferenciarse en un tipo específico de célula o a formar un tipo específico de tejido.

Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que la frase "células multipotenciales STRO-1$^+$" significa células progenitoras STRO-1$^+$ y/o TNAP$^+$ capaces de formar colonias celulares multipotenciales.

Las células multipotenciales STRO-1$^+$ son células que se encuentran en la médula ósea, la sangre, las células de la pulpa dental, el tejido adiposo, la piel, órganos como bazo, páncreas, cerebro, riñón, hígado, corazón, retina, cerebro, los folículos pilosos, el intestino, pulmones, nódulos linfáticos, timo, huesos, ligamentos, tendones, músculo esquelético, dermis y periostio; y son capaces de diferenciarse en líneas germinales como el mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo. Por consiguiente, las células multipotenciales STRO-1$^+$ son capaces de diferenciarse en un gran número de tipos celulares incluyendo, entre otros, de tejido adiposo, óseo, cartilaginoso, elástico, muscular y tejidos conectivos fibrosos. El compromiso con un linaje específico y la ruta de diferenciación que estas células toman depende de diversas influencias, desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citoquinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos huésped. En una realización, las células multipotenciales STRO-1$^+$ son células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para dar células hijas que pueden ser células madre o precursoras que, a su vez, se diferenciarán de manera irreversible para dar origen a una célula fenotípica.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ son enriquecidas a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que va a ser tratado o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o de una especie diferente). Los términos "enriquecido", "enriquecimiento" o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la cual la proporción de un tipo celular particular o la proporción de una serie de tipos celulares particulares aumenta en comparación con una población de células no tratada (por ejemplo, células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida para células STRO-1$^+$ comprende al menos aproximadamente 0,1 % o 0,5 % o 1 % o 2 % o 5 % o 10 % o 15 % o 20 % o 25 % o 30 % o 50 % o 75 % de células STRO-1$^+$. En este sentido, se entenderá que la expresión "población de células enriquecidas para células STRO-1$^+$" proporciona apoyo explícito a la expresión "población de células que comprende X % de células STRO-1$^+$", donde X % es un porcentaje como se indica en el presente documento. Las células STRO-1$^+$ pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, por ejemplo, UFC-F (fibroblastos) o un subgrupo de los mismos (por ejemplo, 50 % o 60 % o 70 % o 70 % o 90 % o 95 %) pueden tener esta actividad.

En un ejemplo, la población de células se enriquece a partir de una preparación de células que comprende células STRO-1$^+$ en una forma seleccionable. En este sentido, se entenderá que el término "forma seleccionable" significa que las células expresan un marcador (por ejemplo, un marcador de superficie celular) que permite la selección de las células STRO-1$^+$. El marcador puede ser, pero no necesariamente, STRO-1. Por ejemplo, como se describe y/o ejemplifica en el presente documento, las células (por ejemplo, MPC) que expresan STRO-2 y/o STRO-3 (TNAP) y/o STRO-4 y/o VCAM-1 y/o CD146 y/o 3G5 también expresan STRO-1 (y pueden ser STRO-1^{bright}). En consecuencia, una indicación de que las células son STRO-1$^+$ no significa que las células son seleccionadas por expresión de STRO-1. En un ejemplo, las células se seleccionan según al menos expresión de STRO-3, por ejemplo, son STRO-3$^+$ (TNAP$^+$).

La referencia a selección de una célula o población de las mismas no necesariamente requiere selección de una fuente de tejido específica. Como se describe en el presente documento, las células STRO-1$^+$ se pueden seleccionar o aislar

o enriquecer a partir de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos proporcionan apoyo para la selección a partir de cualquier tejido que comprende células STRO-1^+ (por ejemplo, MPC) o tejido vascularizado o tejido que comprende pericitos (por ejemplo, pericitos de STRO-1^+) o uno o más cualquiera de los tejidos indicados en el presente documento.

En un ejemplo, las células utilizadas en el presente documento expresan uno o más marcadores individual o colectivamente seleccionados de entre el grupo que consiste en $TNAP^+$, VCAM-1^+, THY-1^+, STRO-2^+, STRO-4^+ (HSP-90β), $CD45^+$, $CD146^+$, $3G5^+$ o cualquier combinación de los mismos.

Se entenderá que el término "individualmente" se refiere a que la descripción engloba los marcadores o grupos de marcadores indicados por separado, y que, a pesar de que los marcadores individuales o grupos de marcadores pueden no estar mencionados por separado en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dicho marcador o grupos de marcadores por separado y divisiblemente entre sí.

Se entenderá que el término "colectivamente" se refiere a que la descripción engloba cualquier cantidad o combinación de los marcadores o grupos de péptidos indicados, y que, a pesar de que dichas cantidades y combinaciones de marcadores o grupos de marcadores pueden no estar mencionados específicamente en el presente documento, las reivindicaciones que lo acompañan pueden definir dichas combinaciones o subcombinaciones por separado y divisiblemente respecto de cualquier otra combinación de marcadores o grupos de marcadores.

Por ejemplo, las células STRO-1^+ son STRO-1^{bright} (*sin.* STRO-1^{bri}). En un ejemplo, las células Stro-1^{bri} son preferentemente enriquecidas respecto de las células STRO-1^{dim} o STRO-$1^{intermediate}$.

Por ejemplo, las células STRO-1^{bright} son adicionalmente una o más de las siguientes: $TNAP^+$, VCAM-1^+, THY-1^+, STRO-2^+, STRO-4^+ (HSP-90β) a $^+$. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o muestran expresión de uno o más de los marcadores anteriores. En este sentido, una célula que muestra expresión de un marcador no necesita ser específicamente analizada, más bien, se pueden analizar las células previamente enriquecidas o aisladas, y se puede asumir razonablemente que las células posteriormente utilizadas, aisladas o enriquecidas también expresan el mismo marcador.

En un ejemplo, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares tal y como se definen en la publicación internacional WO 2004/85630. Por ejemplo, las células precursoras mesenquimales expresan un marcador de una célula perivascular, por ejemplo, las células son STRO-1^+ o STRO-1^{bright} y/o $3G5^+$. En un ejemplo, las células son o eran previamente o son progenie de células que se aislaron a partir de tejido u órganos vascularizados o partes de los mismos.

Cuando se hace referencia a una célula como "positiva" para un marcador dado, puede ser que tenga una expresión baja (lo o dim) o alta (bright, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro marcador usado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre lo (o dim o dull) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que se está clasificando. Una célula a la que se hace referencia como "negativa" para un marcador dado no necesariamente implica que la misma esté completamente libre del mismo. Este término significa que el marcador está expresado a un nivel relativamente muy bajo por dicha célula, y que genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable o es indetectable por encima de niveles de base, por ejemplo, niveles detectados utilizando un anticuerpo de control de isotipo.

El término "bright", cuando se usa en el presente documento, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca de manera detectable. Sin restringirse a consideraciones teóricas, se propone que las células "bright" expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{bri} producen una mayor señal de fluorescencia cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, como se determina por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), que las células no bright (STRO-$1^{dull/dim}$). En un ejemplo, las células "bright" constituyen al menos alrededor del 0,1 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células "bright" constituyen al menos alrededor del 0,1 %, al menos alrededor del 0,5 %, al menos alrededor del 1 %, al menos alrededor del 1,5 % o al menos alrededor del 2 % de las células mononucleares de médula ósea más fuertemente marcadas contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo, las células STRO-1^{bright} tienen una expresión 2 logaritmos de magnitud más alta de expresión superficial de STRO-1 en relación con la "base", es decir, células STRO-1^-. En comparación, las células intermedias STRO-1^{dim} y/o STRO-$1^{intermediate}$ tienen una expresión de menos de 2 logaritmos de magnitud más alta de expresión superficial de STRO-1, generalmente de aproximadamente 1 logaritmo o menos que la "base".

Tal como se usa en el presente documento, el término "TNAP" pretende englobar todas las isoformas de fosfatasa alcalina no específica de tejido. Por ejemplo, el término abarca la isoforma hepática (LAP), la isoforma ósea (BAP) y la isoforma renal (KAP). En un ejemplo, la TNAP es BAP. En un ejemplo, la TNAP como se usa en el presente documento hace referencia a una molécula que puede unirse al anticuerpo STRO-3 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC el 19 de diciembre de 2005 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, con número de acceso al depósito PTA-7282.

Asimismo, en un ejemplo, las células STRO-1$^+$ son capaces de dar origen a UFC-F clonogénicas.

En un ejemplo, una proporción significativa de las células multipotenciales STRO-1$^+$ es capaz de diferenciarse en al menos dos líneas germinales distintas. Los ejemplos no limitantes de los linajes con los que pueden estar comprometidas las células multipotenciales incluyen células precursoras óseas; progenitores hepatocíticos, que son multipotentes para células epiteliales de conducto biliar y hepatocitos; células restringidas neurales, que pueden generar precursores de células gliales que evolucionan hasta oligodendrocitos y astrocitos; precursores neuronales que evolucionan hasta neuronas; precursores para músculo cardíaco y cardiomiocitos y líneas celulares beta pancreáticas secretoras de insulina sensibles a glucosa. Otros linajes incluyen, pero sin limitación, odontoblastos, células productoras de dentina y condrocitos y células precursoras de las siguientes: células epiteliales de pigmento retinal, fibroblastos, células cutáneas tales como queratinocitos, células dendríticas, células de folículo piloso, células epiteliales de conducto renal, células de músculo liso y esquelético, progenitores testiculares, células endoteliales vasculares, tendón, ligamento, cartílago, adipocito, fibroblasto, estroma medular, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético, pericito, células vasculares, epiteliales, gliales, neuronales, astrocíticas y oligodendrocíticas.

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

En un ejemplo, las células se extraen del sujeto que va a tratarse, cultivadas *in vitro* utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener sobrenadante o factores solubles o células expandidas para administrar al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otro ejemplo útil de la descripción, se usan células de un animal no humano (o, si el paciente no es un humano, de otra especie).

La presente descripción también contempla el uso de sobrenadante o factores solubles obtenidos o derivados de células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie (estas últimas también denominadas células expandidas) que se producen a partir de cultivo *in vitro*. Las células expandidas de la descripción pueden tener una amplia variedad de fenotipos dependiendo de las condiciones de cultivo (incluyendo el número y/o tipo de factores estimulantes en el medio de cultivo), el número de pases y similares. En ciertos ejemplos, las células de progenie se obtienen después de alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9 o alrededor de 10 pases de la población parental. No obstante, las células de progenie se pueden obtener después de cualquier número de pases de la población parental.

Las células de progenie se pueden obtener cultivando en cualquier medio adecuado. El término "medio", como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una combinación de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquido, así como también medios que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que se exponen las células que crecen en una placa de petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también hace referencia al material cuya utilización se pretende en un cultivo celular, incluso si aún no ha estado en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que, cuando se mezcla con agua u otro líquido, se vuelve adecuado para cultivo celular se puede denominar un "medio en polvo".

En un ejemplo, las células de progenie útiles para los procedimientos de la descripción se obtienen aislando células TNAP$^+$ STRO-1$^+$ a partir de médula ósea utilizando perlas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y a continuación expandiendo las células aisladas mediante cultivo (véase Gronthos y otros, Blood 85: 929-940, 1995 para obtener un ejemplo de las condiciones de cultivo adecuadas).

En un ejemplo, dichas células expandidas (progenie) (por ejemplo, después de al menos 5 pases) pueden ser TNAP$^-$, CC9$^+$, HLA class I$^+$, HLA class II$^-$, CD14$^-$, CD19$^-$, CD3$^-$, CD11a-c$^-$, CD31$^-$, CD86$^-$, CD34$^-$ y/o CD80$^-$. No obstante, es posible que la expresión de distintos marcadores pueda variar en condiciones de cultivo distintas a las descritas en el presente documento. También, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población de células expandida, no significa que no haya una proporción minoritaria de las células que no tengan este fenotipo o fenotipos (por ejemplo, un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9$^-$). En un ejemplo, las células expandidas siguen poseyendo la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células.

En un ejemplo, una población de células expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células propiamente dichas comprende células donde al menos el 25 %, *por ejemplo*, al menos el 50 %, de las células son $CC9^+$.

En otro ejemplo, una población de células expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células propiamente dichas comprende células donde al menos el 40 %, *por ejemplo*, al menos el 45 %, de las células son STRO-1^+.

En un ejemplo adicional, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectiva o individualmente de entre el grupo consistente en: LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, leptina-R (STRO-2 = leptina-R), RANKL, STRO-4 (HSP-90β), STRO-1^{bright} y CD146 o cualquier combinación de estos marcadores.

En un ejemplo, las células de progenie son progenie de células multipotenciales STRO-1^+ expandidas multipotenciales (MEMP) tal como se definen y/o describen en la publicación internacional WO 2006/032092. Los procedimientos para la preparación de poblaciones enriquecidas de células multipotenciales STRO-1^+ de las que puede derivarse la progenie se describen en el documento WO 01/04268 y WO 2004/085630. En un contexto *in vitro* las células multipotenciales STRO-1^+ raramente estarán presentes como una preparación absolutamente pura y, por lo general, estarán presentes con otras células que son células comprometidas específicas de tejido (TSCC, por sus siglas en inglés). El documento WO 01/04268 hace referencia a la recolección de dichas células de la médula ósea en niveles de pureza de alrededor de entre un 0,1 % y un 90 %. La población que comprende MPC de las cuales se deriva la progenie se puede recolectar directamente de una fuente de tejido o alternativamente puede ser una población que ya se ha expandido *ex vivo.*

Por ejemplo, la progenie se puede obtener de una población de células multipotenciales STRO-1^+ sustancialmente purificada recolectada, no expandida, que comprende al menos alrededor de 0,1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 95 % de células totales de la población en la cual están presentes. Este nivel se puede lograr, por ejemplo, seleccionando células que son positivas para al menos un marcador seleccionado individual o colectivamente de entre el grupo que consiste en TNAP, STRO-4 (HSP-90β), STRO-1^{bright}, $3G5^+$, VCAM-1, THY-1, CD146 y STRO-2.

Las MEMP se pueden distinguir de células multipotenciales STRO-1^+ recién recolectadas por ser positivas para el marcador STRO-1^{bri} y negativas para el marcador fosfatasa alcalina (ALP). En cambio, las células multipotenciales STRO-1^+ recién aisladas son positivas para STRO-1^{bri} y ALP. En un ejemplo de la presente descripción, al menos el 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de las células administradas tienen el fenotipo STRO-1^{bri}, ALP^-. En un ejemplo adicional, las MEMP son positivas para uno o más de los marcadores Ki67, CD44 y/o CD49c/CD29, VLA-3, α3β1. En aun otro ejemplo, las MEMP no presentan actividad TERT y/o son negativas para el marcador CD18.

La población inicial de células STRO-1^+ puede derivarse de cualquiera o más de un tipo de tejidos de aquellos descritos en los documentos WO 01/04268 o WO 2004/085630, es decir, médula ósea, células de la pulpa dental, tejido adiposo y piel, o tal vez de manera más amplia del tejido adiposo, dientes, pulpa dental, piel, hígado, riñón, corazón, retina, cerebro, folículos pilosos, intestino, pulmón, bazo, ganglio linfático, timo, páncreas, hueso, ligamento, médula ósea, tendón y músculo esquelético.

Se entenderá que al llevar a la práctica los procedimientos descritos en la presente descripción, la separación de las células que poseen cualquier marcador superficial de célula dado se puede efectuar a través de una serie de procedimientos diferentes, sin embargo, algunos de los procedimientos preferidos se basan en la unión de un agente de unión (por ejemplo, un fragmento de unión a anticuerpo o antígeno del mismo) al marcador en cuestión seguido de una separación de los que presentan unión, ya sea unión de alto nivel o unión de bajo nivel o ausencia de unión. Los agentes de unión más convenientes son anticuerpos o moléculas basadas en anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o basados en anticuerpos monoclonales (por ejemplo, proteínas que comprenden fragmentos de unión a antígeno de los mismos) debido a la especificidad de estos últimos agentes. Se pueden utilizar anticuerpos para ambas etapas, sin embargo, también se podrían utilizar otros agentes, por lo tanto, también se pueden emplear ligandos para estos marcadores para enriquecer las células que los poseen o que carecen de estos.

Los anticuerpos o ligandos pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. En algunos ejemplos, las técnicas de separación maximizan la retención de viabilidad de la fracción que se ha de recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir,

pero sin limitación, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e "inmunopurificación" con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, entre otros, la FACS. Los procedimientos para llevar a cabo FACS serán evidentes para los expertos en la materia.

Los anticuerpos contra cada uno de los marcadores descritos en el presente documento están disponibles en el mercado (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales contra STRO-1 se pueden conseguir en R&D Systems, EE. UU.), se pueden conseguir en ATCC u otra organización depositaria y/o se pueden producir utilizando técnicas reconocidas en la materia.

En un ejemplo, el procedimiento para aislar células STRO-1$^+$ comprende una primera etapa de clasificación en fase sólida utilizando, por ejemplo, clasificación celular activada magnéticamente (MACS) que reconoce expresión de alto nivel de STRO-1. Entonces, es posible seguir con una segunda etapa de clasificación, en caso de así desearlo, que dé como resultado un nivel más alto de una expresión de célula precursora, tal como se describe en la especificación de la patente WO 01/14268. Esta segunda etapa de clasificación podría comprender el uso de dos o más marcadores.

El procedimiento para obtener células STRO-1$^+$ también podría incluir la recolección de una fuente de las células antes de la primera etapa de enriquecimiento utilizando técnicas conocidas. Por ende, el tejido se retirará quirúrgicamente. Entonces, se separarán las células que comprenden el tejido fuente en lo que se denomina suspensión celular simple. Esta separación puede conseguirse por medios físicos y/o enzimáticos.

Una vez obtenida una población de células STRO-1$^+$ adecuada, se puede cultivar o expandir a través de cualquier medio adecuado para obtener MEMP.

En un ejemplo, las células se extraen del sujeto que va a tratarse, cultivadas *in vitro* utilizando técnicas estándar y se utilizan para obtener sobrenadante o factores solubles o células expandidas para administrar al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas para obtener el sobrenadante o factores solubles. En otro ejemplo útil de la descripción, se usan células de un animal no humano (o, si el paciente no es un humano, de otra especie) para obtener factores sobrenadantes o solubles.

Los procedimientos y usos de la presente descripción se pueden llevar a la práctica utilizando células de cualquier especie animal no humana, incluyendo, sin carácter restrictivo, células de primate no humano, células de ungulados, caninas, felinas, de lagomorfos, de roedores, aviares y de peces. Las células de primates con las que puede llevarse a cabo la descripción incluyen, entre otras, las células de chimpancés, babuinos, monos cangrejeros y cualquier mono del Nuevo o el Viejo Mundo. Las células de ungulados con las que puede llevarse a cabo la descripción incluyen, entre otras, las células de bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos y bisontes. Las células de roedores con las que puede llevarse a cabo la descripción incluyen, entre otras, las de ratones, ratas, conejillos de indias, hámsters y jerbos. Los ejemplos de especies de lagomorfos con los que puede llevarse a cabo la descripción incluyen conejos domesticados, salvajes, liebres, conejos de rabo blanco, liebres americanas y ochotonas. Los pollos (*Gallus gallus*) constituyen un ejemplo de especie aviar con la que puede llevarse a cabo la descripción.

En un ejemplo, las células son células humanas.

Las células útiles para los procedimientos de la descripción se pueden almacenar antes de su uso o antes de obtener el sobrenadante o los factores solubles. Los procedimientos y protocolos para preservar y almacenar células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pollard, J. W. y Walker, J. M. (1997) Basic Cell Culture Protocols, segunda edición, Humana Press, Totowa, N.J.; Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells, cuarta edición, Wiley-Liss, Hoboken, N.J.). Cualquier procedimiento que mantiene la actividad biológica de las células madre aisladas tales como células madre/progenitoras mesenquimales, o su progenie, se puede utilizar en relación con la presente descripción. En un ejemplo, las células se mantienen y almacenan utilizando criopreservación.

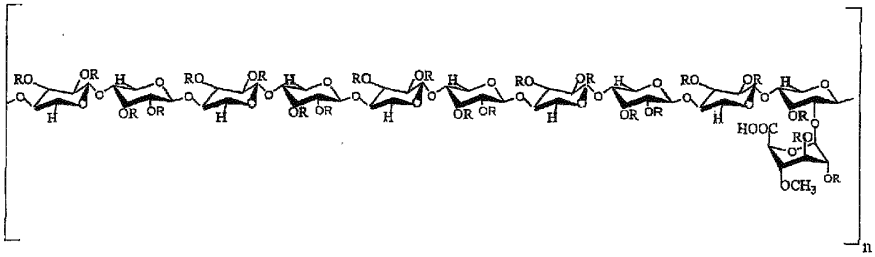
Polisacáridos polisulfatados

Los polisacáridos polisulfatados pueden ser cualquier polisacárido polisulfatado de origen natural o semisintético/sintético o un fragmento biológicamente activo del mismo que contenga dos o más anillos de azúcar o estructuras de carbohidratos a los que uno o más grupos éster sulfato se unen covalentemente, como ejemplifica el polisulfato de heparina y pentosano.

En un ejemplo, las células STRO-1$^+$ y/o su progenie y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran en combinación con un polisacárido polisulfatado.

En otro ejemplo, el polisacárido polisulfatado es polisulfato de pentosano (PPS, por sus siglas en inglés) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En un ejemplo, el PPS se aísla a partir de hemicelulosa de haya (*Fagus silvatica*) con una estructura principal lineal de xilano (pentosano) de polisulfato de pentosano que contiene, de media, una cadena lateral de 4-O-metil-glucuronato unida a la posición 2 en cada décimo anillo de xilosa (pentosa). Por ejemplo, el polisulfato de pentosano y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo tienen la siguiente estructura:



En un ejemplo, los iones complejantes particulares (para producir la sal de PPS) se pueden seleccionar de entre el grupo que consiste en los metales alcalinos, por ejemplo, Na^+ y K+, metales alcalinotérreos, por ejemplo, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, así como Ag^+, Au^+, Pb^{2+}, Cu^{2+}, Au^{2+}, Pd^{2+}, Pd^{4+}, Pt^{4+}, Pt^{2+}, iones metálicos trivalentes y complejos de compuestos de amonio cuaternario. Algunos ejemplos de estos últimos compuestos son cloruro de piridinio, cloruro de tetraalquilamonio, cloruro de colina, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de N-cetil-N, N, N-trialquilamonio o sus derivados.

Por ejemplo, el ion complejante es sodio, es decir, el PPS es NaPPS. Por ejemplo, el NaPPS es SP54, fabricado por Bene Pharmachem, Alemania.

En un ejemplo, el PPS mejora la viabilidad de las células progenitoras, mejora la crioconservación de las células progenitoras, regula la proliferación de células progenitoras y/o regula la diferenciación de las células progenitoras.

Células genéticamente modificadas

En un ejemplo, las células madre y/o células de su progenie están genéticamente modificadas, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés. Por ejemplo, las células están diseñadas para expresar una proteína útil en el tratamiento de la disfunción endotelial, por ejemplo, angiopoyetina I u óxido nítrico sintasa (por ejemplo, eNOS o iNOS).

Los procedimientos para modificar genéticamente una célula serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, un ácido nucleico que se ha de expresar en una célula está operativamente ligado a un promotor para inducir expresión en la célula. Por ejemplo, el ácido nucleico se une a un promotor operativo en una serie de células de un sujeto, tal como, por ejemplo, un promotor viral, por ejemplo, un promotor de CMV (por ejemplo, un promotor de CMV-IE) o un promotor SV-40. En la técnica se conocen otros promotores adecuados y se entenderá que se aplican *mutatis mutandis* al presente ejemplo de la descripción.

En un ejemplo, el ácido nucleico se proporciona en forma de un constructo de expresión. Tal como se usa en el presente documento, el término "constructo de expresión" se refiere a un ácido nucleico que tiene la capacidad de otorgar expresión en un ácido nucleico (por ejemplo, un gen reportero y/o un gen reportero contra-seleccionable) al cual está operativamente conectado, en una célula. Dentro del contexto de la presente descripción, se ha de entender que un constructo de expresión puede comprender o ser un plásmido, bacteriófago, fagémido, cósmido, fragmento subgenómico o genómico de virus, u otro ácido nucleico capaz de mantener y/o replicar ADN heterólogo en un formato expresable.

Los procedimientos para la construcción de un constructo de expresión adecuado para el funcionamiento de la descripción serán evidentes para el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Ausubel y otros (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987) o Sambrook y otros (En: Molecular Cloning: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, tercera edición 2001). Por ejemplo, cada uno de los componentes del constructo de expresión se amplifica a partir de un ácido nucleico plantilla adecuado utilizando, por ejemplo, PCR y posteriormente se clona en un constructo de expresión adecuado, tal como, por ejemplo, un plásmido o un fagémido.

Los vectores adecuados para dicho constructo de expresión son conocidos en la técnica y/o se describen en el presente documento. Por ejemplo, un vector de expresión adecuado para el procedimiento de la presente descripción en una célula de mamífero, por ejemplo, un vector del conjunto de vectores pcADN suministrado por Invitrogen, un vector del conjunto de vectores pCI (Promega), un vector del conjunto de vectores pCMV (Clontech), un vector pM (Clontech), un vector pSI (Promega), un vector VP 16 (Clontech) o un vector del conjunto de vectores pcADN (Invitrogen).

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

Los medios para introducir la molécula de ácido nucleico aislada o un constructo génico que comprenda la misma en una célula para la expresión son conocidos por los expertos en la materia. La técnica utilizada para un organismo dado dependerá de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en células incluyen microinyección, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas utilizando, por ejemplo, lipofectamina (Gibco, MD, EE. UU.) y/o cellfectin (Gibco, MD, EE. UU.), captación de ADN mediada por PEG, electroporación y bombardeo de micropartículas utilizando, por ejemplo, tungsteno recubierto por ADN o partículas de oro (Agracetus Inc., WI, EE. UU.) entre otros.

Como alternativa, un constructo de expresión de la descripción es un vector viral. Los vectores virales adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los sistemas convencionales basados en virales para el suministro de un ácido nucleico e integración del mismo en un genoma de células huésped incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector viral adenoasociado. De manera alternativa, un vector adenoviral se utiliza para la introducción de un ácido nucleico que permanece episomal hacia dentro de una célula huésped. Los vectores virales constituyen un procedimiento eficiente y versátil para la transferencia de genes en las células y tejidos meta. De manera adicional, se han observado las eficiencias de alta transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

Por ejemplo, un vector retroviral por lo general comprende repeticiones terminales largas (RTL) que actúan en cis con capacidad de empaquetado para como máximo 6-10 kb de secuencia extraña. Las RTL que actúan en cis mínimas son suficientes para replicar y empaquetar un vector, que luego se utiliza para integrar el constructo de expresión en la célula diana para proporcionar expresión a largo plazo. Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia murina (VLMu), el virus de la leucemia de monos gibones (VLMG), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y combinaciones de las mismas (véase, por ejemplo, Buchscher y otros, J Virol. 56:2731-2739 (1992); Johann y otros, J. Virol. 65:1635-1640 (1992); Sommerfelt y otros, Virol. 76:58-59 (1990); Wilson y otros, J. Virol. 63:274-2318 (1989); Miller y otros, J. Virol. 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700; Miller y Rosman BioTechniques 7:980-990, 1989; Miller, A. D. Human Gene Therapy 7:5-14, 1990; Scarpa y otros, Virology 75:849-852, 1991; Burns y otros, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:8033-8037, 1993).

También se han desarrollado diversos sistemas de vectores de virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) para administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses número 5,173,414 y 5,139,941; las publicaciones internacionales número WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski y otros, Molec. Cell. Biol. 5:3988-3996, 1988; Vincent y otros (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter Current Opinion in Biotechnology 5:533-539, 1992; Muzyczka. Current Topics in Microbiol, and Immunol. 158:91-129, 1992; Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801, 1994; Shelling and Smith Gene Therapy 7:165-169, 1994; y Zhou y otros, J Exp. Med. 179:1867-1875, 1994.

Los vectores virales adicionales útiles para administrar un constructo de expresión de la descripción incluyen, por ejemplo, los derivados de la familia de los poxvirus, tal como virus vacuna y poxvirus aviar o un alfavirus o un vector de virus conjugado (por ejemplo, el descrito en Fisher-Hoch y otros, Proc. Natl Acad. Sci. USA 56:317-321, 1989).

Análisis del potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles

Diversos modelos para estudiar la función/disfunción endotelial se conocen en la técnica. Los modelos *in vitro* ejemplares incluyen:

- El cultivo de células endoteliales en un medio con alto contenido de glucosa, que provoca la supresión de la proliferación, el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión y el aumento de la apoptosis; y

- Un cultivo de órganos de la arteria mesentérica, por ejemplo, tal como se describe en Alm y otros, BMC Cardiovascular Disorders, 2: 8, 2002

Los modelos *in vivo* de función/disfunción endotelial incluyen:

- Un modelo murino de hiperhomocistinemia tal como se describe en Eberhardt y otros, J Clin Invest 106: 483-491, 2000;

- Un modelo de hipertensión en ratas producido mediante técnicas de goldblatt, como el modelo 2 riñones, 1 clip y el modelo 1 riñón, 1 clip, de los que se ha demostrado que aumentan la presión arterial, la resistencia periférica total (RPT) y disminuyen la relajación dependiente del endotelio a la acetilcolina (Ach) (Share y otros, Clin. Exp. Hypertens., 4: 1261-1270, 2982; Sventek y otros, Hypertensive, 27: 49-55, 1996).

- La uninefrectomía en roedores seguida de la administración de sal de DOCA (40 mg kg-1, por vía subcutánea) en aceite de oliva junto con NaCl al 1 % y KCl al 0,5 % dos veces por semana durante 6 semanas ha producido disfunción endotelial vascular (Shah y Singh, Naun. Schmie. Arch. Pharmacol., 373: 221-229, 2006).

- Se ha demostrado que el tratamiento de roedores con L-NAME (un inhibidor de la eNOS) (50 mg kg-1 día-1) durante 6 semanas aumenta la presión arterial y reduce la relajación dependiente del endotelio en ratas (Kung y otros, Hypertensive, 26: 744-751, 1995).

- Se ha observado que la infusión de angiotensina-II (0,7 mg kg-1 día-1) en roedores durante 5 días aumenta la presión arterial sistólica y la generación de aniones superóxido y causa un deterioro de la relajación inducida por Ach (Rajagopalan y otros, J. Clin. Invest., 97: 1916-1923, 1996).

- Se ha demostrado que la administración crónica de etinilestradiol (1,5 mg kg-1 día-1) a roedores aumenta la presión arterial y, por lo tanto, reduce la relajación dependiente del endotelio (Thakre y otros, Ind. J. Pharmacol., 32: 15-20, 2000).

- Se ha demostrado que los roedores alimentados con una dieta moderadamente alta en grasas durante 10 semanas desarrollan una disfunción endotelial vascular caracterizada por hipertensión, aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y peroxidación de lípidos (Dobrian y otros, Hypertensive, 37: 554-560, 2001).

- La administración de estreptozotocina (55 mg kg-1, una vez por vía intraperitoneal) en ratas produjo diabetes y, por lo tanto, indujo disfunción endotelial vascular (Shah y Singh, Mol. Cell. Biochem., 283: 191-199, 2006).

Modelos adicionales de disfunción endotelial se describen, por ejemplo, en Balakumar y otros, Trends in Medical Research, 2: 12-20, 2007.

Composiciones celulares

En un ejemplo de la presente descripción se administran células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie en forma de una composición. Por ejemplo, dicha composición comprende un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los términos "vehículo" y "excipiente" se refieren a composiciones de materia que son convencionalmente utilizadas en la técnica para facilitar el almacenamiento, administración y/o la actividad biológica de un compuesto activo (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., Mac Publishing Company (1980)). Un vehículo también puede reducir cualquier efecto secundario no deseado del compuesto activo. Un vehículo adecuado es, por ejemplo, estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros ingredientes en el vehículo. En un ejemplo, el vehículo no produce efectos adversos locales o sistémicos significativos en receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas para tratamiento.

Los vehículos adecuados para la presente descripción incluyen los convencionalmente utilizados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, lactosa, disolución de Ringer, una disolución tamponada, hialurano y glicoles, que son vehículos líquidos ejemplares, en particular (cuando son isotónicos) para disoluciones. Los vehículos y excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, celulosa, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares.

En otro ejemplo, un vehículo es una composición de medio, por ejemplo, en la cual una célula se cultiva o se pone en suspensión. Por ejemplo, dicha composición de medio no induce ningún efecto adverso en un sujeto a quien se le administra.

Los vehículos y excipientes ejemplares no afectan de manera adversa la viabilidad de una célula y/o la capacidad de una célula para reducir, prevenir o retrasar una enfermedad articular inflamatoria.

En un ejemplo, el vehículo o excipiente proporciona una actividad de tampón para mantener las células y/o los factores solubles con un pH adecuado para, de este modo, llevar a cabo una actividad biológica, por ejemplo, el vehículo o excipiente es tampón fosfato salino (PBS). El PBS representa un vehículo o excipiente atractivo puesto que interactúa mínimamente con células y factores y permite la liberación rápida de las células y factores, en cuyo caso, la composición de la descripción se puede producir como un líquido para aplicación directa en el flujo sanguíneo o en un tejido o una región que rodea o es adyacente a un tejido, por ejemplo, mediante inyección.

Las células STRO-1^+ y/o células de su progenie también se pueden incorporar o incrustar en andamios que sean compatibles con el receptor y que se degraden en productos que no sean dañinos para el receptor. Estos andamios proporcionan soporte y protección para las células que se han de trasplantar en los sujetos receptores. Los andamios biodegradables naturales y/o sintéticos son ejemplos de dichos andamios.

En la práctica de la descripción se puede utilizar con éxito una variedad de distintos andamios. Los andamios ejemplares incluyen, sin carácter restrictivo, andamios biológicos, degradables. Los andamios biodegradables naturales incluyen colágeno, fibronectina y andamios de laminina. Un material sintético adecuado para un andamio de trasplante celular debería ser capaz de soportar crecimiento celular y función celular importantes. Dichos andamios también pueden ser reabsorbibles. Entre los andamios adecuados se incluyen andamios de ácido poliglicólico, por ejemplo, como describen Vacanti y otros, J. Ped. Surg. 23:3-9 1988; Cima, y otros Biotechnol. Bioeng. 38:145 1991; Vacanti, y otros, Plast. Reconstr. Surg. 88:753-9 1991; o polímeros sintéticos tales como polianhídridos, poliortoésteres y ácido poliláctico.

En otro ejemplo, las células se pueden administrar en un andamio de gel (tal como Gelfoam de Upjohn Company).

Las composiciones celulares útiles para los procedimientos descritos en el presente documento pueden administrarse solas o como mezclas con otras células. Las células que pueden administrarse junto con las composiciones de la presente descripción incluyen, sin carácter restrictivo, otras células multipotentes o pluripotentes o células madre o células de médula ósea. Pueden mezclarse células de diferentes tipos con una composición de la descripción inmediatamente o poco antes de la administración, o pueden cocultivarse conjuntamente durante un periodo de tiempo antes de la administración.

En un ejemplo, la composición comprende una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de células. Por ejemplo, la composición comprende entre aproximadamente 1 x 10^5 células STRO-1^+/kg y aproximadamente 1 x 10^7 células STRO-1^+/kg o entre aproximadamente 1 x 10^6 células STRO-1^+/kg y aproximadamente 5 x 10^6 células STRO-1^+/kg. La cantidad exacta de células que se administrará depende de una variedad de factores que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, así como la extensión y gravedad de la enfermedad articular inflamatoria.

En un ejemplo, al sujeto se le administra una dosis baja de células. Las dosificaciones ejemplares incluyen entre aproximadamente 0,1 x 10^4 y aproximadamente 0,5 x 10^6 células por kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 x 10^5 y aproximadamente 0,5 x 10^6 células por kg, tal como, entre aproximadamente 0,5 x 10^5 y aproximadamente 0,5 x 10^6 células por kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 x 10^6 y aproximadamente 0,5 x 10^6 células por kg, por ejemplo, aproximadamente 0,2 x 10^6 o 0,3 x 10^6 o 0,4 x 10^6 células por kg.

En un ejemplo, al sujeto se le administra una dosis alta de células. Las dosis ejemplares incluyen al menos aproximadamente 1,5 x 10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende entre aproximadamente 1,5 x 10^6 y aproximadamente 6 x 10^6 células/kg, como por ejemplo entre aproximadamente 1,5 x 10^6 y aproximadamente 5 x 10^6 células/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 1,5 x 10^6 y aproximadamente 4 x 10^6 células/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 1,5 x 10^6 y aproximadamente 3 x 10^6 células/kg. Por ejemplo, una dosis alta comprende aproximadamente 1,5 x 10^6 o aproximadamente 2 x 10^6 células/kg.

En un ejemplo, las células se administran como una dosis consistente en un número total de células, independientemente del peso del paciente.

Por ejemplo, en un ejemplo, las células se administran en una dosis de entre aproximadamente 100 millones y 300 millones de células, independientemente del peso del paciente.

Por ejemplo, en un ejemplo, las células se administran en una dosis de entre aproximadamente 100 millones y 200 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células se administran en una dosis de aproximadamente 100 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células se administran en una dosis de aproximadamente 150 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células se administran en una dosis de aproximadamente 200 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En un ejemplo, las células se administran en una dosis de aproximadamente 300 millones de células, independientemente del peso del paciente.

En algunos ejemplos, las células están contenidas dentro de una cámara que no permite que las células salgan a la circulación del sujeto, aunque permite que los factores secretados por las células entren en la circulación. De esta manera, los factores solubles se pueden administrar a un sujeto permitiendo que las células secreten los factores en la circulación del sujeto. Dicha cámara se puede implantar de igual manera en un sitio de un sujeto para aumentar los niveles locales de los factores solubles, por ejemplo, se puede implantar en o cerca del páncreas.

En algunos ejemplos de la descripción, puede no ser necesario o deseable inmunosuprimir con composiciones celulares a un paciente antes del inicio de la terapia. Por consiguiente, el trasplante con células STRO-1$^+$ alogénicas, o incluso xenogénicas, o su progenie puede tolerarse en algunos casos.

Sin embargo, en otros casos, puede ser deseable o apropiado inmunosuprimir farmacológicamente a un paciente antes de iniciar una terapia celular y/o reducir una respuesta inmune de un sujeto contra la composición celular. Esto puede lograrse mediante el uso de agentes inmunosupresores sistémicos o locales, o puede lograrse suministrando las células en un dispositivo encapsulado. Las células pueden encapsularse en una cápsula que sea permeable a los nutrientes y oxígeno requeridos por la célula y a factores terapéuticos, pero la célula es impermeable a factores humorales inmunitarios y células. Por ejemplo, el encapsulante es hipoalergénico, se sitúa de manera sencilla y estable en un tejido diana y proporciona una protección añadida a la estructura implantada. Estos y otros medios para reducir o eliminar una respuesta inmune a las células trasplantadas son conocidos en la técnica. Como alternativa, es posible modificar genéticamente las células para reducir su inmunogenicidad.

Composiciones de factores solubles

En un ejemplo de la presente descripción, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$ y/o derivados de células de su progenie se administran en forma de una composición, por ejemplo, que comprende un vehículo y/o excipiente adecuado. Por ejemplo, el vehículo o excipiente no afecta de manera adversa el efecto biológico de los factores solubles o sobrenadante.

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

Las composiciones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$ y/o derivados de células de su progenie se pueden preparar como suspensiones líquidas apropiadas, por ejemplo, en medio de cultivo o en un vehículo estable o una disolución tamponada, por ejemplo, tampón fosfato salino. Los vehículos adecuados se describen anteriormente en el presente documento. En otro ejemplo, las suspensiones que comprenden sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$ y/o derivados de células de su progenie son suspensiones oleosas inyectables. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo; o ésteres de ácido graso sintético tales como oleato de etilo o triglicéridos; o liposomas. Las suspensiones que se usan para inyección pueden contener también sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

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

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el sobrenadante o factores solubles a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de

preparación ejemplares son secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente esterilizada por filtración. Según un aspecto alternativo de la descripción, el sobrenadante o factores solubles pueden formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

Otros vehículos o excipientes ejemplares se describen, por ejemplo, en Hardman y otros (2001) Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N. Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N. Y.; Avis y otros (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman y otros (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman y otros (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y.

Las composiciones terapéuticas deberían ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de disolución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los factores solubles pueden administrarse en una formulación de liberación retardada, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico-poliglicólico (PLG). Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia.

El sobrenadante o factores solubles se pueden administrar en combinación con una matriz apropiada, por ejemplo, para proporcionar liberación lenta de los factores solubles.

Componentes adicionales de las composiciones

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se pueden administrar con otros fármacos o moléculas biológicas beneficiosos (factores de crecimiento, factores tróficos). Cuando se administran con otros agentes, pueden administrarse conjuntamente en una sola composición farmacéutica, o en composiciones farmacéuticas separadas, simultánea o secuencialmente con los otros agentes (antes o después de la administración de los otros agentes). Los factores bioactivos que pueden coadministrarse incluyen agentes antiapoptóticos (por ejemplo, EPO, mimeticuerpos de EPO, TPO, IGF-I e IGF-II, HGF, inhibidores de caspasa); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de p38 MAPK, inhibidores de TGF-beta, estatinas, inhibidores de IL-6 e IL-1, PEMIROLAST, TRANILAST, REMICADE, SIROLIMÚS y AINE (fármacos antiinflamatorios no esteroideos; por ejemplo, TEPOXALINA, TOLMETINA, SUPROFENO); agentes inmunosupresores/inmunomoduladores (por ejemplo, inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina, tacrolimús; inhibidores de mTOR (por ejemplo, SIROLIMÚS, EVEROLIMÚS); antiproliferativos (por ejemplo, azatioprina, micofenolato de mofetilo); corticosteroides (por ejemplo, prednisolona, hidrocortisona); anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor IL-2Ralfa (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), anticuerpos policlonales anti-linfocitos T (por ejemplo, anti-globulina de timocito (ATG); anti-globulina de linfocito (ALG); anticuerpo monoclonal anti-linfocitos T OKT3)); agentes antitrombogénicos (por ejemplo, heparina, derivados de heparina, urocinasa, PPack (dextrofenilalanina, prolina, arginina, clorometilcetona), compuestos antitrombina, antagonistas de receptor de plaquetas, anticuerpos anti-trombina, anticuerpos anti-receptor de plaquetas, aspirina, dipiridamol, protamina, hirudina, inhibidores de prostaglandina e inhibidores de plaquetas); y antioxidantes (por ejemplo, probucol, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q-10, glutation, L-cisteína, N-acetilcisteína) así como anestésicos locales.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$ o su progenie, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran con un compuesto útil para el tratamiento de la disfunción endotelial, tal como un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, activadores del receptor activados por proliferador de peroxisomas (sensibilizadores de la insulina, por ejemplo, las glitazonas pioglitazona y rosiglitazona) y activadores del receptor activados por proliferador de peroxisomas (fibratos, por ejemplo, feno fibrato), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico o vitamina E) o terapia de reemplazo hormonal.

En otro ejemplo, una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo comprende

adicionalmente un factor que induce o potencia la diferenciación de una célula progenitora en una célula vascular. Los factores ejemplares incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP; por ejemplo, FCDP-BB), y FCF.

En otro ejemplo, una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo comprende adicionalmente una célula comprometida específica de tejido (TSCC, por sus siglas en inglés). A este respecto, la solicitud internacional de patente N.º PCT/AU2005/001445 demuestra que la administración de una TSCC y una célula STRO-1$^+$ puede producir la proliferación potenciada de la TSCC. En un ejemplo, la TSCC es una célula vascular. La administración de dicha composición a un sujeto puede dar pie a una mayor producción de vasculatura, por ejemplo, dando pie a una mayor administración de nutrientes al tejido afectado.

Dispositivos médicos

La presente descripción también proporciona dispositivos médicos para uso o cuando se usan en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. Por ejemplo, la presente descripción proporciona una jeringa o catéter u otro dispositivo de administración adecuado que comprende células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. De manera opcional, la jeringa o catéter está empaquetado con instrucciones para uso en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo.

En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un implante que comprende células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. De manera opcional, el implante está empaquetado con instrucciones para uso en un procedimiento como se describe en el presente documento según cualquier ejemplo. Los implantes adecuados se pueden formar con un andamio, por ejemplo, como se describe en el presente documento y células STRO-1$^+$ y/o células de su progenie y/o factores solubles obtenidos de las mismas.

Modos de administración

El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, administrarse (por ejemplo, por medio de un catéter o jeringa), o administrarse sistémicamente de otro modo.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administra/administran en el flujo sanguíneo de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran por vía parenteral. Entre las vías de administración parenteral ejemplares se incluyen, sin carácter restrictivo, las vías intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intraarterial, intranodal o intravenosa. En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran por vía intraarterial, dentro de la aorta, en un atrio o ventrículo del corazón o dentro de un vaso sanguíneo, por ejemplo, por vía intravenosa.

En el caso de administración de células en un atrio o ventrículo del corazón, las células pueden administrarse en el atrio o ventrículo izquierdo para evitar complicaciones que puedan surgir de la rápida administración de células a los pulmones.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se inyectan en el sitio de administración, por ejemplo, utilizando una jeringa o por medio de un catéter o una línea central.

La elección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de distintos factores, incluyendo la velocidad de recambio sérico o tisular de la entidad clínica, el nivel de los síntomas, y la inmunogenicidad de la entidad clínica. Por ejemplo, un régimen de administración maximiza la cantidad de compuesto terapéutico administrado al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por lo tanto, la cantidad de formulación administrada depende en parte de la entidad concreta y de la gravedad de la afección que se trata.

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran en una dosis de bolo única. Como alternativa, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1$^+$, las células STRO-1$^+$ o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis ejemplar es el que incluye la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y actividad del compuesto que se está utilizando. La dosis apropiada es determinada por un médico clínico, por ejemplo, utilizando los parámetros o factores que se sabe o se supone según la técnica que afectan el

tratamiento o que se predice afectan dicho tratamiento. Como regla general, la dosis comienza con una cantidad un tanto inferior a la dosis óptima y se aumenta lentamente a partir de entonces hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo en cuanto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas diagnósticas importantes incluyen las destinadas a los síntomas de la diabetes.

En algunos ejemplos, las células se administran semanalmente, quincenalmente, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

Según ejemplos de la descripción dirigidos a tratar o retrasar la progresión de una enfermedad articular inflamatoria, en un ejemplo, las células STRO-1^+ células de su progenie y/o factores solubles de las mismas se administran después del diagnóstico de la afección, por ejemplo, utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inmunoselección de MPC mediante selección de células STRO-$3^{\pm}$

Se recolecta médula ósea (MO) de voluntarios adultos sanos normales (20-35 años de edad). En resumen, se aspiran 40 ml de MO de la cresta ilíaca posterior en tubos que contienen anticoagulante de litio-heparina.

Se preparan BMMNC mediante separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) tal como se describió anteriormente (Zannettino, A.C. y otros (1998) Blood 92: 2613-2628). Después de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, se retira la capa leucocítica con una pipeta de transferencia y se lavan tres veces con "HHF" compuesto por solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, Gaithersburg, MD), que contiene suero fetal de ternero al 5 % (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

Posteriormente, se aislaron células STRO-3^+ (o $TNAP^+$) por clasificación celular activada magnéticamente tal como se describió anteriormente (Gronthos y otros (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. y Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940). En resumen, se incuban aproximadamente 1-3 x 10^8 BMMNC en tampón de bloqueo, consistente en suero de conejo normal al 10 % (v/v) en HHF durante 20 minutos sobre hielo. Se incuban las células con 200 µl de una solución 10 µg/ml de AcM STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las células se lavan dos veces con HHF por centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución de 1/50 de γ-biotina antimurina de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en tampón HHF y se incuban las células durante 1 hora sobre hielo. Se lavan las células dos veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca^{2+} y Mn^{2+} suplementado con BSA al 1 %, EDTA 5 mM y azida de sodio al 0,01 %) como se indicó anteriormente y se vuelven a colocar en suspensión en un volumen final de 0,9 ml de tampón de MACS.

Se añaden 100 µl de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuba en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se vuelve a colocar en suspensión en 0,5 ml de tampón de MACS y, a continuación, se carga en una mini-columna de MACS (Columnas MS, Miltenyi Biotec), y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón de MACS para recuperar las células que no se unieron al AcM STRO-3 (depositadas el 19 de diciembre de 2005 en la Recolección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) con número de acceso al depósito PTA-7282 - véase la publicación internacional N.º WO 2006/108229). Después de la adición de 1 ml adicional de tampón de MACS, se retira la columna del imán y se aíslan las células $TNAP^+$ por presión positiva. Puede teñirse una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y valorarse la pureza por citometría de flujo.

Ejemplo 2: Las células seleccionadas mediante AcM STRO-3 son células STRO-1^{bright}

Se diseñaron experimentos para confirmar el potencial de uso del AcM STRO-3 como reactivo único para el aislamiento de células STRO-1^{bright}.

Dado que el de STRO-3 (IgG1) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), se valoró la capacidad de STRO-3 de identificar UFC-F clonogénicas mediante análisis FACS de dos colores basado en su coexpresión con células STRO-1^+ aisladas usando el procedimiento de MACS (figura 1). El histograma de gráfico de puntos representa 5 x 10^4 eventos recogidos como datos a modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población minoritaria de células STRO-1^{bright} coexpresaron TNAP (cuadrante superior derecho), mientras que el resto de células STRO-1^+ no consiguieron reaccionar con el AcM STRO-3. Posteriormente, las células aisladas mediante FACS de los cuatro cuadrantes se analizaron para determinar la incidencia de UFC-F (Tabla 1).

Tabla 1: Enriquecimiento de células de médula ósea humana por análisis FACS de color doble basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (véase la figura 1). Se cultivaron células clasificadas por FACS en condiciones clonogénicas estándar en alfa-MEM suplementado con FCS al 20 %. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias (UFC-F) por 10^5 células sembradas ± EE (n= 3 aspirados de médula ósea diferentes) el día 14. Estos datos sugieren que las MPC humanas están exclusivamente restringidas a la fracción positiva de TNAP de MO que coexpresa el antígeno de STRO-1 fuertemente.

Fracción de médula ósea	Frecuencia de células UFC-F/10^5	Enriquecimiento (aumento en veces)
BMMNC no fraccionadas	11,0 ± 2,2	1,0
$TNAP^+/STRO\text{-}1^{bright}$	4.511 ± 185	410
$TNAP^+/STRO\text{-}1^{dull}$	0,0	0,0

Ejemplo 3: Expresión génica y de proteína superficial relativa de células $STRO\text{-}1^{dull}$ y $STRO\text{-}1^{bright}$

En la primera serie de experimentos, se empleó análisis RT-PCR semicuantitativo para examinar el perfil de expresión génica de diversos genes asociados con linaje expresado por poblaciones de $STRO\text{-}1^{dull}$ o $STRO\text{-}1^{bright}$, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia (figura 2A). En la segunda serie de experimentos, se empleó citometría de flujo y análisis de los canales medios de fluorescencia para examinar el perfil de expresión de proteína superficial de diversas proteínas asociadas con linaje expresado por poblaciones de $STRO\text{-}1^{dull}$ o $STRO\text{-}1^{bright}$, aisladas por clasificación celular activada por fluorescencia.

Se preparó ARN celular total a partir de o bien 2 x 10^6células primarias clasificadas $STRO\text{-}1^{bright}$ o $STRO\text{-}1^{dull}$, sedimentos de condrocitos y otros cultivos inducidos y se lisó utilizando el procedimiento de extracción RNAzolB (Biotecx Lab. Inc., Houston, TX) según las recomendaciones del fabricante. Se usó entonces ARN aislado de cada subpoblación como plantilla para la síntesis de ADNc, preparado usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia). La expresión de diversos transcritos se evaluó mediante amplificación por PCR, utilizando un protocolo estándar como se describió anteriormente (Gronthos y otros, J. Bone y Min. Res. Res. 14:48-57, 1999). Los conjuntos de cebadores utilizados en el presente estudio se muestran en la Tabla 2. Después de la amplificación, se analizó cada mezcla de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se valoró la integridad del ARN mediante la expresión de GAPDH.

Se evaluó la expresión génica relativa para cada marcador celular con referencia a la expresión del gen constitutivo, GAPDH, utilizando el software ImageQant (figura 2B, C). Además, se utilizó análisis de citometría de flujo de color doble para examinar el perfil de expresión de proteínas de MPC expandidas *ex vivo* basándose en su expresión de una gama más amplia de marcadores asociados con linaje celular en combinación con el anticuerpo STRO-1. En la Tabla 3 se presenta un resumen del fenotipo general basado en la expresión génica y de proteínas de células cultivadas $STRO\text{-}1^{dull}$ y $STRO\text{-}1^{bri}$. Los datos indican que las MPC $STRO\text{-}1^{bright}$ expandidas *ex vivo* presentan una expresión diferencialmente mayor de marcadores asociados con células perivasculares, incluidos angiopoyetina-1, VCAM-1, SDF-1, IL-1β, TNFα y RANKL. Las comparaciones entre los perfiles de expresión génica y de proteínas de las células cultivadas $STRO\text{-}1^{dull}$ y $STRO\text{-}1^{bright}$ se resumen en las Tablas 3 y 4.

También se llevaron a cabo estudios de hibridación sustractiva para identificar genes únicamente expresados por células $STRO\text{-}1^{bri}$. En resumen, las células $STRO\text{-}1^{dull}$ y $STRO\text{-}1^{bright}$ se aislaron como se describió anteriormente (véase la figura 3A). Se preparó ARN total a partir de células $STRO\text{-}1^{dull}$ y $STRO\text{-}1^{bright}$ agrupadas de 5 muestras de médula diferentes utilizando el sistema RNA STAT-60 (TEL-TEST). Se llevó a cabo síntesis de primera hebra utilizando el kit de síntesis de ADNc SMART (Clontech Laboratories). El híbrido resultante de ARNm/ADNc monocatenario se amplificó mediante PCR a larga distancia (kit Advantage 2 PCR; Clontech) utilizando sitios de cebadores específicos en los extremos de cebador 3' y 5' formados durante el proceso de RT inicial según las especificaciones del fabricante. Después de la digestión RsaI del ADNc de $STRO\text{-}1^{bright}$, se utilizaron 2 alícuotas para enlazar distintos oligonucleótidos adaptadores específicos utilizando el kit de sustracción de ADNc con selección por PCR de Clontech. Se llevaron a cabo dos rondas de hibridación sustractiva utilizando ADNc de $STRO\text{-}1^{bright}$ (de prueba) y $STRO\text{-}1^{dull}$ (propulsor) y viceversa, según el protocolo del fabricante. Este procedimiento también se llevó a cabo a la inversa utilizando ADNc de $STRO\text{-}1^{dull}$ de prueba hibridado contra ADNc de $STRO\text{-}1^{bright}$ propulsor.

Para identificar los genes únicamente expresados por la población de $STRO\text{-}1^{bright}$, se utilizó ADNc sustraído de $STRO\text{-}1^{bright}$ para construir filtros de micromatriz de baja densidad replicados que comprendían 200 clones bacterianos seleccionados de forma aleatoria transformados con los ADNc sustraídos de $STRO\text{-}1^{bright}$ enlazados a un vector de clonación T/A. A continuación se sondearon las micromatrices con o bien $STRO\text{-}1^{bright}$ marcadas con [^{32}P] dCTP o ADNc sustraído de $STRO\text{-}1^{dull}$ (figura 3B-C). Con el cribado diferencial se identificaron un total de 44 clones, muy

diferencialmente expresados entre las subpoblaciones de STRO-1^{dull} y STRO-1^{bright}. La secuenciación de ADN de todos los clones expresados diferencialmente reveló que únicamente 1 clon era representativo de un mitógeno de células estromales conocido; concretamente, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Gronthos y Simmons, Blood. 85: 929-940, 1995). Curiosamente se descubrió que 6 de los 44 clones contenían insertos de ADN correspondientes a quimiocina, factor derivado de células estromales 1 (SDF-1). La alta abundancia de transcritos de SDF-1 en células STRO-1^{bright} humanas fue confirmada por RT-PCR semicuantitativa de ARN total preparado a partir de subpoblaciones de médula ósea de STRO-1^{bright}, STRO-1^{dull}, y STRO-1^{negative} (figura 3D y Tabla 3).

Tabla 2. Cebadores de RT-PCR y condiciones para la amplificación específica de ARNm humano

Gen diana	Secuencias de cebadores sentido/antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
GAPDH	CACTGACACGTTGGCAGTGG (SEQ ID NO: 1)	417
	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC (SEQ ID NO: 2)	
SDF-1	GAGACCCGCGCTCGTCCGCC (SEQ ID NO: 3)	364
	GCTGGACTCCTACTGTAAGGG (SEQ ID NO: 4)	
IL-1β	AGGAAGATGCTGGTTCCCTCTC (SEQ ID NO: 5)	151
	CAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC (SEQ ID NO: 6)	
LT-1	TCACTATGGAAGATCTGATTTCTTACAGT (SEQ ID NO: 7)	380
	GGTATAAATACACATGTGCTTCTAG (SEQ ID NO: 8)	
TNF-α	TCAGATCATCTTCTCGAACC (SEQ ID NO: 9)	361
	CAGATAGATGGGCTCATACC (SEQ ID NO: 10)	
KDR	TATAGATGGTGTAACCCGGA (SEQ ID NO: 11)	450
	TTTGTCACTGAGACAGCTTGG (SEQ ID NO: 12)	
RANKL	AACAGGCCTTTCAAGGAGCTG (SEQ ID NO: 13)	538
	TAAGGAGGGGTTGGAGACCTCG (SEQ ID NO: 14)	
Leptina	ATGCATTGGGAACCCTGTGC (SEQ ID NO: 15)	492
	GCACCCAGGGCTGAGGTCCA (SEQ ID NO: 16)	
CBFA-1	GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA (SEQ ID NO: 17)	632
	TGGCAGGTAGGTGTGGTAGTG (SEQ ID NO: 18)	
PPARγ2	AACTGCGGGGAAACTTGGGAGATTCTCC (SEQ ID NO: 18)	341
	AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC (SEQ ID NO: 19)	
OCN	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC (SEQ ID NO: 20)	289
	CGTAGAAGCGCCGATAGGC (SEQ ID NO: 21)	
MyoD	AAGCGCCATCTCTTGAGGTA (SEQ ID NO: 22)	270
	GCGAGAAACGTGAACCTAGC (SEQ ID NO: 23)	
SMMHC	CTGGGCAACGTAGTAAAACC (SEQ ID NO: 24)	150
	TATAGCTCATTGCAGCCTCG (SEQ ID NO: 25)	
GFAP	CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT (SEQ ID NO: 26)	370
	TCATCGCTCAGGAGGTCCTT (SEQ ID NO: 27)	
Nestina	GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA (SEQ ID NO: 28)	460
	CTCTAAACTGGAGTGGTCAGGGCT (SEQ ID NO: 29)	
SOX9	CTCTGCCTGTTTGGACTTTGT (SEQ ID NO: 30)	598
	CCTTTGCTTGCCTTTTACCTC (SEQ ID NO: 31)	
Colágeno de tipo X	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA (SEQ ID NO: 32)	387
	TTTTCCCACTCCAGGAGGGC (SEQ ID NO: 33)	
Agrecano	CACTGTTACCGCCACTTCCC (SEQ ID NO: 34)	184

Gen diana	Secuencias de cebadores sentido/antisentido (5'-3')	Tamaño del producto
	ACCAGCGGAAGTCCCCTTCG (SEQ ID NO: 35)	

Tabla 3. Resumen de la expresión génica relativa en poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull}. Se presentan una lista de genes que mostraron una expresión cuantificable y diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull} según lo determinado por transcripción PCR inversa. Los valores representan la expresión génica relativa con referencia al gen constitutivo, GAPDH.

		Expresión génica relativa a GAPDH	
Tejido	**Marcador**	**STRO-1^{Bright}**	**STRO-1^{Dull}**
Neuronas	*GFAP (proteína ácida fibrilar glial)*	0,1	0,7
Hueso	*OCN (osteocalcina)*	1,1	2,5
	OSX (Osterix)	0,4	1,3
	CBFA-1 (proteína de unión al factor central-1)	0,3	0,6
Inmunoregulador	*RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B) SDF-1-alfa (factor 1 alfa derivado del estroma)*	1,6 3,2	0,3 0,1
Grasa	*Leptina*	3,1	4,2
Cardiomiocitos	*GATA-4*	1,1	2,9
Células endoteliales	*Ang-1 (angiopoyetina-1)*	1,5	0,8
Condrocitos	*Sox 9*	0,3	1,1
	COL X (Colágeno X)	3,5	2,8
Citoquinas proinflamatorias	*TNF-alfa (necrosis tumoral alfa)*	1,7	0,9

Se prepararon suspensiones de células únicas de células expandidas *ex vivo* derivadas de MPC de médula ósea mediante desprendimiento de tripsina/EDTA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo STRO-1 en combinación con anticuerpos que identifican una amplia gama de marcadores asociados con linaje celular para correlacionar expresión superficial de proteína con densidad de expresión de STRO-1. Se identificó STRO-1 utilizando IgM antimurina de cabra-isotiocianato de fluoresceína, mientras que se identificaron todos los otros marcadores utilizando IgG antimurina o anticonejo de cabra-ficoeritrina. Para aquellos anticuerpos que identifican antígenos intracelulares, las preparaciones de células primero se marcaron con el anticuerpo STRO-1, se fijaron con etanol al 70 % frío para permeabilizar la membrana celular y después se incubaron con anticuerpos específicos del antígeno intracelulares. Los anticuerpos de control de isotipo coincidentes se usaron en idénticas condiciones. Se realizó un análisis de citometría de flujo de color dual con un citómetro de flujo COULTER EPICS y se recopilaron los datos en modo de lista. Los gráficos de puntos representan 5.000 eventos en modo de lista que indican el nivel de intensidad de fluorescencia para cada marcador de celda de linaje (eje y) y STRO-1 (eje x). Los cuadrantes vertical y horizontal se establecieron con referencia a los anticuerpos de control negativo de isotipo coincidente.

Tabla 4. Resumen de la expresión de la proteína relativa en poblaciones de STRO-1^{Bright} y STRO-1^{Dull}. Se presenta una lista de proteínas que mostraron expresión diferencial entre las poblaciones de STRO-1^{Bri} y STRO-1^{Dull} según lo determinado mediante citometría de flujo. Los valores representan la intensidad de fluorescencia media relativa de la tinción.

		Intensidad de fluorescencia media	
Tejido	**Marcador**	**STRO-1^{Bright}**	**STRO-1^{Dull}**
Neuronas	*Neurofilamento*	1,7	20,5
Hueso	*ALK PHOS (fosfatasa alcalina)*	5,7	44,5
Inmunoregulador	*RANKL (activador del receptor del factor nuclear κ B)*	658,5	31,0
Células epiteliales	*Citoqueratina 10+13*	1,2	23,3
	Citoqueratina 14	1,8	8,8

		Intensidad de fluorescencia media	
Tejido	**Marcador**	**STRO-1^{Bright}**	**STRO-1^{Dull}**
Músculo liso	*α-SMA (Actina del músculo liso alfa)*	318,0	286,0
Condrocitos	*Biglicano*	84,4	65,9
Fibroblasto basal	*Tenascina C*	22,2	6,9
Cardiomiocito	*Troponina C*	2,5	15,0

Ejemplo 4: Las células estromales expresan angiotensina I

Las líneas celulares estromales humanas HS5 y HS27A se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con suero fetal de ternero (FCS) al 10 % y penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/mL). Los fibroblastos estromales primarios se cultivaron a partir de células mononucleares de médula ósea (BMMNC) como se describió anteriormente (Pillai y otros, Blood 107: 3520-3526, 2006). Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD146 conjugado con FITC (Ebiosciences, San Diego, CA), con control de isotipo adecuado para el análisis, así como la clasificación celular en poblaciones de CD146hi y CD146 lo en un clasificador de células FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para la RT-PCR cuantitativa, se preparó el ARN total utilizando el kit miRNEasy (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante; se realizó digestión de DNAse en columna para eliminar la contaminación con ADN genómico. Los niveles de ARNm se cuantificaron mediante reacción en cadena cuantitativa de polimerasa en tiempo real basada en SYBR-GREEN (qRT-PCR) en ADNc generado por transcripción inversa.

La línea celular estromal HS27a parecía compartir perfiles funcionales y transcripcionales similares a los reportados para los precursores estromales CD146 ^{hi}. Así, se evaluó la expresión de CD14 en esta línea celular. Se realizó un análisis de citometría de flujo de CD146 en las células HS27a y HS5, que mostró que HS27a expresó fuertemente CD146, mientras que HS5 no (figura 4A). La expresión de CD146 también se evaluó en 9 cultivos primarios, establecidos a partir de médula ósea normal. Los cultivos que se analizaron en los primeros dos o tres pases demostraron proporciones variables de células CD146 ^{hi} (entre el 6 y el 40 %), un ejemplo de las cuales se muestra en la figura 4B. A continuación, se evaluaron las células CD146 ^{hi} y CD146 ^{lo} provenientes de los cultivos primarios para determinar la expresión de dos genes, CXCL12 y angiopoyetina I. Como se muestra en las figuras 3C y 3D, la población CD146^{hi} tiene una expresión significativamente mayor tanto de CXCL12 como de angiopoyetina I en comparación con células CD146^{lo}.

Estos datos indican que las células precursoras estromales que expresan niveles altos de CD146, por ejemplo, las MPC que expresan STRO-1, también expresan angiopoitina I.

Ejemplo 5: Las MPC tratan o previenen la disfunción endotelial

Procedimientos

Se sensibilizaron ovinos al colágeno bovino de tipo II (BColl-II] mediante una inyección subcutánea de una emulsión de adyuvante *completo* de Freund (1 mL) y BColl-II (5 mg) administrada el día 0, seguida de una segunda inyección de adyuvante *incompleto* de Freund (1 mL) y BColl-II (5 mg) el día 14. El día 28, se inyectaron por vía intraarticular 100 µg de BColl-II en 0,5 ml de solución salina isotónica en la articulación de la corva izquierda para fomentar una artritis aguda acompañada de inflamación sistémica. El día 29, se inyectó solución salina (n = 8) o 150 millones de MPC suspendidas en PBS (n = 8) a los ovinos por vía intravenosa. Se tomaron muestras de sangre durante los 13 días siguientes y se determinaron los niveles plasmáticos de Il-10, fibrinógeno, Activina A y proteína C reactiva (PCR) utilizando kits comerciales de ELISA. Se sacrificó a todos los animales el día 42.

Los tejidos se recolectaron y almacenaron en una solución de Krebs-Henseleit (KHS) modificada helada. Se diseccionaron ramas de segundo orden de la arteria coronaria descendente izquierda para liberarlas del tejido circundante bajo un microscopio de disección (Stemi 2000 stereomicroscope, Carl Zeiss, Gőttengen, Alemania), a una longitud preparada para el estudio vasomotor funcional utilizando el miógrafo de alambre Mulvany-Halpern (Danish Myo Technologies, Dinamarca). Resumiendo, los segmentos del vaso se montaron entre dos alambres paralelos de acero inoxidable (de 40 µm de diámetro) unidos a las mordazas del miógrafo de alambre.

Se obtuvieron arterias digitales ovinas de la extremidad anterior izquierda del mismo ovino. Se tomaron segmentos de 1 mm de la primera rama de la arteria palmar digital y se montaron en el miógrafo de alambre como se describió anteriormente.

Fármacos y soluciones

La KHS modificada utilizada tiene la siguiente composición (en mM): NaCl 118, KCl 4,57, $CaCl_2$ 1,27, KH_2PO_4 1,19, $MgSO_4$ 1,19, $NaHCO_3$ 25 y glucosa 5,55. Todos los fármacos se obtuvieron de la empresa Sigma-Aldrich Ltd, Australia. Todos los fármacos y soluciones de KHS se prepararon de nuevo el día del experimento y se disolvieron en agua destilada. Posteriormente, todos los fármacos se diluyeron en KHS.

Registro de la tensión isométrica

Las preparaciones se colocaron en una cámara que contenía 5 ml de KHS, se mantuvieron a 37 °C y se airearon con O_2 al 95 % y CO_2 al 5 %. Tras un periodo de equilibrio de 15 minutos, cuando los segmentos del vaso se normalizan según los procedimientos desarrollados por Mulvany y Halpern Circulation Res. 41: 19-26, 1977, y se determinó la circunferencia interna óptima durante el procedimiento de normalización. Se aplicó la tensión de reposo a los vasos sanguíneos según su circunferencia interna normalizada, correspondiente a 13,3 kPa (100 mmHg) con un factor de ajuste de 0,9. Una vez establecida la tensión de reposo, los vasos se sometieron a un periodo de equilibrio adicional de 30 min en KHS, seguido de una respuesta contráctil a una solución de Krebs despolarizante estándar (DKS; KCl 118 mM).

Arterias coronarias: relajación de las arterias pre-contraídas con endotelina-1 inducida por bradiquinina y nitroprusiato de sodio

Tras el lavado y el reequilibrado (15 min), se incubaron dos segmentos de vasos del mismo individuo con KHS que contenía ibuprofeno (10 µM) para eliminar cualquier efecto de bradiquinina mediado por prostaglandina. A continuación, se contrajeron al 75 % de su respuesta máxima a DKS utilizando endotelina-1 ($3x\ 10^{-8}$ M). Una vez se logró una contracción en estado de equilibrio, se obtuvieron respuestas relajantes para aumentar de forma acumulativa las concentraciones de o bien, el vasodilatador dependiente del endotelio, bradiquinina (10^{-11} M to 10^{-5} M), o el vasodilatador independiente del endotelio, nitroprusiato de sodio (10^{-10} M to 10^{-4} M). Solo se realizó una curva de concentración-respuesta en cada segmento y se utilizaron dos segmentos adyacentes en cada experimento.

Arterias digitales: relajación de las arterias pre-contraídas con 5-HT inducida por carbacol y nitroprusiato de sodio

Tras el lavado y el reequilibrado (15 min), dos segmentos de vasos del mismo individuo se contrajeron al 75 % de su respuesta máxima a DKS utilizando 5-HT (3×10^{-6} M). Una vez se logró una contracción en estado de equilibrio, se obtuvieron respuestas relajantes para aumentar de forma acumulativa las concentraciones de o bien, el vasodilatador dependiente del endotelio, carbacol (10^{-9} M to 10^{-4} M), o el vasodilatador independiente del endotelio, nitroprusiato de sodio (10^{-10} M to 10^{-4} M). Solo se realizó una curva de concentración-respuesta en cada segmento y se utilizaron dos segmentos adyacentes en cada experimento.

Análisis de datos

La tensión se registró de forma continua mediante un sistema de adquisición computarizado y los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (s.e.m., por sus siglas en inglés) del número indicado de experimentos independientes (*n*), cada uno a partir de una preparación independiente. Los datos se utilizaron para construir curvas acumulativas de concentración-respuesta (CRC, por su sigla en inglés). De estas, se calcularon los valores y respuestas máximas de EC_{50} (la concentración del agonista produjo el 50 % de la respuesta máxima expresada como media geométrica e intervalos de confianza del 95 %) y se realizaron comparaciones estadísticas utilizando un análisis de varianza de una o dos vías mediante prueba post-hoc de Dunnett cuando procedía mediante software de ajuste de curvas (GraphPad Prism 5.0).

Resultados

Los resultados mostraron que una única administración IV de 150 millones de MPC alogénicas causó un pico en la producción de los niveles de IL-10 el día después de la administración (figura 5). La IL-10 es una citoquina inflamatoria que promueve los niveles de neutrófilos en circulación y ayuda a limitar su estado proinflamatorio. Esto, a su vez, sirve para potenciar el tratamiento de enfermedades infecciosas sistémicas como la sepsis.

La dosis única de MPC también fue eficaz para reducir el fibrinógeno plasmático, la activina A y la proteína C reactiva en relación con los ovinos no tratados (figuras 6 a 9). Tanto el fibrinógeno, la activina A como la proteína C reactiva son marcadores de sepsis y su reducción en los niveles plasmáticos indica una reducción de los síntomas de sepsis tras la administración de MPC.

Los ovinos tratados con MPC demostraron una respuesta máxima significativamente más elevada al carbacol o la bradiquinina en comparación con los ovinos no tratados (p<0,05) (figuras 10A y 10B). No hubo diferencias significativas en la respuesta de las arterias coronarias o digitales de los dos grupos al nitroprusiato de sodio (figuras 10C y 10D), lo que indica que la función del músculo liso vascular no se vio afectada por el tratamiento. Este estudio preclínico demostró que las MPC administradas por vía intravenosa son capaces de atenuar el desarrollo de la disfunción endotelial sistémica.

Ejemplo 6: Las MPC en combinación con PPS inducen efectos antiinflamatorios

Procedimientos

Se sensibilizaron ovinos al colágeno bovino de tipo II (BColl-II] mediante una inyección subcutánea de una emulsión de adyuvante *completo* de Freund (1 mL) y BColl-II (5 mg) administrada el día 0, seguida de una segunda inyección de adyuvante *incompleto* de Freund (1 mL) y BColl-II (5 mg) el día 14. El día 28, se inyectaron por vía intraarticular 100 µg de BColl-II en 0,5 ml de solución salina isotónica en la articulación de la corva izquierda para fomentar una artritis aguda acompañada de inflamación sistémica. El día 29, se inyectaron 75 millones de MPC suspendidas en PBS (n = 6) o 75 millones de MPC suspendidas en PBS más 75 miligramos de polisulfato de pentosano (PPS) (n = 6) o 75 miligramos de PPS a los ovinos por vía intravenosa. Se tomaron muestras de sangre durante los 13 días siguientes y se determinaron los niveles plasmáticos de Il-10, fibrinógeno, Activina A y proteína C reactiva (PCR) utilizando kits comerciales de ELISA. Se sacrificó a todos los animales el día 42.

Las arterias digitales y coronarias de ovinos se obtuvieron como se describió anteriormente. Además, el registro de la tensión isométrica, el análisis de datos y el análisis de la función de las arterias coronarias y digitales se realizaron como se describió anteriormente.

Resultados

Los resultados muestran que una única administración IV de 75 millones de MPC alogénicas más PPS causó una elevación significativa (en relación con la base de referencia) en la producción de niveles plasmáticos de IL-10 en comparación con PPS por sí solo (figura 11). La IL-10 es una citoquina inflamatoria que promueve los niveles de neutrófilos en circulación y ayuda a limitar su estado proinflamatorio. Esto, a su vez, sirve para potenciar el tratamiento de enfermedades infecciosas sistémicas como la sepsis.

La dosis única de MPC más PPS fue eficaz para reducir el fibrinógeno plasmático en comparación con MPC o PPS por sí solos a partir del día 36 (figura 12). Los niveles de proteína A en ambos grupos tratados con MPC (75 millones de MPC ± PPS) se redujeron en relación con los controles tratados con PPS (figuras 13 y 14). Los niveles de proteína C reactiva en relación con la base de referencia se redujeron en ambos grupos tratados con MPC (75 millones de MPC ± PPS), pero no en los controles tratados con PPS. Tanto el fibrinógeno, la activina A como la proteína C reactiva son marcadores de sepsis y su reducción en los niveles plasmáticos indica una reducción de los síntomas de sepsis tras la administración de MPC ± PPS.

Los ovinos tratados con MPC más PPS demostraron una respuesta máxima significativamente más elevada de las arterias coronarias a la bradiquinina en comparación con los ovinos tratados con PPS por sí solo (p <0.05) (figuras 15A), lo que indica un efecto beneficioso directo sobre el endotelio vascular. Los ovinos tratados con MPC más PPS demostraron una mejora en la respuesta máxima de relajación dependiente del endotelio en las arterias digitales al carbacol en comparación con los ovinos tratados con PPS por sí solo (figura 15B). No hubo diferencias significativas en la respuesta de las arterias coronarias o digitales de los dos grupos al nitroprusiato de sodio (figuras 15C y 15D), lo que indica que la función del músculo liso vascular no se vio afectada por el tratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Una población de células enriquecidas para células STRO-1^{bright} para su uso en el tratamiento o la prevención de la nefropatía diabética en un sujeto humano, donde la población de células comprende al menos el 0,1 % de células STRO-1^{bright} y está formulada para la administración sistémica.

2. La población de células para el uso según la reivindicación 1, donde la población de células está formulada para la administración intravenosa.

3. La población de células para el uso según la reivindicación 1 o 2, donde la población de células está formulada para administrarse a una dosis de entre 0,1 x 10^6 y 5 x 10^6 células STRO-1^{bright} por kilogramo.

4. La población de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la población de células está formulada para administrarse a una dosis corporal constante, por ejemplo, a una dosis de entre aproximadamente 100 millones y 300 millones de células independientemente del peso del paciente o a una dosis de aproximadamente 150 millones de células independientemente del peso del paciente.

5. La población de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la población de células se ha de administrar una vez a la semana o con menor frecuencia.

6. La población de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la población de células es autogénica o alogénica.

7. La población de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la población de células se ha expandido mediante cultivo antes del uso.

8. La población de células para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la población de células expresa fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).

9. La población de células para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la población de células se administra en combinación con polisulfato de pentosano (PPS) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. La población de células para el uso según la reivindicación 9, en la que la sal farmacéuticamente aceptable de polisulfato de pentosano es la sal de sodio.

11. La población de células para el uso según la reivindicación 9, en la que el polisulfato de pentosano o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a una dosis de aproximadamente entre 1 mg y 100 mg.

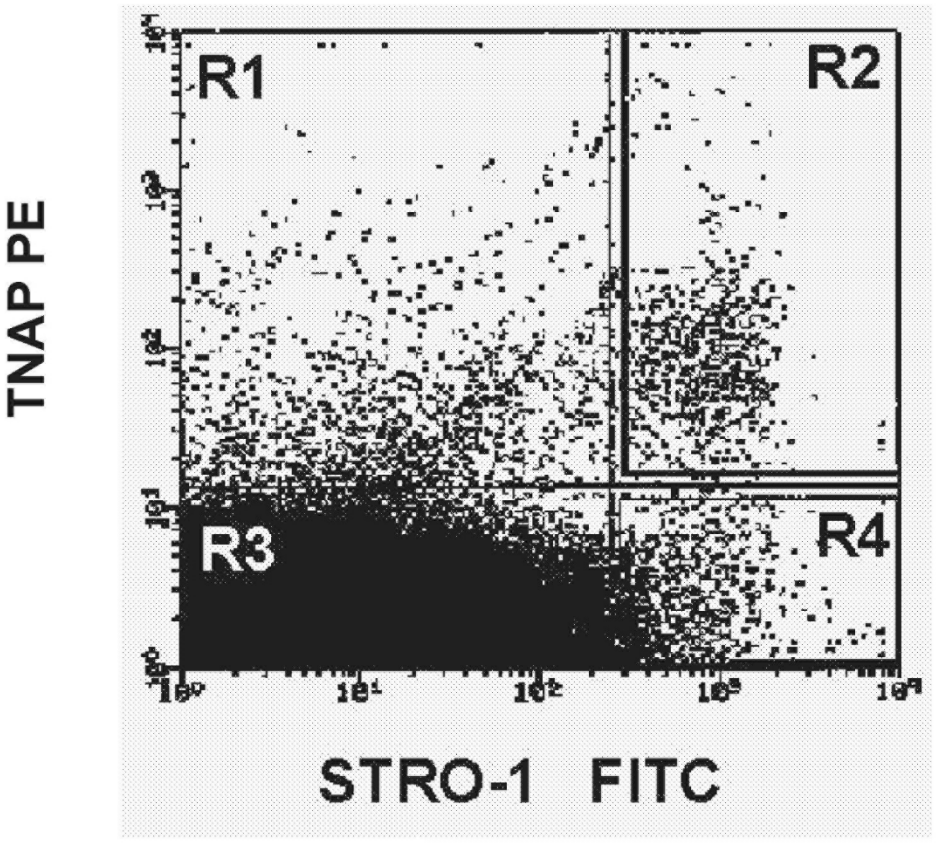


Figura 1

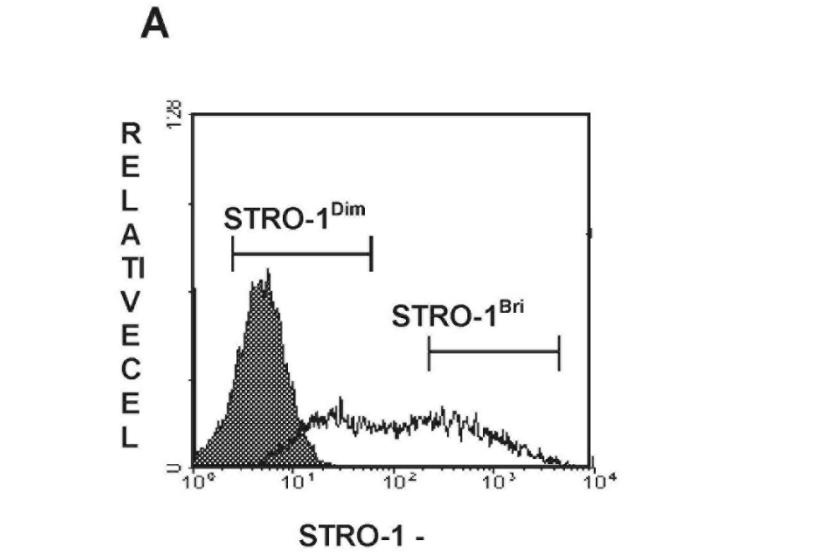

A
RELATIVE CELL
STRO-1Dim
STRO-1Bri
STRO-1 -
B
GAPDH
Nestina
GFAP
CBFA1
Osterix
OCN
PDGF-R
SOX-9
COL X
Leptina
PPARγ
Flt-1
KDR
Myo D
GATA-4
SMMHC
Ang-1
SDF-1α
IL-1β
TNF
RANK
SB SD

Figura 2A

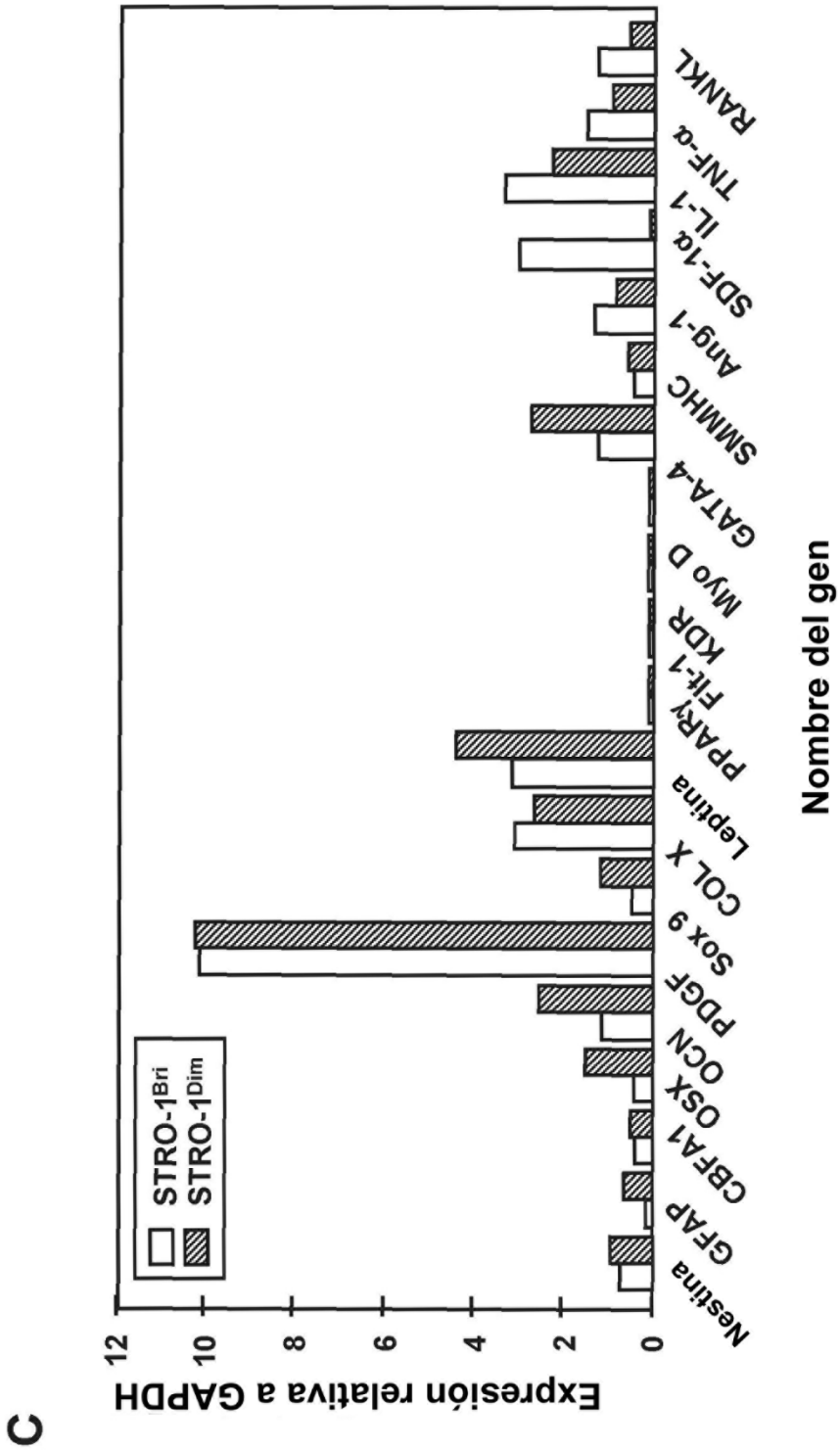

C
Expresión relativa a GAPDH
12
10
8
6
4
2
0
STRO-1Bri
STRO-1Dim
Nestina
GFAP
CBFA1
OSX
OCN
PDGF
Sox 9
COL X
Leptina
PPARγ
Flk-1
KDR
Myo D
GATA-4
SMMHC
Ang-1
SDF-1α
IL-1
TNF-α
RANKL
Nombre del gen

Figura 2B

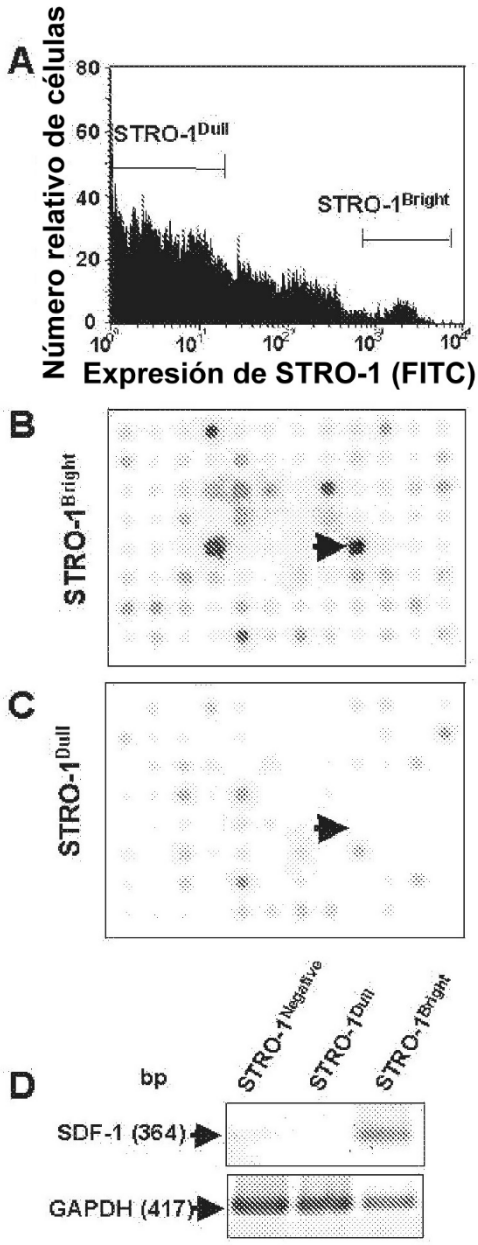

A
Número relativo de células
80
60
40
20
0
STRO-1Dull
STRO-1Bright
Expresión de STRO-1 (FITC)
B
STRO-1Bright
C
STRO-1Dull
D
bp
STRO-1Negative
STRO-1Dull
STRO-1Bright
SDF-1 (364)
GAPDH (417)

Figura 3

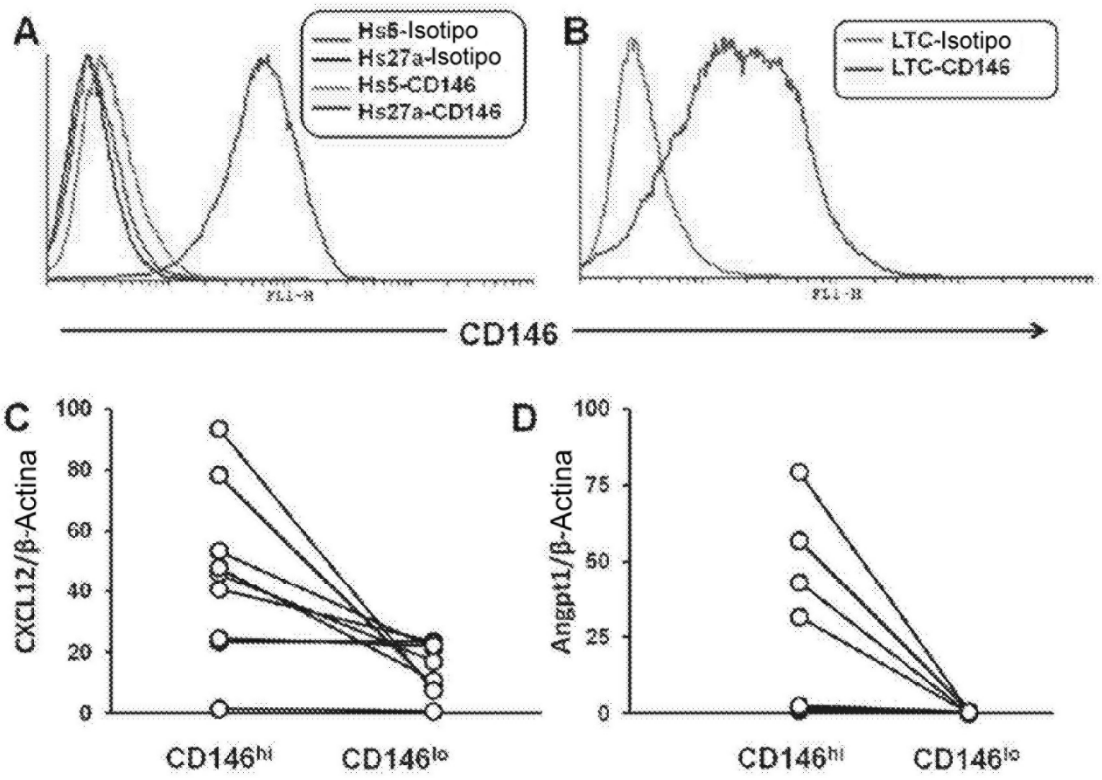

A
Hs5-Isotipo
Hs27a-Isotipo
Hs5-CD146
Hs27a-CD146
B
LTC-Isotipo
LTC-CD146
CD146
C
CXCL12/β-Actina
100
80
60
40
20
0
CD146hi
CD146lo
D
Angpt1/β-Actina
100
75
50
25
0
CD146hi
CD146lo

Figura 4

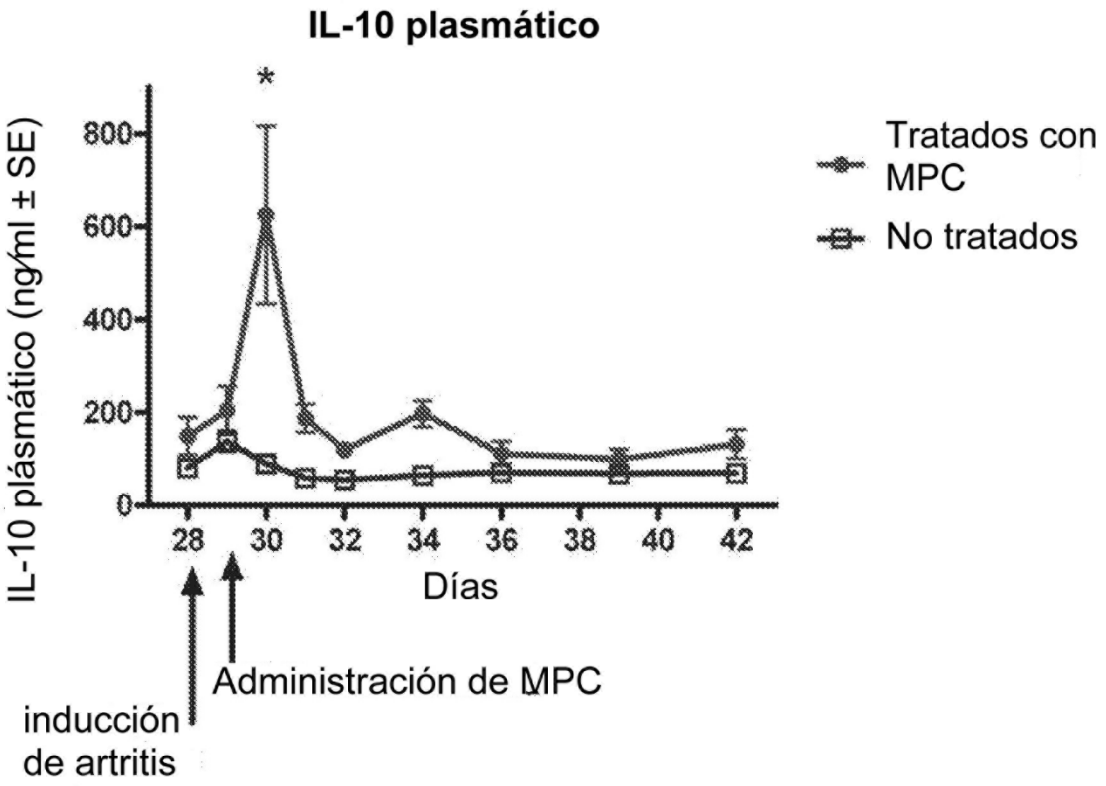

IL-10 plasmático
IL-10 plásmático (ng/ml ± SE)
800
600
400
200
0
*
28
30
32
34
36
38
40
42
Días
Tratados con MPC
No tratados
Administración de MPC
inducción de artritis

Figura 5

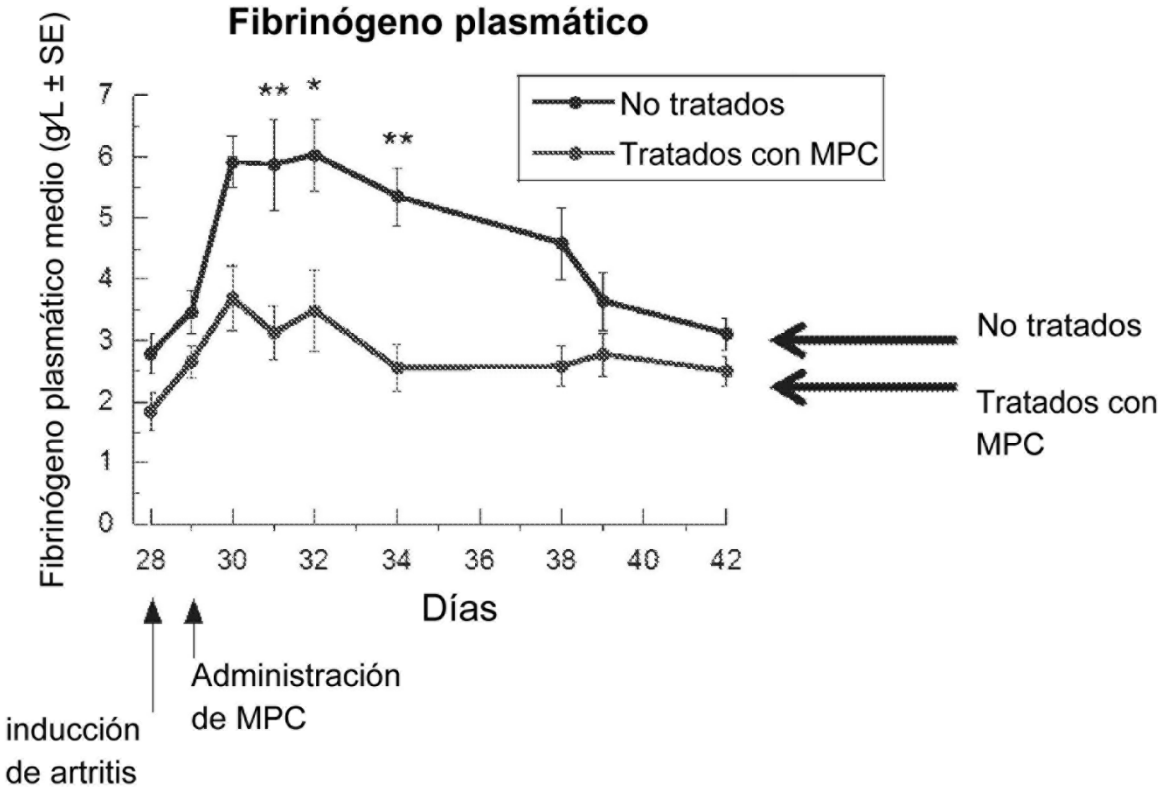

Fibrinógeno plasmático
Fibrinógeno plasmático medio (g/L ± SE)
No tratados
Tratados con MPC
** *
**
0
1
2
3
4
5
6
7
28
30
32
34
36
38
40
42
Días
No tratados
Tratados con MPC
Administración de MPC
inducción de artritis

Figura 6

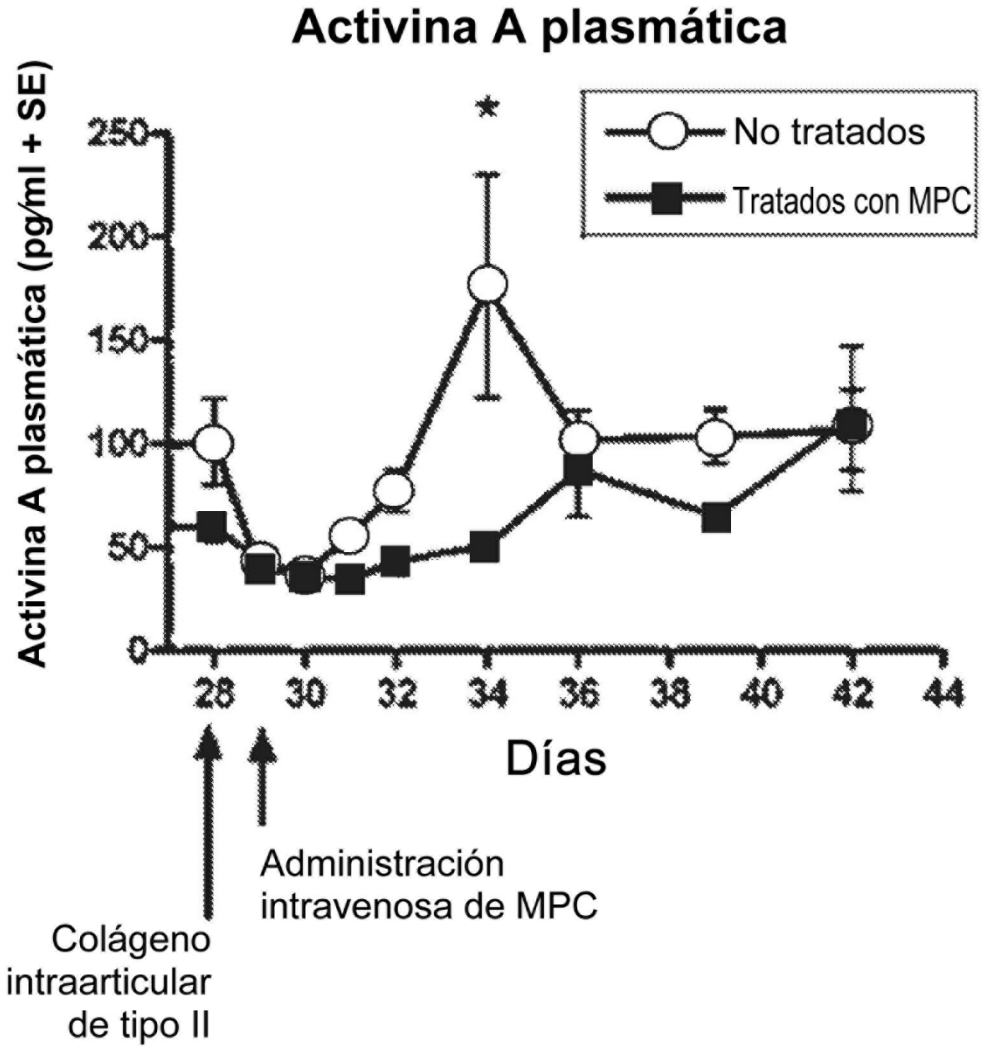

Activina A plasmática
Activina A plasmática (pg/ml + SE)
250
200
150
100
50
0
*
No tratados
Tratados con MPC
28
30
32
34
36
38
40
42
44
Días
Administración
intravenosa de MPC
Colágeno
intraarticular
de tipo II

Figura 7

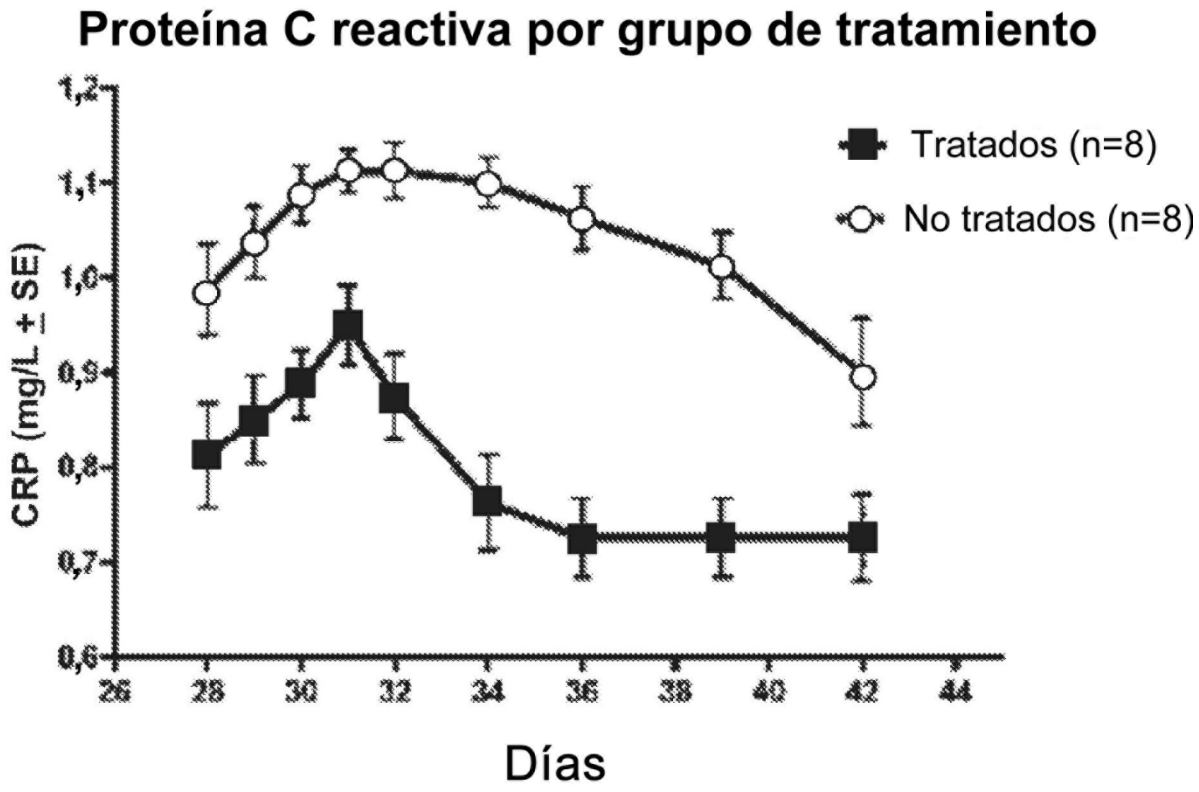

Proteína C reactiva por grupo de tratamiento
Tratados (n=8)
No tratados (n=8)
CRP (mg/L ± SE)
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
Días

Figura 8

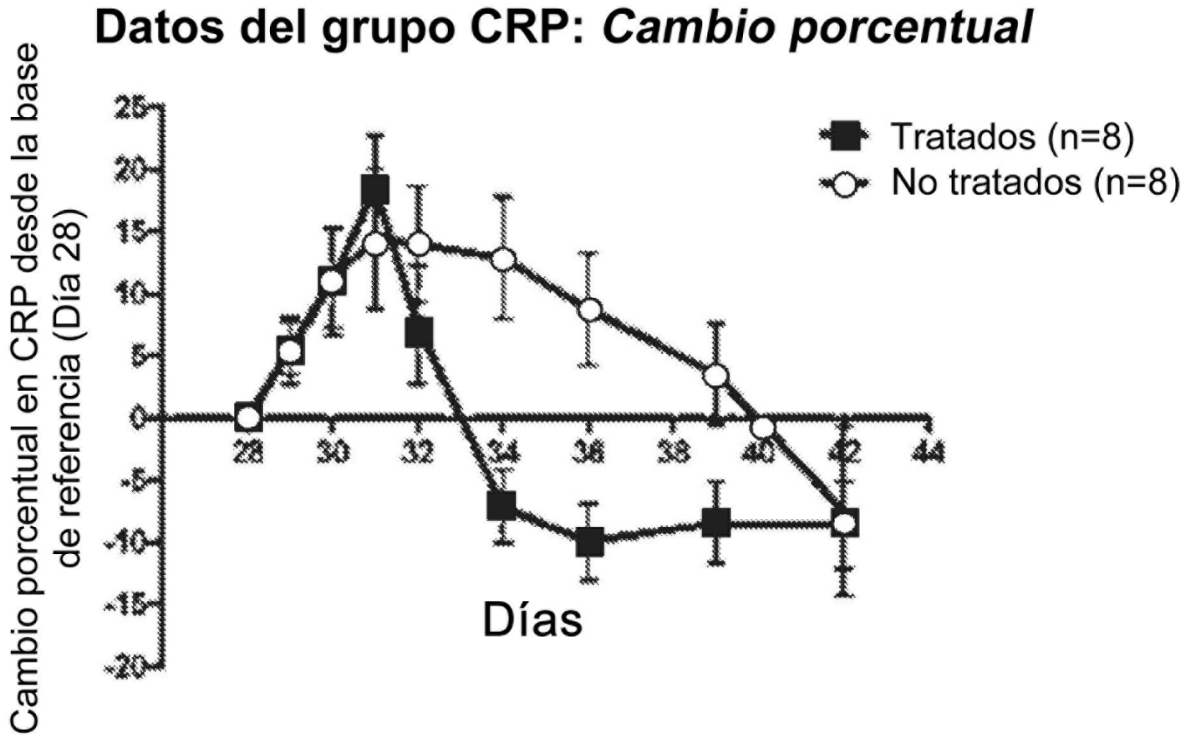

Datos del grupo CRP: *Cambio porcentual*
Cambio porcentual en CRP desde la base de referencia (Día 28)
Tratados (n=8)
No tratados (n=8)
Días
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
28
30
32
34
36
38
40
42
44

Figura 9

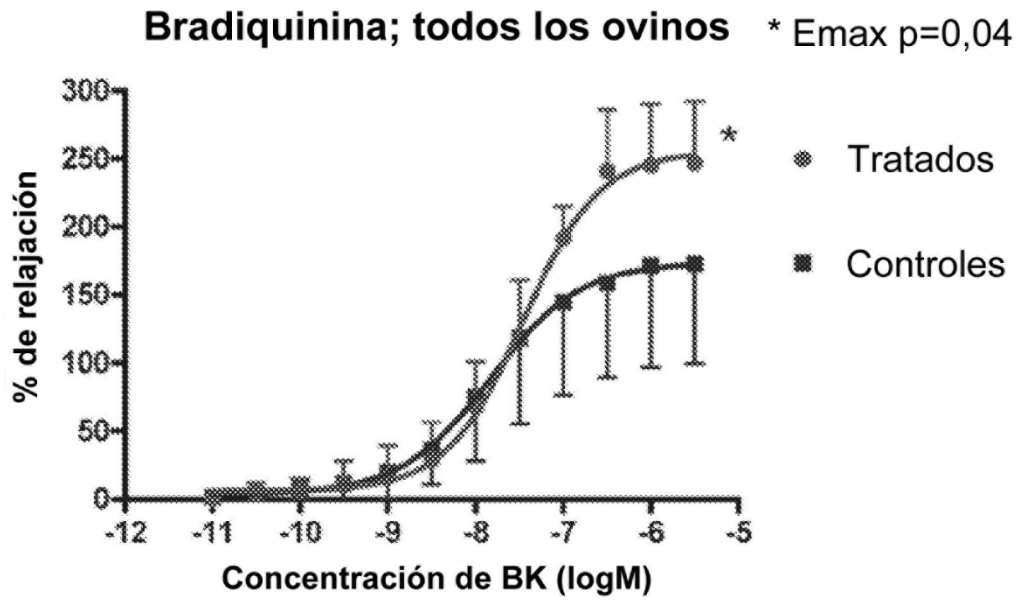


Figura 10A

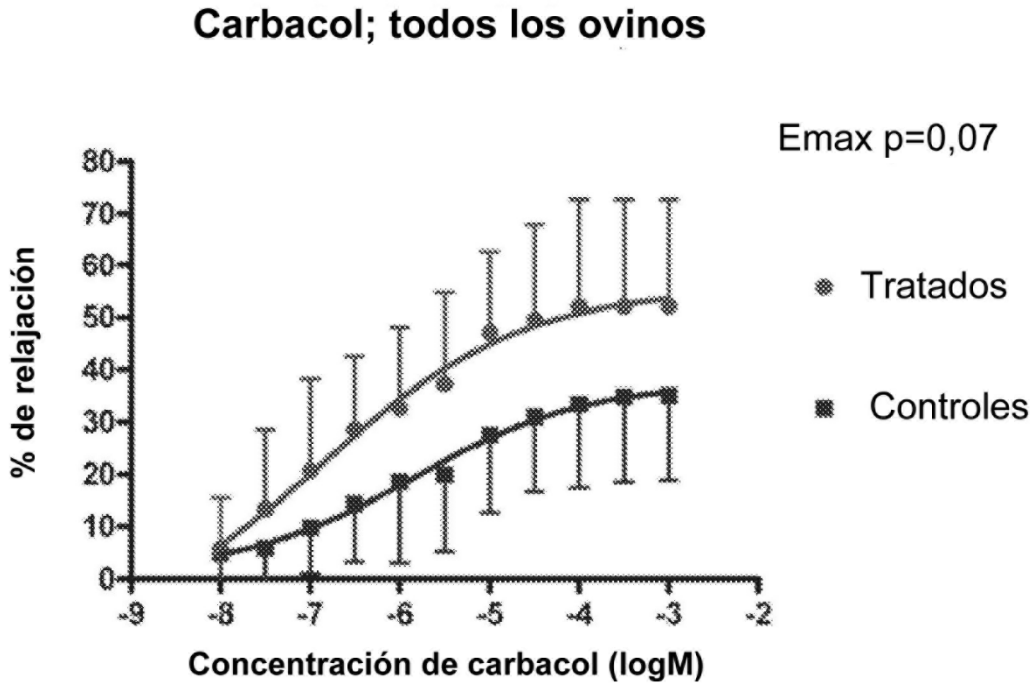


Figura 10B

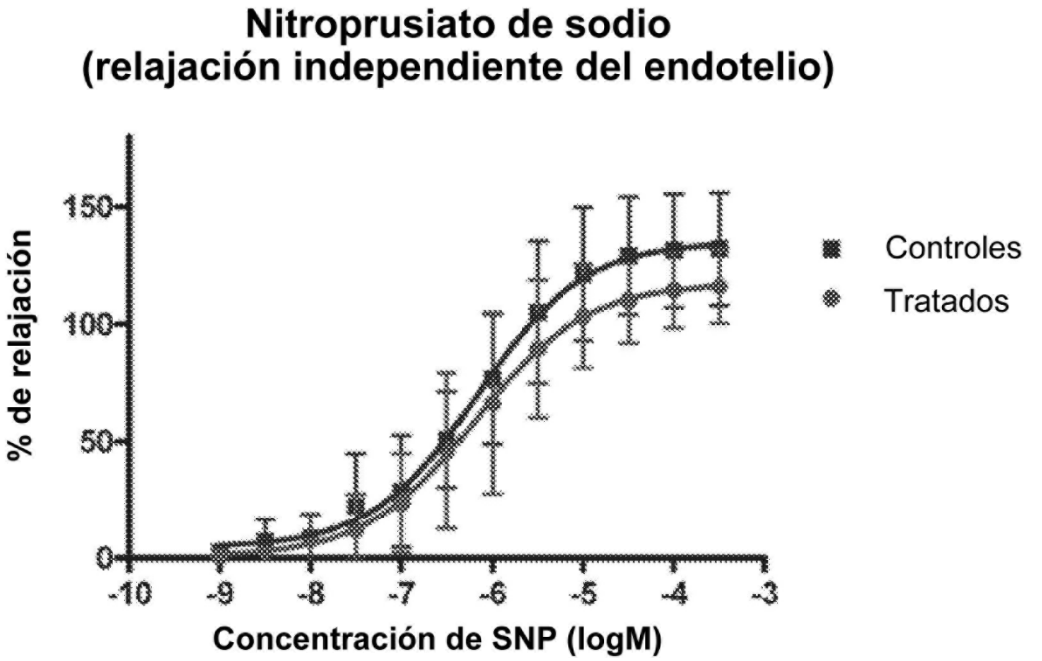


Figura 10C

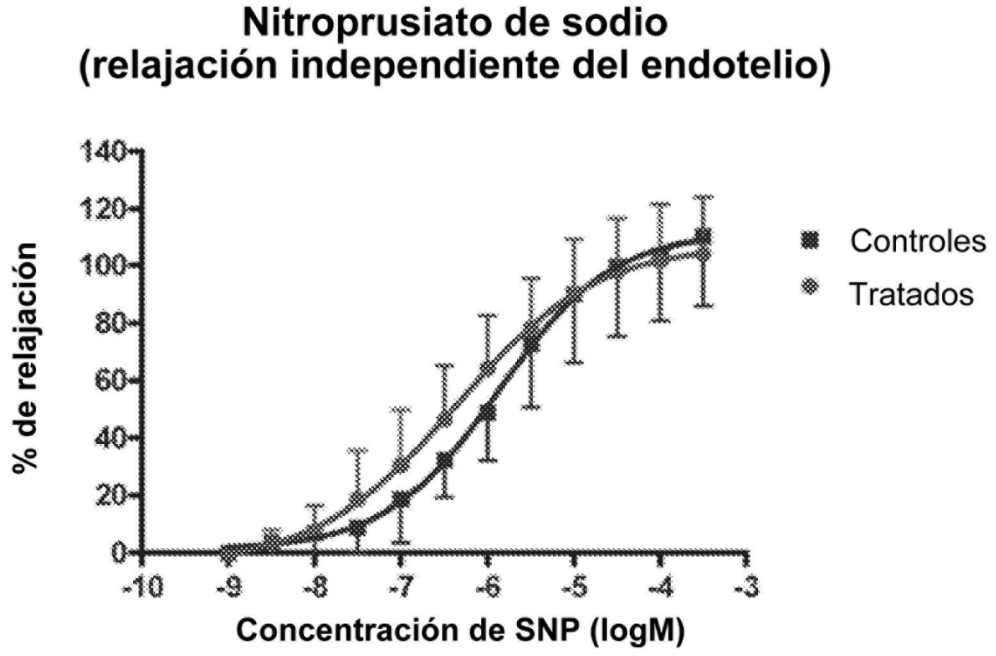


Figura 10D

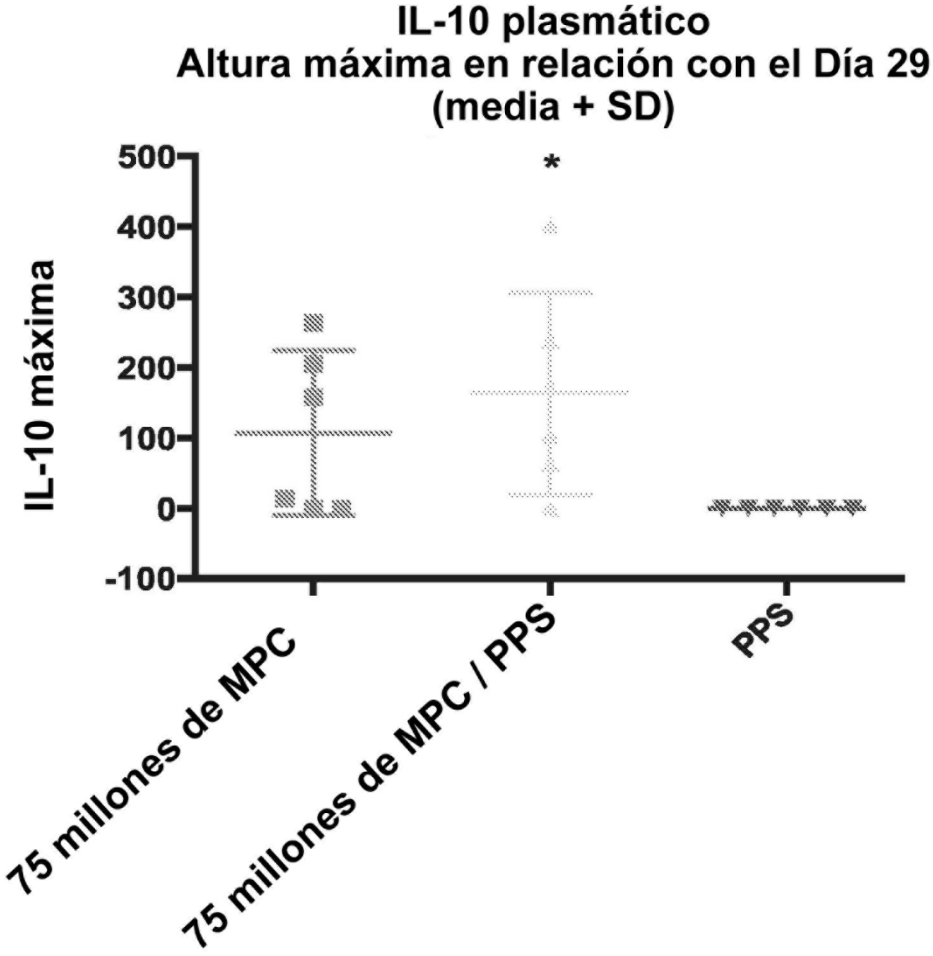

IL-10 plasmático
Altura máxima en relación con el Día 29
(media + SD)
IL-10 máxima
500
400
300
200
100
0
-100
*
75 millones de MPC
75 millones de MPC / PPS
PPS

Figura 11

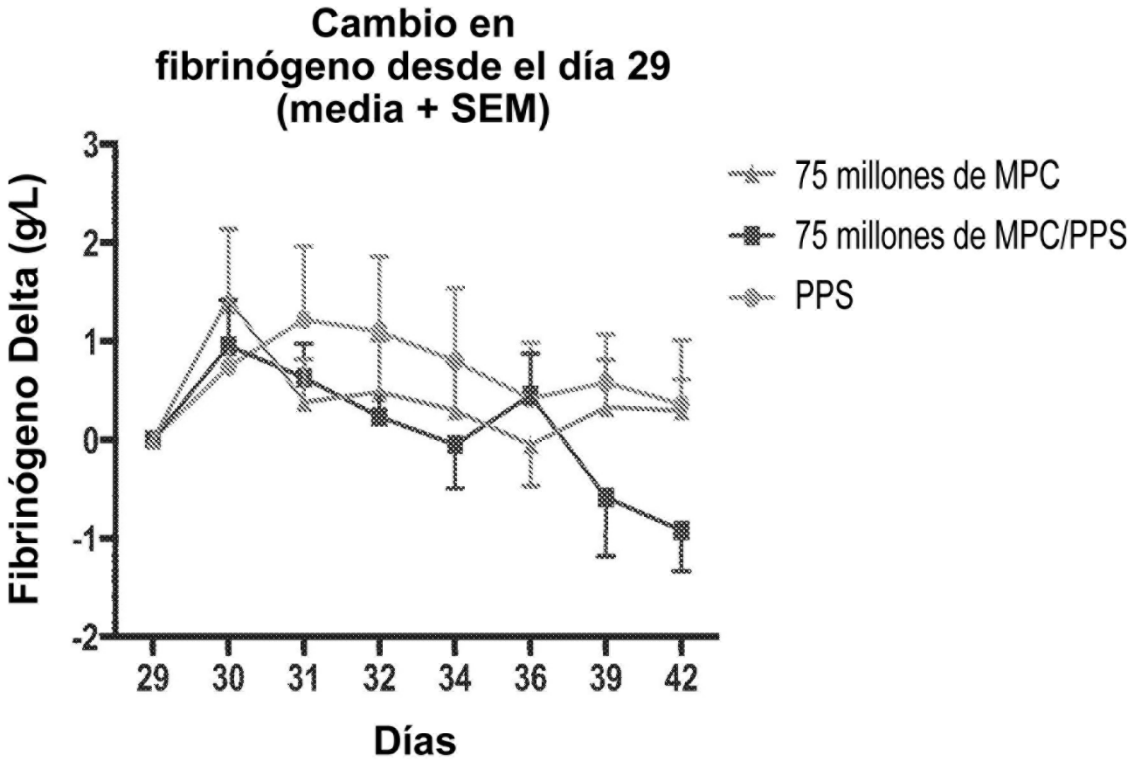

Cambio en
fibrinógeno desde el día 29
(media + SEM)
Fibrinógeno Delta (g/L)
3
2
1
0
-1
-2
29
30
31
32
34
36
39
42
Días
75 millones de MPC
75 millones de MPC/PPS
PPS

Figura 12

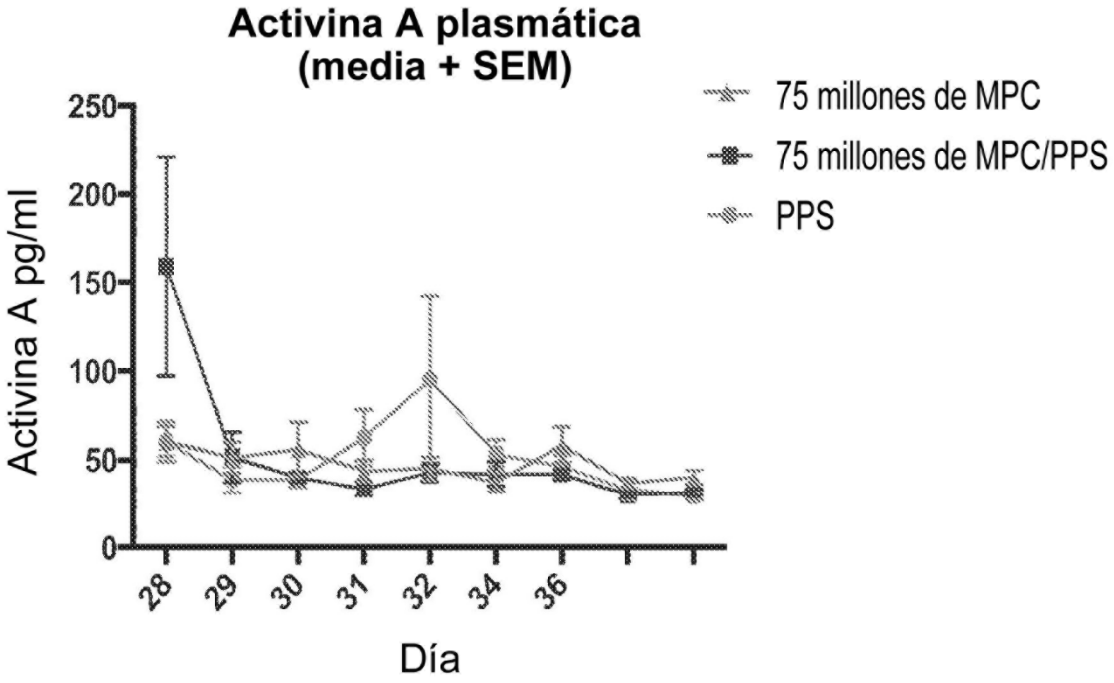

Activina A plasmática
(media + SEM)
75 millones de MPC
75 millones de MPC/PPS
PPS
Activina A pg/ml
250
200
150
100
50
0
28
29
30
31
32
34
36
Día

Figura 13

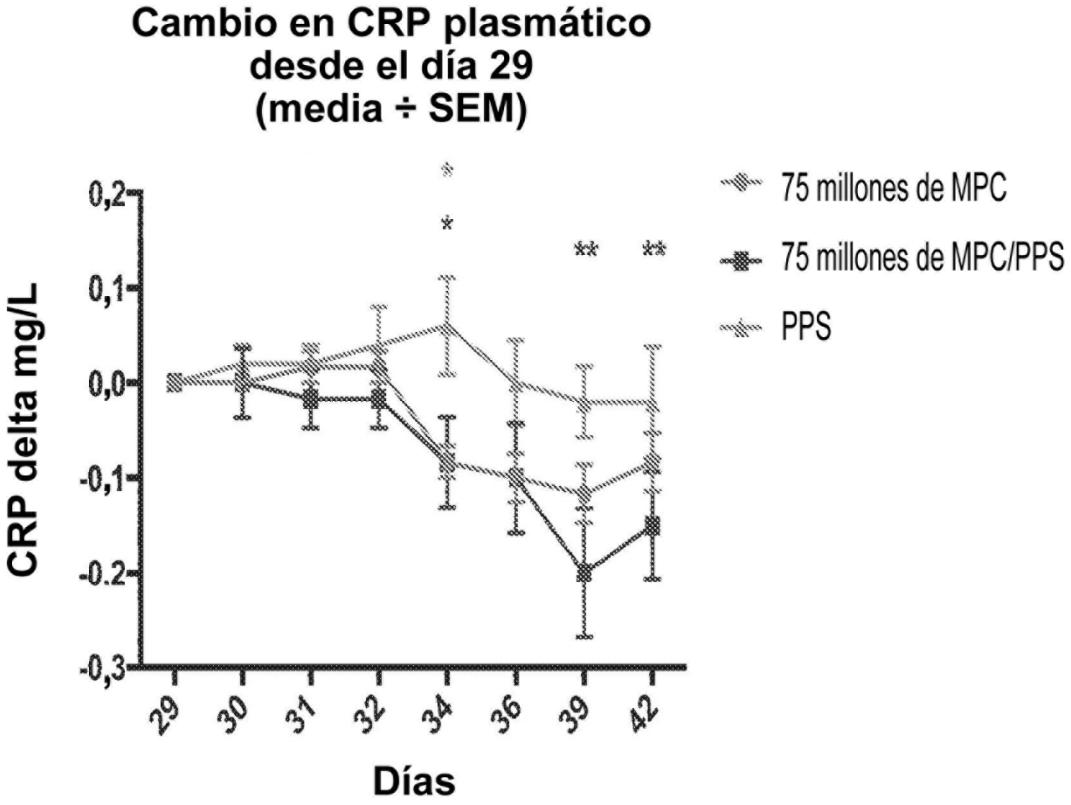

Cambio en CRP plasmático
desde el día 29
(media ÷ SEM)
CRP delta mg/L
0,2
0,1
0,0
-0,1
-0,2
-0,3
29
30
31
32
34
36
39
42
Días
*
*
**
**
75 millones de MPC
75 millones de MPC/PPS
PPS

Figura 14

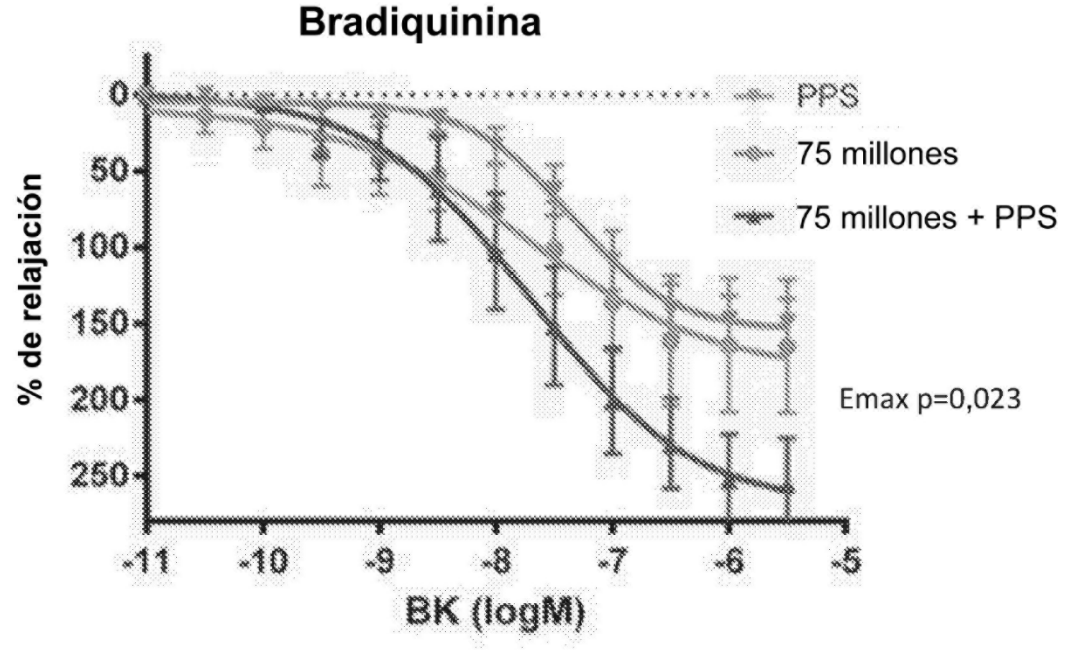


Figura 15A

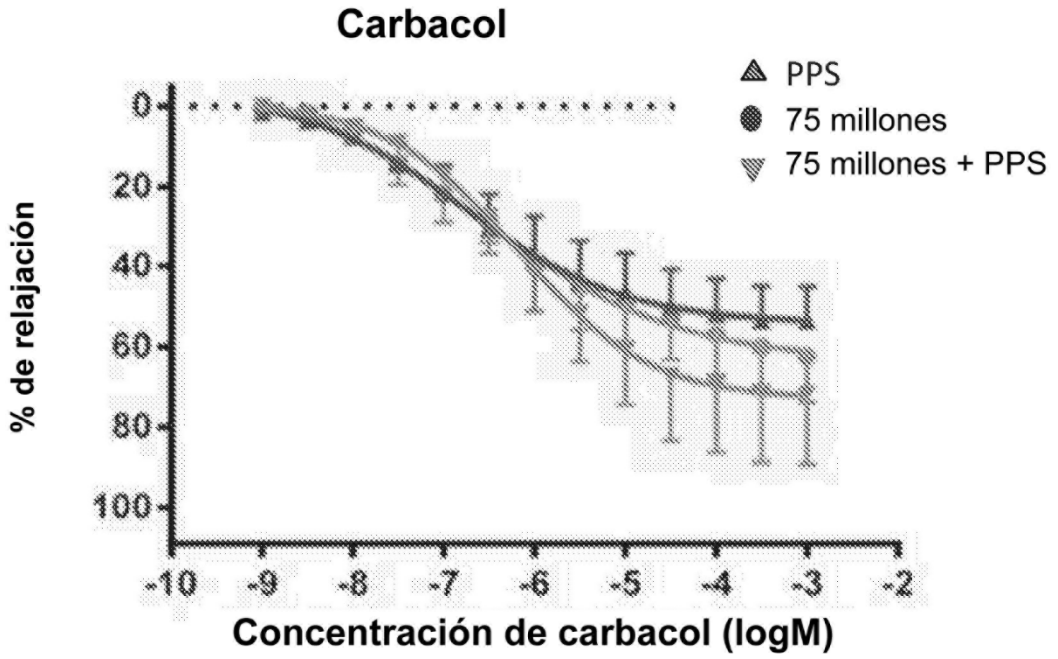


Figura 15B

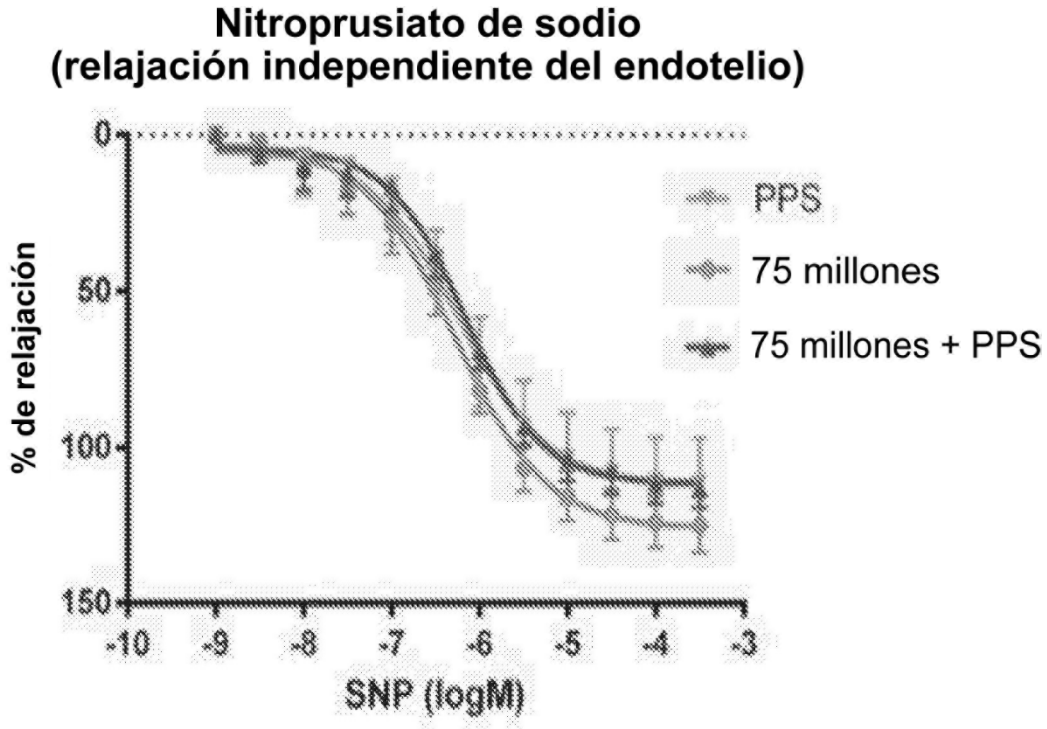


Figura 15C

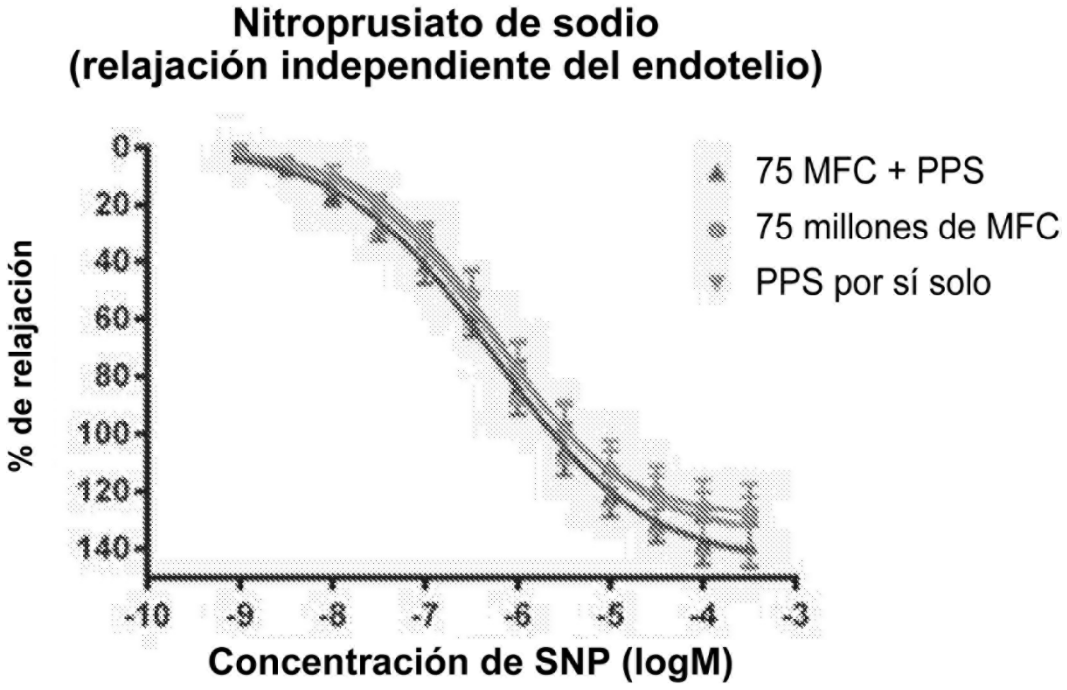


Figura 15D