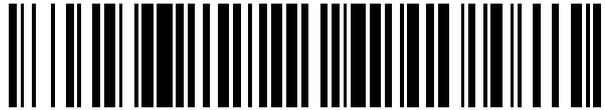


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 323**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/545** (2015.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/IB2014/001666**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184666**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14780560 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2992088**

54 Título: **Terapia celular para síndromes mielodisplásicos**

30 Prioridad:

**30.04.2013 US 201361817625 P**

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

**08.04.2020**

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (100.0%)  
Minderbroedersstraat 8A - bus 5101  
3000 Leuven, BE**

72 Inventor/es:

**ROOBROUCK, VALERIE;  
DELFORGE, MICHEL y  
VERFAILLIE, CATHERINE, M.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 753 323 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Terapia celular para síndromes mielodisplásicos

## 5 Campo de la invención

La divulgación se refiere a métodos para tratar síndromes mielodisplásicos (MDS). La divulgación generalmente se refiere a administrar células que proporcionan al menos un efecto clínico positivo, es decir, aliviando uno o más síntomas evidentes o efectos biológicos subyacentes de la enfermedad. La divulgación también se refiere a métodos de descubrimiento de fármacos para detectar agentes que modulan la capacidad de las células administradas para lograr estos efectos. También se describen en el presente documento bancos de células que pueden usarse para proporcionar células para administración a un sujeto, comprendiendo los bancos células que tienen una potencia deseada para lograr estos efectos. También se describen en el presente documento composiciones que comprenden células de potencia específica para lograr estos efectos, como en las composiciones farmacéuticas. También se describen en el presente documento métodos para evaluar la eficacia de la dosis de las células para lograr estos efectos en un paciente evaluando los efectos *in vivo* o *in vitro*. También se describen en el presente documento métodos de diagnóstico realizados antes de administrar las células a un sujeto a tratar, incluidos ensayos para evaluar la potencia deseada de las células a administrar. También se describen en el presente documento ensayos de diagnóstico posteriores a la administración para evaluar el efecto de las células en un sujeto que se está tratando y ajustar el régimen de dosificación. Estos ensayos se pueden realizar de forma continua junto con el tratamiento. Las células descritas en el presente documento son células madre no embrionarias, no germinales que pueden caracterizarse por uno o más de los siguientes: replicación extendida en cultivo y marcadores expresos de replicación extendida, tales como telomerasa, marcadores expresos de pluripotencialidad y tienen amplia diferenciación potencial, no son tumorigénicas o transformadas, y tienen un cariotipo normal.

## 25 Antecedentes de la invención

Los síndromes mielodisplásicos primarios (MDS) son trastornos de células madre hematopoyéticas clonales (HSC) caracterizados por hematopoyesis ineficaz y citopenias periféricas. Los defectos intrínsecos en los HSC así como los defectos extrínsecos en el nicho de la médula ósea (BM) contribuyen a la patogénesis de los MDS. En algunos pacientes, los fármacos inmunomoduladores han mostrado una mejora significativa en las citopenias.

El trasplante de células madre, particularmente en pacientes más jóvenes (es decir, menores de 40 años), pacientes más gravemente afectados, ofrece el potencial de una terapia curativa. Se ha encontrado que el éxito del trasplante de médula ósea se correlaciona con la gravedad del MDS de acuerdo con lo determinado por el puntaje IPSS, con pacientes que tienen un puntaje IPSS más favorable tienden a tener un resultado más favorable con el trasplante (Oosterveld, M., et al. Br J. Haematol 123 (1): 81-9 (2003)).

## 40 Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que ciertas células tienen un efecto de mejora en los síndromes mielodisplásicos. También han descubierto que estas células pueden usarse *in vitro* para afectar la función de las células mieloides.

Debido a que los efectos pueden medirse fácilmente, por ejemplo, observando el efecto sobre las células de la médula ósea total o las células de sangre periférica derivadas de pacientes con MDS tratados, también se describe en este documento un marcador de diagnóstico en tiempo real para evaluar la eficacia y ajustar el régimen de dosificación de las células.

Debido a que existen ensayos *in vitro* e *in vivo* para medir la capacidad de las células para tratar los síndromes mielodisplásicos y producir los efectos deseados, se pueden identificar y depositar células potentes para uso futuro en el mercado.

Los síndromes mielodisplásicos son afecciones médicas hematológicas (relacionadas con la sangre) que se manifiestan con una producción ineficaz (o displasia) de la clase de células sanguíneas mieloides. En consecuencia, los pacientes con MDS pueden desarrollar anemia severa y requieren transfusiones de sangre. En algunos casos, los sujetos pueden desarrollar citopenia (recuentos sanguíneos bajos) causados por insuficiencia progresiva de la médula ósea. Dado que los síndromes mielodisplásicos son todos trastornos de las células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea (por ejemplo, véase la Figura 6) (solo relacionada con el linaje mieloides), de acuerdo con la presente invención, el tratamiento con las células descritas en este documento puede afectar el número y la calidad de las células que forman la sangre, reduciendo su disminución y promoviendo la producción de sangre.

Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos generalmente para mejorar los síntomas de MDS, reducir la anemia, reducir la citopenia, reducir la insuficiencia progresiva de la médula ósea y aumentar el número de células formadoras de sangre en el curso de la enfermedad (o prevenir o reducir una disminución).

65

En los síndromes mielodisplásicos, en lugar de producir glóbulos rojos maduros sanos, glóbulos blancos y plaquetas, la médula produce células que tienden a permanecer inmaduras y morir prematuramente. En la mayoría de los sujetos con estos síndromes, hay una mayor cantidad de células en la médula en comparación con los sujetos sanos (médula hiper celular), pero las células pueden no vivir lo suficiente como para salir de la médula al torrente sanguíneo. O, si salen de la médula, no permanecen en circulación por mucho tiempo antes de morir. Como resultado de esto, los sujetos con MDS tienen niveles bajos de uno o más tipos de células sanguíneas en su torrente sanguíneo (citopenia). Los niveles bajos de glóbulos rojos se denominan anemia, los niveles bajos de glóbulos blancos como leucopenia y los niveles bajos de plaquetas como trombocitopenia. Son los bajos niveles de estas células sanguíneas o los bajos recuentos sanguíneos que causan los síntomas evidentes de MDS.

Estos síndromes pueden caracterizarse por células que tienden a permanecer inmaduras. En tales pacientes, la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento se pueden detectar no solo por el número de glóbulos rojos maduros, glóbulos blancos y plaquetas, sino por el número de células inmaduras, es decir, células blásticas, en la médula ósea y la sangre. Esto se aplica a los pacientes con MDS de alto riesgo donde aumenta el porcentaje de blastos. Los pacientes con MDS de bajo riesgo tienen un porcentaje normal de blastos.

En consecuencia, después de la administración de las células descritas en el presente documento, se pueden evaluar las células en la médula ósea y/o la sangre periférica, incluidas todas las células diferenciadas terminalmente que incluyen plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos, también como, precursores inmaduros de estas células. La dosificación se puede ajustar en consecuencia.

Por consiguiente, la presente divulgación está dirigida a lograr ciertos efectos, que incluyen los síntomas físicos evidentes de MDS descritos anteriormente y los puntos finales biológicos subyacentes, tales como números anormales de glóbulos rojos, glóbulos blancos y/o plaquetas, también como números anormales de precursores de estas células hematopoyéticas diferenciadas terminalmente. Las células, por lo tanto, mueven los números de estas células hacia niveles más normales. Es decir, reducen la pérdida de estas células hematopoyéticas diferenciadas terminalmente y reducen el aumento de las células precursoras más inmaduras (blastos).

Los métodos anteriores se llevan a cabo administrando ciertas células a un sujeto. Las células incluyen, pero no se limitan a, células que no son células madre embrionarias y no células germinales, que tienen algunas características de células madre embrionarias, pero que se derivan de tejido no embrionario y que proporcionan los efectos descritos en esta solicitud. Las células pueden lograr naturalmente estos efectos (es decir, no modificados genéticamente o farmacéuticamente). Sin embargo, los expresores naturales pueden modificarse genética o farmacéuticamente para aumentar la potencia.

Las células pueden expresar marcadores de pluripotencia, tales como oct4. También pueden expresar marcadores asociados con una capacidad replicativa extendida, como la telomerasa. Otras características de la pluripotencia pueden incluir la capacidad de diferenciarse en tipos de células de más de una capa germinal, tal como dos o tres capas germinales embrionarias ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Dichas células pueden o no ser inmortalizadas o transformadas en cultivo. Las células pueden expandirse mucho sin transformarse y también mantener un cariotipo normal. Por ejemplo, las células madre no germinales no embrionarias pueden haber sufrido al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo, tal como 50, 60 o más, en donde las células no se transforman y tienen un cariotipo normal. Las células pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los dos linajes embrionarios endodérmicos, ectodérmicos y mesodérmicos y pueden incluir la diferenciación en los tres. Además, las células pueden no ser tumorigénicas, tal como no producir teratomas. Si las células se transforman o son tumorigénicas, y es deseable usarlas para infusión, dichas células pueden desactivarse para que no puedan formar tumores *in vivo*, como por el tratamiento que previene la proliferación celular en tumores. Tales tratamientos son bien conocidos en la técnica.

Las células descritas en el presente documento incluyen:

1. Células madre no embrionarias no germinales, expandidas aisladas, las células que han sufrido al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo, en donde las células expresan oct4, no se transforman y tienen un cariotipo normal.

2. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 1 anterior que expresan adicionalmente una o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.

3. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 1 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.

4. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 3 anterior que expresan adicionalmente una o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.

5. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 3 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmicos y mesodérmico.

6. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 5 anterior que expresan además una o más de telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 5 7. Las células madre no embrionarias expandidas, no germinales aisladas que se obtienen por cultivo de tejido no embrionario, no germinal, habiendo sufrido las células al menos 40 duplicaciones de células en cultivo, en donde las células no se transforman y tienen un cariotipo normal.
8. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 7 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 10 9. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 7 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
- 15 10. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 9 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
11. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 9 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
- 20 12. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 11 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
13. Células madre no embrionarias expandidas, no germinales aisladas, las células que han sufrido al menos 10-40 duplicaciones celulares en cultivo, en donde las células expresan telomerasa, no se transforman y tienen un cariotipo normal.
- 25 14. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 13 anteriores que además expresan uno o más de oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 30 15. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 13 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
16. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 15 anterior que además expresan uno o más de oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 35 17. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 15 anteriores que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
18. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 17 anterior que además expresan uno o más de oct4, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 40 19. Células madre no germinales expandidas y no embrionarias aisladas que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de al menos dos de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico, dichas células han sufrido al menos 10-40 duplicaciones de células en cultivo.
- 45 20. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 19 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
21. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 19 anterior que pueden diferenciarse en al menos un tipo de célula de cada uno de los linajes embrionarios endodérmico, ectodérmico y mesodérmico.
- 50 22. Las células madre no embrionarias, no germinales del numeral 21 anterior que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, rox-1 o sox-2.
- 55 El sujeto descrito en el presente documento puede ser humano.

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

60 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para evaluar la potencia de una célula, siendo la célula una célula progenitora adulta multipotente caracterizada porque la célula es una célula no embrionaria, no germinal que expresa uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1, el método comprende analizar la potencia de la célula para mejorar la diferenciación, proliferación o esperanza de vida (viabilidad) de glóbulos rojos, leucocitos, plaquetas o precursores de estas células.

Las células no embrionarias, no germinales pueden expresar telomerasa. En esta realización, las células no embrionarias no germinales pueden ser capaces de diferenciarse en tipos de células de al menos dos de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.

5 Las células no embrionarias no germinales pueden ser capaces de diferenciarse en tipos de células de al menos dos capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica. Las células no embrionarias no germinales pueden diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.

10 Las células no embrionarias, no germinales pueden expresar oct4. En esta realización, las células no embrionarias no germinales pueden ser capaces de diferenciarse en tipos de células de al menos dos de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.

15 En una realización, las células no embrionarias, no germinales expresan oct4 y telomerasa y pueden diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.

Las células no embrionarias, no germinales pueden derivarse de la médula ósea humana.

20 En una realización, las células no embrionarias, no germinales no son tumorigénicas ni están transformadas y tienen un cariotipo normal.

25 El ensayo de la potencia de la célula puede incluir un ensayo de formación de colonias. El ensayo de la potencia de la célula puede realizarse mediante la detección de genes modulados por las células o mediante la detección de genes expresados por las células. Los genes pueden seleccionarse del grupo que consiste en osteopontina, factor de células madre y Angpt1. Los genes que expresan las células pueden detectarse mediante ELISA, Luminex, qRT-PCR, transferencias Western antifactor o inmunohistoquímica de factor.

30 El método de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede comprender además seleccionar células que tengan dicha potencia y, opcionalmente, comprender además crear un banco de células que comprenda las células que tengan dicha potencia.

35 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona células para su uso en un método para tratar un síndrome mielodisplásico en un sujeto, siendo las células, células no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1, o rox-1, en donde se ha evaluado la potencia de las células de acuerdo con el método del primer aspecto de la invención y en el que se ha descubierto que las células tienen una potencia para mejorar la diferenciación, proliferación o vida útil (viabilidad) de los glóbulos rojos, leucocitos, plaquetas o precursores de estas células.

40 En vista de la propiedad de las células para lograr los efectos deseados, las células pueden usarse en métodos de descubrimiento de fármacos para detectar un agente que afecte la capacidad de las células para lograr cualquiera de los efectos. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros de ADN de ARNpi, péptidos, anticuerpos, proteínas que no son anticuerpos, citoquinas, quimiocinas y quimio-atrayentes.

45 En vista de la propiedad de las células para lograr los efectos, se pueden establecer bancos de células que contienen células que se seleccionan por tener la potencia deseada para lograr cualquiera de los efectos. El banco puede proporcionar una fuente para hacer una composición farmacéutica para administrar a un sujeto. Las células se pueden usar directamente desde el banco o expandirse antes de su uso. Especialmente en el caso de que las células se sometan a una expansión adicional, después de la expansión es deseable validar que las células todavía tienen la potencia deseada. Los bancos permiten el uso "inmediato" de células que son alogénicas para el sujeto.

50 Por consiguiente, también se describen en el presente documento procedimientos de diagnóstico realizados antes de administrar las células a un sujeto. Los procedimientos incluyen evaluar la potencia de las células para lograr los efectos descritos en esta solicitud. Las células pueden tomarse de un banco de células y usarse directamente o expandirse antes de la administración. En cualquier caso, las células podrían evaluarse para la potencia deseada. Especialmente en el caso de que las células se sometan a una expansión adicional, después de la expansión es deseable validar que las células todavía tengan la potencia deseada. O las células pueden derivarse del sujeto y expandirse antes de la administración. En este caso, también, las células podrían evaluarse para la potencia deseada antes de la administración de nuevo al sujeto (autólogo).

60 En un entorno clínico, se pueden administrar las células después de obtener una línea base analizando los números de los diversos glóbulos rojos y blancos y plaquetas, así como sus precursores inmaduros, directamente o por medio de la expresión génica, y luego, después de la administración de las células durante el tratamiento, controlar una o más veces para detectar uno o más de estos efectos. Entonces se podría determinar la dosis optimizada para el tratamiento.

65

Por consiguiente, también se describen en el presente documento procedimientos de diagnóstico realizados antes de administrar las células a un sujeto, los procedimientos previos al diagnóstico que incluyen evaluar la potencia de las células para lograr uno o más de los efectos deseados. Las células pueden tomarse de un banco de células y usarse directamente o expandirse antes de la administración. En cualquier caso, las células se evaluarían para la potencia deseada. O las células pueden derivarse del sujeto y expandirse antes de la administración. También en este caso, se evaluaría la potencia deseada de las células antes de la administración.

Aunque las células seleccionadas para los efectos se analizan necesariamente durante el procedimiento de selección, puede ser preferible y prudente volver a analizar las células antes de la administración a un sujeto para tratamiento para confirmar que las células aún logran los efectos a los niveles deseados. Esto es particularmente preferible cuando las células se han almacenado durante cualquier período de tiempo, tal como en un banco de células, donde las células probablemente se congelan durante el almacenamiento.

Con respecto a los métodos de tratamiento con células que logran los efectos deseados, entre el aislamiento original de las células y la administración a un sujeto, puede haber múltiples ensayos (es decir, secuenciales) para los efectos. Esto es para confirmar que las células aún pueden lograr los efectos, en los niveles deseados, después de las manipulaciones que ocurren dentro de este marco de tiempo. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo después de cada expansión de las células. Si las células se almacenan en un banco de células, se pueden analizar después de liberarlas del almacenamiento. Si están congeladas, se pueden analizar después de la descongelación. Si las células de un banco de células se expanden, se pueden analizar después de la expansión. Preferiblemente, se puede analizar una porción del producto celular final (que se administra físicamente al sujeto).

En el presente documento también se describen ensayos de diagnóstico posteriores al tratamiento, después de la administración de las células, para evaluar la eficacia.

En el presente documento también se describe un método para establecer la dosificación de tales células evaluando la potencia de las células para lograr uno o más de los efectos anteriores. En este caso, se determinaría la potencia y la dosis se ajustaría en consecuencia.

En este caso, se controlaría la eficacia, mediante métodos que incluyen uno o más de los ensayos descritos en esta solicitud, para establecer y mantener un régimen de dosificación adecuado.

En el presente documento también se describen composiciones que comprenden una población de células que tienen una potencia deseada para lograr los efectos deseados. Dichas poblaciones pueden encontrarse como composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto y/o en bancos de células a partir de las cuales las células pueden usarse directamente para la administración a un sujeto o expandirse antes de la administración. Las células pueden tener una potencia mejorada (aumentada) en comparación con la población de células anterior (progenitora). Las células progenitoras son como se definen en el presente documento. La mejora puede ser mediante la selección de expresores naturales o por factores externos que actúan sobre las células.

Por consiguiente, cualquiera de los indicadores descritos en el presente documento puede controlarse durante el tratamiento con los métodos y las células de acuerdo con la divulgación actual.

Para todos estos tratamientos, se administrarían las células que logran los efectos descritos en esta solicitud. Dichas células podrían haber sido evaluadas para la potencia y seleccionadas para la potencia deseada.

Se entiende, sin embargo, que para el tratamiento de cualquiera de las condiciones anteriores, puede ser conveniente usar tales células; es decir, una que ha sido evaluada para lograr los efectos deseados y seleccionada para un nivel deseado de eficacia antes de la administración para el tratamiento de la afección.

La patología puede ser el resultado del fracaso de la proliferación y/o diferenciación normal de las células precursoras mieloides y las células son células no embrionarias, no germinales que expresan marcadores de pluripotencialidad, por ejemplo, uno o más de telomerasa, rex-1, sox-2, oct4, rox-1, nanog, SSEA-1 y SSEA-4, y/o tienen un amplio potencial de diferenciación, por ejemplo, al menos dos de los tipos de células ectodérmica, endodérmica y mesodérmica.

Las células pueden prepararse mediante las condiciones de aislamiento y cultivo descritas en este documento. Pueden prepararse por condiciones de cultivo que se describen en este documento que implican concentraciones de oxígeno más bajas combinadas con suero más alto, tal como los utilizados para preparar las células denominadas "MultiStem®".

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1 - La edad, la celularidad de la BM y el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> en controles jóvenes (n = 16), controles pareados por edad (n = 7), pacientes con MDS (n = 17) y pacientes con citopenias desconocidas (n = 7)

Figura 2 - Ensayo de CFC con y sin MultiStem (SJA de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestran los números de colonias BFU-E y CFU-GM en pacientes y controles de la misma edad.

5 Figura 3 - Ensayo de CFC con y sin MAPC (B30E2 de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestran los números de colonias BFU-E y CFU-GM en pacientes y controles de la misma edad.

10 Figura 4 - Panel izquierdo = ensayo LTC-IC con y sin MultiStem (SJA de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestra el número de LTC-IC totales por 15.000 células CD34<sup>+</sup> sembradas en pacientes y controles de la misma edad. Panel derecho = Morfología de contraste de fase de colonias CFU-GM de una muestra de paciente con MDS con y sin MultiStem (50x, Axiovert 40C, Zeiss).

15 Figura 5 - Ensayo LTC-IC con y sin MultiStem (SVG de donante en SJA de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo, con medio MultiStem solo (en un dispositivo Transwell), con MultiStem (SJA) en contacto directo, con MultiStem (SJA) administrado intermitentemente. Se muestra el número de LTC-IC totales por cada 15.000 células CD34<sup>+</sup> sembradas en pacientes con MDS de bajo riesgo y citopenias desconocidas.

Figura 6 - Esquema del desarrollo hematopoyético. CLP: progenitor linfóide común. CMP: progenitor mielóide común. LT-HSC: células madre hematopoyéticas a largo plazo. ST-HSC: células madre hematopoyéticas a corto plazo.

20 Descripción detallada de la invención

Los encabezados de las secciones se usan en este documento solo con fines organizativos y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del tema descrito.

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

#### Definiciones

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

40 Un "banco de células" es la nomenclatura de la industria para las células que se han cultivado y almacenado para su uso futuro. Las células pueden almacenarse en alícuotas. Se pueden usar directamente fuera del almacenamiento o se pueden expandir después del almacenamiento. Esto es una conveniencia para que haya células disponibles para la administración. Las células pueden estar almacenadas en un excipiente farmacéuticamente aceptable para que puedan administrarse directamente o pueden mezclarse con un excipiente apropiado cuando se liberan del almacenamiento. Las células pueden congelarse o almacenarse de otra manera en una forma para preservar la viabilidad. En una realización de la invención, se crean bancos de células en los que las células se han seleccionado para potencia mejorada para lograr los efectos descritos en esta solicitud. Después de liberación del almacenamiento, y antes de la administración al sujeto, puede ser preferible volver a analizar la potencia de las células. Esto se puede hacer utilizando cualquiera de los ensayos, directos o indirectos, descritos en esta solicitud o conocidos en la técnica. Luego, las células que tienen la potencia deseada se puede administrar al sujeto para el tratamiento. Los bancos se pueden hacer utilizando células derivadas del individuo a tratar (de sus tejidos prenatales, como placenta, sangre del cordón umbilical o matriz del cordón umbilical o expandirse del individuo en cualquier momento después del nacimiento). O los bancos pueden contener células para usos alogénicos.

"Coadministrar" significa administrar conjuntamente entre sí, juntos, de manera coordinada, incluyendo la administración simultánea o secuencial de dos o más agentes.

55 "Comprender" significa, sin otra limitación, incluido el referente, necesariamente, sin ninguna calificación o exclusión sobre qué más puede incluirse. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" abarca cualquier composición que contenga x e y, sin importar qué otros componentes puedan estar presentes en la composición. Del mismo modo, "un método que comprende la etapa de x" abarca cualquier método en el que se lleva a cabo x, ya sea que x sea la única etapa en el método o sea solo uno de las etapas, sin importar cuántas otras etapas pueda haber y no importa cuán simple o complejo sea x en comparación con ellos. "Compuesto por y frases similares que usan palabras de la raíz" "comprende" se usan en el presente documento como sinónimos de "que comprende" y tienen el mismo significado.

60 "Compuesto por" es un sinónimo de "que comprende" (véase más arriba).

65

Se descubrieron "células EC" a partir del análisis de un tipo de cáncer llamado teratocarcinoma. En 1964, los investigadores notaron que una sola célula en los teratocarcinomas podría aislarse y permanecer indiferenciada en cultivo. Este tipo de célula madre se conoció como una célula de carcinoma embrionario (célula EC).

5 "Cantidad efectiva" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado, por ejemplo, eficaz para mejorar los efectos indeseables de MDS, incluido el logro de los efectos deseados específicos descritos en esta solicitud. Por ejemplo, una cantidad efectiva es una cantidad suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado. Las cantidades efectivas se pueden proporcionar de una vez en una sola administración o en cantidades fraccionarias que proporcionan la cantidad efectiva en varias administraciones. La determinación  
10 precisa de lo que se consideraría una cantidad efectiva puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluido su tamaño, edad, lesión y/o enfermedad o lesión que se está tratando, y la cantidad de tiempo desde que se produjo la lesión o comenzó la enfermedad. Un experto en la materia podrá determinar la cantidad efectiva para un sujeto determinado basándose en estas consideraciones que son rutinarias en la técnica. Como se usa en este documento, "dosis efectiva" significa lo mismo que "cantidad efectiva".

15 "Ruta efectiva" generalmente significa una ruta que proporciona la entrega de un agente a un compartimento, sistema o ubicación deseados. Por ejemplo, una ruta efectiva es aquella a través de la cual se puede administrar un agente para proporcionar en el sitio deseado de acción una cantidad suficiente del agente para obtener un resultado clínico beneficioso o deseado.

20 Las "células madre embrionarias (ESC)" son bien conocidas en la técnica y se han preparado a partir de muchas especies de mamíferos diferentes. Las ESC se describen en este documento solo como referencia, ya que no están cubiertas por las reivindicaciones. Las células madre embrionarias son células madre derivadas de la masa celular interna de un embrión en etapa temprana conocido como blastocisto. Son capaces de diferenciarse en todos los derivados de las tres capas germinales primarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estos incluyen cada uno de  
25 los más de 220 tipos de células en el cuerpo adulto. Las células ES pueden convertirse en cualquier tejido del cuerpo, excluyendo la placenta. Solo las células de la mórula son totipotentes, capaces de convertirse en todos los tejidos y en una placenta. Algunas células similares a las ESC pueden ser producidas por transferencia nuclear de un núcleo de células somáticas en un óvulo fertilizado enucleado.

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

Las "células madre hematopoyéticas" son las células sanguíneas que dan lugar a todas las demás células sanguíneas y se derivan del mesodermo.

35 Dan origen a los mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linajes linfoides (células T, células B, células NK). La definición de células madre hematopoyéticas ha cambiado en las últimas dos décadas. El tejido hematopoyético contiene células con capacidades de regeneración a corto y largo plazo y progenitores multipotentes, oligopotentes y unipotentes comprometidos. Las HSC constituyen 1:10.000 de células en tejido mielóide.

40 Las HSC son una población heterogénea. Existen tres clases de células madre, que se distinguen por su proporción de progenie linfóide a mielóide (L/M) en la sangre. Las HSC con sesgo mielóide (My-bi) tienen una relación L/M baja ( $> 0, < 3$ ), mientras que las HSC con sesgo linfóide (Ly-bi) muestran una proporción grande ( $> 10$ ). La tercera categoría consiste en las HSC balanceadas (Bala) para las cuales  $3 \leq L/M \leq 10$ . Solo las HSC con sesgo mielóide y balanceadas tienen propiedades de autorrenovación duraderas. Además, los experimentos de trasplante en serie han demostrado que cada subtipo recrea preferentemente su distribución de tipo de células sanguíneas, lo que sugiere un programa epigenético heredado para cada subtipo.

50 Como células madre, las HSC se definen por su capacidad de reponer todos los tipos de células sanguíneas y su capacidad de autorrenovación.

Heterogeneidad de células madre. Originalmente se creía que todas las HSC eran iguales en sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. Esta visión fue cuestionada por primera vez por el descubrimiento en 2002 por el grupo Muller-Sieburg en San Diego, que ilustró que diferentes células madre pueden mostrar distintos patrones de repoblación que son propiedades intrínsecas epigenéticamente predeterminadas de HSC clonales Thy-1<sup>lo</sup> SCA-1<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup>[3][4][5]. Los resultados de estos estudios clonales condujeron a la noción de sesgo de linaje. Usando la relación  $\rho = L/M$  de células linfoides (L) a mieloides (M) en la sangre como un marcador cuantitativo, el compartimento de células madre se puede dividir en tres categorías de HSC. Las HSC balanceadas (Bala) repueblan glóbulos blancos periféricos  
55 en la misma proporción de células mieloides a linfoides que se observa en ratones no manipulados (en promedio aproximadamente 15% de células mieloides y 85% de linfoides, o  $3 \leq \rho \leq 10$ ). Las HSC con sesgo mieloides (My-bi) da lugar a muy pocos linfocitos, lo que da como resultado relaciones  $0 < \rho < 3$ , mientras que las HSC con sesgo linfóide (Ly-bi) generan muy pocas células mieloides, lo que da como resultado relaciones de linfoides a mieloides de  $10 < \rho < \infty$ . Los tres tipos son tres tipos normales de HSC, y no representan etapas de diferenciación. Más bien, estas son tres clases de HSC, cada una con un programa de diferenciación epigenéticamente fijo. Estos estudios también mostraron que el sesgo de linaje no está regulado estocásticamente ni depende de las diferencias en la

influencia ambiental. Las HSC My-bi se renuevan automáticamente por más tiempo que el las HSC balanceadas Ly-bi. El sesgo mieloide resulta de la capacidad de respuesta reducida a la linfopoyetina Interleuquina 7 (IL-7)<sup>[4]</sup>.

Después de esto, otros grupos confirmaron y destacaron los hallazgos originales<sup>[6]</sup>. Por ejemplo, el grupo de Eaves confirmó en 2007 que la cinética de repoblación, la capacidad de autorrenovación a largo plazo y My-bi y Ly-bi son propiedades de las HSC intrínsecamente heredadas en forma estable<sup>[7]</sup>. En 2010, el grupo de Goodell proporcionó información adicional sobre la base molecular del sesgo de linaje en la población lateral (SP) de HSC: SCA-1<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup><sup>[8]</sup>. Como se mostró anteriormente para la señalización de IL-7, se encontró que un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF-beta) induce e inhibe la proliferación de HSC My-bi y Ly-bi, respectivamente.

Marcadores. En referencia al fenotipo, las células madre hematopoyéticas se identifican por su pequeño tamaño, falta de marcadores de linaje (lin), baja tinción (población lateral) con colorantes vitales tales como rodamina 123 (rodamina<sup>DULL</sup>, también llamada ro<sup>o</sup>) o Hoechst 33342, y la presencia de varios marcadores antigénicos en su superficie.

Grupo de diferenciación y otros marcadores. Muchos de estos marcadores pertenecen al grupo de series de diferenciación, tales como: CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, y también c-kit, el receptor para el factor de células madre. Las células madre hematopoyéticas son negativas para los marcadores que se utilizan para la detección del compromiso de linaje y, por lo tanto, se llaman Lin<sup>-</sup>; y, durante su purificación por FACS, un grupo de hasta 14 marcadores de linaje sanguíneo maduros diferentes, por ejemplo, CD13 y CD33 para células mieloide, CD71 para eritroide, CD19 para B, CD61 para megacariocíticas, etc., para humanos; y B220 (CD45 murinas) para células B, Mac-1 (CD11b/CD18) para monocitos, Gr-1 para granulocitos, Ter119 para células eritroides, I17Ra, CD3, CD4, CD5, CD8 para células T, etc. (para ratones). Los anticuerpos se usan como una mezcla para agotar las células lin<sup>+</sup> o los progenitores multipotentes tardíos (MPP).

Hay muchas diferencias entre los marcadores de células hematopoyéticas humanas y de ratones para el tipo comúnmente aceptado de células madre hematopoyéticas<sup>[9]</sup>.

- HSC de ratón: CD34<sup>lo/-</sup>, SCA-1<sup>+</sup>, Thy1.1<sup>+/lo</sup>, CD38<sup>+</sup>, C-kit<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>
- HSC humanas: CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy1/CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>lo/-</sup>, C-kit/CD117<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>

Código SLAM. Actualmente están surgiendo métodos alternativos que podrían dar lugar a una cosecha similar o mejor de células madre. Uno de estos métodos utiliza una firma de la familia *SLAM* de moléculas de superficie celular. La familia *SLAM* (molécula de activación de linfocitos de señalización) es un grupo de más de 10 moléculas cuyos genes se encuentran principalmente en tándem en un solo locus en el cromosoma 1 (ratón), todos pertenecientes a un subconjunto de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, y originalmente se pensó que estaban involucrados en la estimulación de células T. Esta familia incluye CD48, CD150, CD244, etc., siendo CD150 el miembro fundador y, por lo tanto, también llamado slamF1, es decir, miembro 1 de la familia *SLAM*.

Los códigos *SLAM* de firma para la jerarquía hemopoyética son:

- Células madre hematopoyéticas (HSC): CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> CD244<sup>-</sup>
- Células progenitoras multipotentes (MPP): CD150<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup> CD244<sup>+</sup>
- Células progenitoras con restricción de linaje (LRP): CD150<sup>-</sup> CD48<sup>+</sup> CD244<sup>+</sup>
- Progenitor mieloide común (CMP): lin SCA-1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>mid</sup>
- Progenitor de granulocitos y macrófagos (GMP): lin SCA-1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD16/32<sup>hi</sup>
- Progenitor de eritroides megacariocitos (MEP): lin SCA-1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD16/32<sup>low</sup>

Para las HSC, CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> fue suficiente en lugar de CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD244<sup>-</sup> porque CD48 es un ligando para CD244, y ambos serían positivos solo en los progenitores de linaje restringido activados. El trabajo reciente ha demostrado que este método excluye una gran cantidad de HSC e incluye una cantidad igualmente grande de células no madre<sup>[13]</sup><sup>[14]</sup>. CD150<sup>+</sup> CD48<sup>-</sup> produjeron una pureza de células madre comparable a Thy1<sup>lo</sup>SCA-1<sup>+</sup>lin c-kit<sup>+</sup> en ratones<sup>[15]</sup>.

Los osteoclastos también surgen de células hemopoyéticas del linaje de monocitos/neutrófilos, específicamente CFU-GM.

Comité	"linfo"	"rubri"	"granulo" o "mielo"	"mono"	"megacario"
<i>Linaje</i>	Linfoide	Mieloide	Mieloide	Mieloide	Mieloide
<i>CFU</i>	CFU-L	CFU-GEMM→CFU-E	CFU-GEMM→CFU-GM→CFU-G	CFU-GEMM→CFU-GM→CFU-M	CFU-GEMM→CFU-Meg
<i>Proceso</i>	linfocitopoyesis	eritropoyesis	granulocitopoyesis	monocitopoyesis	trombocitopoyesis
<i>[raiz]blasto</i>	Linfoblasto	Proeritroblasto	Mieloblasto	Monoblasto	Megacarioblasto
<i>pro[raiz]cito</i>	Prolinfocito	Eritrocito policromatofílico	Promielocito	Promonocito	Promegacariocito
<i>[raiz]cito</i>	-	Normoblasto	Mielocito eosino/neutro/basófilo		Megacariocito
<i>meta[raiz]cito</i>	Linfocito grande	Reticulocito	Metamielocito eosinófilo/neutrófilo/basófilo, célula de banda eosinófila/neutrófila/basófila	Monocito temprano	-
<i>nombre de la célula madura</i>	Linfocito pequeño	Eritrocito	Granulocitos (Eosino/neutrón/basófilo)	Monocito	Trombocitos (Plaquetas)

Unidades formadoras de colonias

Hay varios tipos de unidades formadoras de colonias:

- 5 • Unidad formadora de colonias de linfocitos (CFU-L)
- Unidad formadora de colonias de eritrocitos (CFU-E)
- 10 • Unidad formadora de colonias de granulo-monocitos (CFU-GM)
- Unidad formadora de colonias de megacariocitos (CFU-Me)
- Unidad formadora de colonias de Basófilos (CFU-B)
- 15 • Unidad formadora de colonias de Eosinófilos (CFU-Eo)

Las CFU anteriores se basan en el linaje. Otra CFU, la unidad formadora de colonias del bazo (CFU-S) fue la base de una formación de colonias clonales *in vivo*, que depende de la capacidad de las células de médula ósea infundidas para dar lugar a clones de células hematopoyéticas maduras en los bazo de los ratones irradiados después de 8 a 20 días. Se utilizó ampliamente en los primeros estudios, pero ahora se considera que mide células progenitoras más maduras o células amplificadoras de tránsito en lugar de células madre.

1. "5. Hematopoietic Stem Cells." Stem Cell Information. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 17 de junio de 2011. Web. 9 de noviembre de 2013. <<http://stemcells.nih.gov/info/scirepost/pages/chapter5.aspx>>

2. Dzierzak & Speck, Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells, Nature Immunology, 2008

3. Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB, Deterministic regulation of haematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood. 2002; 100; 1302-9

4. <sup>b</sup> Muller-Sieburg CE, Cho RH, Karlson L, Huang JF, Sieburg HB. Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood. 2004; 103:4111-8

5. Sieburg HB, Cho RH, Dykstra B, Eaves, CJ, Muller-Sieburg, CE. The haematopoietic stem cell compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. Blood. 2006; 107:2311-6. Epub 15 de noviembre de 2005

6. Schroeder, T. Haematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. Cell Stem Cell 2010. DOI 10.1016/j.stem.2010.02.006

7. Dykstra, B et al. Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo. Cell Stem Cell, Volumen 1, Publicación 2, 218-229, 16 de agosto de 2007

8. Challen, G., Boles, NC, Chambers, SM, Goodell, MA. Distinct Haematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF-beta1. Cell Stem Cell 2010. DOI 10.1016/j.stem.2010.02.002

13. David C Weksberg, Stuart M Chambers, Nathan C Boles, y Margaret A Goodell. CD150 negative Side Population cells represent a functionally distinct population of long-term haematopoietic stem cells. Blood 2007: blood-2007-09-115006v1

14. Gary Van Zant Stem cell markers: less is more! Blood 107: 855-856.

15. Kiel et al., Cell, Vol. 121, 1109-1121, 1 de julio de 2005, Copyright ©2005 por Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cell.2005.05.026

"Incremento" o "incrementar" significa inducir un evento biológico por completo o incrementar el grado del evento.

Las "células madre pluripotentes inducidas (células iPSC o IPS)" son células somáticas que han sido reprogramadas, por ejemplo, mediante la introducción de genes exógenos que confieren a la célula somática un fenotipo menos diferenciado. Estas células pueden ser inducidas a diferenciarse en una progenie menos diferenciada. Las células IPS se han derivado utilizando modificaciones de un enfoque descubierto originalmente en 2006 (Yamanaka, S. et al., Cell Stem Cell, 1: 39-49 (2007)). Por ejemplo, en un caso, para crear células IPS, los científicos comenzaron con células de piel que luego fueron modificadas por una técnica de laboratorio estándar utilizando retrovirus para insertar genes

en el ADN celular. En un caso, los genes insertados fueron Oct4, Sox2, Lf4 y c-myc, que se sabe que actúan juntos como reguladores naturales para mantener las células en un estado similar a las células madre embrionarias. Estas células han sido descritas en la literatura. Véase, por ejemplo, Wernig et al., PNAS, 105: 5856-5861 (2008); Jaenisch et al., Cell, 132: 567-582 (2008); Hanna et al., Cell, 133: 250-264 (2008); y Brambrink et al., Cell Stem Cell, 2: 151-159 (2008). Estas referencias enseñan las iPSC y los métodos para producirlas. También es posible que tales células puedan ser creadas por condiciones específicas de cultivo (exposición a agentes específicos).

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

Sin embargo, como se usa en el presente documento, el término "aisladas" no indica la presencia de solo las células descritas en el presente documento. Más bien, el término "aisladas" indica que las células descritas en este documento se eliminan de su entorno de tejido natural y están presentes en una concentración más alta en comparación con el entorno de tejido normal. Por consiguiente, una población celular "aislada" puede incluir además tipos de células además de las células descritas en el presente documento y puede incluir componentes de tejido adicionales. Esto también se puede expresar en términos de duplicación celular, por ejemplo. Una célula puede haber sufrido 10, 20, 30, 40 o más duplicaciones *in vitro* o *ex vivo* para que se enriquezca en comparación con su número original *in vivo* o en su entorno de tejido original (por ejemplo, médula ósea, sangre periférica, placenta, cordón umbilical), sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, etc.).

"MAPC" es un acrónimo de "célula progenitora adulta multipotente". Se refiere a una célula que no es una célula madre embrionaria o una célula germinal pero que tiene algunas características de estas. MAPC se puede caracterizar en una serie de descripciones alternativas, cada una de las cuales confirió novedad a las células cuando fueron descubiertas. Por lo tanto, pueden caracterizarse por una o más de esas descripciones. Primero, tienen capacidad replicativa extendida en cultivo sin ser transformadas (tumorigénicas) y con un cariotipo normal. En segundo lugar, pueden dar lugar a la progenie celular de más de una capa germinal, tal como dos o las tres capas germinales (es decir, endodermo, mesodermo y ectodermo) tras la diferenciación. Tercero, aunque no son células madre embrionarias o células germinales, pueden expresar marcadores de estos tipos de células primitivas para que las MAPC puedan expresar uno o más de Oct 3/4 (es decir, Oct 3A), rex-1 y rox-1. También pueden expresar uno o más de sox-2 y SSEA-4. Cuarto, como una célula madre, pueden auto renovarse, es decir, tener una capacidad de replicación extendida sin transformarse. Esto significa que estas células expresan telomerasa (es decir, tienen actividad de telomerasa). En consecuencia, el tipo de célula que se designó "MAPC" puede caracterizarse por características básicas alternativas que describen la célula a través de algunas de sus propiedades novedosas.

El término "adulto" en MAPC no es restrictivo. Se refiere a una célula somática no embrionaria. Las MAPC son cariotípicamente normales y no forman teratomas *in vivo*. Este acrónimo se utilizó por primera vez en la patente de los Estados Unidos No. 7.015.037 para describir una célula pluripotente aislada de la médula ósea. Sin embargo, las células con marcadores pluripotenciales y/o potencial de diferenciación se han descubierto posteriormente y, para los fines de esta invención, pueden ser equivalentes a aquellas células designadas por primera vez como "MAPC". Las descripciones esenciales del tipo de célula MAPC se proporcionan en el Sumario de la invención más arriba.

Las MAPC representan una población de células progenitoras más primitivas que las MSC (Verfaillie, CM, Trends Cell Biol 12: 502-8 (2002), Jahagirdar, BN, et al., Exp Hematol, 29: 543-56 (2001); Reyes, M. y CM Verfaillie, Ann NY Acad Sci, 938: 231-233 (2001); Jiang, Y. et al., Exp Hematol, 30: 896-904 (2002); y (Jiang, Y. et al., Nature, 418: 41-9. (2002)).

El término "MultiStem®" es el nombre comercial de una preparación celular basada en las MAPC de la patente de los Estados Unidos No. 7.015.037, es decir, una célula madre no embrionaria no germinal, como se describió anteriormente. MultiStem® se prepara de acuerdo con los métodos de cultivo celular descritos en esta solicitud de patente, particularmente, oxígeno bajo y mayor contenido de suero. MultiStem® es altamente expandible, cariotípicamente normal y no forma teratomas *in vivo*. Puede diferenciarse en linajes celulares de más de una capa germinal y puede expresar uno o más de telomerasa, oct3/4, rex-1, rox-1, sox-2 y SSEA4.

Los "precursores mieloides" son aquellas células madre y progenitoras que normalmente se diferencian en las células maduras del linaje mieloides: (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas). Estos precursores también se muestran en la Figura 6. Por lo tanto, estos precursores pueden ser un objetivo de los ensayos *in vitro* y evaluaciones *in vivo* descritos en esta solicitud. Estos precursores incluyen las HSC que finalmente dan lugar a las células sanguíneas mieloides.

El "vehículo farmacéuticamente aceptable" es cualquier medio farmacéuticamente aceptable para las células para uso de acuerdo con la presente invención. Tal medio puede retener la isotonicidad, el metabolismo celular, el pH y similares. Es compatible con la administración a un sujeto *in vivo*, y puede usarse, por lo tanto, para la administración y el tratamiento celular.

El término "potencia" se refiere a la capacidad de las células para lograr los diversos efectos descritos en esta solicitud. En consecuencia, la potencia se refiere al efecto a varios niveles, que incluyen, entre otros, la reducción de los síntomas de MDS, que incluyen, entre otros, la mejora de la capacidad de diferenciación mieloides que conduce a niveles más altos de células sanguíneas maduras. La potencia también puede incluir la simulación de la proliferación/diferenciación de células precursoras mieloides, una reducción de la apoptosis de las células precursoras mieloides y una reducción de la inflamación. Los glóbulos maduros incluyen glóbulos rojos, también llamados eritrocitos, así como glóbulos blancos, también llamados leucocitos. Sin embargo, como también se discute, la potencia puede referirse a efectos sobre trombocitos o megacariocitos, es decir, precursores de plaquetas.

Las "células germinales embrionarias primordiales" (células PG o EG) se pueden cultivar y estimular para producir muchos tipos de células menos diferenciadas. Las células PG o EG se describen en el presente documento solo como referencia, ya que no están cubiertas por las reivindicaciones.

Las "células progenitoras" son células producidas durante la diferenciación de una célula madre que tienen algunas, pero no todas, las características de su progenie diferenciada terminalmente. Las células progenitoras definidas, tal como las "células progenitoras cardíacas", están comprometidas con un linaje, pero no con un tipo celular específico o terminalmente diferenciado. El término "progenitor" como se usa en el acrónimo "MAPC" no limita estas células a un linaje particular. Una célula progenitora puede formar una célula de progenie que está más altamente diferenciada que la célula progenitora.

Los "glóbulos rojos", también llamados eritrocitos, son el tipo más común de células sanguíneas y el principal medio del organismo vertebrado para suministrar oxígeno (O<sub>2</sub>) a los tejidos del cuerpo a través del flujo sanguíneo a través del sistema circulatorio.<sup>[1]</sup> Toman oxígeno en los pulmones o las branquias y lo liberan en los tejidos mientras se estrujan a través de los capilares del cuerpo.

Los glóbulos rojos también se conocen como RBC, glóbulos rojos,<sup>[5]</sup> corpúsculos de glóbulos rojos (un término arcaico), hematidos, células eritroides o eritrocitos.

Enfermedades y herramientas de diagnóstico.

Las enfermedades de la sangre que involucran a los glóbulos rojos incluyen, pero no se limitan a:

- Las anemias son enfermedades caracterizadas por la baja capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, debido al bajo recuento de glóbulos rojos o alguna anomalía de los glóbulos rojos o la hemoglobina.
  - La anemia por deficiencia de hierro es la anemia más común; ocurre cuando la ingesta o absorción de hierro en la dieta es insuficiente y no se puede formar hemoglobina, que contiene hierro.
  - La anemia aplásica es causada por la incapacidad de la médula ósea para producir células sanguíneas.
  - La aplasia pura de glóbulos rojos es causada por la incapacidad de la médula ósea para producir solo glóbulos rojos.
- La hemólisis es el término general para la descomposición excesiva de los glóbulos rojos. Puede tener varias causas y puede provocar anemia hemolítica.
- Las policitemias (o eritrocitosis) son enfermedades caracterizadas por un exceso de glóbulos rojos. El aumento de la viscosidad de la sangre puede causar una serie de síntomas.
  - En la policitemia vera, el aumento del número de glóbulos rojos se debe a una anomalía en la médula ósea.
- Varias enfermedades microangiopáticas, incluyendo la coagulación intravascular diseminada y las microangiopatías trombóticas, se presentan con fragmentos de glóbulos rojos patognomónicos (diagnóstico) llamados esquistocitos. Estas patologías generan hebras de fibrina que cortan los glóbulos rojos cuando intentan sobrepasar un trombo.
- La reacción de transfusión hemolítica es la destrucción de glóbulos rojos donados después de una transfusión, mediada por anticuerpos del huésped, a menudo como resultado de un desajuste del tipo de sangre.

Varios análisis de sangre implican glóbulos rojos, incluido el recuento de RBC (el número de glóbulos rojos por volumen de sangre), el hematocrito (porcentaje del volumen sanguíneo ocupado por los glóbulos rojos) y la velocidad de sedimentación globular. Muchas enfermedades que involucran a los glóbulos rojos se diagnostican con una película de sangre (o frotis de sangre periférica), donde se extiende una fina capa de sangre en un portaobjetos de microscopio. El tipo de sangre debe determinarse para prepararse para una transfusión de sangre o un trasplante de órganos.

1. "Blood Cells". (<http://www.biosbcc.net/doohan/sample/htm/Blood%20cells.htm>).

5. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto, Richard N. Mitchell (2007). Robbins Basic Pathology (8a edición). Saunders.

46. An X, Mohandas N (mayo de 2008). "Disorders of red cell membrane". British Journal of Haematology 141 (3): 367-75. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07091.x. PMID 18341630.

El término "reducir" como se usa en el presente documento significa prevenir así como disminuir. En el contexto del tratamiento, "reducir" es prevenir o mejorar uno o más síntomas clínicos. Un síntoma clínico es uno (o más) que tiene o tendrá, si no se trata, un impacto negativo en la calidad de vida (salud) del sujeto. Esto también se aplica a los efectos biológicos subyacentes, tal como el aumento de la apoptosis, el aumento del entorno proinflamatorio, la disminución de la diferenciación y/o la disminución de la proliferación de precursores de células mieloides, cuyo resultado final sería mejorar los síntomas clínicos nocivos del MDS.

"Seleccionar" una célula con un nivel deseado de potencia (por ejemplo, para modular la activación de macrófagos) puede significar identificar (tal como mediante ensayo), aislar y expandir una célula. Esto podría crear una población que tiene una potencia más alta que la población de células progenitoras de la que se aisló la célula. La población de células "progenitoras" se refiere a las células progenitoras de las que se dividieron las células seleccionadas. "Progenitor" se refiere a una relación real P1 → F1 (es decir, una célula de progeñie). Por lo tanto, si la célula X se aísla de una población mixta de células X e Y, en la que X es un expresor e Y no, no se clasificaría un simple aislado de X como expresión mejorada. Pero, si una célula de progeñie de X es un expresador más alto, se clasificaría la célula de progeñie como que tiene una expresión mejorada.

Para seleccionar una célula que logre el efecto deseado se incluirá un ensayo para determinar si las células logran el efecto deseado y también se incluirá la obtención de esas células. La célula puede lograr naturalmente el efecto deseado en el sentido de que el efecto no se logra por un transgén/ADN exógeno. Pero una célula efectiva puede mejorarse al incubarse o exponerse a un agente que aumenta el efecto. Puede que no se sepa que la población de células de la que se selecciona la célula efectiva tiene la potencia antes de realizar el ensayo. Es posible que no se sepa que la célula logra el efecto deseado antes de realizar el ensayo. Como un efecto podría depender de la expresión y/o secreción génica, también se podría seleccionar con base en uno o más de los genes que causan el efecto.

La selección podría ser de células en un tejido. Por ejemplo, en este caso, las células se aislarían de un tejido deseado, se expandirían en cultivo, se seleccionarían para lograr el efecto deseado, y las células seleccionadas se expandirían aún más.

La selección también podría ser de células *ex vivo*, tales como células en cultivo. En este caso, una o más de las células en cultivo se analizarían para lograr el efecto deseado y las células obtenidas que logran el efecto deseado podrían expandirse aún más.

Las células también podrían seleccionarse para mejorar la capacidad de lograr el efecto deseado. En este caso, la población celular de la que se obtiene la célula mejorada ya tiene el efecto deseado. Efecto mejorado significa una cantidad promedio más alta por célula que en la población progenitora.

La población original de la que se selecciona la célula mejorada puede ser sustancialmente homogénea (el mismo tipo de célula). Una forma de obtener una célula mejorada de esta población es crear células individuales o grupos de células y analizar esas células o grupos de células para obtener clones que naturalmente tienen el efecto mejorado (mayor) (en lugar de tratar las células con un modulador que induce o aumenta el efecto) y luego expande las células que se mejoran naturalmente.

Sin embargo, las células pueden tratarse con uno o más agentes que inducirán o aumentarán el efecto. Por lo tanto, se pueden tratar poblaciones sustancialmente homogéneas para potenciar el efecto.

Si la población no es sustancialmente homogénea, entonces, es preferible que la población de células progenitoras a tratar contenga al menos 100 del tipo de célula deseado en el que se busca un efecto mejorado, más preferiblemente al menos 1.000 de las células, y aún más preferiblemente, al menos 10.000 de las células. Después del tratamiento, esta subpoblación puede recuperarse de la población heterogénea mediante técnicas de selección de células conocidas y expandirse aún más si se desea.

Por lo tanto, los niveles de efecto deseados pueden ser aquellos que son más altos que los niveles en una población precedente dada. Por ejemplo, las células que se colocan en cultivo primario a partir de un tejido y se expanden y aíslan mediante condiciones de cultivo que no están específicamente diseñadas para producir el efecto pueden proporcionar una población progenitora. Dicha población progenitora puede tratarse para mejorar el efecto promedio por célula o seleccionarse para una célula o células dentro de la población que expresan mayores grados de efecto sin un tratamiento deliberado. Dichas células pueden expandirse para proporcionar una población con una expresión más alta (deseada).

La "autorrenovación" de una célula madre se refiere a la capacidad de producir células madre replicadas que tienen un potencial de diferenciación que es idéntico al de aquellas de las que surgieron. Un término similar utilizado en este contexto es "proliferación".

5 "Célula madre" significa una célula que puede someterse a una autorrenovación (es decir, una progenie con el mismo potencial de diferenciación) y también producir células de progenie que tienen un potencial de diferenciación más restringido. Dentro del contexto de la invención, una célula madre también abarcaría una célula más diferenciada que se ha desdiferenciado, por ejemplo, mediante la introducción de factores de transcripción específicos, o mediante cultivo en condiciones específicas. Como referencia, fuera del contexto de la invención, la desdiferenciación también  
10 puede ocurrir por transferencia poco clara o por fusión con una célula madre más primitiva. Véanse, por ejemplo, Wilmut et al., Nature, 385: 810-813 (1997); Ying et al., Nature, 416: 545-548 (2002); Guan et al., Nature, 440: 1199-1203 (2006); Takahashi et al., Cell, 126: 663-676 (2006); Okita et al., Nature, 448: 313-317 (2007); y Takahashi et al., Cell, 131: 861-872 (2007).

15 La desdiferenciación también puede ser causada por la administración de ciertos compuestos o la exposición a un entorno físico *in vitro* o *in vivo* que causaría la desdiferenciación. Las células madre también pueden derivarse de tejido anormal, tal como un teratocarcinoma y algunas otras fuentes, como los cuerpos embrioides (aunque pueden considerarse células madre embrionarias, ya que se derivan del tejido embrionario, aunque no directamente de la masa celular interna). Las células madre también se pueden producir mediante la introducción de genes asociados  
20 con la función de las células madre en una célula no madre, tal como una célula madre pluripotente inducida.

"Sujeto" significa un vertebrado, tal como un mamífero, tal como un humano. Los mamíferos incluyen, entre otros, humanos, perros, gatos, caballos, vacas y cerdos.

25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente determinado para producir cualquier respuesta terapéutica en un mamífero. Por ejemplo, los agentes terapéuticos antiinflamatorios efectivos pueden prolongar la supervivencia del paciente y/o inhibir los síntomas clínicos evidentes. Los tratamientos que son terapéuticamente efectivos dentro del significado del término como se usa en este documento, incluyen tratamientos que mejoran la calidad de vida de un sujeto, incluso si no mejoran el resultado de la enfermedad misma. Dichas  
30 cantidades terapéuticamente efectivas son fácilmente determinadas por un experto en la materia. Por lo tanto, "tratar" significa suministrar tal cantidad. Por lo tanto, el tratamiento puede prevenir o mejorar cualquier síntoma patológico de MDS.

35 "Tratar", "que trata" o "tratamiento" se usan ampliamente en relación con la invención y cada uno de estos términos abarca, entre otros, prevenir, mejorar, inhibir o curar una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso dañino, incluidos aquellos que interfieren y/o resultan a partir de una terapia.

"Validar" significa confirmar. En el contexto de la invención, se confirma que una célula es un expresor con una potencia deseada. Esto es para que se pueda usar esa célula (en tratamiento, almacenamiento, detección de fármacos, etc.) con una expectativa razonable de eficacia. En consecuencia, validar significa confirmar que las células,  
40 habiéndose encontrado originalmente que tenían/se estableció que tenían la actividad deseada, de hecho, retienen esa actividad. Por lo tanto, la validación es un evento de verificación en un proceso de dos eventos que involucra la determinación original y la determinación de seguimiento. El segundo evento se denomina en este documento "validación".

45 Las células para uso de acuerdo con la invención son útiles para tratar cualquiera de los síndromes mielodisplásicos. Esto incluye, entre otros, anemia refractaria, que puede caracterizarse por menos del 5% de células sanguíneas primitivas (mieloblastos) en la médula ósea y anomalías patológicas observadas principalmente en precursores de glóbulos rojos, anemia refractaria con sideroblastos en anillo, también caracterizados por menos del 5% de  
50 mieloblastos en la médula ósea, pero se distingue por la presencia de 15% o más de precursores de glóbulos rojos en la médula, que son células anormales rellenas de hierro llamadas "sideroblastos en anillo", anemia refractaria con blastos excesivos caracterizados por 5-20% de mieloblastos en la médula, anemia refractaria con exceso de blastos en transformación, caracterizada por 21-30% de mieloblastos en la médula (más del 30% de blastos se define como leucemia mieloide aguda) y leucemia mieloide crónica (que no debe confundirse con leucemia mielógena crónica),  
55 que se caracteriza por menos del 20% de mieloblastos en la médula ósea y más de  $1 \times 10^9$  por litro de monocitos (un tipo de glóbulo blanco) que circulan en la sangre periférica.

60 En general, las células son eficaces para aliviar los signos y síntomas que incluyen anemia (recuento bajo de glóbulos rojos o reduce la hemoglobina), cansancio crónico, dificultad para respirar, sensación de frío y, a veces, dolor en el pecho; neutropenia (recuento bajo de neutrófilos), que puede asociarse con una mayor susceptibilidad a la infección; y trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas), asociado con una mayor susceptibilidad a hemorragias y hematomas (equimosis), así como hemorragia subcutánea que resulta en púrpura o petequias.

65 En ciertos casos, los individuos pueden ser asintomáticos y la citopenia sanguínea u otros problemas solo se identifican como parte de un conteo sanguíneo de rutina. Estos problemas incluyen neutropenia, anemia y trombocitopenia (recuento bajo de glóbulos blancos y rojos y plaquetas, respectivamente), esplenomegalia o, rara vez, hepatomegalia,

gránulos anormales en las células, forma y tamaño nuclear anormal y/o anomalías cromosómicas, que incluyen, translocaciones cromosómicas y número cromosómico anormal.

5 Existe cierto riesgo de desarrollar leucemia mielógena aguda, pero en general, las muertes ocurren como resultado de sangrado o infección.

Las características generalmente utilizadas para definir un MDS son: citopenias sanguíneas; hematopoyesis ineficaz; diseritropoyesis; disgranulopoyesis; dismegacaropoyesis y aumento de mieloblastos.

10 La displasia puede afectar los tres linajes observados en la médula ósea. La mejor manera de diagnosticar la displasia es mediante la morfología y las manchas especiales (PAS) utilizadas en el aspirado de médula ósea y el frotis de sangre periférica. La displasia en la serie mielóide se define por:

- Serie granulocítica

- 15
1. Neutrófilos hipersegmentados (también observados en Vit B<sub>12</sub>/Deficiencia de folato)
  2. Neutrófilos hiposegmentados (Pseudo-Pelger Huet)
- 20
3. Neutrófilos hipogranulares o gránulos grandes pseudo Chediak Higashi
  4. Bastones de Auer: automáticamente RAEB II (si el recuento de blastos es < 5% en sangre periférica y < 10% en aspirado de médula ósea) también se observan los bastones de Auer en neutrófilos maduros en AML con translocación t(8; 21)

25

5. Gránulos dimórficos (gránulos basófilos y eosinófilos) dentro de los eosinófilos.

- Serie eritroide

- 30
1. Precursores eritroides binucleados y cariorrexis
  2. Gemación nuclear eritroide
- 35
3. Cuerdas nucleares eritroides o puente internuclear (también observado en anemias diseritropoyéticas congénitas)
  4. La pérdida de cadherina E en los normoblastos es un signo de aberración.
  5. PAS (globular en vacuolas o tinción citoplasmática difusa) dentro de precursores eritroides en el aspirado de médula ósea (no tiene relación con la biopsia de médula ósea fijada en parafina). Nota: se puede observar la positividad vacuolar PAS en blastos L1 y L2 (clasificación AFB; la nomenclatura L1 y L2 no se usa en la clasificación de WHO)

40

6. Sideroblastos anillados observados en la tinción de hierro con azul de Prusia (10 o más gránulos de hierro que rodean 1/3 o más del núcleo y > 15% de sideroblastos anillados cuando se cuentan entre los precursores de glóbulos rojos)

- 45
- Serie megacariocítica (puede ser la más subjetiva)
1. Características nucleares hiposegmentadas en megacariocitos productores de plaquetas (falta de lobación)
- 50
2. Megacariocitos hipersegmentados (apariencia osteoclástica)
  3. Forma de globo de las plaquetas (observado con microscopía de contraste de interferencia)

55 Otras manchas pueden ayudar en casos especiales (PAS y positividad mediante naftol-ASD cloroacetato esterasa) en eosinófilos es un marcador de anomalía observado en leucemia eosinofílica crónica y es un signo de aberración.

60 En la biopsia de médula ósea, la displasia de alto grado (RAEB-I y RAEB-II) puede mostrar localización atípica de precursores inmaduros (ALIP) que son islas de células precursoras inmaduras (mieloblastos y promielocitos) localizadas en el centro del espacio intertrabecular en vez de adyacentes a las trabéculas o arteriolas circundantes. Esta morfología puede ser difícil de reconocer por la leucemia tratada y la recuperación de elementos medulares normales inmaduros. También se puede ver la alteración topográfica de las células eritroides nucleadas en la mielodisplasia temprana (RA y RARS), donde se observan normoblastos junto a las trabéculas óseas en lugar de formar islas eritroides normales colocadas intersticialmente.

65 La mielodisplasia es un diagnóstico de exclusión y debe realizarse después de la determinación adecuada de las reservas de hierro, las deficiencias de vitaminas y las deficiencias de nutrientes. También se han reconocido

enfermedades congénitas como la anemia diseritropoyética congénita (CDA I a IV), síndrome de Pearson (anemia sideroblástica), anomalía de Jordans: puede observarse vacuolización en todas las líneas celulares en el síndrome de Chanarin-Dorfman, deficiencia de la enzima ALA (ácido aminolevulínico), y se sabe que otras deficiencias enzimáticas más esotéricas producen una imagen pseudomiélocitoplásmica en una de las líneas celulares, sin embargo, las tres líneas celulares nunca son morfológicamente displásicas en estas entidades con la excepción del cloranfenicol, la toxicidad del arsénico y otros venenos.

Todas estas condiciones se caracterizan por anomalías en la producción de uno o más de los componentes celulares de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos distintos de los linfocitos y plaquetas o sus células progenitoras, megacariocitos).

Indicadores de un buen pronóstico: edad más joven; recuentos normales o moderadamente reducidos de neutrófilos o plaquetas; bajo recuento de blastos en la médula ósea (< 20%) y sin blastos en la sangre; sin bastones de Auer; sideroblastos anillados; Cariotipos normales de cariotipos mixtos sin anomalías cromosómicas complejas y cultivo de médula *in vitro*: patrón de crecimiento no leucémico.

Indicadores de mal pronóstico: edad avanzada; neutropenia grave o trombocitopenia; alto recuento de blastos en la médula ósea (20-29%) o blastos en la sangre; bastones de Auer; ausencia de sideroblastos anillados; localización anormal o precursores de granulocitos inmaduros en la sección de médula ósea, todos o en su mayoría cariotipos anormales o anomalías complejas de cromosomas de médula y patrón de crecimiento leucémico de cultivo de médula ósea *in vitro*.

Pronóstico y cariotipo: Bueno: Normal, -Y, del(5q), del(20q) Intermedio o variable: +8, otras anomalías simples o dobles Pobre; Complejo (> 3 aberraciones cromosómicas); anomalías del cromosoma 7.

#### Células madre

La presente invención puede llevarse a la práctica, usando células madre solo como se define en las reivindicaciones, que pueden ser de especies de vertebrados, tales como humanos, primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos. A continuación se describen los tipos de células madre (aquellas que son células madre embrionarias y células germinales que quedan fuera del alcance de las reivindicaciones y están marcadas como "referencia").

#### Células madre embrionarias (como referencia)

La célula madre más estudiada es la célula madre embrionaria (ESC) ya que tiene un potencial ilimitado de autorrenovación y diferenciación multipotente. Estas células se derivan de la masa celular interna del blastocisto o se pueden derivar de las células germinales primordiales de un embrión posterior a la implantación (células germinales embrionarias o células EG). Las células ES y EG se han derivado, primero del ratón, y luego, de muchos animales diferentes, y más recientemente, también de primates no humanos y humanos. Cuando se introducen en blastocistos de ratón o blastocistos de otros animales, las ESC pueden contribuir a todos los tejidos del animal. Las células ES y EG pueden identificarse mediante tinción positiva con anticuerpos contra SSEA1 (ratón) y SSEA4 (humano). Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5.453.357; 5.656.479; 5.670.372; 5.843.780; 5.874.301; 5.914.268; 6.110.739 6.190.910; 6.200.806; 6.432.711; 6.436.701, 6.500.668; 6.703.279; 6.875.607; 7.029.913; 7.112.437; 7.145.057; 7.153.684; y 7.294.508, que enseñan las células madre embrionarias y los métodos para fabricarlas y expandirlas. Por consiguiente, las ESC y los métodos para aislarlas y expandirlas son bien conocidos en la técnica.

Se han identificado varios factores de transcripción y citoquinas exógenas que influyen en el estado de potencia de las células madre embrionarias *in vivo*. El primer factor de transcripción que se describe que participa en la pluripotencia de células madre es Oct4. Oct4 pertenece a la familia de factores de transcripción POU (Pit-Oct-Unc) y es una proteína de unión al ADN que puede activar la transcripción de genes, que contiene una secuencia octamérica llamada "el motivo octamérico" dentro de la región promotora o potenciadora. Oct4 se expresa en el momento de la etapa de escisión del cigoto fertilizado hasta que se forma el cilindro de huevo. La función de Oct3/4 es reprimir genes inductores de diferenciación (es decir, FoxaD3, hCG) y activar genes que promueven la pluripotencia (FGF4, Utf1, Rex1). Sox2, un miembro de los factores de transcripción de caja del grupo de alta movilidad (HMG), coopera con Oct4 para activar la transcripción de genes expresados en la masa celular interna. Es esencial que la expresión de Oct3/4 en las células madre embrionarias se mantenga entre ciertos niveles. La sobreexpresión o subregulación de > 50% del nivel de expresión de Oct4 alterará el destino de las células madre embrionarias, con la formación de endodermo/mesodermo o trofodermo primitivos, respectivamente. *In vivo*, los embriones deficientes en Oct4 se desarrollan hasta la etapa de blastocisto, pero las células de masa celular interna no son pluripotentes. En cambio, se diferencian a lo largo del linaje extraembrionario del trofoblasto. Sa114, un factor de transcripción Spalt de mamíferos, es un regulador de la secuencia arriba de Oct4 y, por lo tanto, es importante para mantener niveles apropiados de Oct4 durante las primeras fases de la embriología. Cuando los niveles de Sa114 caen por debajo de cierto umbral, las células trofodérmicas se expandirán ectópicamente en la masa celular interna. Otro factor de transcripción requerido para la pluripotencia es Nanog, llamado así por una tribu celta "Tir Nan Og": la tierra de los siempre jóvenes.

*In vivo*, Nanog se expresa desde la etapa de la mórula compactada, posteriormente se define con la masa celular interna y se subregula por la etapa de implantación. La subregulación de Nanog puede ser importante para evitar una expansión incontrolada de células pluripotentes y para permitir la diferenciación multilínea durante la gastrulación. Los embriones nulos para Nanog, aislados en el día 5.5, consisten en un blastocisto desorganizado, que contiene principalmente endodermo extraembrionario y ningún epiblasto discernible.

#### Células madre no embrionarias

Se han identificado células madre en la mayoría de los tejidos. Quizás la mejor caracterizada es la célula madre hematopoyética (HSC). Las HSC son células derivadas del mesodermo que se pueden purificar usando marcadores de superficie celular y características funcionales. Se han aislado de médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, hígado fetal y saco vitelino. Inician la hematopoyesis y generan múltiples linajes hematopoyéticos. Cuando se trasplantan en animales irradiados letalmente, pueden repoblar el grupo de células hematopoyéticas neutrófilos y macrófagos eritroides megacariocíticas y linfoides. También se les puede inducir a someterse a una división celular de autorrenovación. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5.635.387; 5.460.964; 5.677.136; 5.750.397; 5.681.599; y 5.716.827. La patente de Estados Unidos N° 5.192.553 reporta métodos para aislar células madre o progenitoras hematopoyéticas neonatales o fetales humanas. La patente de Estados Unidos N° 5.716.827 reporta células hematopoyéticas humanas que son progenitoras de Thy-1<sup>+</sup>, y medios de crecimiento apropiados para regenerarlas *in vitro*. La patente de Estados Unidos N° 5.635.387 reporta un método y dispositivo para cultivar células hematopoyéticas humanas y sus precursores. La patente de Estados Unidos N° 6.015.554 describe un método para reconstituir células linfoides y dendríticas humanas. En consecuencia, las HSC y los métodos para aislarlas y expandirlas son bien conocidos en la técnica.

Otra célula madre que es bien conocida en la técnica es la célula madre neural (NSC). Estas células pueden proliferar *in vivo* y regenerar continuamente al menos algunas células neuronales. Cuando se cultivan *ex vivo*, se puede inducir las células madre neurales para proliferar así como diferenciarse en diferentes tipos de neuronas y células gliales. Cuando se trasplantan al cerebro, las células madre neurales pueden injertarse y generar células neurales y gliales. Véase, por ejemplo, Gage F.H., *Science*, 287: 1433-1438 (2000), Svendsen S.N. et al., *Brain Pathology*, 9: 499-513 (1999), y Okabe S. et al., *Mech Development*, 59: 89-102 (1996). La patente de Estados Unidos N° 5.851.832 reporta células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral. La patente de los Estados Unidos N° 5.766.948 reporta la producción de neuroblastos a partir de hemisferios cerebrales de recién nacidos. Las patentes estadounidenses Nos 5.564.183 y 5.849.553 reportan el uso de células madre de crestas neurales de mamíferos. La patente de Estados Unidos N° 6.040.180 reporta la generación *in vitro* de neuronas diferenciadas a partir de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamíferos. Los documentos WO 98/50526 y WO 99/01159 reportan la generación y el aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocitos-astrocitos y precursores neuronales restringidos al linaje. La patente de Estados Unidos N° 5.968.829 reporta células madre neurales obtenidas del cerebro anterior embrionario. En consecuencia, las células madre neurales y los métodos para fabricarlas y expandirlas son bien conocidos en la técnica.

Otra célula madre que se ha estudiado ampliamente en la técnica es la célula madre mesenquimatosa (MSC). Las MSC se derivan del mesodermo embrionario y pueden aislarse de muchas fuentes, incluida la médula ósea adulta, sangre periférica, grasa, placenta y sangre umbilical, entre otras. Las MSC pueden diferenciarse en muchos tejidos mesodérmicos, incluidos músculo, hueso, cartílago, grasa y tendón. Existe considerable literatura sobre estas células. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos 5.486.389; 5.827.735; 5.811.094; 5.736.396; 5.837.539; 5.837.670; y 5.827.740. Véase también Pittenger, M. et al, *Science*, 284: 143-147 (1999).

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

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

Otras células no embrionarias que se reporta que son capaces de diferenciarse en tipos de células de más de una capa de germen embrionario incluyen, pero no se limitan a, células de sangre del cordón umbilical (véase la publicación de los Estados Unidos No. 2002/0164794), placenta (véase la publicación de Estados No. 2003/0181269, matriz del cordón umbilical (Mitchell, KE et al., *Stem Cells*, 21: 50-60 (2003)), pequeñas células madre de tipo embrionario (Kucia, M. et al., *J Physiol Pharmacol*, 57 Suplemento 5: 5-18 (2006)), células madre de líquido amniótico (Atala, A., *J Tissue Regen Med*, 1: 83-96 (2007)), precursores derivados de la piel (Toma et al., *Nat Cell Biol*, 3: 778-784 (2001)) y médula ósea (véanse las publicaciones de los Estados Unidos Nos. 2003/0059414 y 2006/0147246), cada una de las cuales enseña estas células.

Estrategias de reprogramación de células somáticas (como referencia)

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

Transferencia Nuclear (como referencia)

El trasplante nuclear (NT), también denominado transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), denota la introducción de un núcleo de una célula somática donante en un ovocito enucleado para generar un animal clonado como la oveja Dolly (Wilmut et al., *Nature*, 385: 810-813 (1997)). La generación de animales vivos por NT demostró que el estado epigenético de las células somáticas, incluido el de las células diferenciadas terminalmente, aunque estable, no es fijo irreversible, sino que puede reprogramarse hasta un estado embrionario que es capaz de dirigir el desarrollo de un nuevo organismo. Además de proporcionar un enfoque experimental emocionante para dilucidar los mecanismos epigenéticos básicos involucrados en el desarrollo embrionario y la enfermedad, la tecnología de clonación nuclear es de potencial interés para la medicina de trasplante específica del paciente.

Fusión de células somáticas y células madre embrionarias (como referencia)

Se ha demostrado la reprogramación epigenética de núcleos somáticos hasta un estado indiferenciado en híbridos murinos producidos por fusión de células embrionarias con células somáticas. Híbridos entre varias células somáticas y células de carcinoma embrionario (Solter, D., *Nat Rev Genet*, 7: 319-327 (2006), células germinales embrionarias (EG) o ES (Zwaka y Thomson, *Development*, 132: 227-233 (2005)) comparten muchas características con las células embrionarias progenitoras, lo que indica que el fenotipo pluripotente es dominante en tales productos de fusión. Al igual que con el ratón (Tada et al., *Curr Biol*, 11: 1553-1558 (2001)), las células ES humanas tienen el potencial para reprogramar núcleos somáticos después de la fusión (Cowan et al., *Science*, 309: 1369-1373 (2005)); Yu et al., *Science*, 318: 1917-1920 (2006)). La activación de marcadores de pluripotencia silenciosos como Oct4 o la reactivación del cromosoma X somático inactivo proporcionaron evidencia molecular para la reprogramación del genoma somático en las células híbridas. Se ha sugerido que la replicación del ADN es esencial para la activación de los marcadores de pluripotencia, que se observa por primera vez 2 días después de la fusión (Do y Scholer, *Stem Cells*, 22: 941-949 (2004)), y que la sobreexpresión forzada de Nanog en células ES promueven la pluripotencia cuando se fusionan con células madre neurales (Silva et al., *Nature*, 441: 997-1001 (2006)).

Reprogramación inducida por cultivo

Las células pluripotentes se han derivado de fuentes embrionarias tales como blastómeros y la masa celular interna (ICM) del blastocisto (células ES), el epiblasto (células EpiSC), células germinales primordiales (células EG) y las células madre espermatogoniales postnatales (células "maGSCsm" "tipo ES"). Las células aisladas de células madre embrionarias y células germinales se describen solo como referencia. Las siguientes células pluripotentes, junto con su célula/tejido donante, son las siguientes: las células ES partenogénicas se derivan de ovocitos murinos (Narasimha et al., *Curr Biol*, 7: 881-884 (1997)); células madre embrionarias se han derivado de blastómeros (Wakayama et al., *Stem Cells*, 25: 986-993 (2007)); células de masa celular interna (fuente no aplicable) (Eggan et al., *Nature*, 428: 44-49 (2004)); células germinales embrionarias y carcinoma embrionario se han derivado de células germinales primordiales (Matsui et al., *Cell*, 70: 841-847 (1992)); GMCS, maSSC y MASC se han derivado de células madre espermatogoniales (Guan et al., *Nature*, 440: 1199-1203 (2006); Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119: 1001-1012 (2004); y Seandel et al., *Nature*, 449: 346-350 (2007)); células EpiSC se derivan de epiblastos (Brons et al., *Nature*, 448: 191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448: 196-199 (2007)); las células ES partenogénicas se han derivado de ovocitos humanos (Cibelli et al., *Science*, 295L819 (2002); Revazova et al., *Cloning Stem Cells*, 9: 432-449 (2007)); las células ES humanas se han derivado de blastocistos humanos (Thomson et al., *Science*, 282: 1145-1147 (1998)); MAPC se han derivado de médula ósea (Jiang et al., *Nature*, 418: 41-49 (2002); Phinney y Prockop, *Stem Cells*, 25: 2896-2902 (2007)); células de sangre del cordón umbilical (derivadas de la sangre del cordón umbilical) (van de Ven et al., *Exp Hematol*, 35: 1753-1765 (2007)); células derivadas de la neuroesfera derivadas de la célula neural (Clarke et al., *Science*, 288: 1660-1663 (2000)). Se sabe que las células donadoras del linaje de células germinales, tales como las PGC o las células madre espermatogoniales, son unipotentes *in vivo*, pero se ha demostrado que las células pluripotentes de tipo ES (Kanatsu-Shinohara et al., *Cell*, 119: 1001-1012 (2004)) o maGSC (Guan et al., *Nature*, 440: 1199-1203 (2006)), pueden aislarse después de un cultivo prolongado *in vitro*. Si bien la mayoría de estos tipos de células pluripotentes fueron capaces de diferenciación *in vitro* y formación de teratoma, solo ES, EG, EC, y las maGSC

derivadas de células madre espermatogoniales o células similares a ES fueron pluripotentes por criterios más estrictos, ya que pudieron formar quimeras postnatales y contribuir a la línea germinal. Recientemente, las células madre espermatogoniales adultas multipotentes (MASC) se derivaron de células madre espermatogoniales testiculares de ratones adultos, y estas células tenían un perfil de expresión diferente al de las células ES (Seandel et al., *Nature*, 449: 346-350 (2007)) pero similar a las células EpiSC, que se derivaron del epiblasto de embriones de ratón posterior a la implantación (Brons et al., *Nature*, 448: 191-195 (2007); Tesar et al., *Nature*, 448: 196-199 (2007)).

#### Reprogramación por factores de transcripción definidos

Takahashi y Yamanaka han informado que la reprogramación de las células somáticas vuelve a un estado similar a ES (Takahashi y Yamanaka, *Cell*, 126: 663-676 (2006)). Reprogramaron con éxito fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y fibroblastos adultos en células pluripotentes similares a ES después de la transducción mediada por virus de los cuatro factores de transcripción Oct4, Sox2, c-myc y Klf4, seguido de la selección para la activación del gen objetivo Oct4 Fbx15 (Figura 2A). Las células que habían activado Fbx15 eran células iPS acuñadas (células madre pluripotentes inducidas) y se demostró que eran pluripotentes por su capacidad de formar teratomas, aunque no pudieron generar quimeras vivas. Este estado pluripotente dependía de la expresión viral continua de los genes transducidos Oct4 y Sox2, mientras que los genes endógenos Oct4 y Nanog no se expresaron o se expresaron a un nivel inferior que en las células ES, y se descubrió que sus respectivos promotores eran en gran medida metilados. Esto es consistente con la conclusión de que las células Fbx15-iPS no correspondían a las células ES, pero pueden haber representado un estado incompleto de reprogramación. Mientras que los experimentos genéticos habían establecido que Oct4 y Sox2 son esenciales para la pluripotencia (Chambers y Smith, *Oncogene*, 23: 7150-7160 (2004); Ivanona et al., *Nature*, 442: 5330538 (2006); Masui et al., *Nat Cell Biol*, 9: 625-635 (2007)), el papel de los dos oncogenes c-myc y Klf4 en la reprogramación es menos claro. De hecho, algunos de estos oncogenes pueden ser prescindibles para la reprogramación, ya que se han obtenido células iPS de ratón y humanas en ausencia de transducción de c-myc, aunque con baja eficacia (Nakagawa et al., *Nat Biotechnol*, 26: 191- 106 (2008); Werning et al., *Nature*, 448: 318-324 (2008); Yu et al., *Science*, 318: 1917-1920 (2007)).

#### MAPC

Las MAPC humanas se describen en la patente de Estados Unidos No. 7.015.037. Las MAPC se han identificado en otros mamíferos. Las MAPC murinas, por ejemplo, también se describen en la patente de Estados Unidos No. 7.015.037. Las MAPC de rata también se describen en la patente de Estados Unidos No. 7.838.289.

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

#### Aislamiento y crecimiento de MAPC

Los métodos de aislamiento de MAPC son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 7.015.037, y estos métodos, junto con la caracterización (fenotipo) de MAPC. Las MAPC pueden aislarse de múltiples fuentes, que incluyen, entre otras, médula ósea, placenta, cordón umbilical y sangre del cordón umbilical, músculo, cerebro, hígado, médula espinal, sangre o piel. Por lo tanto, es posible obtener aspirados de médula ósea, biopsias de cerebro o hígado y otros órganos, y aislar las células utilizando técnicas de selección positivas o negativas disponibles para los expertos en la materia, basándose en los genes que se expresan (o no expresado) en estas células (por ejemplo, mediante ensayos funcionales o morfológicos como los descritos en las aplicaciones mencionadas anteriormente).

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

MAPC de médula ósea humana como se describe en la patente de Estados Unidos No. 7.015.037

Las MAPC no expresan el antígeno leucocitario común CD45 o la glucoforina A específica de eritroblastos (Gly-A). La población mixta de células se sometió a una separación de Ficoll Hypaque. Luego, las células se sometieron a una selección negativa usando anticuerpos anti-CD45 y anti-Gly-A, agotando la población de células CD45<sup>+</sup> y Gly-A<sup>+</sup>, y luego se recuperó el 0,1% restante de células mononucleares de médula ósea. Las células también se pueden sembrar en placas en pozos recubiertos con fibronectina y cultivarse como se describe a continuación durante 2-4 semanas para agotar las células de las células CD45<sup>+</sup> y Gly-A<sup>+</sup>. En cultivos de células adherentes de la médula ósea, muchas células estromales adherentes experimentan senescencia replicativa alrededor de la duplicación celular 30 y una población de células más homogénea continúa expandiéndose y mantiene telómeros largos.

Alternativamente, la selección positiva podría usarse para aislar células mediante una combinación de marcadores específicos de células. Tanto las técnicas de selección positiva como negativa están disponibles para los expertos en la materia, y numerosos anticuerpos monoclonales y policlonales adecuados para fines de selección negativa también están disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, *Leukocyte Typing V*, Schlossman, et al., Eds. . (1995) Oxford University Press) y están disponibles comercialmente a partir de varias fuentes.

Las técnicas para la separación de células de mamíferos de una mezcla de poblaciones celulares también han sido descritas por Schwartz, et al., en la Patente de Estados Unidos No. 5.759.793 (separación magnética), Basch et al., 1983 (cromatografía de inmunoafinidad), y Wysocki y Sato, 1978 (clasificación de células activadas por fluorescencia).

5 Las células pueden cultivarse en medio de cultivo bajo en suero o libre de suero. El medio libre de suero utilizado para cultivar MAPC se describe en la patente de Estados Unidos No. 7.015.037. Los factores de crecimiento comúnmente utilizados incluyen, entre otros, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento epidérmico. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 7.169.610; 7.109.032; 7.037.721; 6.617.161; 6.617.159; 10 6.372.210; 6.224.860; 6.037.174; 5.908.782; 5.766.951; 5.397.706; y 4.657.866; todas enseñan células en crecimiento en medio sin suero.

#### Métodos de cultivo adicionales

15 En experimentos adicionales, la densidad a la que se cultivan las MAPC puede variar de aproximadamente 100 células/cm<sup>2</sup> o aproximadamente 150 células/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 10.000 células/cm<sup>2</sup>, incluyendo aproximadamente 200 células/cm<sup>2</sup> hasta aproximadamente 1500 células/cm<sup>2</sup> hasta aproximadamente 2000 células/cm<sup>2</sup>. La densidad puede variar entre especies. Además, la densidad óptima puede variar de acuerdo con las condiciones de cultivo y la fuente de células. Está dentro de la habilidad del experto ordinario la densidad óptima para 20 un conjunto dado de condiciones de cultivo y células.

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

25 Las células pueden cultivarse bajo diversas concentraciones en suero, por ejemplo, aproximadamente 2-20%. Se puede usar suero bovino fetal. Se puede usar suero superior en combinación con tensiones de oxígeno más bajas, por ejemplo, aproximadamente 15-20%. No es necesario seleccionar las células antes de la adhesión a las placas de cultivo. Por ejemplo, después de un gradiente de Ficoll, las células se pueden sembrar en placa directamente, por 30 ejemplo, 250.000-500.000/cm<sup>2</sup>. Las colonias adherentes pueden ser recogidas, posiblemente agrupadas y expandidas.

En una realización, usada en los procedimientos experimentales en los Ejemplos, se usaron condiciones de suero elevado (aproximadamente 15-20%) y bajo oxígeno (aproximadamente 3-5%) para el cultivo celular. Específicamente, 35 las células adherentes de las colonias se colocaron en placas y se pasaron a densidades de aproximadamente 1700-2300 células/cm<sup>2</sup> en suero al 18% y oxígeno al 3% (con PDGF y EGF).

En una realización específica para MAPC, los suplementos son factores o componentes celulares que permiten a las MAPC retener la capacidad de diferenciarse en tipos de células de más de un linaje embrionario, tal como los tres 40 linajes. Esto puede estar indicado por la expresión de marcadores específicos del estado indiferenciado, tal como Oct 3/4 (Oct 3A) y/o marcadores de alta capacidad de expansión, tal como la telomerasa.

#### Cultivo de células

45 Para todos los componentes enumerados a continuación, véase la patente de Estados Unidos No. 7.015.037.

En general, las células útiles para la invención pueden mantenerse y expandirse en un medio de cultivo disponible y bien conocido en la técnica. También se contempla la suplementación del medio de cultivo celular con sueros de mamíferos. Los suplementos adicionales también se pueden usar ventajosamente para suministrar a las células los 50 oligoelementos necesarios para un crecimiento y expansión óptimos. Las hormonas también pueden usarse ventajosamente en cultivo celular. Los lípidos y los portadores de lípidos también se pueden usar para complementar los medios de cultivo celular, dependiendo del tipo de célula y el destino de la célula diferenciada. También se contempla el uso de capas de células alimentadoras.

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

65 Las células también se pueden cultivar en cultivos "3D" (agregados). Un ejemplo es la PCT/US2009/31528, presentada el 21 de enero de 2009.

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

5 Formulaciones farmacéuticas

La patente de estados Unidos No. 7.015.037 enseña formulaciones farmacéuticas. Las poblaciones de células pueden estar presentes dentro de una composición adaptada y adecuada para el suministro, es decir, fisiológicamente compatible.

15 La pureza de las células (o medio acondicionado) para la administración a un sujeto puede ser aproximadamente del 100% (sustancialmente homogénea). Puede ser del 95% al 100%. Puede ser del 85% al 95%. Particularmente, en el caso de mezclas con otras células, el porcentaje puede ser aproximadamente 10% -15%, 15% -20%, 20% -25%, 25% -30%, 30% -35%, 35% -40%, 40% -45%, 45% -50%, 60% -70%, 70% -80%, 80% -90% o 90% -95%. O el aislamiento/pureza puede expresarse en términos de duplicación celular donde las células han sufrido, por ejemplo, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 o más duplicaciones de células.

20 La elección de la formulación para administrar las células para una aplicación dada dependerá de una variedad de factores. Entre estos se destacarán la especie de sujeto, la naturaleza de la afección a tratar, su estado y distribución en el sujeto, la naturaleza de otras terapias y agentes que se administran, la ruta óptima para la administración, la supervivencia a través de la ruta, el régimen de dosificación y otros factores que serán evidentes para los expertos en la materia. Por ejemplo, la elección de portadores adecuados y otros aditivos dependerá de la ruta exacta de administración y la naturaleza de la forma de dosificación particular.

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

30 Las células/medio pueden formularse en una forma inyectable de dosificación unitaria, tal como una solución, suspensión o emulsión. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la inyección de células/medio son típicamente soluciones y dispersiones acuosas estériles. Los vehículos para formulaciones inyectables pueden ser un disolvente o medio dispersante que contenga, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

35 El experto en la materia puede determinar fácilmente la cantidad de células y aditivos, vehículos y/o portadores opcionales en las composiciones a administrar. Típicamente, cualquier aditivo (además de las células) está presente en una cantidad de 0,001 a 50% en peso en solución, tal como en solución salina tamponada con fosfato. El ingrediente activo está presente en el orden de microgramos a miligramos, tal como aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 5% en peso, preferiblemente aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1% en peso, lo más preferiblemente aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,05% en peso o aproximadamente 0,001 a aproximadamente 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10% en peso, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5% en peso.

45 Las células pueden encapsularse para la administración, particularmente cuando la encapsulación mejora la efectividad de la terapia, o proporciona ventajas en el manejo y/o la vida útil. Las células pueden ser encapsuladas en membranas, así como en cápsulas, antes de la implantación. Se contempla que se pueda emplear cualquiera de los muchos métodos de encapsulación celular disponibles.

50 Se puede usar una amplia variedad de materiales para la microencapsulación de células. Tales materiales incluyen, por ejemplo, cápsulas de polímero, microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato, cápsulas de alginato de poli-L-lisina de bario, cápsulas de alginato de bario, fibras huecas de poliacrilonitrilo/cloruro de polivinilo (PAN/PVC) y fibras huecas polietersulfona (PES).

55 Las técnicas para la microencapsulación de células que pueden usarse para la administración de células son conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Chang, P., et al., 1999; Matthew, H.W., et al., 1991; Yanagi, K., et al., 1989; Cai Z.H., et al., 1988; Chang, TM, 1992 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.639.275 (que, por ejemplo, describe una cápsula biocompatible para el mantenimiento a largo plazo de células que expresan de manera estable moléculas biológicamente activas. Métodos adicionales de encapsulación se encuentran en la publicación de Patente Europea No. 301.777 y en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.353.888; 4.744.933; 4.749.620; 4.814.274; 5.084.350; 5.089.272; 5.578.442; 5.639.275; y 5.676.943.

65 Las células pueden incorporarse en un polímero, tal como un biopolímero o polímero sintético. Los ejemplos de biopolímeros incluyen, entre otros, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, trombina, colágeno y proteoglicanos. Otros factores, tales como las citoquinas discutidas anteriormente, también se pueden incorporar al polímero. Las células

pueden incorporarse en los intersticios de un gel tridimensional. Un polímero o gel grande, típicamente, se implantará quirúrgicamente. Un polímero o gel que se puede formular en partículas o fibras lo suficientemente pequeñas se puede administrar por otras vías comunes, más convenientes, no quirúrgicas.

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

15 Las células pueden suspenderse en un excipiente apropiado en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/mL. Los excipientes adecuados para las soluciones de inyección son aquellos que son biológicamente y fisiológicamente compatibles con las células y con el receptor, tal como la solución salina tamponada u otros excipientes adecuados. La composición para administración puede formularse, producirse y almacenarse de acuerdo con métodos estándar que cumplan con la esterilidad y estabilidad adecuadas.

20 Administración en tejidos linfohematopoyéticos

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

30 Dosificación

Las dosis para humanos u otros mamíferos se pueden determinar sin una experimentación indebida por parte del experto en la materia, a partir de esta divulgación, los documentos citados en el presente documento y el conocimiento en la técnica. La dosis de células/medio apropiada para usarse de acuerdo con el segundo aspecto de la invención dependerá de numerosos factores. Los parámetros que determinarán las dosis óptimas a administrar para la terapia primaria y adyuvante generalmente incluirán algunos o todos los siguientes: la enfermedad que se está tratando y su etapa; la especie del sujeto, su salud, género, edad, peso y tasa metabólica; la inmunocompetencia del sujeto; otras terapias que se administran; y posibles complicaciones esperadas de la historia o el genotipo del sujeto. Los parámetros también pueden incluir: si las células son singénicas, autólogas, alogénicas o xenogénicas; su potencia (actividad específica); el sitio y/o distribución que debe ser dirigido para que las células/medio sean efectivos; y características del sitio tales como accesibilidad a células/medio y/o injerto de células. Los parámetros adicionales incluyen la administración conjunta con otros factores (tales como factores de crecimiento y citoquinas). La dosis óptima en una situación dada también tendrá en cuenta la forma en que se formulan las células/medio, la forma en que se administran y el grado en que las células/medio se localizarán en los sitios objetivo después de la administración.

45 La dosis óptima de células podría estar en el rango de dosis utilizadas para el trasplante de médula ósea mononuclear autóloga. Para preparaciones de células bastante puras, las dosis óptimas pueden variar de  $10^4$  a  $10^8$  células/kg de masa del receptor por administración. La dosis óptima por administración puede estar entre  $10^5$  a  $10^7$  células/kg. La dosis óptima por administración puede ser de  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células/kg. A modo de referencia, las dosis más altas en lo anterior son análogas a las dosis de células nucleadas usadas en el trasplante de médula ósea mononuclear autóloga. Algunas de las dosis más bajas son análogas a la cantidad de células CD34<sup>+</sup>/kg utilizadas en el trasplante de médula ósea mononuclear autóloga.

55 Las células/medio pueden administrarse en una dosis inicial, y posteriormente mantenerse mediante administración adicional. Las células/medio pueden administrarse mediante un método inicialmente, y luego administrarse mediante el mismo método o uno o más métodos diferentes. Los niveles se pueden mantener mediante la administración continua de las células/medio. Las células/medio pueden administrarse inicialmente o para mantener su nivel en el sujeto o ambos por inyección intravenosa. Se pueden usar otras formas de administración, dependiendo de la condición del paciente y otros factores, discutidos en otra parte del presente documento.

60 Las células/medio pueden administrarse en muchas frecuencias durante un amplio intervalo de veces. En general, la duración del tratamiento será proporcional a la duración del proceso de la enfermedad, la efectividad de las terapias que se aplican y la condición y respuesta del sujeto a tratar.

65 Debido a que la invención proporciona células para su uso en un método para tratar MDS, esto podría extenderse potencialmente a otros estados de falla de la médula ósea inmunes/ambientales, tales como anemia aplásica,

neutropenia crónica mediada por inmunidad y leucemia linfocítica granular grande. La idea subyacente es que el aumento de la proliferación y/o diferenciación o la reducción de la apoptosis de los precursores mieloides, si bien es eficaz para el MDS, proporciona un principio por el cual otras deficiencias de células mieloides podrían reducirse o incluso eliminarse.

- 5 Usos
- 10 La administración de las células es útil para reducir cualquiera de los síntomas evidentes de MDS como se describe en esta solicitud. Esto puede basarse en los efectos subyacentes de las células, tales como la reducción en la disminución de precursores mieloides y/o células sanguíneas mieloides maduras, tal como se describe en otra parte de esta solicitud.
- 15 Además, el conocimiento de los mecanismos biológicos descritos en esta solicitud proporciona otros usos. Uno de estos incluye el descubrimiento de fármacos. Este aspecto implica examinar uno o más compuestos para determinar la capacidad de afectar la capacidad de la célula para lograr cualquiera de los efectos descritos en esta solicitud. En consecuencia, el ensayo puede diseñarse para realizarse *in vivo* o *in vitro*. Los ensayos podrían evaluar el efecto a cualquier nivel deseado, por ejemplo, morfológico, por ejemplo, hematológico, supervivencia inmunológica, incluido el efecto sobre la apoptosis y el efecto sobre la diferenciación de células sanguíneas/precursores mieloides.
- 20 Las células pueden seleccionarse en busca de un agente que mejore la capacidad de las células para prevenir o reducir los eventos asociados con MDS como se describe en esta solicitud. La evaluación podría ser *in vivo* como en modelos animales apropiados.
- 25 Sin pretender encontrarse con ninguna teoría en particular, los efectos de las células pueden estar ocurriendo por efectos directos sobre una o más de las diversas células sanguíneas mieloides y sus progenitores o por la secreción de factores de estas células que actúan sobre estos progenitores para aumentar la proliferación y/o diferenciación. En consecuencia, los ensayos de potencia descritos en esta solicitud pueden incluir ensayos *in vitro* que miden los efectos de las células en cualquiera de las diversas células mieloides y sus progenitores. Esto incluiría ensayos sobre la viabilidad general, incluida la proliferación, la vida útil y la diferenciación. También puede implicar el análisis de la función de esas células hematopoyéticas, incluida la expresión génica apropiada o inapropiada. Dichos ensayos incluyen los ensayos de formación de colonias mostrados en los Ejemplos.
- 30 La expresión génica puede evaluarse analizando directamente proteínas o ARN. Esto se puede hacer a través de cualquiera de las técnicas bien conocidas disponibles en la técnica, tal como mediante FACS y otros métodos de detección basados en anticuerpos y PCR y otros métodos de detección basados en hibridación. Los ensayos indirectos también se pueden usar para la expresión, tal como el efecto de la expresión génica.
- 35 Los ensayos de potencia pueden realizarse mediante la detección de genes que son modulados por las células o mediante la detección de genes que son expresados por las células y que pueden ser responsables de los efectos de mejora descritos en esta solicitud, por ejemplo, osteopontina, factor de células madre y Angpt1, que son genes de mantenimiento de células madre hematopoyéticas y, por lo tanto, son de interés. La detección puede ser directa, por ejemplo, mediante ensayos de ARN o proteínas o indirecta, por ejemplo, ensayos biológicos para uno o más efectos biológicos de estos genes.
- 40 Los ensayos para la expresión/secreción incluyen, pero no se limitan a, ELISA, Luminex, qRT-PCR, transferencias Western antifactor, e inmunohistoquímica de factores en muestras de tejido o células.
- 45 La determinación cuantitativa de factores moduladores en células y medios condicionados se puede realizar usando kits de ensayo disponibles comercialmente (por ejemplo, R&D Systems que se basa en un ensayo basado en anticuerpos sustractivos de dos etapas).
- 50 Las células descritas en el presente documento pueden usarse como una capa de alimentación para mantener la hematopoyesis de células mononucleares de médula ósea en pacientes con MDS.
- 55 Un uso adicional para el método de la invención es el establecimiento de bancos de células para proporcionar células para administración clínica. En general, una parte fundamental de este procedimiento es proporcionar células que tengan la potencia deseada para la administración en diversos entornos clínicos terapéuticos.
- 60 Las células pueden seleccionarse por tener una potencia deseada para mejorar los niveles de células sanguíneas mieloides maduras *in vivo* o en un contexto *in vitro*. El medio acondicionado por las células o para extractos de dicho medio acondicionado también se puede usar para evaluar la potencia de una preparación celular, por ejemplo, aumentando la diferenciación y/o proliferación, o reduciendo la apoptosis de una o más células precursoras mieloides, como las mostradas en la Figura 6 y/o aumentando el número de células mieloides maduras.
- 65 Cualquiera de los mismos ensayos útiles para el descubrimiento de fármacos también podría aplicarse a la selección de células para el banco, así como del banco para la administración.

Por consiguiente, en un procedimiento de banco, las células (o el medio) se analizarían para determinar la capacidad de lograr cualquiera de los efectos anteriores. Luego, se seleccionarían las células que tengan la potencia deseada para cualquiera de los efectos anteriores, y estas células formarían la base para crear un banco de células.

5 También se contempla que la potencia se puede aumentar mediante el tratamiento con un compuesto exógeno, tal como un compuesto descubierto a través de la detección de células con grandes bibliotecas combinatorias. Estas bibliotecas de compuestos pueden ser bibliotecas de agentes que incluyen, pero no se limitan a, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros de ADN de ARNpi, péptidos, anticuerpos, proteínas no anticuerpos, citoquinas, quimiocinas y quimioatrayentes. Por ejemplo, las células pueden estar expuestas a dichos agentes en cualquier momento durante el proceso de crecimiento y fabricación. El único requisito es que haya números suficientes para que se realice el ensayo deseado para evaluar si el agente aumenta o no la potencia. Dicho agente, encontrado durante el proceso general de descubrimiento de fármacos descrito anteriormente, podría aplicarse de manera más ventajosa durante el último pasaje antes de realizar operaciones de banco.

15 Una realización que se ha aplicado con éxito a MultiStem® es la siguiente. Las células pueden aislarse de un donante de médula calificado que se haya sometido a requisitos de prueba específicos para determinar que un producto celular obtenido de este donante sería seguro para su uso en un entorno clínico. Las células mononucleares se aíslan usando un procedimiento manual o automatizado. Estas células mononucleares se colocan en cultivo permitiendo que las células se adhieran a la superficie tratada de un recipiente de cultivo celular. Se permite que las células MultiStem® se expandan en la superficie tratada con cambios en los medios que ocurren el día 2 y el día 4. En el día 6, las células se remueven del sustrato tratado por medios mecánicos o enzimáticos y se vuelven a sembrar en placa sobre otra superficie tratada de un recipiente de cultivo celular. En los días 8 y 10, las células se remueven de la superficie tratada como antes y se vuelven a sembrar en placa. El día 13, las células se retiran de la superficie tratada, se lavan y se combinan con un material crioprotector y se congelan, en última instancia, en nitrógeno líquido. Después de que las células se hayan congelado durante al menos una semana, se extrae una parte alícuota de las células y se analiza su potencia, identidad, esterilidad y otras pruebas para determinar la utilidad del banco de células. Estas células en este banco se pueden usar descongelándolas, colocándolas en cultivo o usándolas fuera de la congelación para tratar posibles indicaciones.

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

35 El ensayo de diagnóstico puede implicar evaluar la capacidad de formación de colonias hematopoyéticas mediante el uso de ensayos de CFC y/o LTC-IC.

40 Un uso adicional es evaluar la eficacia de la célula para lograr cualquiera de los resultados anteriores como diagnóstico previo al tratamiento que precede a la administración de las células a un sujeto. Además, la dosificación puede depender de la potencia de las células que se administran. En consecuencia, un ensayo de diagnóstico de potencia previo al tratamiento puede ser útil para determinar la dosis de las células administradas inicialmente al paciente y, posiblemente, administradas adicionalmente durante el tratamiento en función de la evaluación en tiempo real del efecto clínico.

45 El procedimiento de diagnóstico previo al tratamiento puede implicar evaluar la potencia de las células para mejorar la formación de colonias mieloides en un ensayo de CFC y/o LTC-IC.

50 También debe entenderse que las células descritas en el presente documento pueden usarse no solo con fines de tratamiento, sino también con fines de investigación, tanto *in vivo* como *in vitro* para comprender el mecanismo implicado normalmente y en los modelos de enfermedad. Los ensayos, *in vivo* o *in vitro*, se pueden hacer en presencia de agentes que se sabe que están involucrados en el proceso biológico. El efecto de esos agentes se puede evaluar luego. Estos tipos de ensayos también podrían usarse para detectar agentes que tengan un efecto sobre los eventos promovidos por las células descritas en este documento. En consecuencia, se podrían detectar agentes en el modelo de enfermedad que reviertan los efectos negativos y/o promuevan efectos positivos. Por el contrario, se podrían detectar agentes que tengan efectos negativos en un modelo sin enfermedad.

55 La fuente de las células para los diversos ensayos podría ser sangre y/o médula ósea de sujetos tanto normales como con MDS.

60 Composiciones

También se describen en el presente documento poblaciones de células con potencias específicas para lograr cualquiera de los efectos descritos en el presente documento. Como se describió anteriormente, estas poblaciones se establecen seleccionando las células que tienen la potencia deseada. Estas poblaciones se usan para hacer otras composiciones, por ejemplo, un banco celular que comprende poblaciones con potencias específicas deseadas y composiciones farmacéuticas que contienen una población celular con una potencia específica deseada.

Las células pueden tener una potencia deseada para aumentar los niveles de células sanguíneas maduras, por ejemplo, glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas.

## 5 Ejemplos no limitantes

### Ejemplo 1

1. El efecto del MultiStem/MAPC humano sobre las células madre hematopoyéticas (HSC) derivadas de pacientes con MDS utilizando ensayos de formación de colonias (cultivos a corto y largo plazo).

#### 1.1 Características de las muestras de pacientes.

La médula ósea (BM) se obtuvo de pacientes que se presume que tienen MDS y de controles sanos, después del consentimiento informado. Todos los muestreos y la manipulación se realizaron de acuerdo con las directrices del comité ético local de los Hospitales Universitarios de Lovaina (UZ Lovaina), que cumplen con la declaración de Helsinki.

Hasta ahora, se analizaron veinticuatro muestras de BM de presuntos pacientes con MDS. Después del diagnóstico clínico, trece pacientes fueron clasificados como MDS de bajo riesgo y cuatro pacientes como MDS de alto riesgo. Los otros pacientes fueron categorizados como citopenias desconocidas (n = 7). Como controles, se utilizaron muestras de BM de jóvenes (n = 16) y de edades similares (n = 7) de voluntarios sanos.

Se aislaron células mononucleares de BM (BMMNC) sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) y se seleccionaron células CD34<sup>+</sup> usando perlas magnéticas (Miltenyi Biotec). La celularidad de la BM disminuye con la edad, lo que se observó en los pacientes, así como en los controles de la misma edad. Sin embargo, el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> no se vio afectado en pacientes con MDS o citopenias desconocidas (Figura 1).

#### 1.2 Ensayo de células formadoras de colonias (CFC)

Las BMMNC se prepararon en medios MethoCult H4434 que contenían FBS al 30%, 50 ng/mL del factor de células madre, 10 ng/mL de GM-CSF, 10 ng/mL interleuquina 3 y 3 U/mL de EPO (Stem Cell Technologies). Las células se colocaron en placas a razón de  $1,5 \times 10^5$  células/pozo para pacientes y  $1,5 \times 10^4$  células/pozo para controles en una placa de 12 pozos, con o sin MultiStem/MAPC. En la condición con MultiStem, las células se añadieron a razón de 10.000 células/cm<sup>2</sup> en un dispositivo Transwell de 0,4 µm por encima del cultivo (= sin contacto). Después de 14 días de incubación, las placas se evaluaron utilizando un microscopio invertido. Grupos de 40 o más células se evaluaron como una colonia. Las colonias de granulocitos, monocitos y granulocitos-monocitos se evaluaron como CFU-GM y las colonias eritroides como BFU-E.

No hubo un aumento significativo en el número de colonias eritroides cuando se añadieron MultiStem o MAPC al cultivo, tanto en pacientes como en controles de la misma edad. Sin embargo, se observó un aumento significativo en las colonias mieloides (CFU-GM) en los pacientes tratados con MultiStem o MAPC (Figura 2-3).

#### 1.3 Ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC)

Para determinar la influencia de MultiStem/MAPC en la frecuencia de células progenitoras hematopoyéticas primitivas, se inició un ensayo LTC-IC con y sin MultiStem proporcionado en un dispositivo Transwell de 0,4 µm por encima del cultivo (10.000 células/cm<sup>2</sup>). Por lo tanto, las células CD34<sup>+</sup> derivadas de pacientes con MDS y controles se colocaron en placas en alimentadores AFT durante 5 semanas. Posteriormente, las células se volvieron a sembrar en placa en metilcelulosa y las colonias se cuantificaron después de 14 días. En las muestras de pacientes con MDS, se observó una frecuencia significativamente mayor de LTC-IC cuando se agregó MultiStem al cultivo, mientras que no se observó influencia en la frecuencia de LTC-IC en muestras de control de la misma edad (Figura 4).

A continuación, se repitió el mismo ensayo en pacientes con MDS de bajo riesgo y citopenias desconocidas (n = 5), incluidas condiciones adicionales: un cultivo sin contacto con dos donantes de MultiStem diferentes (SJA y SVG), un cultivo sin contacto con medio MultiStem fresco (sin células), un cultivo de contacto directo con MultiStem (SJA de donante, sembrado en placa a razón de 5.000 células/cm<sup>2</sup>) y finalmente un cultivo sin contacto con MultiStem (SJA de donante) proporcionado de manera intermitente (cada dos semanas).

Se puede confirmar el resultado anterior en el que MultiStem (SJA de donante) aumenta significativamente el porcentaje de LTC-IC. Además, este efecto fue independiente del donante, ya que se pudo obtener el mismo resultado usando SVG de donante MultiStem. El efecto positivo de MultiStem también se mantuvo cuando las células se proporcionaron de forma intermitente (cada dos semanas) al cultivo. No se obtuvo ningún resultado significativo con el medio MultiStem solo o cuando MultiStem estuvo en contacto directo con el cultivo, lo que indica un posible papel para un factor soluble producido por MultiStem (Figura 5).

Ejemplo 2

1. El efecto de las células progenitoras adultas multipotentes sobre la insuficiencia de la médula ósea en los síndromes mielodisplásicos

5

Introducción

Los síndromes mielodisplásicos primarios (MDS) son trastornos clonales de células madre hematopoyéticas (HSC) caracterizados por hematopoyesis ineficaz y citopenias periféricas. Los defectos intrínsecos en el HSC así como los defectos extrínsecos en el nicho de la médula ósea (BM) contribuyen a la patogénesis del MDS. En algunos pacientes, los fármacos inmunomoduladores han mostrado una mejora significativa en las citopenias. Las células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) son células madre del estroma no hematopoyéticas derivadas de la BM con potentes efectos inmunomoduladores hacia las células T.

10

Propósito

Probar el efecto de MAPC como terapia basada en células para MDS. Se presumió que los pacientes con MDS de bajo riesgo en los que los mecanismos mediados por el sistema inmunitario y el medio ambiente que son en gran parte causados por las citopenias podrían beneficiarse de la terapia con MAPC.

20

Materiales y métodos

Se generaron dos modelos de ratón MDS: se creó un primer modelo mediante la sobreexpresión del oncogén Evi-1 en las células de linaje de BM de murino que se trasplantaron posteriormente en ratones C57Bl/6 irradiados en forma letal. Se creó un segundo modelo entrecruzando Dicer flexionado con ratones Osterix-Cre para crear ratones Osx-Cre+ dicer<sup>lox/lox</sup> (OCD), en los que Dicer se elimina selectivamente en osteoprogenitores de BM. Esta eliminación altera la integridad de la hematopoyesis en el nicho y conduce a MDS.

25

Además, se usaron muestras de BM de pacientes con MDS en cultivos hematopoyéticos a corto y largo plazo, con o sin MAPC humano sembrado en dispositivos Transwell por encima del cultivo.

30

Resultados

En los ratones trasplantados con Evi-1, la pancitopenia se desarrolló 10-15 meses después del trasplante de BM y Evi-1 se expresó altamente en sangre y BM. Además, el número de colonias hematopoyéticas y la frecuencia de progenitores primitivos disminuyeron en estos ratones. El modelo de OCD mostró recuentos sanguíneos más bajos, un número reducido de colonias mixtas y una frecuencia más baja de progenitores hematopoyéticos en comparación con los ratones de control. El análisis morfológico reveló megacariocitos displásicos en BM y aumento de RBC policromatófilicos en sangre de ratones enfermos.

35

40

Las células de BM totales, derivadas de pacientes con MDS, se colocaron en placas en metilcelulosa con y sin MAPC humanas. Después de 14 días, se observó un aumento en las colonias de CFU-GM en la condición con MAPC. Cuando las células CD34<sup>+</sup> de estos pacientes se colocaron en placas en alimentadores en un cultivo a largo plazo, se pudo observar una mayor frecuencia de progenitores hematopoyéticos primitivos cuando se proporcionaron MAPC en un dispositivo Transwell por encima del cultivo.

45

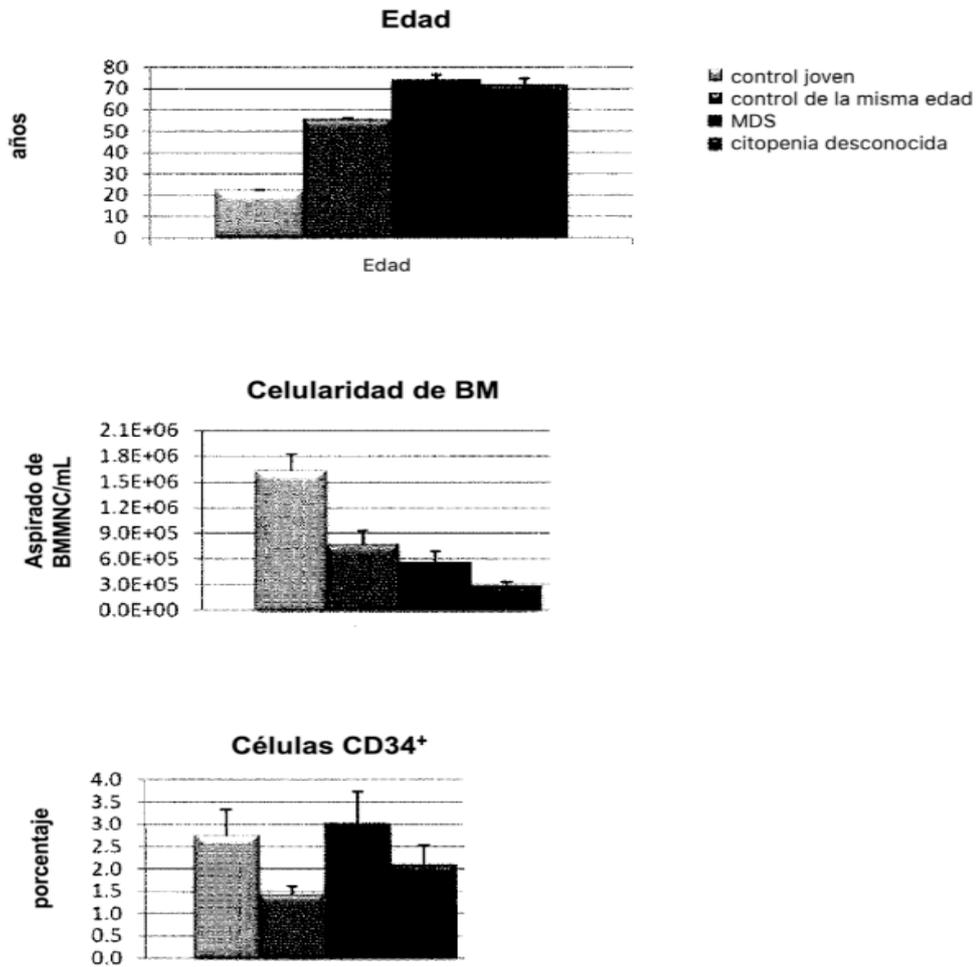
Conclusiones

Se establecieron dos modelos de ratón de MDS. Además, las MAPC humanas ejercieron un efecto positivo *in vitro* sobre la capacidad de formación de colonias de células hematopoyéticas derivadas de pacientes con MDS.

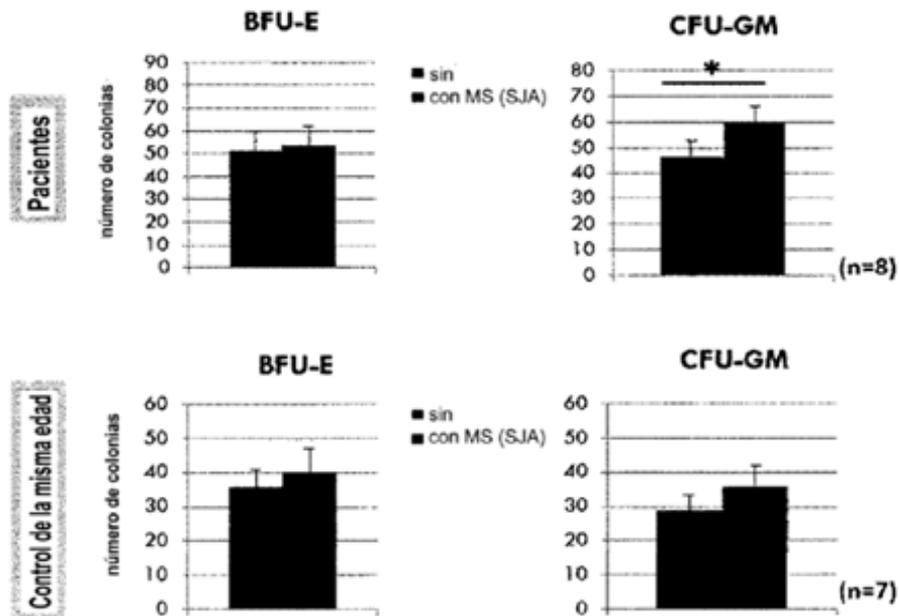
50

**REIVINDICACIONES**

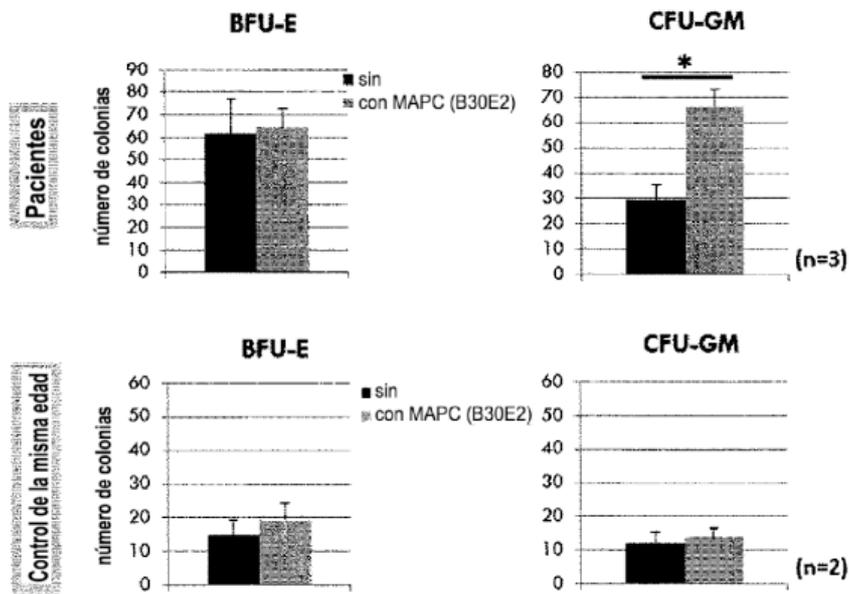
- 5 1. Un método *in vitro* para evaluar la potencia de una célula, siendo la célula una célula progenitora adulta multipotente caracterizada porque la célula es una célula no embrionaria, no germinal que expresa uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1, comprendiendo el método evaluar la potencia de la célula para mejorar la diferenciación, proliferación o esperanza de vida (viabilidad) de glóbulos rojos, leucocitos, plaquetas o precursores de estas células.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que las células no embrionarias, no germinales expresan telomerasa.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, en el que las células no embrionarias, no germinales pueden diferenciarse en tipos de células de al menos dos de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que las células no embrionarias, no germinales expresan oct4.
- 15 5. El método de la reivindicación 3, en el que las células no embrionarias, no germinales pueden diferenciarse en tipos células de las tres capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
- 20 6. El método de la reivindicación 2, en el que las células no embrionarias, no germinales pueden diferenciarse en tipos de células de al menos dos de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
- 20 7. El método de la reivindicación 4, en el que las células no embrionarias, no germinales pueden diferenciarse en tipos células de al menos dos de las capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, en el que las células no embrionarias, no germinales expresan oct4 y telomerasa y pueden diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales endodérmica, ectodérmica y mesodérmica.
- 30 9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que las células no embrionarias, no germinales no son tumorigénicas ni están transformadas y tienen un cariotipo normal.
- 30 10. El método de cualquier reivindicación precedente en el que la evaluación de la potencia de la célula incluye un ensayo de formación de colonias o en el que la evaluación de la potencia de la célula se realiza mediante la detección de genes que son modulados por las células o mediante la detección de genes que son expresados por las células.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que los genes se seleccionan del grupo que consiste en osteopontina, factor de células madre y Angpt1.
- 40 12. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que los genes que son expresados por las células son detectados por ELISA, Luminex, qRT-PCR, transferencias Western antifactor o inmunohistoquímica de factor.
- 40 13. El método de cualquier reivindicación precedente que comprende además seleccionar células que tienen dicha potencia y opcionalmente que comprende además crear un banco de células que comprende las células que tienen dicha potencia.
- 45 14. El método de cualquier reivindicación precedente en el que las células no embrionarias, no germinales se derivan de la médula ósea humana.
- 50 15. Células para usar en un método para tratar un síndrome mielodisplásico en un sujeto, las células son células no embrionarias, no germinales que expresan uno o más de oct4, telomerasa, rex-1 o rox-1, en el que las células se han evaluado por la potencia de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y en el que se ha encontrado que las células tienen una potencia para mejorar la diferenciación, proliferación o esperanza de vida (viabilidad) de glóbulos rojos, leucocitos, plaquetas o precursores de estas células.



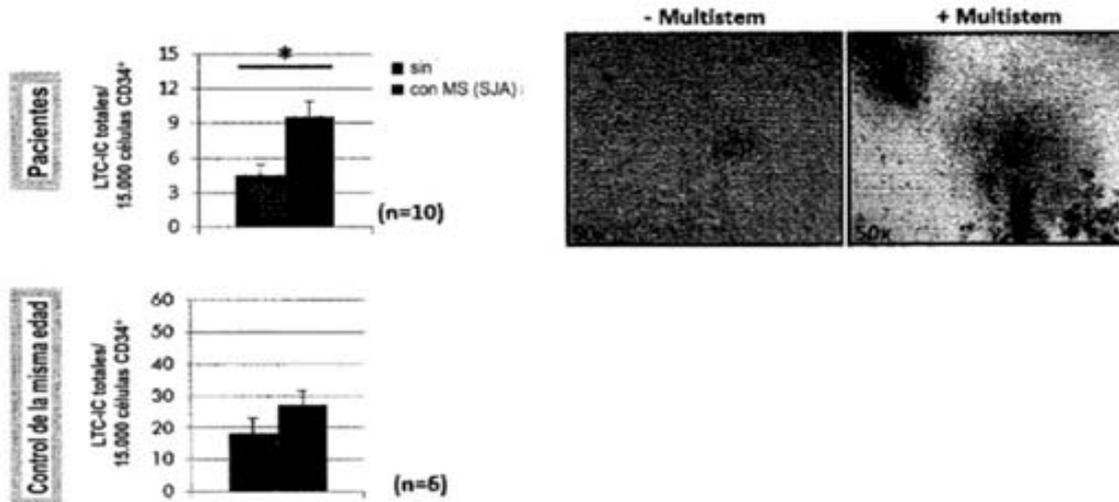
**Figura 1:** La edad, la celularidad de la BM y el porcentaje de células CD34+ en controles jóvenes (n=16), controles de la misma edad (n=7), pacientes con MDS (n=17) con citopenias desconocidas (n=7)



**Figura 2:** Ensayo de CFC con y sin MultiStem (SJA de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestran los números de colonias de BFU-E y CFU-GM en pacientes y controles de la misma edad.



**Figura 3:** Ensayo de CFC con y sin MAPC (B30E2) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestran los números de colonias de BFU-E y CFU-GM en pacientes y controles de la misma edad.



**Figura 4:** panel izquierdo = ensayo LTC-IC con y sin MultiStem (SJA de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo. Se muestra el número de LTC-IC totales por 15.000 células CD34+ sembradas en placa en pacientes y controles de la misma edad. Panel derecho = Morfología de contraste de fase de colonias de CFU-GM de una muestra de un paciente con MDS con y sin MultiStem (50x, Axiovert 40C, Zeiss).

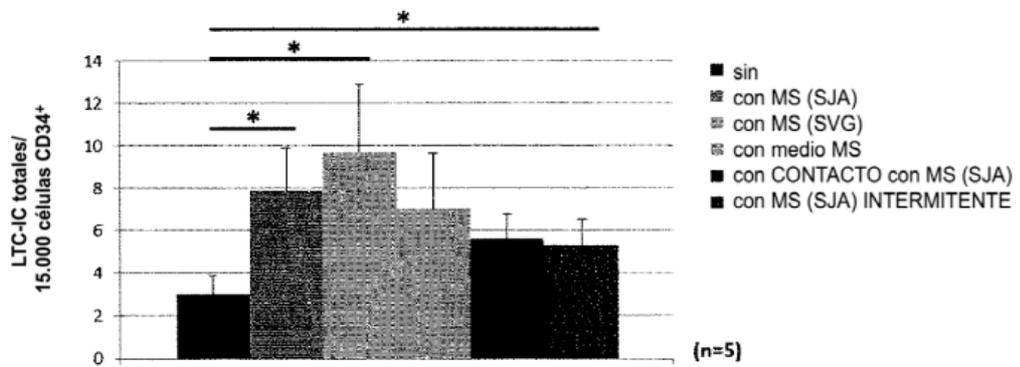


Figura 5: Ensayo LTC-IC con y sin MultiStem (SJA de donante en SVG de donante) proporcionado en un dispositivo Transwell por encima del cultivo, sólo con medio MultiStem (en Transwell), con MultiStem (SJA) en contacto directo, con MultiStem (SJA) suministrado intermitentemente. Se muestra el número de LTC-IC totales por 15.000 células CD34+ sembradas en placa en pacientes con MDS de bajo riesgo y citopenias desconocidas.

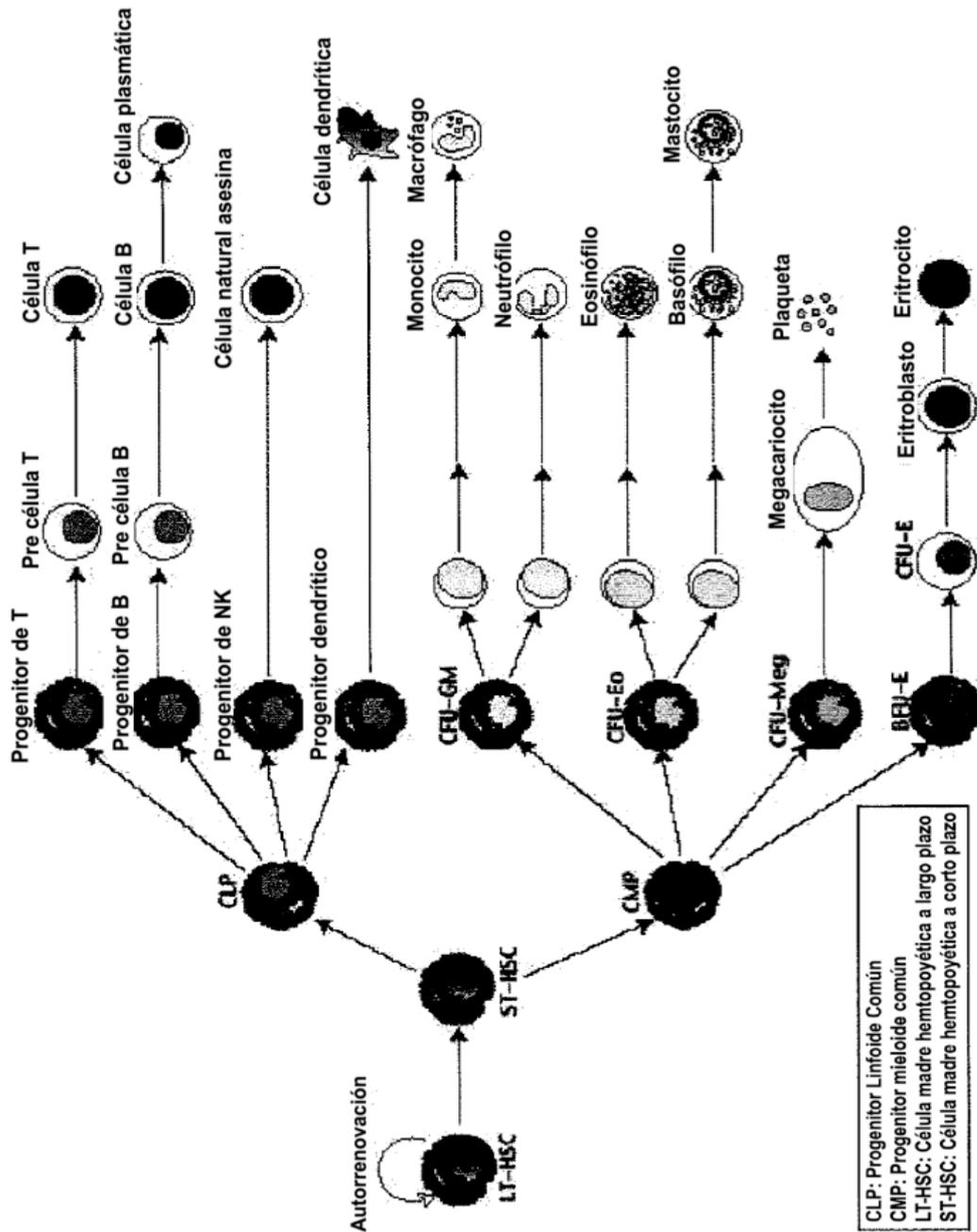


Figura 6