

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 281**

51 Int. Cl.:

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/AU2013/001454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14089625**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13862590 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2931373**

54 Título: **Métodos de tratamiento o prevención de afecciones respiratorias**

30 Prioridad:
12.12.2012 US 201261736352 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2020

73 Titular/es:
**MESOBLAST, INC. (100.0%)
505 Fifth Avenue Third Floor
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:
**ITESCU, SILVIU;
KRISHNAN, RAVI y
GHOSH, PETER**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 759 281 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

Métodos de tratamiento o prevención de afecciones respiratorias

5 Campo

La presente descripción se refiere a células para su uso en el tratamiento o la prevención de afecciones respiratorias, por ejemplo, afecciones respiratorias alérgicas mediadas por IgE.

10 Introducción

Se reconoce que las afecciones respiratorias abarcan afecciones patológicas que afectan a los órganos y tejidos involucrados en el intercambio de gases, e incluyen afecciones del tracto respiratorio superior, tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos, pleura y cavidad pleural, y los nervios y músculos de la respiración. Las afecciones respiratorias crónicas causan aproximadamente el 7 % de todas las muertes en todo el mundo y representan aproximadamente el 4 % de la carga mundial de enfermedad. Solo en los EE. UU., el costo de las afecciones respiratorias crónicas se estima en alrededor de 154 mil millones de dólares anuales, incluidos los costos directos e indirectos. Las afecciones respiratorias se pueden dividir en varias clases, que incluyen:

- 20 • condiciones pulmonares inflamatorias, tales como asma, fibrosis quística, enfisema, trastorno pulmonar obstructivo crónico o síndrome de dificultad respiratoria aguda, que se caracterizan por niveles elevados de neutrófilos y/o citocinas inflamatorias en los pulmones de un sujeto;
- afecciones pulmonares obstructivas, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma, que se caracterizan por una reducción en el volumen de las vías respiratorias o impedimento del flujo de gas libre; y
- 25 • afecciones pulmonares restrictivas (también conocidas como enfermedades pulmonares intersticiales), como el síndrome de dificultad respiratoria infantil, que se caracteriza por la pérdida de la distensibilidad pulmonar que causa expansión pulmonar incompleta y/o aumento de la rigidez pulmonar.

El asma es una afección respiratoria crónica común caracterizada por síntomas variables y recurrentes, obstrucción reversible de las vías respiratorias, hiperreactividad de las vías respiratorias (por ejemplo, bronquial) y una inflamación subyacente. Los síntomas agudos del asma incluyen tos, sibilancias, dificultad para respirar y despertar nocturno. Estos síntomas generalmente surgen del broncoespasmo y requieren y responden a la terapia broncodilatadora. Un aspecto central de la fisiopatología del asma es la presencia de inflamación subyacente de las vías respiratorias mediada por el reclutamiento y la activación de múltiples tipos de células, incluyendo mastocitos, eosinófilos, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Los mecanismos que influyen en la hiperreactividad de las vías respiratorias son múltiples e incluyen inflamación, neuroregulación disfuncional y remodelación de las vías respiratorias. La remodelación de las vías respiratorias implica cambios estructurales que incluyen engrosamiento de la membrana subbasal, fibrosis subepitelial, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso de las vías respiratorias, proliferación y dilatación de los vasos sanguíneos con los consiguientes cambios permanentes en las vías respiratorias que aumentan la obstrucción del flujo de aire y que no se previene ni es completamente reversible por terapias actuales.

Las terapias estándar actuales para el asma son una combinación de corticosteroides y agonistas β_2 (fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores). Estos fármacos proporcionan un control aceptable de la afección para muchos asmáticos. Sin embargo, se estima que del 5 al 10 % de los pacientes con asma tienen una afección sintomática a pesar del tratamiento con esta combinación de corticosteroides y agonistas β_2 (Chanez y col., J Allergy Clin Immunol 119:1337-1348 (2007)).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés) es la afección pulmonar crónica más común asociada con una morbilidad y mortalidad significativas. En los Estados Unidos, la COPD es la cuarta causa principal de muerte y representa más de 30 mil millones de dólares en costos anuales de atención médica. Se estima que 16 millones de adultos se ven afectados por la COPD, y cada año alrededor de 120.000 estadounidenses mueren a causa de la enfermedad. La COPD se define como una enfermedad crónica caracterizada por inflamación de las vías respiratorias/alveolares/sistémicas, con obstrucción medida del flujo de aire (FEV1/FVC <70 % y FEV_i <80 % predicho) que mejora parcialmente con la terapia broncodilatadora. La liberación local y sistémica de mediadores inflamatorios por las células pulmonares conduce a la enfermedad de las vías respiratorias (bronquitis obstructiva crónica) y, en una minoría de pacientes, a la destrucción del tejido parenquimatoso (enfisema), lo que puede provocar la limitación del flujo de aire que caracteriza la COPD. La liberación de estos mediadores inflamatorios por las células pulmonares también puede exacerbar la inflamación en otros sistemas de órganos, como el observado en afecciones coronarias, cerebrovasculares y vasculares periféricas.

Las terapias actuales para tratar la COPD incluyen broncodilatadores, especialmente agentes anticolinérgicos, que

ayudan en cierto grado a disminuir la hiperinflación, aumentando así la capacidad inspiratoria y aliviando la disnea. Aunque los corticosteroides son un tratamiento efectivo para la mayoría de los casos de asma, las células inflamatorias y los mediadores en la COPD no son sensibles al tratamiento con corticosteroides sistémicos o inhalados, por lo que el tratamiento con estos agentes es de utilidad limitada en la COPD.

5

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés) es un trastorno fibrótico crónico y progresivo del tracto respiratorio inferior que generalmente afecta a adultos mayores de 40 años. Se cree que la IPF se produce como resultado de una lesión inicial en el pulmón por factores ambientales como el humo del cigarrillo que conduce al reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y macrófagos en los alvéolos pulmonares. La liberación de citocinas fibrogénicas, como el TGF- β por parte de las células epiteliales alveolares, produce la proliferación, migración y fibrosis de fibroblastos. Estos fibroblastos no solo llenan el espacio respiratorio sino que también secretan colágeno y proteínas de la matriz en respuesta a muchas citocinas que conducen a la remodelación parenquimatosa (Shimizu y col., Am J Respir Crit Care Med 163:210-217 (2001)). Esta diferenciación de fibroblastos es probablemente clave para la naturaleza crónica de IPF. Estos eventos conducen a tos y a falta de aire progresiva. Los pacientes con IPF han comprometido la función pulmonar y han mostrado volúmenes y capacidades pulmonares restrictivos. Aunque los corticosteroides, los agentes inmunosupresores, el inhibidor de elastasa de neutrófilos, el factor de crecimiento de hepatocitos y el interferón gamma-1b se han propuesto como agentes de tratamiento para la IPF, no se sabe que otro tratamiento que no sea el trasplante de pulmón prolongue la supervivencia y la IPF sigue siendo un trastorno mortal con una tasa media de supervivencia de 3 a 6 años. Por lo tanto, la primera línea de tratamiento de IPF aún no se ha establecido.

Otras afecciones respiratorias incluyen, entre otras, hipertensión arterial pulmonar (PAH, por sus siglas en inglés), vasoconstricción pulmonar, linfangioleiomiomatosis (LAM, por sus siglas en inglés), complejo de esclerosis tuberosa (TSC, por sus siglas en inglés), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés) y lesión pulmonar inducida por el ventilador (VILI, por sus siglas en inglés).

Será evidente para el experto en la materia a partir de la descripción anterior que las afecciones respiratorias son una clase de afecciones prevalentes y debilitantes para las que existen opciones limitadas de tratamiento. Por lo tanto, las nuevas terapias para estas afecciones son deseables.

30

Resumen

Los presentes inventores han demostrado que usar preparaciones celulares STRO-1⁺ son capaces de reducir las respuestas alérgicas mediadas por T_H2 (por ejemplo, reducir los niveles de eosinófilos y/o IL-4 y/o niveles de IgE), por ejemplo, una respuesta alérgica mediada por IgE, así como la hiperreactividad bronquial de una manera dependiente de la dosis en un modelo animal aceptado de una afección respiratoria humana, como asma, por ejemplo, asma alérgica. Los inventores descubrieron que podían suprimir (o ambos) una respuesta alérgica temprana y/o una respuesta alérgica tardía. Esta dosis de respuesta demuestra que son las preparaciones celulares STRO-1⁺ las que proporcionan un beneficio terapéutico.

40

Las preparaciones celulares STRO-1⁺ redujeron adicionalmente la infiltración de células eosinófilas en la luz de las vías respiratorias y el líquido de lavado broncoalveolar y el número de neutrófilos en el líquido de lavado broncoalveolar, demostrando la capacidad de estas preparaciones para suprimir la inflamación en el pulmón de un sujeto, por ejemplo, sujetos que padecen una afección respiratoria inflamatoria, como, asma

45

Las preparaciones celulares STRO-1⁺ redujeron adicionalmente los niveles de IgE específica de alérgenos en animales tratados.

Los inventores también observaron que la respuesta asmática de fase tardía, por ejemplo, causada por la migración de neutrófilos y basófilos al sistema respiratorio mejoró en los sujetos que recibieron preparaciones celulares STRO-1⁺. Estas observaciones indican que las preparaciones celulares STRO-1⁺ son útiles para reducir o prevenir el daño al sistema respiratorio, por ejemplo, inflamación y/o remodelación causada por neutrófilos y basófilos.

La presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones.

55

Los hallazgos de los inventores proporcionan la base para un método de tratamiento o prevención de una afección respiratoria en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para tratar o prevenir una alergia mediada por IgE (o una alergia mediada por T_H2) en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

60

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para reducir una respuesta alérgica a un alérgeno y/o para inducir anergia a un alérgeno, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

5

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para tratar o prevenir una respuesta alérgica al alérgeno de los ácaros del polvo doméstico (HDM, por sus siglas en inglés) o reducir una respuesta alérgica a los HDM y/o para inducir anergia a los HDM, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

10

La presente descripción proporciona adicionalmente un método para mejorar la función pulmonar en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas, donde el sujeto padece una alergia, una alergia mediada por IgE o una respuesta alérgica a HDM.

15

En un ejemplo, la afección respiratoria se asocia con proliferación celular excesiva, remodelación, inflamación, vasoconstricción, broncoconstricción, hiperreactividad de las vías respiratorias y/o edema. Por ejemplo, la descripción proporciona métodos para tratar o prevenir afecciones tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, hipertensión arterial pulmonar; síndrome de dificultad respiratoria aguda, lesión pulmonar inducida por el ventilador, fibrosis quística, bronquiectasia, deficiencia de alfa-1-antitripsina, rinitis, rinosinusitis, discinesia ciliar primaria, neumonía, bronquiolitis, enfermedad pulmonar intersticial que incluye linfangioleiomiomatosis, fibrosis pulmonar idiopática, bronquiolitis obliterante, neumonía intersticial inespecífica, neumonía organizadora criptogénica, neumonía intersticial aguda, enfermedad pulmonar intersticial asociada a bronquiolitis respiratoria o sarcoidosis pulmonar.

20

En un ejemplo, un pulmón o afección es una lesión pulmonar aguda. Por ejemplo, la lesión pulmonar aguda es uno o más de traumatismo físico, una lesión química, por ejemplo, una quemadura química, inhalación de humo o exposición a una sustancia tóxica. En otra realización específica, dicha enfermedad, trastorno o afección pulmonar es una lesión causada por una enfermedad neoplásica o paraneoplásica.

En un ejemplo, la afección respiratoria es crónica. A este respecto, un método de descripción puede usarse para tratar una etapa temprana o una etapa tardía o ambas etapas de una afección respiratoria crónica.

En un ejemplo, la afección respiratoria es una afección respiratoria inflamatoria, una afección respiratoria obstructiva o una afección respiratoria restrictiva.

35

En un ejemplo, la afección respiratoria o alergia es una obstrucción reversible de las vías respiratorias.

En un ejemplo, la afección respiratoria o alergia es una afección respiratoria obstructiva, como COPD, asma, broncolitis obliterante o fibrosis quística. En un ejemplo, la afección respiratoria es asma.

40

En un ejemplo, la afección respiratoria es una afección respiratoria restrictiva, como una afección pulmonar restrictiva (por ejemplo, alveolitis alérgica extrínseca, alveolitis fibrosante, asbestosis o neumonía eosinofílica) o una afección pleural restrictiva (por ejemplo, derrame pleural, neumotórax o bronquiectasia).

En un ejemplo, la afección respiratoria no se debe a una infección o cáncer.

En un ejemplo, la afección respiratoria es una afección inflamatoria. Por ejemplo, la afección se asocia con hiperreactividad de las vías respiratorias y/o hiperreactividad bronquial y/o infiltración de células eosinófilas en la luz de las vías respiratorias y el líquido de lavado broncoalveolar. A este respecto, en un ejemplo, un método de la descripción comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas, de modo que se reduce la hiperreactividad de las vías respiratorias y/o la hiperreactividad bronquial y/o la infiltración de células eosinófilas y/o la infiltración de neutrófilos en la luz de las vías respiratorias y/o el líquido de lavado broncoalveolar.

50

En un ejemplo, la afección es asma, como asma crónica o asma aguda o asma alérgica. Por ejemplo, la afección es asma crónica o asma alérgica.

En un ejemplo, la afección está asociada con la remodelación del pulmón, por ejemplo, asma o fibrosis pulmonar, como la fibrosis pulmonar idiopática.

60

En un ejemplo, el asma es asma grave y/o asma refractaria.

En un ejemplo, la afección es asma refractaria a esteroides. Por ejemplo, un sujeto que padece asma es resistente al tratamiento con un esteroide, por ejemplo, un corticosteroide, como flunisolida, furoato de mometasona, triamcinolona, fluticasona, budesonida, dipropionato de beclometasona o una combinación de dos o más de los anteriores.

5 En otro ejemplo, la afección es asma refractaria beta agonista de acción prolongada (LABA, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un sujeto que padece asma es resistente al tratamiento con un agonista beta de acción prolongada como, por ejemplo, salmeterol, formoterol, bambeterol o clenbuterol.

En otro ejemplo, la afección es LABA y asma refractaria a esteroides.

10

En un ejemplo, el método reduce o previene una respuesta alérgica o asmática de fase temprana.

En otro ejemplo, el método reduce o previene una respuesta alérgica o asmática de fase tardía.

15 En un ejemplo, la afección es una afección fibrótica. La enfermedad fibrótica del pulmón puede ser enfermedad pulmonar intersticial (enfermedad pulmonar parenquimatosa difusa). En otro ejemplo, la enfermedad pulmonar intersticial es silicosis, asbestosis, beriliosis, esclerosis sistémica, polimiositis o dermatomiositis. En otros ejemplos, la enfermedad pulmonar intersticial es causada por un antibiótico, un fármaco quimioterapéutico, un fármaco antiarrítmico o una infección.

20

En otro ejemplo, la afección es fibrosis pulmonar idiopática.

En un ejemplo, un método como se describe en esta invención en cualquier ejemplo comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1^{brillantes} y/o progenie de las mismas y/o factores solubles

25

derivados de las mismas.

En un ejemplo, un método como se describe en esta invención en cualquier ejemplo comprende administrar una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y fosfato alcalino no específico de tejido + (TNAP)⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas.

30

En un ejemplo, un método como se describe en esta invención en cualquier ejemplo comprende administrar una población de células enriquecidas para células fosfato alcalino no específico de tejido + (TNAP)⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas. Como se muestra en esta invención, tales células son STRO-1⁺, por ejemplo, STRO-1^{brillante}. En un ejemplo, las células están enriquecidas para células STRO-3⁺.

35

En un ejemplo, la población enriquecida para células STRO-1⁺ y/o la progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran sistémicamente.

Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran por vía intravenosa.

40

En otro ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran por vía intranasal o por inhalación.

En un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una pluralidad de veces. A este respecto, los presentes inventores han demostrado que una población de células como se describe en esta invención

45 puede proporcionar un beneficio terapéutico durante hasta cuatro semanas o durante al menos cuatro semanas. Según un ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada tres o más semanas. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada cuatro o más semanas. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada cinco o más semanas. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada diez o más

50 semanas. Por ejemplo, la población y/o la progenie y/o los factores solubles se administran una vez cada doce o más semanas.

En un ejemplo, el método comprende monitorear al sujeto y administrar una dosis adicional de la población y/o la progenie y/o los factores solubles cuando ocurre uno o más de los siguientes:

55

(i) un sujeto comienza a jadear y/o tos persistentemente y/o tiene opresión en el pecho y/o tiene dificultad para respirar;

(ii) un sujeto muestra uno o más de los siguientes cuando es evaluado por espirómetro:

a) 20 % de diferencia en al menos tres días en una semana durante al menos dos semanas;

60

b) ≥ 20 % de mejora del flujo máximo después del tratamiento, por ejemplo: 10 minutos de agonista β inhalado (por ejemplo, salbutamol); seis semanas de corticosteroides inhalados (por ejemplo, beclometasona); 14 días de 30 mg de prednisolona.

c) ≥ 20 % de disminución en el flujo máximo después de la exposición a un desencadenante (por ejemplo, ejercicio);

(iii) broncoscopia que muestra células anormales y/o sustancias extrañas y/o bloqueos en el tracto respiratorio de un sujeto; o

(iv) tomografía computarizada del tórax que muestra anomalías de los vasos sanguíneos en los pulmones, acumulación de sangre o líquido en los pulmones, bronquiectasias, derrame pleural o neumonía.

5

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar una dosis de la población y/o la progenie y/o los factores solubles suficientes para lograr uno o más de los siguientes:

(i) hiperreactividad bronquial mejorada, por ejemplo, evaluada mediante una prueba de provocación bronquial;

10 (ii) hiperreactividad mejorada de las vías respiratorias;

(iii) infiltración reducida de eosinófilos en el pulmón o líquido de lavado broncoalveolar;

(iv) reducción de la infiltración de neutrófilos en el pulmón o líquido de lavado broncoalveolar;

(v) respuesta asmática tardía reducida, por ejemplo, según lo evaluado por espirómetro;

(vi) respuesta asmática temprana reducida, por ejemplo, según lo evaluado por espirómetro; y/o

15 (vii) reducción de la remodelación pulmonar/fibrosis, por ejemplo, según lo evaluado por la tomografía computarizada del tórax.

En un ejemplo, la dosis es suficiente para lograr al menos dos o tres o cuatro de cinco o todo lo anterior.

20 En un ejemplo, un método descrito en esta invención de según cualquier ejemplo comprende administrar entre 1×10^6 hasta 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas.

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar entre 25×10^6 hasta 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas. Por ejemplo, el método comprende administrar

25 aproximadamente 25×10^6 o 75×10^6 o 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas.

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar entre aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células hasta $4,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg.

30 En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar entre aproximadamente $4,5 \times 10^5$ hasta $4,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg. Por ejemplo, el método comprende administrar aproximadamente $4,5 \times 10^5$ o aproximadamente $5,5 \times 10^6$ o aproximadamente $1,7 \times 10^6$ o aproximadamente $1,9 \times 10^6$ o aproximadamente $3,5 \times 10^6$ o aproximadamente $4,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por kg.

35

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar una dosis de células STRO-1⁺ para todo el cuerpo y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas. Por ejemplo, cuando las células o los factores solubles se administran una pluralidad de veces, la dosis de todo el cuerpo permanece constante.

40

Por ejemplo, el método comprende administrar 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas en 10 ml a un sujeto, es decir, $1,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por ml.

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar a un sujeto que padece asma refractaria a esteroides o asma refractaria LABA o asma refractaria a esteroides y LABA 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas, por ejemplo, en 10 ml a un sujeto, es decir, $1,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por ml.

45

En un ejemplo, un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo comprende administrar a un sujeto que padece fibrosis pulmonar idiopática 150×10^6 células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas, por ejemplo, en 10 ml a un sujeto, es decir, $1,5 \times 10^6$ células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas por ml.

50

En un ejemplo, las de población y/o de la progenie son autogénicas o alogénicas y/o los factores solubles pueden derivarse de células autogénicas o alogénicas. En un ejemplo, la población y/o la progenie son alogénicas y/o los factores solubles son de células alogénicas.

55

Según el ejemplo anterior, el método puede comprender adicionalmente obtener las células de población y/o de progenie y/o factores solubles o puede comprender adicionalmente aislar la población y/o células de progenie y/o factores solubles. En un ejemplo, las células de población y/o progenie se basan en la expresión de STRO-1 y/o TNAP.

60

En un ejemplo, las células de población y/o progenie y/o factores solubles se obtienen del sujeto que se está tratando. En otro ejemplo, las células de población y/o progenie y/o factores solubles se obtienen de un sujeto diferente de la

misma especie.

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

5

Según el ejemplo anterior, un método como se describe en esta invención según cualquier ejemplo puede comprender adicionalmente cultivar las células de población y/o de la progenie.

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

10

Según el ejemplo anterior, un método como se describe en esta invención según cualquier ejemplo puede comprender adicionalmente formular la población y/o la progenie y/o factores solubles en una composición.

15

En un ejemplo, el sujeto padece una afección respiratoria o una exacerbación de la misma (por ejemplo, un ataque de asma) en el momento del tratamiento. Por ejemplo, el sujeto necesita tratamiento.

En un ejemplo, el sujeto tiene una afección respiratoria, sin embargo, no padece activamente la afección respiratoria o una exacerbación de la misma (por ejemplo, un ataque de asma) en el momento del tratamiento, es decir, el método es un método para prevenir la afección o una exacerbación de la misma.

20

La presente descripción también proporciona una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para su uso en el tratamiento o prevención de una afección respiratoria.

25

La presente descripción también proporciona el uso de una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una afección respiratoria en un sujeto.

30

La presente descripción también proporciona un kit que comprende una población de células enriquecidas para células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas empaquetadas con instrucciones de uso en un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo.

Por ejemplo, la presente descripción proporciona un kit que comprende una composición que comprende la población y/o la progenie y/o los factores solubles empaquetados con información del producto que indica el uso de la composición en un método descrito en esta invención según cualquier ejemplo.

35

Breve descripción de los dibujos

40

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

45

50

Figura 2. Representaciones gráficas que muestran histogramas citométricos de flujo representativos producidos utilizando suspensiones de células individuales de MPC de macacos cangrejeros expandidas derivadas de médula ósea de cultivo con expresión positiva de la superficie celular de los marcadores de células madre mesenquimatosas, STRO-1, STRO-4 y CD146 (sólido) en relación con los controles negativos del isotipo (IgM, IgG2a e IgG1) (cortado) detectados usando anticuerpos secundarios de cabra anti-murino IgM o IgG-FITC conjugado. Los histogramas representativos también muestran que las MPC de macacos cangrejeros carecen de la expresión de la superficie celular para marcadores de monocitos/macrófagos (CD14), células madre/progenitoras hematopéticas (CD34) y leucocitos maduros (CD45). Los niveles de fluorescencia superior al 1 % en comparación con el control de isotipo significan positividad.

55

60

Figura 3 es una representación esquemática de la línea de tiempo del estudio para evaluar la seguridad y la eficacia

de las MPC en el tratamiento de un modelo de asma en ovejas.

Figura 4 es una serie de representaciones gráficas que muestran la respuesta asmática de fase temprana (EAR, por sus siglas en inglés) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos resumidos de EAR se muestran en (A) para el grupo de control y los tres grupos de tratamiento, 25 millones, 75 millones y 150 millones de oMPC. Los datos representan el cambio porcentual en la resistencia desde las lecturas de resistencia del valor basal tomadas después de la exposición a aerosol de solución salina de control hasta las lecturas de resistencia máxima tomadas durante la primera hora después de la exposición a alérgenos. Las lecturas de EAR se tomaron en tres ocasiones durante el ensayo: 2 semanas antes del tratamiento con oMPC/solución salina (pretratamiento); 1 semana después del tratamiento con oMPC/solución salina (1 semana después del tratamiento); y 4 semanas después de los tratamientos con oMPC/solución salina (4 semanas después del tratamiento). Los datos en (B) y (C) muestran comparaciones entre los grupos de control y tratamiento para el cambio porcentual en EAR desde el pretratamiento hasta 1 semana y 4 semanas, después de los tratamientos, respectivamente. Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y el grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC. $**p<0,01$ $*p<0,05$.

Figura 5 es una serie de representaciones gráficas que muestran la respuesta asmática de fase tardía (LAR, por sus siglas en inglés) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos resumidos de LAR se muestran en (A) para el grupo de control y los tres grupos de tratamiento, 25 millones, 75 millones y 150 millones de oMPC. Los datos representan el cambio porcentual en la resistencia desde las lecturas de resistencia de valor basal tomadas antes de la exposición a alérgenos en aerosol hasta las lecturas de resistencia tomadas 6 horas después de la exposición a alérgenos. Las lecturas de LAR se tomaron en tres ocasiones durante el ensayo: 2 semanas antes del tratamiento con oMPC/solución salina (pretratamiento); 1 semana después del tratamiento con oMPC/solución salina (1 semana después del tratamiento); y 4 semanas después de los tratamientos con oMPC/solución salina (4 semanas después del tratamiento). Los datos en (B) y (C) muestran comparaciones entre los grupos de control y tratamiento para el cambio porcentual en LAR desde el pretratamiento hasta 1 semana y 4 semanas, después de los tratamientos, respectivamente. Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y el grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC. $**p<0,01$ $*p<0,05$.

Figura 6 es una serie de representaciones gráficas que muestran hiperreactividad bronquial (BHR, por sus siglas en inglés) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos resumidos de BHR se muestran en (A) para el grupo de control y los tres grupos de tratamiento, 25 millones, 75 millones y 150 millones de oMPC. Los datos de BHR en el eje y representan el número medio de unidades respiratorias de carbacol requeridas para inducir un cambio del 100 % en la resistencia. Las lecturas de BHR se tomaron en tres ocasiones durante el ensayo: 2 semanas antes del tratamiento con oMPC/solución salina (pretratamiento); 1 semana después del tratamiento con oMPC/solución salina (1 semana después del tratamiento); y 4 semanas después de los tratamientos con oMPC/solución salina (4 semanas después del tratamiento). Los datos en (B) y (C) muestran comparaciones entre los grupos de control y tratamiento para el cambio porcentual en BHR desde el pretratamiento hasta 1 semana y 4 semanas, después de los tratamientos, respectivamente. Los datos en (D) muestran las comparaciones de datos BHR entre el grupo control y los grupos de tratamiento agrupados. Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y el grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC. $*p<0,05$ $**p<0,01$

Figura 7 es una serie de representaciones gráficas que muestran eosinófilos en el líquido broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos se presentan como un resumen del porcentaje de eosinófilos (A), el cambio en el porcentaje de eosinófilos desde el pretratamiento a 1 semana (C) y 4 semanas (D) después del tratamiento, y el grupo control en comparación con los grupos de tratamiento agrupados (E). Los eosinófilos/ml se muestran en (B). Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y el grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC. $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Figura 8 es una serie de representaciones gráficas que muestran neutrófilos en el líquido broncoalveolar (BAL) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos se presentan como un resumen del porcentaje de neutrófilos (A) y neutrófilos/ml (B). Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y el grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC. $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,005$

Figura 9 es una serie de representaciones gráficas que muestran macrófagos en el líquido broncoalveolar (BAL) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos se presentan como un resumen del porcentaje de macrófagos (A) y macrófagos/ml (B). Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y grupos de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de

oMPC.

Figura 10 es una serie de representaciones gráficas que muestran linfocitos en el líquido broncoalveolar (BAL) en el transcurso del estudio para grupos de tratamiento con solución salina y MPC. Los datos se presentan como un resumen del porcentaje de linfocitos (A) y linfocitos/ml (B). Los datos se presentan como media \pm EEM. N = 11 para el grupo de control y grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para un grupo de 25 millones y 150 millones de oMPC.

Figura 11 es una serie de representaciones gráficas que muestran los niveles de IgE en sueros de ovejas asmáticas. Datos de ELISA que muestran niveles medios de absorbancia (Abs) para IgE específica de HDM en los sueros de ovejas de ensayo. Los datos se presentan como media \pm EEM y muestran comparaciones de los niveles de HDM-IgE antes y después de los tratamientos con oMPC (A), y el cambio porcentual en los niveles de IgE desde el pretratamiento a 1 semana (B) y 4 semanas (C). Se tomaron sueros en el pretratamiento, 1 semana después del tratamiento y 4 semanas después del tratamiento de todas las ovejas en los días de ensayo 51, 72 y 93, respectivamente. N = 11 para el grupo de control y grupo de 75 millones de oMPC; N = 10 para grupos de 25 millones y 150 millones de oMPC. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Descripción detallada

Técnicas generales y definiciones seleccionadas

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

Cada ejemplo descrito en esta invención debe aplicarse *mutatis mutandis* a todos y cada uno de los ejemplos de la descripción, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los expertos en la materia apreciarán que la presente descripción y ejemplos individuales de la misma son susceptibles a variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se ha de entender que la descripción incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La descripción también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos o más cualquiera de dichas etapas o características.

El alcance de la presente descripción no está limitado por los ejemplos específicos de la descripción incluidos en esta invención, que están destinados únicamente a fines de ejemplo. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la descripción como se describe en esta invención.

La presente descripción se lleva a cabo sin experimentación indebida utilizando, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología de ADN recombinante, síntesis de péptidos en disolución, síntesis de péptidos en fase sólida, e inmunología. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Segunda edición (1989), todos los Vols I, II y III; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II (D. N.

Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, texto completo; *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, texto completo, y concretamente los trabajos de Gait, pág. 1-22; Atkinson y col., pág. 35-81; Sproat y col., pág. 83-115; y Wu y col., pág. 135-151; 4. *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, todo el texto; *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (1986) IRL Press, Oxford, texto completo; Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods In*

Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), serie completa; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Germany); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en *The Peptides* (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, New York. 12. Wunsch, E., ed. (1974)

Synthese von Peptiden en Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4a ed., Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. & Bodanszky, A. (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 25, 449-474; *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y *Animal Cell Culture: Practical Approach*, tercera edición (John R. W.

Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, texto completo.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que el término

“comprende”, o variaciones tales como “comprenden” o “que comprende/comprenden” implican la inclusión de determinada etapa o elemento o número entero o grupo de etapas o elementos o números enteros, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

5 Tal como se usa en esta invención, el término “derivados/derivadas de” se entenderá que indica que un número entero especificado se puede obtener de una fuente en particular aunque no necesariamente directamente de dicha fuente. En el contexto de los factores solubles derivados de células STRO-1⁺ y/o células de su progenie, este término se entenderá que significa uno o más factores, por ejemplo, proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. producidos durante el cultivo *in vitro* de células STRO-1⁺ y/o células de su progenie.

10

Se debe considerar que el término “afección respiratoria” incluye cualquier enfermedad o afección que reduce la función pulmonar en un sujeto e incluye, por ejemplo, asma, bronquitis crónica, enfisema, fibrosis quística, insuficiencia respiratoria, edema pulmonar, embolia pulmonar, hipertensión pulmonar (presión arterial alta), neumonía y tuberculosis (TB), cáncer de pulmón, rigidez y cicatrización de los pulmones (por ejemplo, causada por fármacos, 15 venenos, infecciones o radiación), trastornos pulmonares por presión atmosférica inusual (por ejemplo, causada por un mecanismo ventilador). En un ejemplo, la afección respiratoria es una afección pulmonar crónica y/o una afección pulmonar asociada con inflamación en el pulmón, por ejemplo, la afección pulmonar es COPD asmática o fibrosis quística o fibrosis pulmonar o bronquiolitis o alveolitis o vasculitis o sarcoidosis. En otro ejemplo, la afección se asocia con remodelación o fibrosis de los pulmones de un sujeto, por ejemplo, la afección es fibrosis pulmonar (por ejemplo, 20 fibrosis pulmonar idiopática) o asma.

Como se usa en esta invención, se entenderá que el término “asma” significa una enfermedad caracterizada por síntomas paroxísticos o persistentes de disnea, opresión en el pecho, sibilancias, producción de esputo y tos, asociados con limitación variable del flujo de aire e hiperreactividad de las vías respiratorias a estímulos endógenos o 25 exógenos (Pautas de Canadian Asthma Consensus) y/o una afección caracterizada por hiperreactividad de las vías respiratorias que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos, particularmente de noche o temprano en la mañana junto con una obstrucción variable del flujo de aire que a menudo es reversible espontáneamente o con tratamiento (The Global Initiative for Asthma).

30 Como se usa en esta invención, se entenderá que el término “asma grave” significa síntomas de asma bien controlados en dosis altas a muy altas de corticosteroides inhalados, con o sin el uso de corticosteroides orales; y “asma muy grave” se entenderá que significa síntomas de asma bien controlados o no controlados adecuadamente a pesar de una dosis muy alta de corticosteroides inhalados e ingeridos y con o sin necesidad de terapias adicionales. Para estas definiciones, las dosis diarias altas y muy altas de corticosteroides inhalados (dosis equivalentes aproximadas) se 35 definen de la siguiente manera: La dosis alta es dipropionato de beclometasona, 1000 a 2000 µg; fluticasona, 500 a 1000 µg; y budesonida, 800 a 1600 µg y una dosis muy alta es fluticasona, 1000 a 2000 µg y budesonida, 1600-3200 µg.

Como se usa en esta invención, el término “asma refractaria” incluye pacientes con asma “fatal” o “casi fatal”, así como 40 los subgrupos de asma descritos previamente como “asma grave” y “asma dependiente y/o resistente a esteroides”, “difícil de controlar el asma”, “asma mal controlada”, “asma quebradiza” o “asma irreversible”. El asma refractaria se puede definir según las pautas de la American Thoracic Society cuando se cumplen uno o ambos criterios principales y dos criterios menores, descritos a continuación. Los criterios principales son: Para lograr el control a un nivel de asma persistente leve-moderada: (1) Tratamiento con corticosteroides orales continuos o casi continuos (≥50 % del 45 año) 2) Requisitos para el tratamiento con corticosteroides inhalados en dosis altas. Los criterios menores son: (1) Requisito para el tratamiento diario con un medicamento controlador además de los corticosteroides inhalados, por ejemplo, LABA, teofilina o antagonista de leucotrienos (2) Síntomas de asma que requieren el uso de agonistas β de acción corta a diario o casi a diario (3) Obstrucción persistente de las vías respiratorias (FEV₁<80 % previsto; variabilidad diurna máxima del flujo espiratorio (PEF, por sus siglas en inglés)> 20 %) (4) Una o más visitas de atención 50 urgente para el asma por año (5) Tres o más “estallidos” de esteroides orales por año (6) Deterioro rápido con una reducción ≤25 % en la administración oral o dosis de corticosteroides inhalados (7) Evento de asma casi fatal en el pasado. A los efectos de la definición de asma refractaria, el fármaco (µg/d) y la dosis (dosis de inhalaciones/d) son como sigue: (a) dipropionato de beclometasona > 1.260 > 40 dosis de inhalaciones (42 µg/inhalación) > 20 dosis de inhalaciones (84 µg/inhalación); (b) Budesonida > 1.200 > 6 dosis de inhalaciones; (c) Flunisolida > 2.000 > 8 dosis de 55 inhalaciones; (d) propionato de fluticasona > 880 > 8 dosis de inhalaciones (110 µg), > 4 dosis de inhalaciones (220 µg); (e) acetónido de triamcinolona > 2.000 > 20 dosis de inhalaciones.

Como se usa en esta invención, el término “asma aguda” o “asma alérgica” se refiere al asma desencadenada por alérgenos (por ejemplo, heces de ácaros del polvo o polen) que activan los mastocitos ubicados debajo de la mucosa 60 de las vías respiratorias inferiores del tracto respiratorio. La activación de los mastocitos desencadena la liberación de gránulos que estimulan el epitelio nasal para producir moco y la posterior contracción del músculo liso dentro de las vías respiratorias. Esta contracción del músculo liso constriñe las vías respiratorias, causando la sibilancia asmática

característica.

El “asma crónica” no es causada por alérgenos, sino que es el resultado de la inflamación obtenida del asma aguda. Los efectos generales del asma aguda causan inflamación crónica, lo que hace que el epitelio de la mucosa se vuelva
5 hipersensible a las respuestas ambientales. Por lo tanto, los agentes ambientales simples, como el humo, pueden estimular el epitelio hipersensible para que produzca grandes cantidades de mucosidad y constricción.

Como se usa en esta invención, el término “fibrosis pulmonar idiopática” se entenderá que significa una forma crónica y progresiva de enfermedad pulmonar de origen desconocido caracterizada por fibrosis del marco de soporte
10 (intersticio) de los pulmones. Los síntomas comunes son disnea progresiva (dificultad para respirar), pero también incluyen tos seca, dedos en palillo de tambor (desfiguración de los dedos) y estertores (un sonido crepitante en los pulmones durante la inhalación, que se escucha con un estetoscopio). La Declaración de consenso multidisciplinario ATS/ERS de 2002 sobre las neumonías intersticiales idiopáticas propuso los siguientes criterios para establecer el diagnóstico de IPF sin una biopsia pulmonar:

- 15
- Criterios principales (se requieren los 4):
 - Exclusión de otras causas conocidas de enfermedad pulmonar intersticial (fármacos, exposiciones, enfermedades del tejido conectivo);
 - Pruebas de función pulmonar anormales con evidencia de restricción (capacidad vital reducida) e intercambio de
20 gases deteriorado (pO₂, p(A-a)O₂, DLCO);
 - Anomalías reticulares bibasilares con vidrio esmerilado mínimo en tomografías computarizadas de alta resolución; y
 - La biopsia pulmonar transbronquial o el lavado broncoalveolar (BAL) no muestran características para respaldar un diagnóstico alternativo.
 - 25 • Criterios menores (se requieren 3 de 4):
 - Edad > 50;
 - Inicio insidioso de disnea de esfuerzo de otro modo inexplicable;
 - Duración de la enfermedad > 3 meses; y
 - Crepitaciones inspiratorias bibasilares.

30 Se entenderá que el término “exacerbación” significa una exageración de los síntomas respiratorios de una afección respiratoria, por ejemplo, un ataque de asma.

Una “respuesta alérgica de fase temprana” (o respuesta asmática) generalmente ocurre dentro de 2 horas, o una hora
35 o 30 minutos o 10 minutos o 1 minuto después de la exposición al alérgeno y también se conoce comúnmente como la reacción alérgica inmediata o como una reacción alérgica tipo I. La reacción es causada por la liberación de histamina y proteínas granulares de mastocitos por un proceso llamado desgranulación, así como por la producción de leucotrienos, prostaglandinas y citocinas, por los mastocitos después de la reticulación de moléculas de IgE específicas de alérgenos unidas a receptores FcεRI de mastocitos. Estos mediadores afectan las células nerviosas
40 que causan picazón, las células del músculo liso que provocan la contracción (que conduce al estrechamiento de las vías respiratorias visto en el asma alérgico), las células caliciformes que producen mucosidad y las células endoteliales que causan vasodilatación y edema.

Una “respuesta alérgica de fase tardía” (o respuesta asmática) generalmente se desarrolla aproximadamente 6-12
45 horas u 8-12 horas después de la exposición al alérgeno y está mediada, por ejemplo, por mastocitos). Los productos de la reacción de fase temprana incluyen quimiocinas y moléculas que actúan sobre las células endoteliales y hacen que expresen la molécula de adhesión intercelular (como la molécula de adhesión de células vasculares y las selectinas), que juntas resultan en el reclutamiento y activación de leucocitos de la sangre al sitio de la reacción alérgica. Normalmente, las células infiltrantes observadas en las reacciones alérgicas contienen una alta proporción
50 de linfocitos, y especialmente de eosinófilos. Los eosinófilos reclutados se degranularán liberando una serie de moléculas citotóxicas (incluidas las proteínas básicas principales y la peroxidasa de eosinófilos), así como producirán varias citocinas como la IL-5. Las células T reclutadas son normalmente de la variedad Th2 y las citocinas que producen conducen a un mayor reclutamiento de mastocitos y eosinófilos, y en el isotipo de células plasmáticas se cambia a IgE, que se unirá a los receptores FcεRI de los mastocitos y preparará al individuo para una respuesta
55 alérgica adicional.

Como se usa en esta invención, el término “cantidad efectiva” se considerará que significa una cantidad suficiente de células STRO-1⁺ y/o células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas para reducir
60 uno o más síntomas de una afección respiratoria como se describe en esta invención.

Como se usa en esta invención, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se considerará que significa una cantidad suficiente de células STRO-1⁺ y/o células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de

las mismas para tratar una afección respiratoria, es decir, de modo que el sujeto ya no satisfaga los criterios clínicos para una afección respiratoria o una exacerbación de la misma.

5 Como se usa en esta invención, el término “cantidad profilácticamente efectiva” se considerará que significa una cantidad suficiente de células STRO-1⁺ y/o células de la progenie y/o factores solubles derivados de las mismas para prevenir o inhibir o retrasar la aparición de una afección respiratoria o una exacerbación de la misma o una recaída de la misma.

10 Tal como se usa en esta invención, se entenderá que el término “dosis de cuerpo entero” significa que a los sujetos se les administra una dosis específica de células y/o factores solubles independientemente de su peso corporal o área de superficie corporal.

15 Tal como se usa en esta invención, se entenderá que el término “tratar” o “tratamiento” o “tratar” significa administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de factores solubles y/o células y reducir o inhibir los síntomas de una afección respiratoria tal que el sujeto ya no se diagnostica clínicamente con la afección o una exacerbación de la misma.

20 Como se usa en esta invención, el término “prevenir” o “que previene” o “prevención” se entenderá como administrar una cantidad profilácticamente efectiva de factores solubles y/o células y detener u obstaculizar o retrasar el desarrollo o progresión de una afección respiratoria o exacerbación de la misma. La prevención de una afección respiratoria también incluye administrar una cantidad profilácticamente efectiva de factores solubles y/o células y prevenir o reducir la frecuencia de exacerbaciones de la afección.

25 Como se usa en esta invención, el término “factores solubles” se entenderá que significa cualquier molécula, por ejemplo, proteína, péptido, glucoproteína, glucopéptido, lipoproteína, lipopéptido, carbohidrato, etc., producida por células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas que son solubles en agua. Dichos factores solubles pueden ser intracelulares y/o secretados por una célula. Dichos factores solubles pueden ser una mezcla compleja (por ejemplo, sobrenadante) y/o una fracción de estos y/o pueden ser un factor purificado. En un ejemplo, los factores solubles están o están contenidos dentro del sobrenadante. En consecuencia, cualquier ejemplo en esta invención dirigido a la administración de uno o más factores solubles se tomará para aplicar *mutatis mutandis* a la administración de sobrenadante.

35 Como se usa en esta invención, el término “sobrenadante” se refiere al material no celular producido después del cultivo *in vitro* de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas en un medio adecuado, por ejemplo, medio líquido. Normalmente, el sobrenadante se produce cultivando las células en el medio en condiciones y tiempo adecuados, y a continuación se elimina el material celular mediante un proceso tal como centrifugación. El sobrenadante puede o puede no haber sido sometido a etapas de purificación adicionales antes de la administración. En un ejemplo, el sobrenadante comprende menos de 10⁵, más como, menos de 10⁴, por ejemplo, menos de 10³, por ejemplo, no hay células vivas.

40 Como se usa en esta invención, el término “individuo normal o sano” se entenderá como un sujeto que no padece una afección respiratoria según lo evaluado por cualquier método conocido en la técnica y/o descrito en esta invención. En un ejemplo, un “individuo normal o sano” no padece ninguno de los síntomas de una afección respiratoria.

Alérgenos

45 En un ejemplo, la presente descripción proporciona un método para reducir o prevenir una respuesta (por ejemplo, una respuesta alérgica) a un alérgeno. Como se usa en esta invención, el término “alérgeno” se considerará una sustancia que comprende uno o más antígenos que son capaces de inducir la formación de IgE específica (es decir, una respuesta alérgica). Después de la producción de IgE, la IgE se une a un receptor Fc en la superficie de un mastocito o un basófilo. Después de la exposición posterior al alérgeno, al menos dos anticuerpos IgE que se unen a al menos dos epítomos en el alérgeno provocan la reticulación de las regiones Fab' de las moléculas de IgE, lo que resulta en la liberación de mastocitos o basófilos de una variedad de aminas vasoactivas, como, por ejemplo, histamina, lo que induce síntomas alérgicos. El término alérgeno incluye todos los tipos de alérgenos, por ejemplo, un alérgeno de polipéptido, un alérgeno de fosfolípidos, un ácido graso o un carbohidrato. En la tabla 1 se exponen
55 ejemplos de alérgenos comunes.

Tabla 1: Alérgenos comunes aislados de organismos

	Fuente de alérgenos		PM
	Nombre sistemático	Nombre(s) anterior(es)	
Asterales	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (ambrosía corta)		
	Amb a 1	Antígeno E	38
	Amb a 2	Antígeno K	38
	Amb a 3	Ra3	11
	Amb a 5	Ra5	5
	Amb a 6	Ra6	10
	Amb a 7	Ra7	12
	Amb a?		11
	<i>Ambrosia trifida</i> (ambrosía gigante)		
	Amb t 5	Ra5G	4,4
	<i>Artemisia vulgaris</i> (artemisa)		
	Art v 2		35
Poales	<i>Cynodon dactylon</i> (gramilla)		
	Cyn d 1		32
	<i>Dactylis glomerata</i> (pasto ovillo)		
	Dac g 1	AgDg 1	32
	Dac g 2		11
	Dac g 5		31
	<i>Lolium perenne</i> (grama de centeno)		
	Lol p 1	Grupo I	27
	Lol p 2	Grupo II	11
	Lol p 3	Grupo III	11
	Lol p 5		31
	Lol p 9	Lol p lb	31/35
	<i>Phleum pratense</i> (fleo de los prados)		
	Phl p 1		27
	Phl p 5	Ag25	32
	<i>Poa pratensis</i> (poa de los prados)		
	Poa p 1	Grupo I	33
	Poa p 5		31
	Poa p 9		32/34
	<i>Sorghum halepense</i> (hierba Johnson)		
	Sor h 1		
Fagales	<i>Alnus glutinosa</i> (lambrán)		
	Aln g 1		17
	<i>Betula verrucosa</i> (abedul)		

	Fuente de alérgenos		PM
	Nombre sistemático	Nombre(s) anterior(es)	
	Bet v 1		17
	Bet v 2	profilin	15
	<i>Carpinus betulus</i> (carpe)		
	Car b 1		17
	<i>Corylus avellana</i> (avellano)		
	Cor a 1		17
	<i>Quercus alba</i> (roble blanco)		
	Que a 1		17
Pinales	<i>Cryptomeria japonica</i> (sugi)		
	Cry j 1		41-45
	Cry j 2		
	<i>Juniper sabinooides</i> (cedro de montaña)		
	Jun s 1		50
	<i>Juniper virginiana</i> (cedro rojo oriental)		
	Jun v 1		45-50
Oleales	<i>Olea europea</i> (aceituna)		
	Ole e 1		16
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (ácaro)		
	Der p 1	Antígeno P1	25
	Der p 2		14
	Der p 3	tripsina	28/30
	Der p 4	amilasa	60
	Der p 5		14
	Der p 6	quimotripsina	25
	Der p 7		22-28
	<i>Dermatophagoides microceras</i> (ácaro)		
	Der m 1		25
	<i>Dermatophagoides farinae</i> (ácaro)		
	Der f 1		25
	Der f 2		14
	Der f 3		30
	<i>Lepidoglyphus destructor</i> (ácaro de almacenamiento)		
	Lep d?		15
	<i>Canis familiaris</i> (perro)		
	Can f 1		25
	Can f 2		27
	<i>Felis domesticus</i> (saliva de gato)		

Fuente de alérgenos		PM
Nombre sistemático	Nombre(s) anterior(es)	
Fel d 1	cat-1	38
<i>Mus musculus</i>		
Mus m 1	MUP	19
<i>Rattus norvegicus</i>		
Rata n 1		17
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
Asp f 1		18
Asp f?		90
Asp f?		55
<i>Candida albicans</i>		
Cand a		40
<i>Alternaria alternata</i>		
Alt a 1		28
<i>Trichophyton tonsurans</i>		
Tri t 1		30
<i>Blattaria germanica</i> (cucaracha)		
Bla g 2		20

En un ejemplo, el alérgeno es de un animal, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un perro o un gato o una rata o un ratón.

5

En un ejemplo, el alérgeno es de una planta, por ejemplo, polen vegetal.

En un ejemplo, el alérgeno es de un insecto, por ejemplo, un ácaro.

10 En un ejemplo, el alérgeno es HDM.

Las células STRO-1⁺ o células de progenie, y sobrenadante o uno o más factores solubles derivados de las mismas

15 Las células STRO-1⁺ son células que se encuentran en la médula ósea, la sangre, los dientes de leche (por ejemplo, dientes de leche exfoliados), las células de la pulpa dental, el tejido adiposo, la piel, el bazo, el páncreas, el cerebro, los riñones, el hígado, el corazón, la retina, el cerebro, los folículos pilosos, el intestino, el pulmón, el ganglio linfático, el timo, el hueso, el ligamento, el tendón, el músculo esquelético, la dermis y el periostio.

20 En un ejemplo, las células STRO-1⁺ son capaces de diferenciarse en una o más o dos o más y/o tres líneas germinales tales como mesodermo y/o endodermo y/o ectodermo.

25 En un ejemplo, las células STRO-1⁺ son células multipotenciales que son capaces de diferenciarse en una gran cantidad de tipos celulares que incluyen, entre otros, tejidos conectivos adiposos, óseos, cartilagosos, elásticos, musculares y fibrosos. El compromiso con un linaje específico y la ruta de diferenciación que estas células toman depende de diversas influencias, desde influencias mecánicas y/o factores bioactivos endógenos, tales como factores de crecimiento, citoquinas y/o condiciones microambientales locales establecidas por los tejidos huésped. Las células multipotenciales STRO-1⁺ son, por lo tanto, células progenitoras no hematopoyéticas que se dividen para producir células hijas que son células madre o células precursoras que, con el tiempo, se diferenciarán irreversiblemente para producir una célula fenotípica.

30

En un ejemplo, las células STRO-1⁺ se enriquecen a partir de una muestra obtenida de un sujeto, por ejemplo, un

sujeto a tratar o un sujeto relacionado o un sujeto no relacionado (ya sea de la misma especie o diferente). Los términos “enriquecido”, “enriquecimiento” o variaciones de los mismos se usan en el presente documento para describir una población de células en la cual la proporción de un tipo celular particular o la proporción de una serie de tipos celulares particulares aumenta en comparación con una población de células no tratada (por ejemplo, células en su entorno nativo). En un ejemplo, una población enriquecida para las células STRO-1⁺ comprenden al menos aproximadamente 0,1 % o 0,5 % o 1 % o 2 % o 5 % o 10 % o 15 % o 20 % o 25 % o 30 % o 50 % o 75 % de células STRO-1⁺. En este sentido, el término “población de células enriquecidas para células STRO-1⁺” “se tomarán para proporcionar soporte explícito para el término” población de células que comprende X % de células STRO1⁺”, donde X % es un porcentaje tal como se menciona aquí.

10

Las células STRO-1⁺ pueden, en algunos ejemplos, formar colonias clonogénicas, por ejemplo, CFU-F (fibroblastos) o un subconjunto de las mismas (por ejemplo, 50 % o 60 % o 70 % o 70 % o 90 % o 95 %) pueden tener esta actividad.

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

La referencia a la selección de una célula o población de la misma no requiere la selección de una fuente de tejido específica. Como se describe en esta invención, las células STRO-1⁺ pueden seleccionarse o aislarse o enriquecerse de una gran variedad de fuentes. Dicho esto, en algunos ejemplos, estos términos proporcionan soporte para la selección de cualquier tejido que comprenda células STRO-1⁺ (por ejemplo, MPC) o tejido vascularizado o tejido que comprende pericitos (por ejemplo, pericitos STRO-1⁺) o cualquiera de los tejidos mencionados en esta invención.

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

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

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

Por ejemplo, las células STRO-1⁺ son STRO-1^{brillante} (*sin.* STRO-1^{bri}). En un ejemplo, las células Stro-1^{bri} se enriquecen preferentemente en relación con las células STRO-1^{débil} o STRO-1^{intermedio}.

En un ejemplo, las células STRO-1^{brillante} son adicionalmente uno o más (o todos) de TNAP⁺, VCAM-1⁺, THY-1⁺, STRO-2⁺, STRO-4⁺ (HSP-90β) y/o CD146⁺. Por ejemplo, las células se seleccionan para uno o más de los marcadores anteriores y/o se muestra que expresan uno o más de los marcadores anteriores. En este sentido, una célula que muestra expresión de un marcador no necesita ser específicamente analizada, más bien, se pueden analizar las células previamente enriquecidas o aisladas, y se puede asumir razonablemente que las células posteriormente utilizadas, aisladas o enriquecidas también expresan el mismo marcador.

En un ejemplo, las células precursoras mesenquimales son células precursoras mesenquimales perivasculares como se define en el documento 2004/85630.

Cuando se hace referencia a una célula como “positiva” para un marcador dado, puede ser que tenga una expresión baja (ba u opaca) o alta (brillante, bri) de ese marcador, dependiendo del grado en que el marcador esté presente sobre la superficie celular, donde los términos se relacionan con la intensidad de fluorescencia u otro marcador usado en el proceso de clasificación de las células. La distinción entre ba (u opaco u débil) y bri se entenderá en el contexto del marcador usado en una población de células particular que se está clasificando. Una célula a la que se hace referencia como “negativa” para un marcador dado no necesariamente implica que la misma esté completamente libre

del mismo. Este término significa que el marcador se expresa en un nivel relativamente bajo por esa célula y que genera una señal muy baja cuando se marca de manera detectable o es indetectable por encima de los niveles de fondo, por ejemplo, niveles detectados demandando un anticuerpo de control de isotipo.

5 El término “brillante”, cuando se usa en el presente documento, hace referencia a un marcador sobre una superficie celular que genera una señal relativamente alta cuando se marca de manera detectable. Sin restringirse a consideraciones teóricas, se propone que las células “brillantes” expresan más de la proteína marcadora diana (por ejemplo, el antígeno reconocido por STRO-1) que otras células en la muestra. Por ejemplo, las células STRO-1^{br} producen una mayor señal fluorescente, cuando se marcan con un anticuerpo STRO-1 conjugado con FITC, según lo
 10 determinado por el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), que las células no brillantes (STRO-1^{débil/paca}). En un ejemplo, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente el 0,1 % de las células marcadas con mayor brillo (por ejemplo, células mononucleares de médula ósea) contenidas en la muestra de partida. En otros ejemplos, las células “brillantes” constituyen al menos aproximadamente un 0,1 %, al menos aproximadamente un 0,5 %, al menos aproximadamente un 1 %, al menos
 15 aproximadamente un 1,5 % o al menos aproximadamente un 2 % de las células marcadas más fuertemente, por ejemplo, células mononucleares de médula ósea contenidas en la muestra de partida. En un ejemplo, las células STRO-1^{brillante} tienen una expresión de magnitud 2 log mayor de la expresión de superficie STRO-1 en relación con el “fondo”, es decir, las células que son STRO-1. En comparación, las células STRO-1^{pac} y/o STRO-1^{intermedio} tienen una expresión mayor de menos de magnitud 2 log de la expresión de superficie STRO-1, normalmente
 20 aproximadamente 1 log o menos que el “fondo”.

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

Además, en un ejemplo preferido, las células STRO-1⁺ son capaces de dar lugar a CFU-F clonogénico.

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

En otro ejemplo, las células STRO-1⁺ no son capaces de dar lugar, al cultivo, a células hematopoyéticas.

45 En un ejemplo, las células se toman del sujeto a tratar, se cultivan *in vitro* usando técnicas estándar y usadas para obtener factores sobrenadantes o solubles o células expandidas para la administración al sujeto como una composición autóloga o alogénica. En un ejemplo alternativo, se utilizan las células de una o más de las líneas celulares humanas establecidas. En otro ejemplo útil de la descripción, se usan células de un animal no humano (o, si
 50 el paciente no es un humano, de otra especie).

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

60 Las células de progenie se pueden obtener cultivando en cualquier medio adecuado. El término “medio”, como se usa en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del entorno que rodea a las células. Los medios pueden

ser sólidos, líquidos, gaseosos o una combinación de fases y materiales. Los medios incluyen medios de crecimiento líquido, así como también medios que no sostienen el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Los medios gaseosos a modo de ejemplo incluyen la fase gaseosa a la que se exponen las células que crecen en una placa de petri u otro soporte sólido o semisólido.

- 5 El término "medio" también hace referencia al material cuya utilización se pretende en un cultivo celular, incluso si aún no ha estado en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para el cultivo bacteriano es un medio. Una mezcla en polvo que, cuando se mezcla con agua u otro líquido, se vuelve adecuado para cultivo celular se puede denominar un "medio en polvo".
- 10 En un ejemplo, las células de progenie útiles para los métodos de la descripción se obtienen aislando TNAP⁺ células STRO-1⁺ de la médula ósea utilizando bolas magnéticas marcadas con el anticuerpo STRO-3, y luego cultivo expandiendo las células aisladas (véase Gronthos y col. Blood 85: 929-940, 1995 para obtener un ejemplo de las condiciones de cultivo adecuadas).
- 15 En un ejemplo, tales células expandidas (progenie) (por ejemplo, después de al menos 5 pases) pueden ser TNAP⁻, CC9⁺, HLA clase I⁺, HLA clase II⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD3⁻, CD11a^{c-}, CD31⁻, CD86⁻, CD34⁻ y/o CD80⁻. Sin embargo, es posible que, en condiciones de cultivo diferentes a las descritas en esta invención, la expresión de diferentes marcadores pueda variar. Además, aunque las células de estos fenotipos pueden predominar en la población celular expandida, no significa que haya una proporción menor de las células que no tienen este(os) fenotipo(s) (por ejemplo,
- 20 un pequeño porcentaje de las células expandidas puede ser CC9⁻). En un ejemplo, las células expandidas aún tienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células.

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

- 25 En otro ejemplo, una población celular expandida utilizada para obtener sobrenadante o factores solubles, o células *per se*, comprende células en las que al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 45 %, de las células son STRO-1⁺.

- 30 En otro ejemplo, las células expandidas pueden expresar uno o más marcadores seleccionados colectiva o individualmente del grupo que consiste en LFA-3, THY-1, VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, L-selectina, 3G5, CD49a/CD49b/CD29, CD49c/CD29, CD49d/CD29, CD 90, CD29, CD18, CD61, integrina beta 6-19, trombomodulina, CD10, CD13, SCF, PDGF-R, EGF-R, IGF1-R, NGF-R, FGF-R, Leptina-R (STRO-2 = Leptina-R), RANKL, STRO-4 (HSP-90β), STRO-1^{brillante} y CD 146 o cualquier combinación de estos marcadores.

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

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

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

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

tendón y músculo esquelético.

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

Los anticuerpos o ligandos pueden enlazarse con un soporte sólido para permitir una separación bruta. Por ejemplo, las técnicas de separación maximizan la retención de la viabilidad de la fracción a recoger. Pueden emplearse diversas técnicas de diferente eficacia para obtener separaciones relativamente brutas. La técnica particular empleada dependerá de la eficiencia de separación, la citotoxicidad asociada, la facilidad y velocidad de rendimiento y la necesidad de un equipo sofisticado y/o habilidades técnicas. Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero sin limitación, separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo, cromatografía de afinidad e "inmunopurificación" con anticuerpo enlazado con una matriz sólida. Las técnicas que proporcionan una separación precisa incluyen, entre otros, la FACS. Los procedimientos para llevar a cabo FACS serán evidentes para los expertos en la materia.

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

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

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

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

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

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

En un ejemplo, las células son células humanas.

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

Células genéticamente modificadas

En un ejemplo, las células STRO-1⁺ y/o células de su progenie están genéticamente modificadas, por ejemplo, para expresar y/o secretar una proteína de interés. Por ejemplo, las células están diseñadas para expresar una proteína útil en el tratamiento de una afección respiratoria, como una proteasa, una DNAsa o una proteína tensioactiva, por ejemplo, la proteína tensioactiva C.

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

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

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

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

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

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

Como alternativa, una construcción de expresión de la descripción es un vector viral. Los vectores virales adecuados son conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. Los sistemas convencionales basados en virales para el suministro de un ácido nucleico e integración del mismo en un genoma de células huésped incluyen, por ejemplo, un vector retroviral, un vector lentiviral o un vector viral adenoasociado. De manera alternativa, un vector adenoviral

se utiliza para la introducción de un ácido nucleico que permanece episomal hacia dentro de una célula huésped. Los vectores virales constituyen un procedimiento eficiente y versátil para la transferencia de genes en las células y tejidos diana. De manera adicional, se han observado las eficiencias de alta transducción en muchos tipos celulares y tejidos diana diferentes.

5

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

También se han desarrollado diversos sistemas de vectores de virus adeno-asociados (AAV, por sus siglas en inglés) para administración de ácido nucleico. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses número 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales número WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkowski y col., *Molec. Cell. Biol.* 5:3988-3996, 1988; Vincent y col., (1990) *Vaccines* 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter *Current Opinion in Biotechnology* 5:533-539, 1992; Muzyczka. *Current Topics in Microbiol, and Immunol.* 158:97-129, 1992; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801, 1994; Shelling and Smith *Gene Therapy* 7:165-169, 1994; y Zhou y col., *J Exp. Med.* 179:1867-1875, 1994.

25

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

30 **Análisis del potencial terapéutico/profiláctico de células y factores solubles**

Los métodos procedimientos de determinación de la capacidad de las células o los factores solubles para tratar o prevenir o retrasar el inicio o la progresión de una afección respiratoria serán evidentes para el experto en la materia.

35 Por ejemplo, las células o factores solubles (por ejemplo, una mezcla de factores o un factor único o una fracción de factores (por ejemplo, derivados por purificación por afinidad o cromatografía)) se administran a un modelo de afección respiratoria y se evalúa el efecto sobre uno o más síntomas.

Los modelos ejemplares de afecciones respiratorias incluyen un modelo animal de alergia, por ejemplo, asma alérgica, como un modelo descrito en el documento WO2002/098216, un modelo de ratón de asma alérgica, por ejemplo, inducida por la proteína del ácaro del polvo del huésped (Fattouh y col., *Am J Respir Crit Care Med* 172: 314-321, 2005), un modelo de ratón de asma grave en el que la IL-5 y la eotaxina se sobreexpresan, los ratones reciben instilación intratraqueal de poli-1-lisina que son hipersensibles a la metacolina cuando se administran en forma de aerosol (Homma y col., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L413-L418, 2005), bleomicina o FITC o modelos de 45 fibrosis pulmonar inducidos por sílice (Muggia y col., *Cancer Treat Rev* 10: 221-243, 1983; Roberts y col., *J Pathol* 176: 309-318, 1995; Oberdorster *Inhal Toxicol* 8: 73-89, 1996).

De lo anterior resultará evidente para el experto en la materia que la presente descripción también proporciona un procedimiento para identificar o aislar una célula o un factor soluble para el tratamiento, prevención o retraso de una 50 afección respiratoria, comprendiendo el procedimiento:

(i) administrar una célula o un factor soluble a un sujeto de prueba que padece una afección respiratoria y evaluar un síntoma de la afección respiratoria;

(ii) comparar el síntoma de los niveles de afección respiratoria del sujeto en (i) con el síntoma de la afección respiratoria de un sujeto control que padece la afección respiratoria a la que no se ha administrado el factor celular o soluble, 55

donde una mejora en el síntoma en el sujeto de prueba en comparación con el sujeto de control indica que la célula o el factor soluble trata la afección respiratoria.

60 La célula puede ser cualquier célula descrita en esta invención según cualquier ejemplo.

Se describen ejemplos de síntomas en esta invención.

Composiciones celulares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las células pueden administrarse como un componente de una composición farmacéutica específicamente formulada para administración intranasal. En ciertos ejemplos, las células se administran conjuntamente con un inhibidor enzimático o un potenciador de la absorción. En otros ejemplos, las composiciones farmacéuticas formuladas para administración intranasal comprenden inhibidores enzimáticos y/o potenciadores de la absorción. En otros ejemplos más, las composiciones farmacéuticas comprenden tensioactivos sintéticos, sales biliares, fosfolípidos y ciclodextrinas. Las células también pueden administrarse por vía intranasal a través de una emulsión o un liposoma. En ciertos ejemplos, la administración intranasal se logra mediante el uso de microesferas poliméricas. Las células pueden administrarse en presencia de glicocolato de sodio (NaGC) y ácido linoleico.

La composición farmacéutica para administración intranasal puede administrarse como una pulverización, aerosol, gel, solución, emulsión o suspensión. Alternativamente, la composición farmacéutica se administra directamente a las

vías respiratorias superiores, tales como, por ejemplo, los senos paranasales. En un ejemplo, las células o la composición farmacéutica se administran a través de un microcatéter.

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

10 En un ejemplo, la composición comprende una cantidad efectiva o una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de células. Dosificaciones ejemplares se describen en esta invención. La cantidad exacta de células a administrar depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso y el sexo del paciente, y el alcance y la gravedad de la afección respiratoria.

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

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

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

35 **Composiciones de factores solubles**

En un ejemplo, los sobrenadantes o factores solubles derivados de células STRO-1⁺ y/o derivados de células de progenie se administran en forma de una composición, por ejemplo, que comprende un vehículo y/o excipiente adecuado. En un ejemplo, el vehículo o excipiente no afecta negativamente el efecto biológico de los factores solubles o el sobrenadante.

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

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

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

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el sobrenadante o factores solubles a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación ejemplares son secado a vacío y liofilización, que procuran un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una disolución previamente esterilizada por filtración. Según un ejemplo alternativo de la descripción, el sobrenadante o factores solubles pueden formularse con uno o más compuestos adicionales que potencien su solubilidad.

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

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

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

Componentes adicionales de las composiciones

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

En un ejemplo, una composición como se describe en esta invención con cualquier ejemplo comprende un agente antiinflamatorio, un agente inmunomodulador, un agente inmunosupresor, un medicamento para el dolor o un antibiótico. En un ejemplo, el segundo agente terapéutico es un agente inmunomodulador. En otro ejemplo, el segundo agente es un anticuerpo anti-CD3 (por ejemplo, OKT3, muronomab), un anticuerpo anti-receptor de IL-2 (por ejemplo, basiliximab y daclizumab), un anticuerpo anti receptor de células T (por ejemplo, Muromonab-CD3), azatioprina, un

inhibidor de la calcineurina, un corticosteroide, ciclosporina, metotrexato, mercaptopurina, micofenolato de mofetilo, tacrolímús o sirolímús.

Alternativamente, o además, las células, los factores secretados y/o una composición como se describe en esta
5 invención según cualquier ejemplo se combinan con un tratamiento conocido de una afección respiratoria, por ejemplo, un esteroide o LABA.

En un ejemplo, una composición farmacéutica como se describe en esta invención según cualquier ejemplo
10 comprende un compuesto usado para tratar una afección respiratoria. Alternativamente, un método de tratamiento/profilaxis como se describe en esta invención según cualquier ejemplo de la descripción comprende adicionalmente administrar un compuesto usado para tratar afecciones respiratorias. Los compuestos ejemplares se describen en esta invención y se deben tomar para aplicar *mutatis mutandis* a estos ejemplos de la presente descripción.

15 En otro ejemplo, una composición como se describe en esta invención según cualquier ejemplo comprende adicionalmente un factor que induce o potencia la diferenciación de una célula progenitora en una célula vascular. Los factores ejemplares incluyen factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés; por ejemplo, PDGF-BB), y FGF.

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

Dispositivos médicos

La presente descripción también proporciona dispositivos médicos para uso o cuando se usan en un procedimiento
30 como se describe en esta invención según cualquier ejemplo. Por ejemplo, la presente descripción proporciona una jeringa o catéter u otro dispositivo de administración adecuado que comprende células STRO-1⁺ y/o células de su progenie y/o factores solubles de las mismas y/o una composición como se describe en esta invención según cualquier ejemplo. Opcionalmente, la jeringa o catéter o inhalador se empaqueta con instrucciones para su uso en un método como se describe en esta invención según cualquier ejemplo.

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

Modos de administración

45 El sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o progenie de las mismas pueden implantarse quirúrgicamente, inyectarse, inhalarse, administrarse (por ejemplo, mediante un catéter o jeringa), o administrarse de otro modo directa o indirectamente al sitio que necesita reparación o aumento, por ejemplo, en un pulmón.

50 En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o la progenie de las mismas se entregan al torrente sanguíneo de un sujeto. Por ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o su progenie se entregan parenteralmente. Entre las vías de administración parenteral ejemplares se incluyen, sin carácter restrictivo, las vías intraperitoneal, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, o intravenosa. En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de
55 células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o la progenie de las mismas se administran intraarterialmente, en una aorta, en una aurícula o ventrículo del corazón o en un vaso sanguíneo, por ejemplo, por vía intravenosa. En este sentido, se ha demostrado que las células STRO-1⁺ migran a sitios de lesión y/o a los pulmones.

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

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o la progenie de las mismas se administran por vía intravenosa.

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

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, células STRO-1⁺ o la progenie de las mismas se administran por vía intravenosa.

10

La elección de un régimen de administración para una formulación terapéutica depende de distintos factores, incluyendo la velocidad de recambio sérico o tisular de la entidad clínica, el nivel de los síntomas, y la inmunogenicidad de la entidad clínica. En un ejemplo, un régimen de administración maximiza la cantidad de células y/o factores entregados al sujeto según un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de células y/o factores administrados depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que se está tratando.

15

En un ejemplo, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, las células STRO-1⁺ o su progenie se administran en una dosis de bolo única. Como alternativa, el sobrenadante o factores solubles derivados de células STRO-1⁺, las células STRO-1⁺ o su progenie se administran mediante infusión continua, o mediante dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Un protocolo de dosis ejemplar es el que incluye la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos secundarios no deseados significativos. Una dosis semanal total depende del tipo y actividad del compuesto/célula que se está utilizando. La dosis apropiada es determinada por un médico clínico, por ejemplo, utilizando los parámetros o factores que se sabe o se supone según la técnica que afectan el tratamiento o que se predice afectan dicho tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y luego se incrementa en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo.

20

25

Los presentes inventores han demostrado los beneficios terapéuticos proporcionados por las células STRO-1⁺ y/o la progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas se observan durante al menos cuatro semanas en un sujeto. En consecuencia, en algunos ejemplos, las células se administran semanalmente, quincenalmente, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

30

Según ejemplos de la divulgación dirigida a tratar o retrasar la progresión de una afección respiratoria, las células STRO-1⁺ y/o las células de la progenie de las mismas y/o los factores solubles derivados de las mismas se administran después del diagnóstico del trastorno, por ejemplo, usando métodos estándar conocidos en la técnica y/o descritos en esta invención.

35

Para aquellos ejemplos dirigidos a prevenir o retrasar la aparición de afecciones respiratorias, las células STRO-1⁺ y/o células de la progenie de las mismas y/o factores solubles derivados de las mismas pueden administrarse antes del diagnóstico clínico del trastorno.

40

En un ejemplo, un método de tratamiento de la descripción comprende evaluar a un sujeto tratado para la mejora en uno o más parámetros de la función pulmonar después de la administración (por ejemplo, de 7 días a 30 días después), donde los parámetros de la función pulmonar son volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁); capacidad vital de volumen forzado (FVC); FEV₁/FVC; flujo espiratorio máximo (PEF, por sus siglas en inglés); flujo espiratorio forzado 25 %-50 % o 25 % 75 % (flujo promedio de aire que sale del pulmón durante la parte media de la espiración); tiempo de espiración forzada (FET, por sus siglas en inglés); capacidad pulmonar total (TLC, por sus siglas en inglés); capacidad de difusión, monóxido de carbono (DLCO); ventilación voluntaria máxima; una mejora detectable en una o más radiografías de tórax, tomografía computarizada, resonancia magnética, broncoscopia o una exploración similar (por ejemplo, mejora visible en la apariencia del pulmón); o una mejora detectable en el nivel de dióxido de carbono detectable en la sangre (por ejemplo, movimiento de niveles de CO₂ dentro de un intervalo normal). En un ejemplo, la administración da como resultado una mejora de uno o más de los parámetros de la función pulmonar (1) al 80 % o más de lo esperado; o (2) en al menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %. En un ejemplo, el método comprende identificar cualquiera de los parámetros que, antes de la administración, son inferiores al 80 % de los valores esperados para un individuo de la misma altura y peso, y evaluar dichos parámetros después del tratamiento, donde el tratamiento resulta en la mejora de uno o más de dichos parámetros de función pulmonar (1) a 80 % o más de lo esperado; o (2) en al menos 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 50 %.

45

50

55

La presente descripción incluye los siguientes ejemplos no limitantes.

60

Ejemplos

Ejemplo 1: Inmunoselección de MPC por selección de células STRO-3⁺

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

5 Se preparan BMMNC mediante separación por gradiente de densidad usando Lymphoprep™ (Nycomed Pharma, Oslo, Noruega) tal como se describió anteriormente (Zannettino, A.C. y col., (1998) Blood 92: 2613-2628). Después de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a 4 °C, se retira la capa leucocítica con una pipeta de transferencia y se lavan tres veces con "HHF" compuesto por solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies, 10 Gaithersburg, MD), que contiene suero fetal de ternero al 5 % (FCS, CSL Limited, Victoria, Australia).

Posteriormente, se aislaron células STRO-3⁺ (o TNAP⁺) por clasificación celular activada magnéticamente tal como se describió anteriormente (Gronthos y col., (2003) Journal of Cell Science 116: 1827-1835; Gronthos, S. y Simmons, P.J. (1995) Blood 85: 929-940). Brevemente, se incuban aproximadamente $1-3 \times 10^8$ BMMNC en tampón de bloqueo, 15 consistente en suero de conejo normal al 10 % (v/v) en HHF durante 20 minutos en hielo. Se incuban las células con 200 μ l de una solución 10 μ g/ml de AcM STRO-3 en tampón de bloqueo durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las células se lavan dos veces con HHF por centrifugación a 400 x g. Se añade una dilución de 1/50 de γ -biotina antimurina de cabra (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, RU) en tampón HHF y se incuban las células durante 1 hora sobre hielo. Se lavan las células dos veces con tampón de MACS (PBS exento de Ca²⁺ y Mn²⁺ suplementado 20 con BSA al 1 %, EDTA 5 mM y azida de sodio al 0,01 %) como se indicó anteriormente y se vuelven a colocar en suspensión en un volumen final de 0,9 ml de tampón de MACS.

Se añaden cien μ l de microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania) a la suspensión celular y se incuban en hielo durante 15 minutos. La suspensión celular se lava dos veces y se vuelve a colocar en 25 suspensión en 0,5 ml de tampón de MACS y, a continuación, se carga en una mini-columna de MACS (Columnas MS, Miltenyi Biotec), y se lava tres veces con 0,5 ml de tampón de MACS para recuperar las células que no se unieron al mAb STRO-3 (depositadas el 19 de diciembre de 2005 en la Recolección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) con número de acceso al depósito PTA-7282 - véase la publicación internacional n.º WO 2006/108229). Después de la adición de 1 ml adicional de tampón de MACS, se retira la columna del imán y se aíslan 30 las células TNAP⁺ por presión positiva. Puede teñirse una alícuota de células de cada fracción con estreptavidina-FITC y valorarse la pureza por citometría de flujo.

Ejemplo 2: Las células seleccionadas mediante mAb STRO-3 son células STRO-1^{brillante}

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

Dado que el de STRO-3 (IgG1) es un isotipo diferente al de STRO-1 (IgM), se valoró la capacidad de STRO-3 de 40 identificar CFU-F clonogénicas mediante análisis FACS de dos colores basado en su coexpresión con células STRO-1⁺ aisladas usando el procedimiento de MACS (Figura 1). El histograma de gráfico de puntos representa 5×10^4 eventos recogidos como datos en modo de lista. Se establecieron las líneas vertical y horizontal a niveles de reactividad de <1,0 % de fluorescencia media obtenidos con los anticuerpos de control de isotipo coincidente, 1B5 (IgG) y 1A6.12 (IgM) tratados en las mismas condiciones. Los resultados demuestran que una población menor de células STRO-1^{brillante} coexpresó TNAP (cuadrante superior derecho) mientras que las células STRO-1⁺ restantes no 45 reaccionaron con el mAb de STRO-3. Posteriormente, las células aisladas mediante FACS de los cuatro cuadrantes se analizaron para determinar la incidencia de CFU-F (Tabla 1).

Tabla 1: Enriquecimiento de células de médula ósea humana por análisis FACS de color doble basado en la coexpresión de los marcadores de superficie celular STRO-1 y TNAP (véase la Figura 1). Se cultivaron células 50 clasificadas por FACS en condiciones clonogénicas estándar en alfa-MEM suplementado con FCS al 20 %. Los datos representan el número medio de células formadoras de colonias (CFU-F) el día 14 por 10^5 células sembradas \pm EE (n= 3 aspirados de médula ósea diferentes). Estos datos sugieren que las MPC humanas están exclusivamente restringidas a la fracción positiva de TNAP de MO que coexpresa el antígeno de STRO-1 fuertemente.

Fracción de médula ósea	Frecuencia de CFU-F/ 10^5 células	Enriquecimiento (aumento en veces)
BMMNC no fraccionadas	11,0 \pm 2,2	1,0
TNAP ⁺ /STRO-1 ^{brillante}	4,511 \pm 185	410
TNAP ⁺ /STRO-1 ^{paca}	0,0	0,0

55

Ejemplo 3: Aplicación terapéutica de las MPC ovinas en un modelo ovino de asma ovina**3.1 Procedimientos**

- 5 Se seleccionó un modelo de asma alérgica del ácaro del polvo doméstico (HDM) para el asma alérgico para estudiar el efecto de las MPC en el asma porque utiliza un alérgeno que es clínicamente relevante para los humanos. Otros modelos de asma sufren de deficiencias. Por ejemplo, el modelo de desafío OVA de ratón usa un alérgeno que no es clínicamente relevante para los humanos, el patrón y la distribución de la inflamación pulmonar es diferente de los observados en los humanos, se observan inflamación/remodelación pulmonar y panquimatosa y no se observan grandes aumentos en el músculo liso de las vías respiratorias a diferencia del asma crónica en humanos. Del mismo modo, el modelo de asma en ovejas *Ascaris* no utiliza un antígeno clínicamente relevante y tiene una respuesta neutrofílica fuerte junto con una respuesta eosinófila comparativamente débil al alérgeno (*Ascaris suum*) normalmente no expuesto en humanos.
- 10
- 15 El asma se inició en ovejas mediante la administración de tres inyecciones subcutáneas de antígeno de ácaros del polvo doméstico (50 µg) con alumbre con dos semanas de diferencia. Luego se seleccionaron las ovejas que mostraban respuestas de IgE altas detectadas por ELISA, con un aumento de 1,5 veces en los niveles de IgE después de la administración de antígeno considerado como una "respuesta de IgE alta".
- 20 En los días 7, 28 y 49, las ovejas recibieron exposiciones a aerosol con el antígeno de ácaros del polvo doméstico (5 ml que contiene 200 µg/ml de antígeno) usando un nebulizador conectado a un ventilador mecánico. El ventilador mecánico ayuda a las ovejas a respirar durante 10 minutos a 20 respiraciones por minuto para que cada oveja reciba una dosis de 200 respiraciones de antígeno en aerosol por exposición. Se ha demostrado previamente que esta exposición es suficiente para inducir respuestas asmáticas e inflamatorias en ovejas.
- 25 En los días 7, 28 y 49, la hiperreactividad bronquial se cuantificó calculando la respuesta a la dosis a concentraciones crecientes del broncoconstrictor carbacol. El intervalo de dosis esperado para esta prueba es entre 5 y 300 respiraciones de 1 mg/ml de carbacol en aerosol para dar un aumento del 100 % en la resistencia.
- 30 También se midieron las respuestas asmáticas de fase temprana, con un intervalo esperado de respuestas entre 50 % y 900 % de cambio en la resistencia después de la administración de antígeno en comparación con los valores basales (administración previa al antígeno).

Las ovejas fueron aleatorizadas en cuatro grupos como se muestra en la Tabla 2, de modo que todos los grupos contienen ovejas con un intervalo similar de respuestas fisiológicas. Las MPC ovinas (pase 5) en ProFreeze™/DMSO/αMEM se diluyeron en solución salina y luego se administraron a los grupos relevantes el día 63 (dos semanas después de la administración de la tercera exposición a antígeno en aerosol). Un resumen del protocolo de tratamiento se muestra en la Figura 3.

40 **Tabla 2:** Grupos de tratamiento

Grupo	Cantidad de animales	Tratamiento	
		Tipo	Dosis
A	10	Alérgenos de ácaros del polvo doméstico y MPC	25 millones de MPC
B	11	Alérgenos de ácaros del polvo doméstico y MPC	75 millones de MPC
C	10	Alérgenos de ácaros del polvo doméstico y MPC	150 millones de MPC
D	11	Alérgenos de ácaros del polvo doméstico y solución salina (control)	N/A

Las MPC ovinas se administraron por infusión intravenosa (100 ml/30 minutos) en la vena yugular. Las ovejas fueron estimuladas nuevamente una y cuatro semanas (días 70 y 91, respectivamente) con alérgenos de ácaros del polvo doméstico.

La medición de la función pulmonar basal (respuesta asmática temprana [EAR]) se realizó evaluando las presiones esofágicas y traqueales y los flujos de aire pulmonar para calcular la resistencia de las vías respiratorias, como se describió anteriormente por Koumoundouros y col., Exp. Lung Res., 32: 321-330, 2006. En este protocolo, se insertó un catéter con globo por vía nasal en el esófago inferior para medir la presión esofágica (es decir, la presión externa).

5 Para medir la presión de las vías respiratorias internas, se colocó un catéter traqueal en un tubo endotraqueal insertado nasalmente. El flujo de aire se midió a través de un neumotacógrafo (Hans Rudolph, Kansas City, EE. UU.) conectado al extremo proximal del tubo endotraqueal. Los catéteres esofágicos y traqueales y el neumotacógrafo se conectaron a transductores diferenciales que permiten medir la presión transpulmonar junto con el flujo de aire. Los datos digitales de estas grabaciones se analizaron en un programa de software personalizado Labview Pty Ltd, para registrar la
10 resistencia de las vías respiratorias respiración por respiración. La broncoconstricción inducida por alérgenos se midió en ovejas mediante el análisis de los cambios de resistencia de las vías respiratorias en momentos específicos después de una exposición a aerosol con HDM. Los valores de resistencia se registraron durante una hora inmediatamente después de esta exposición, para evaluar la respuesta asmática de fase temprana (EAR), luego se volvieron a grabar 6 horas después de la exposición para evaluar las respuestas asmáticas de 6 horas. Los resultados
15 para EAR se expresan como el cambio porcentual en la resistencia de las vías respiratorias desde los valores de resistencia basales después de una exposición a solución salina en aerosol hasta los valores de resistencia pico durante la primera hora después de la exposición con HDM. Los datos de LAR se expresan como el cambio porcentual en la resistencia de las vías respiratorias desde los valores de resistencia basales hasta los valores de resistencia promedio medidos seis horas después del desafío con HDM.

20 La hiperreactividad bronquial (BHR), también llamada hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR), es una medida de la reactividad del cierre de las vías respiratorias en respuesta a un estimulante no específico. Las vías respiratorias asmáticas son notablemente nerviosas y reaccionan a dosis relativamente bajas de agentes broncoconstrictores, como los agonistas colinérgicos carbacol y metacolina. En ovejas, BHR se evaluó antes del inicio del periodo de exposición
25 a HDM, y luego después de varias semanas de exposiciones a HDM. Esto se logró administrando el broncoconstrictor carbacol en un intervalo de dosis de aerosol duplicadas (0,25 %-4 % p/v de carbacol) y midiendo los cambios en la resistencia de las vías respiratorias inmediatamente después de cada dosis de carbacol. Los resultados se expresaron como la concentración de aerosol de carbacol necesaria para aumentar la resistencia de las vías respiratorias en un 100 % desde el inicio o se ha alcanzado la dosis máxima de carbacol. La concentración de la dosis
30 administrada de carbacol se midió en unidades de respiración (BU, por sus siglas en inglés); una BU es un soplo de 1 % p/v de carbacol. Las ovejas que se han sensibilizado en los pulmones a HDM generalmente tienen broncoconstricción con dosis relativamente bajas de carbacol.

Se recogieron aproximadamente 20-30 ml de sangre en el día 7 (valor basal de entrada al estudio) y 24 horas después
35 de la prueba BHR (días 2, 51, 72, 93) y se realizaron los siguientes ensayos:

- Hematología y coagulación: recuento de glóbulos rojos (GR), recuento de glóbulos blancos (GB), hemoglobina (Hb), hematocrito, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, fibrinógeno.
- Bioquímica: sodio, potasio, cloruro, bicarbonato, glucosa, creatinina, calcio, magnesio, fosfato, proteínas totales,
40 albúmina, bilirrubina total, aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT).
- Prueba de citocinas: Citocinas (TNF- α e IFN- γ)

Las muestras de suero recogidas en el día 49, día 63 y día 91 se analizaron para determinar la presencia de IgE
45 mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas estándar (ELISA).

Se recogieron células de lavado broncoalveolar (BAL) infundiendo 10 ml de solución salina en el pulmón izquierdo usando un broncoscopio de fibra óptica y recuperando células y líquido BAL. Las células BAL se tiñeron diferencialmente con tinción de Haem Kwik (HD Scientific Pty Ltd.) para determinar los porcentajes de los diversos
50 leucocitos presentes. BAL se realizó el día 7 (inicio de estudio) y 24 h después de la prueba BHR (días 2, 51, 72, 93).

Los animales se sacrificaron usando una sobredosis de pentobarbitona sódica (al menos 200 mg/kg; es decir, 20 ml de una solución de 400 mg/ml por cada 40 kg de ovejas).

55 La necropsia y la recolección de tejidos se realizan en todos los animales que mueren o son sacrificados.

Se recogieron muestras de tejido en la necropsia (día 93) del campo pulmonar caudal izquierdo, y se congelaron en medio de inclusión OCT en moldes en bandejas de aluminio que flotaban sobre nitrógeno líquido para inmunohistoquímica. Se congelaron dos bloques de tejido por pulmón de oveja. Las secciones congeladas (5 μ m) se
60 tiñeron usando mAbs contra las moléculas de superficie celular de oveja CD4, CD8, CD45R, $\gamma\delta$ e IgE. Los eosinófilos se identificaron después de la tinción de tejido con peroxidasa endógena y se contratiñeron con hematoxilina y eosina-y. Las células individuales se examinaron y contaron en el parénquima, la lámina propia de las vías respiratorias y la

pared externa de las vías respiratorias para cada oveja, y se expresaron como el número de células por mm² de tejido examinado. Para los tipos de células de alta densidad, se contaron al menos cien células en las áreas respectivas, con un aumento de 200 veces, para determinar la densidad celular. Para los tipos de células de baja densidad, la densidad se calculó a partir de campos no superpuestos tomados de todas las áreas relevantes de la sección completa.

5 Todos los cálculos de identificación, conteo y densidad de células fueron realizados por observadores que estaban cegados a los grupos de tratamiento.

3.2 Resultados

10 **Respuesta asmática de fase temprana (EAR) en ovejas asmáticas sensibilizadas con HDM en el pretratamiento, 1 y 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina.**

Las ovejas que recibieron 150 millones de oMPC habían mejorado significativamente la función pulmonar durante la hora posterior a la exposición a alérgenos en el punto de tiempo de tratamiento de 4 semanas después de oMPC
15 (Figura 4A, B y C). La mejora en la función pulmonar a las 4 semanas después del punto de tiempo del tratamiento con oMPC se manifestó como una reducción del 57,1 % en la EAR después de la exposición al alérgeno en comparación con la EAR del tratamiento anterior a la oMPC ($p < 0,05$ (Figura 4A y C).

20 **Respuesta asmática de fase tardía (LAR) en ovejas asmáticas sensibilizadas con HDM en el pretratamiento, 1 y 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina**

El grupo de control de solución salina mostró una tendencia hacia el aumento de LAR a las seis horas después de la exposición con alérgenos cuando se evaluó en los puntos de tiempo de 1 semana y 4 semanas en comparación con los valores de pretratamiento (Figura 5A). El grupo de tratamiento de 25 millones de oMPC se asoció con una
25 disminución significativa en LAR de 6 horas en la semana 1 en comparación con los valores previos al tratamiento (Figura 5A). Los 75 y 150 millones de grupos de tratamiento con oMPC experimentaron una tendencia hacia una disminución en LAR de 6 horas en los puntos de tiempo posteriores al tratamiento de 1 y 4 semanas en comparación con los valores previos al tratamiento. En la Figura 5B se muestra un gráfico resumen que muestra los cambios comparativos entre los grupos de tratamiento en LAR de 6 horas. Al evaluar el cambio relativo en LAR por un cambio
30 porcentual desde el tratamiento previo al tratamiento de seguimiento, el cambio porcentual en LAR en el grupo de dosis de 25 millones de oMPC mejoró significativamente en comparación con el control en el punto de tiempo de 1 semana ($p < 0,05$, Figura 5B). Se mostraron tendencias similares para LAR de 6 horas en el punto de tiempo de tratamiento de 4 semanas después de oMPC (Figura 5C).

35 **Hiperreactividad bronquial (BHR) en ovejas asmáticas en pretratamiento, 1 y 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina**

El grupo de control que recibió tratamiento con vehículo de solución salina en lugar de oMPCs no experimentó cambios significativos en BHR en los puntos de tiempo de 1 semana y 4 semanas (Figura 6A, B, C y D). El grupo de ovejas
40 que recibió 75 millones de oMPC había mejorado significativamente los índices de BHR en los puntos de tiempo de 1 y 4 semanas después del tratamiento con oMPC en comparación con BHR medido antes del tratamiento con oMPC (Figura 6A). Las diferencias entre el pretratamiento y los puntos temporales de 1 y 4 semanas fueron estadísticamente significativas cuando todos los grupos de tratamiento se agruparon en un análisis post hoc (Figura 6D).

45 **Análisis de líquido de lavado broncoalveolar (BAL): perfil celular inflamatorio en líquido BAL en ovejas asmáticas en pretratamiento 1 y 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina**

Se tomaron muestras del lavado broncoalveolar (BAL) dos días después de la exposición con alérgenos a la semana
50 1 y 4 semanas después del tratamiento con oMPC o con control de solución salina. En todas las ovejas utilizadas en este ensayo, el porcentaje medio de referencia de eosinófilos de las células BAL totales muestreadas antes de la exposición con alérgenos y el tratamiento con células madre es del 4,5 %. El porcentaje medio de eosinófilos en el BAL de todas las ovejas muestreadas 2 días después de las exposiciones con alérgenos y antes de los tratamientos con células madre o solución salina (es decir, el porcentaje medio de pretratamiento de los eosinófilos BAL) es del
55 15,0 %. El análisis de los eosinófilos en el líquido BAL recuperado de las ovejas de prueba 2 días después de una exposición con alérgenos y después del tratamiento con oMPC reveló que había una diferencia significativa entre el pretratamiento y los puntos de tiempo de 1 semana para las ovejas infundidas con 25 millones de oMPC (Figura 7A y B). Para los grupos tratados con 75 millones y 150 millones de oMPC, las diferencias en los números de eosinófilos en el líquido BAL entre el pretratamiento y los puntos temporales de 1 y 4 semanas no alcanzaron significación
60 estadística. Sin embargo, las diferencias entre los eosinófilos BAL previos y posteriores al tratamiento en los puntos temporales de 1 y 4 semanas fueron estadísticamente significativas cuando los tres valores de tratamiento se agruparon en un análisis post hoc (Figura 7E).

- En todas las ovejas utilizadas en este ensayo, el porcentaje medio de neutrófilos del total de células BAL muestreadas dos días después de la exposición con alérgenos, y antes de los tratamientos con células madre o solución salina, es relativamente bajo, 0,89 %. Los porcentajes de neutrófilos en el líquido BAL fueron significativamente más bajos en el punto de tiempo de 1 semana después de oMPC, en comparación con los valores de pretratamiento, para las ovejas tratadas con 25 y 150 millones de oMPC (Figura 8A). Para el grupo de 75 millones de oMPC, los porcentajes de neutrófilos en el líquido BAL fueron significativamente más bajos en el punto temporal de 4 semanas después de oMPC, en comparación con los valores previos al tratamiento (Figura 8A).
- 10 El análisis de citospot de linfocitos y macrófagos en el líquido BAL recuperado de todas las ovejas de prueba 2 días después de una prueba de alérgenos reveló que no había diferencias significativas entre los grupos para ninguno de estos tipos de células en el líquido BAL (Figuras 9-10).

15 **IgE específica de HDM en sueros de ovejas asmáticas en el pretratamiento, 1 y 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina**

- Dado que el asma inducida por alérgenos se asocia con IgE específica de alérgenos, los niveles de IgE específica de HDM circulante en el suero de todas las ovejas se evaluaron antes de la administración de oMPC, y en dos momentos después, los tratamientos de oMPC en las semanas 1 y 4 (Figura 11A). Los resultados muestran que la dosis de 150 millones de oMPC fue efectiva para reducir significativamente la IgE específica de HDM 1 semana después del tratamiento con oMPC en comparación con los niveles de pretratamiento de IgE específica de HDM (Figura 11A). Los tratamientos con 25 y 75 millones de oMPC redujeron significativamente la IgE específica para HDM 4 semanas después del tratamiento con oMPC en comparación con los niveles de pretratamiento de IgE específica para HDM. Los niveles de IgE específica de HDM disminuyeron ligeramente en las ovejas de control tratadas con solución salina en los puntos de tiempo de 1 y 4 semanas en comparación con los valores de pretratamiento; sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 11A). En la Figura 11 B y C. se muestra una comparación entre las ovejas control y las ovejas infundidas con diferentes dosis de oMPC que evaluaron el cambio porcentual en los niveles de IgE en los sueros desde el pretratamiento hasta la tierra 4 semanas después del tratamiento.

30 **Análisis inmunohistológico del tejido pulmonar: perfil celular inflamatorio en los pulmones de ovejas asmáticas 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina**

- La inmunohistoquímica se realizó en tejidos pulmonares muestreados en la autopsia del lóbulo caudal izquierdo de la oveja de ensayo. Se usó un panel de marcadores de anticuerpos en la superficie celular en secciones de tejido para identificar CD4, CD8 y subconjuntos de células T positivas para $\gamma\delta$, células positivas para CD45R y células positivas para IgE (identifica los mastocitos). Los eosinófilos se identificaron como células de tinción con peroxidasa positiva. Las densidades relativas de estos tipos de células se evaluaron en tres ubicaciones pulmonares separadas que comprenden: el parénquima que incluía tejido no de las vías respiratorias, como espacios alveolares y paredes alveolares; la lámina propia de la pared de las vías respiratorias que restringió el análisis de densidad celular al área de la pared de las vías respiratorias entre el epitelio luminal y el límite interno del haz de músculo liso de la vía aérea; y toda la pared de las vías respiratorias que incluía recuentos de densidad entre el epitelio luminal de las vías respiratorias y la adventicia externa que bordea los alvéolos.

- Un análisis de eosinófilos positivos para peroxidasa en secciones de tejido pulmonar muestreadas de ovejas asmáticas indica que la densidad de eosinófilos en la pared de las vías respiratorias de las ovejas tratadas con 150 millones de oMPC fue significativamente menor en comparación con la densidad de eosinófilos en la pared de las vías respiratorias de las ovejas de control tratadas con solución salina ($p < 0,05$). En general, estos datos indican que el tratamiento con una dosis de 150 millones de oMPC administrado 4 semanas antes de la autopsia se asoció con una menor densidad de eosinófilos positivos para peroxidasa en las paredes de las vías respiratorias expuestas a alérgenos.

50 **Análisis histopatológico: infiltración de eosinófilos en los pulmones de ovejas asmáticas 4 semanas después de una infusión intravenosa única de oMPC o solución salina y 24 horas después de la nueva exposición a HDM**

- 55 Los tejidos pulmonares se tiñeron con el método histológico Luna que identifica a los eosinófilos al teñir los gránulos de eosinófilos de un color rojo distintivo, con el tejido de fondo teñido de azul.

- El análisis de los hallazgos de restos lumbales bronquiolares/eosinófilos y atelectasias con eosinófilos en los pulmones craneales y caudales no reveló diferencias significativas entre los animales de control y tratados. El análisis de los hallazgos en los lóbulos pulmonares craneales y caudales de las ovejas de control y tratadas reveló una tendencia hacia una disminución de los eosinófilos Luna positivos en animales del Grupo C (es decir, ovejas tratadas con 150 millones de oMPC). En el lóbulo craneal del pulmón izquierdo, la incidencia del número de ovejas que muestran

- eosinófilos positivos para Luna disminuyó de 5 en el grupo control a 3 ovejas en el grupo de 150 millones de oMPC. En el lóbulo craneal derecho, la incidencia del número de ovejas que muestran eosinófilos positivos para Luna disminuyó de 5 ovejas en el grupo control a 4 en el grupo tratado con 150 millones de oMPC. En el lóbulo caudal izquierdo del pulmón, la incidencia en el número de ovejas con eosinófilos Luna positivos disminuyó de 5 ovejas en el grupo control a 3 en el grupo tratado con 150 millones de oMPC. En el lóbulo caudal derecho del pulmón, la incidencia en el número de ovejas con eosinófilos positivos para Luna disminuyó de 4 en el grupo control a 2 en el grupo tratado con 150 millones de oMPC. No hubo diferencias en la incidencia de ovejas que muestran eosinófilos Luna positivos entre los grupos de dosis de 25 millones y 75 millones de oMPC y el grupo de control.
- 10 Se realizaron análisis post hoc para evaluar si la dosis de 150 millones de oMPC fue más efectiva en general para reducir la presencia de eosinófilos Luna positivos en comparación con las ovejas de control. Este análisis se realizó agregando el número de ovejas que muestran una notable tinción de eosinófilos positivos para Luna para cada uno de los cuatro lóbulos pulmonares examinados. Este análisis mostró que, si bien hubo un menor número de ovejas que mostraron patología de eosinófilos positivos para Luna en el grupo de 150 millones de oMPC en comparación con el grupo de control tratado con solución salina.

3.3 Discusión

- El presente estudio evaluó la seguridad y la eficacia de la terapia con oMPC en un modelo ovino de asma. Las ovejas con altos niveles de anticuerpos IgE específicos de HDM en sus sueros, en comparación con los niveles previos a la inmunización, recibieron tres desafíos de aerosol pulmonar completo con HDM durante un periodo de 6 semanas para sensibilizar sus vías respiratorias al HDM. Las ovejas se asignaron al azar en cuatro grupos y se les administró solución salina (control) o una de las tres dosis de tratamientos con oMPC (25, 75 o 150 millones de oMPC) mediante infusión intravenosa. Las ovejas fueron sometidas a HDM a los 7 y 28 días después de sus respectivos tratamientos con oMPC o solución salina. La función pulmonar y los análisis de células BAL se evaluaron poco después de la nueva exposición a HDM en los puntos de tiempo indicados previamente. La infusión intravenosa de oMPC a 25, 75 o 150 millones de oMPC fue bien tolerada y no tuvo eventos adversos asociados con la administración de estas células.

- En el estudio actual, la infusión intravenosa de una dosis única de oMPC se asocia con respuestas fisiológicas generalmente menos graves a las exposiciones a alérgenos en comparación con el control de ovejas. Por ejemplo, hubo una atenuación estadísticamente significativa de las respuestas de la función pulmonar EAR a las cuatro semanas después del tratamiento con 150 millones de oMPC. Curiosamente, la reducción significativa en la EAR se retrasó y se observó a las 4 semanas después del tratamiento con MPC en el grupo de tratamiento de 150 millones de oMPC. Sin estar sujeto a ninguna teoría o modo de acción, este efecto retardado se debe potencialmente a la larga semivida de la IgE específica para alérgenos de mastocitos unidos a membrana. Esto puede indicar que después de que la IgE específica de alérgeno finalmente se elimine de los mastocitos, las MPC pueden reducir la desgranulación de los mastocitos, lo que finalmente resulta en una reducción de la EAR a las 4 semanas después del tratamiento con oMPC.

- Los tres grupos de tratamiento con oMPC generalmente tienen índices de función pulmonar LAR atenuados a 1 semana después del tratamiento con oMPC en comparación con el control. Un análisis de los datos agrupados de las tres dosis diferentes de oMPC muestra que los tratamientos con oMPC mejoraron estadísticamente los índices de función pulmonar BHR en comparación con las ovejas infusionadas con solución salina de control en los puntos de tiempo de 1 semana y 4 semanas después del tratamiento. Por lo tanto, la mejora en los índices de función pulmonar BHR para las ovejas tratadas con oMPC pareció persistir durante 4 semanas después de la infusión de oMPC. Esto es consistente con la interpretación de los datos de EAR del grupo de dosis de 150 millones que indica que los efectos significativos del tratamiento de la infusión de oMPC son evidentes en el punto de tiempo de 4 semanas.

- Sin estar sujetos a ninguna teoría o modo de acción, los efectos de los oMPC en la mejora de la función pulmonar en ovejas con asma experimental pueden estar relacionados, al menos en parte, con la densidad algo menor de eosinófilos en la pared de las vías respiratorias en estos animales tratados con oMPC. Los análisis morfométricos cegados de las densidades tisulares de los eosinófilos en la pared de las vías respiratorias mostraron que el grupo tratado con 150 millones de oMPC tenía una densidad significativamente menor de eosinófilos tisulares en comparación con las ovejas de control tratadas con solución salina. Además, la dosis más alta de oMPC fue efectiva para reducir la densidad de eosinófilos de las vías respiratorias durante el periodo de estudio de 4 semanas, dado que todos los datos morfométricos para los análisis se obtuvieron en la autopsia cuatro semanas después de una dosis única de oMPCs.

- Los resultados muestran que los tratamientos con oMPC están asociados con niveles más bajos de neutrófilos en el líquido BAL. El porcentaje medio de neutrófilos en las células BAL totales dos días después de las exposiciones a alérgenos en todas las ovejas de prueba antes del tratamiento es del 0,89 %. A partir de este porcentaje relativamente bajo, los tratamientos de 25 y 150 millones de oMPC redujeron efectivamente el porcentaje de neutrófilos en el BAL

en más del 50 % en el punto de tiempo de 1 semana posterior a las oMPC. A las 4 semanas posteriores a la administración de oMPC, el tratamiento con 75 millones de oMPC redujo significativamente los neutrófilos en el BAL. La presencia de neutrófilos en el fluido BAL y las paredes de las vías respiratorias se ha asociado con la patología de ciertos fenotipos de asma.

5

Todas las ovejas utilizadas en el estudio se seleccionaron para el ensayo sobre la base de altos niveles de anticuerpos IgE específicos de HDM en sus sueros siete días después de la finalización de las inmunizaciones periféricas con HDM, y por lo tanto solo se utilizaron ovejas sensibilizadas en el estudio. Es de destacar que el resultado muestra que el tratamiento con oMPC atenúa los anticuerpos IgE específicos de alérgenos y que los efectos duran cuatro semanas

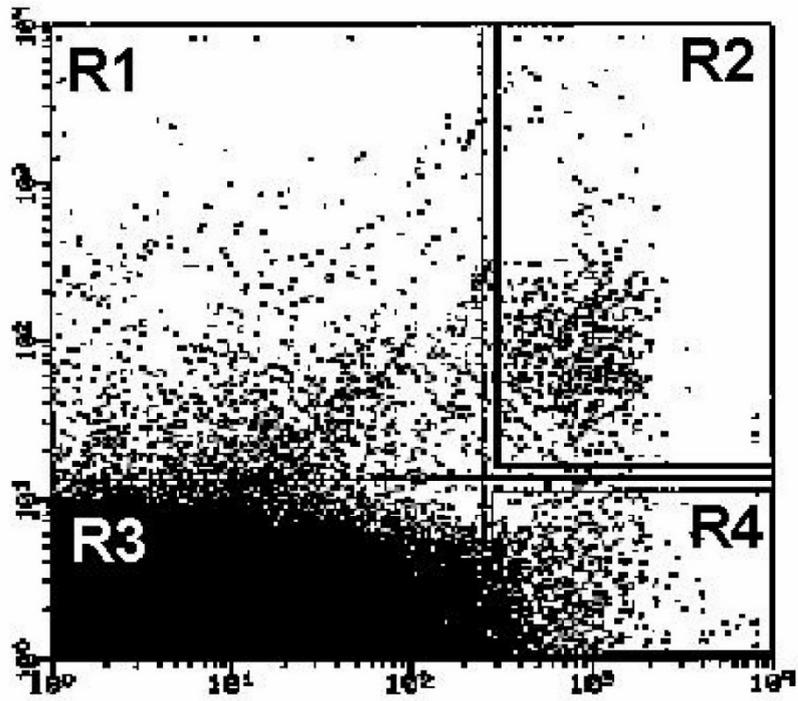
10

después de una infusión única de 25 o 75 millones de oMPC. En el grupo de 150 millones de oMPC, la amortiguación de IgE fue significativa 1 semana después de oMPC y se redujo en el punto de tiempo de muestreo de cuatro semanas. Las ovejas de control tratadas con solución salina no mostraron reducciones significativas en los niveles de IgE específica de HDM en suero en los puntos de tiempo de 1 o 4 semanas en comparación con los valores de pretratamiento.

REIVINDICACIONES

1. Células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para su uso en el tratamiento o prevención de una afección respiratoria que reduce la función pulmonar y/o para tratar una alergia mediada por IgE y/o para reducir una respuesta alérgica a un alérgeno y/o para inducir anergia a un alérgeno en un sujeto y/o para mejorar la función pulmonar en un sujeto que padece una alergia, donde las células STRO-1⁺ y/o la progenie de las mismas expresan fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP).
2. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 1, donde la afección respiratoria es una afección respiratoria aguda o una afección respiratoria crónica.
3. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la afección respiratoria es una afección respiratoria inflamatoria, una afección respiratoria obstructiva o una afección respiratoria restrictiva.
4. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 3, donde la afección o alergia respiratoria es una afección o alergia respiratoria obstructiva o una afección o alergia inflamatoria pulmonar.
5. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 1, donde la afección respiratoria es asma, tal como asma aguda, asma crónica, asma severa y/o asma refractaria, por ejemplo, el asma es un asma refractaria a los agonistas beta de acción prolongada (LABA) o asma refractaria a esteroides.
6. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 3, donde la afección respiratoria es una afección respiratoria restrictiva, por ejemplo, la afección respiratoria es fibrosis pulmonar idiopática.
7. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según la reivindicación 1, donde la alergia es al alérgeno de ácaros del polvo doméstico (HDM) o el alérgeno es HDM.
8. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde las células y/o progenie de las mismas deben administrarse sistémicamente, por ejemplo, intravenosamente o intranasalmente.
9. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde las células y/o la progenie de las mismas deben administrarse una pluralidad de veces, por ejemplo, una dosis adicional de las células y/o la progenie de las mismas se administrarán cuando ocurra uno o más de los siguientes:
 - (i) un sujeto comienza a jadear y/o tos persistentemente y/o tiene opresión en el pecho y/o tiene dificultad para respirar;
 - (ii) un sujeto muestra uno o más de los siguientes cuando es evaluado por espirómetro:
 - a) 20 % de diferencia en al menos tres días en una semana durante al menos dos semanas;
 - b) ≥ 20 % de mejora del flujo máximo después del tratamiento con:
 - 10 minutos de agonista β inhalado;
 - seis semanas de corticosteroides inhalados;
 - 14 días de 30 mg de prednisolona;
 - c) ≥ 20 % de disminución en el flujo máximo después de la exposición a un desencadenante;
 - (iii) broncoscopia que muestra células anormales y/o sustancias extrañas y/o bloqueos en el tracto respiratorio de un sujeto; o
 - (iv) tomografía computarizada del tórax que muestra anomalías de los vasos sanguíneos en los pulmones, acumulación de sangre o líquido en los pulmones, bronquiectasias, derrame pleural o neumonía.
10. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, formuladas para administrar entre 1×10^6 hasta 150×10^6 de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas.
11. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 formuladas para administrar una dosis para el cuerpo entero de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas, por ejemplo, una dosis de 150×10^6 de células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas en 10 ml al sujeto.
12. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde las células y/o progenie de las mismas son autogénicas o alogénicas.
13. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde las células y/o la progenie de las mismas se han expandido en cultivo antes de su uso.

14. Las células STRO-1⁺ y/o progenie de las mismas para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las células y/o progenie de las mismas son alogénicas.



STRO-1 FITC

FIGURA 1

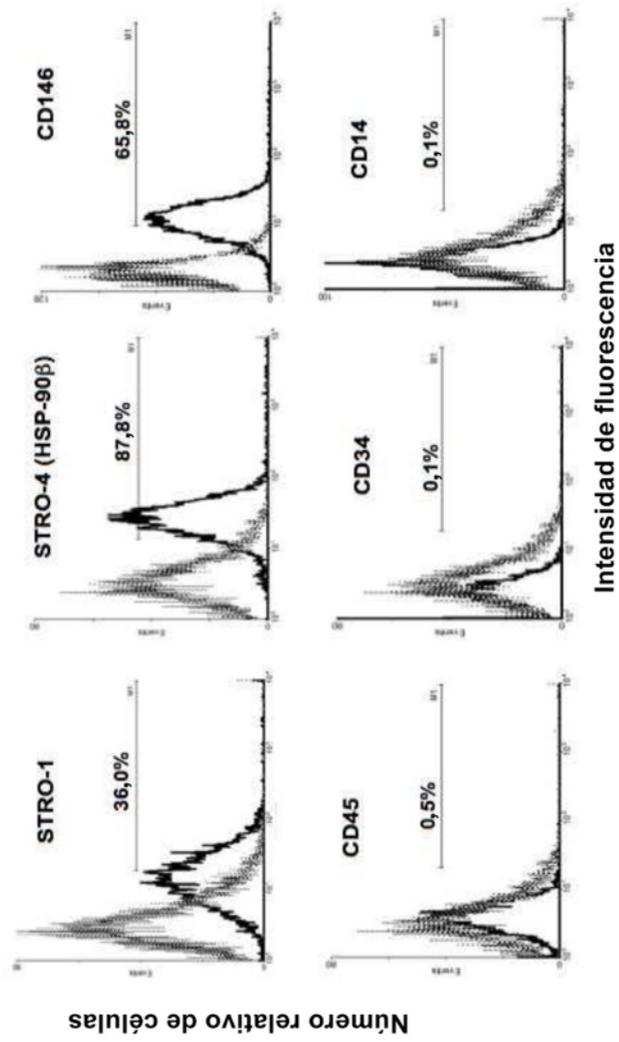


FIGURA 2

N.º de día	-7	0	1	2	7	28	49	50	51	63	70	71	72	91	92	93
Sensibilización y exposición a HDM	[Barra negra]															
Exposiciones a aerosol con HDM					↑	↑	↑				↑			↑		
Seguimiento	[Barra negra]															
Seguimiento clínico	[Barra gris]															
Medición del peso	↑									↑						↑
Patología clínica	[Barra negra]															
Sangre*	↑		↑						↑				↑			↑
BAL			↑						↑				↑			↑
Función pulmonar	[Barra negra]															
BHR		↑						↑				↑				↑
Función pulmonar (EAR y LAR)		↑					↑				↑			↑		
Tratamiento (MPCs o solución salina)	[Barra negra]															
Asignación de grupos									↑							
Inyección I.V. del artículo de prueba										↑						
Sacrificio	[Barra negra]															
Sacrificio																↑

*Sangre extraída para hematología, bioquímica, citocinas y ensayo de IgE.

Figura 3

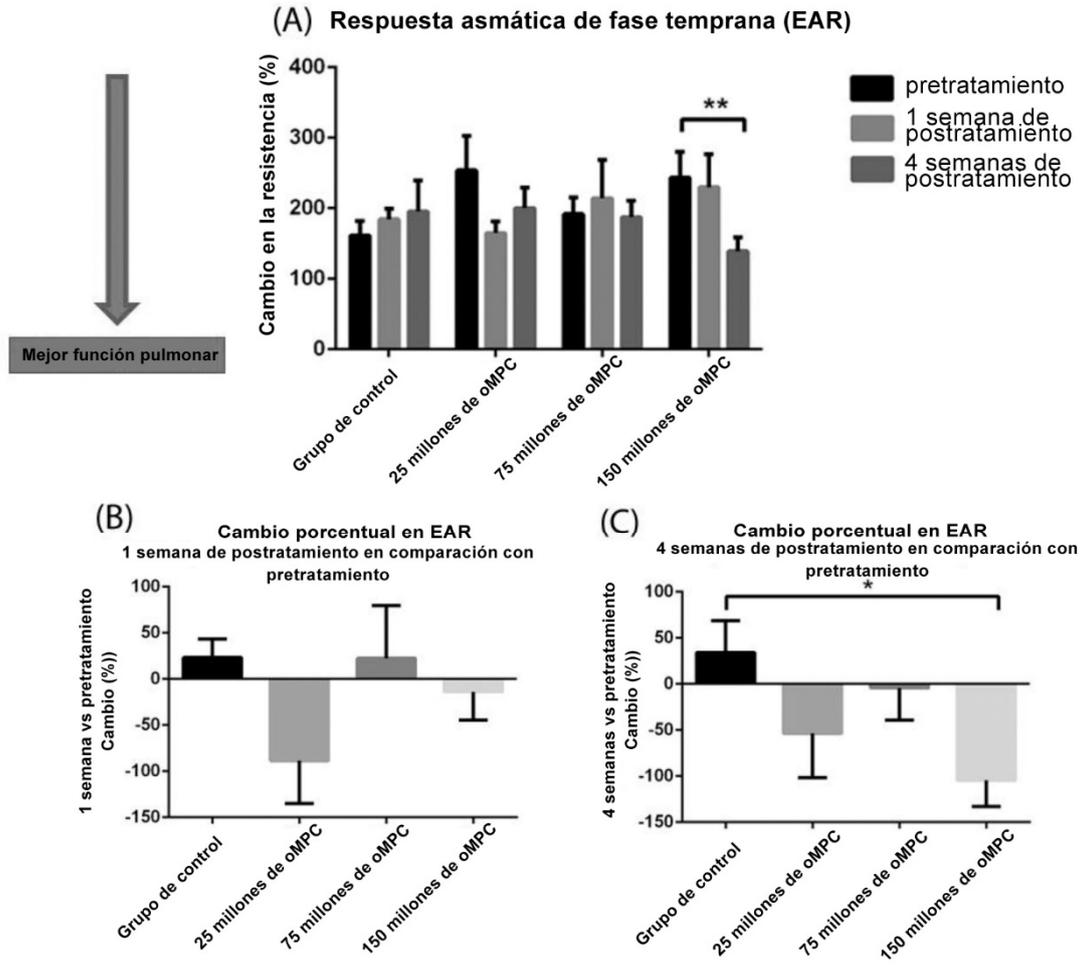


Figura 4

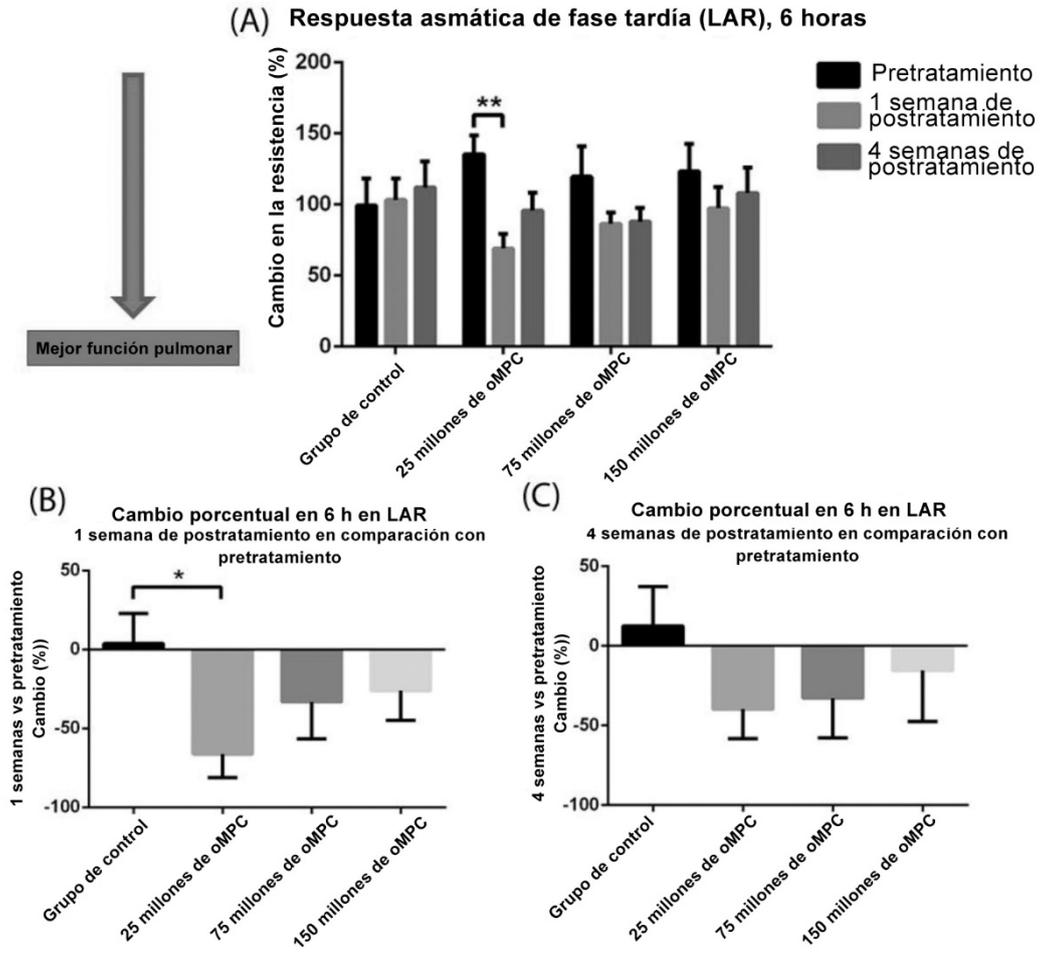


Figura 5

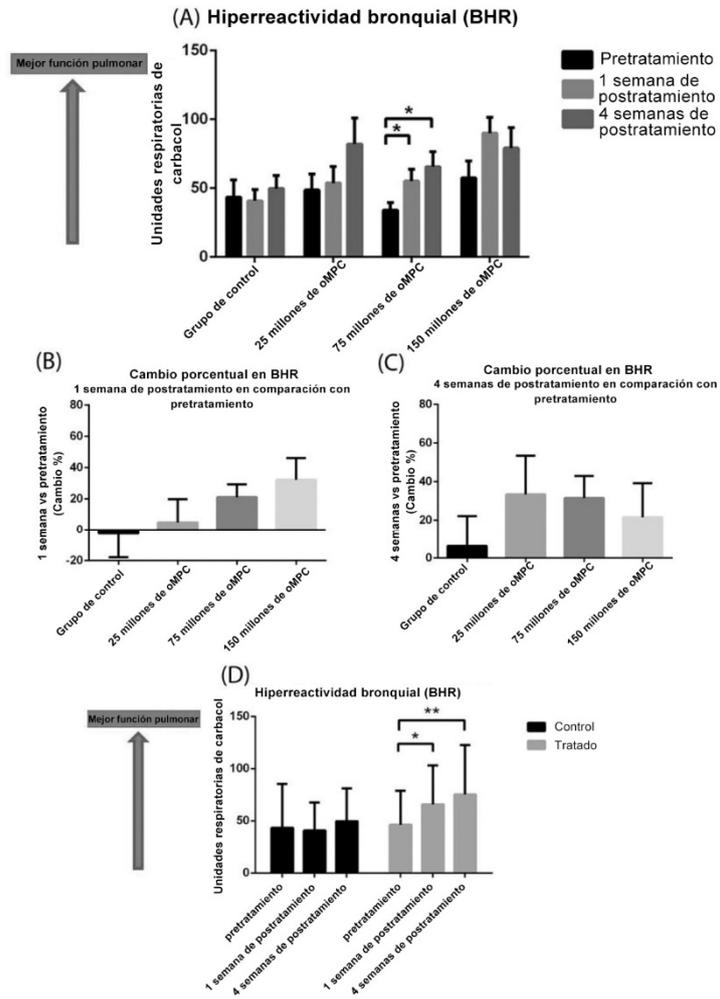


Figura 6

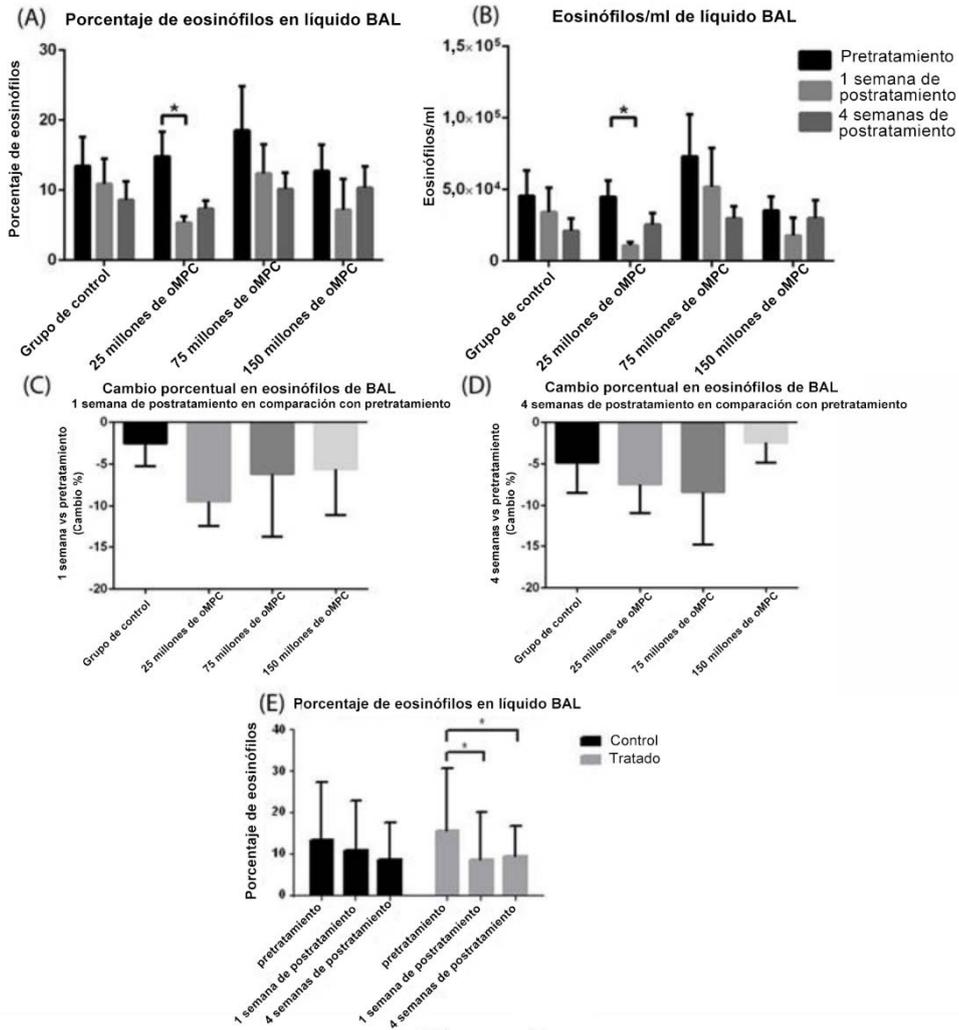


Figura 7

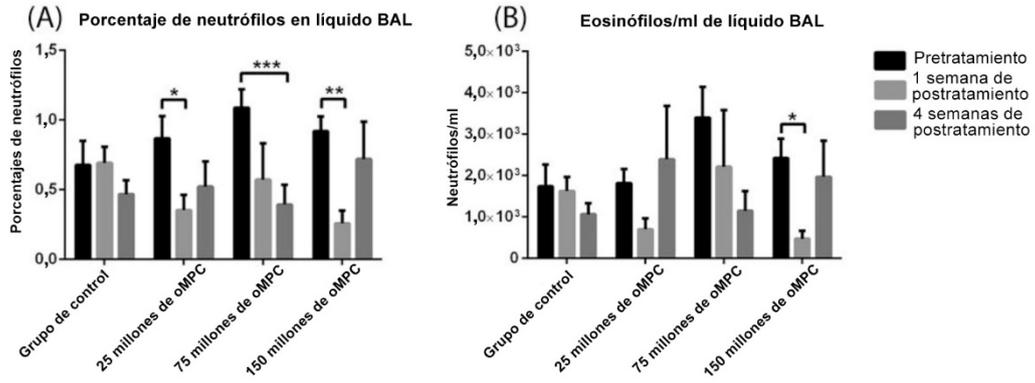


Figura 8

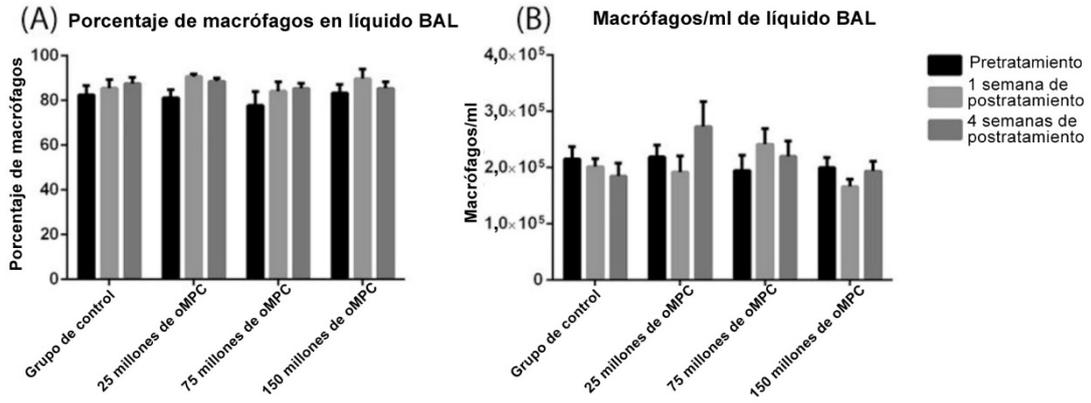


Figura 9

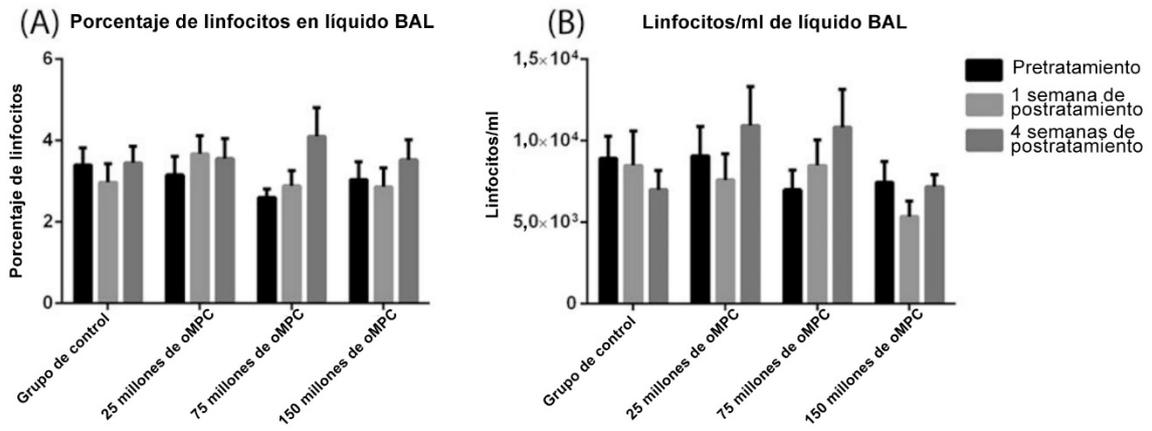


Figura 10

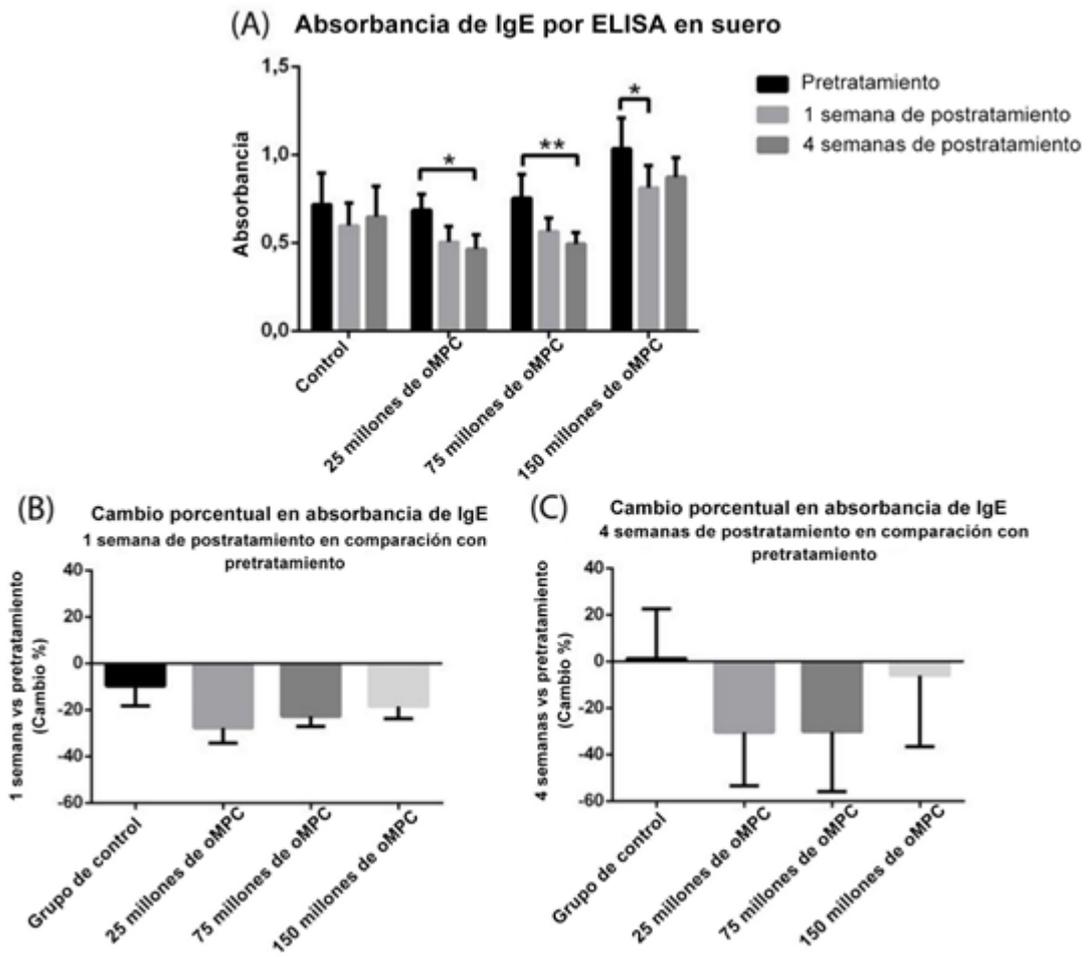


Figura 11